

haematologica

ISSN 1138-0381

Edición española. Órgano Oficial de la Asociación Española de Hematología
y Hemoterapia y de la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia,
editada por Acción Médica, S.A., Madrid

Volumen 93, Extraordinario n.º 1, Octubre 2008

www.aehh.org • www.seth.es

L Reunión Nacional de la AEHH XXIV Congreso Nacional de la SETH

Murcia, 23-25 de octubre de 2008

PROGRAMA EDUCACIONAL
CONFERENCIA INAUGURAL
XXI LECCIÓN CONMEMORATIVA ANTONIO RAICHS
VII LECCIÓN CONMEMORATIVA RICARDO CASTILLO
SIMPOSIOS
CASOS CLÍNICOS CITOLÓGICOS

L Reunión Nacional de la AEHH XXIV Congreso Nacional SETH

Murcia, 23-25 de octubre de 2008

PROGRAMA EDUCACIONAL

CONFERENCIA INAUGURAL

XXI LECCIÓN CONMEMORATIVA ANTONIO RAICHS

VII LECCIÓN CONMEMORATIVA RICARDO CASTILLO

SIMPOSIOS

CASOS CLÍNICO-CITOLÓGICOS

Editores: Eduardo Rocha
Javier Corral

Agradecimientos

A las siguientes compañías farmacéuticas, casas comerciales y asociaciones por su colaboración en el desarrollo de la Reunión y del Congreso:

AEAL, Alexion Europe, Amgen, Astra Zeneca, Baxter, Bayer Schering Farma, Binding Site, Boehringer Ingelheim, Bristol Myers Squibb, Celgene, Cephalon, CSL Behring, Esteve, Federación Española de Hemofilia, Fresenius, Gambro, Genzyme, Gilead, Grifols, Grupo MBA, Hospira España, Izasa, Janssen Cilag, Leo Pharma, Merck Sharp & Dohme, Miltenyi Biotec, Mundipharma, Novartis, Novo Nordisk, Octapharma, Pfizer, Progenika, Roche, Roche Diagnostics, Rovi, Sanofi-Aventis, Schering Plough, Shire Pharmaceuticals, Siemens, Sociedad Española de Transfusión Sanguínea, Uriach, Wyeth Farma

haematologica

Haematologica, Spanish Edition

Edición y Publicidad:

ACCIÓN MÉDICA, S.A.

c/ Fernández de la Hoz, 61, entreplanta. 28003 MADRID

Telf.: 91 536 08 14 - Fax: 91 536 06 07

publicaciones@accionmedica.com • www.accionmedica.com

jsanchez@accionmedica.com (publicidad)

Balcells, 21-25, bajos, local 1. 08024 BARCELONA

Telf.: 93 285 75 55 - Fax: 93 285 75 56

bordonez@accionmedica.com (publicidad)

Publicación mensual (más dos números extraordinarios).

Tarifa de suscripción anual:

Personas físicas 127,63 €

MIR/estudiantes Consultar

Empresas e instituciones 285,17 €

Precios válidos sólo para España

Suscripciones: ACCIÓN MÉDICA, S.A. c/ Fernández de la Hoz, 61, entreplanta. 28003 MADRID. Tfno.: 91 536 08 14
publicaciones@accionmedica.com

Protección de datos: ACCIÓN MÉDICA, S.A. declara cumplir lo dispuesto por la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal.

Haematologica: se distribuye únicamente entre los profesionales de la medicina

Control voluntario de difusión realizado por

Impresa en España por: Impresos Izquierdo

Depósito legal:

Haematologica no asume ninguna responsabilidad por las afirmaciones realizadas por los autores de los artículos ni por los mensajes contenidos en la publicidad que vehicula.

L Reunión Nacional de la AEHH XXIV Congreso Nacional SETH

Murcia, 23-25 de octubre de 2008

COMITÉ ORGANIZADOR

Presidente: Vicente Vicente García
Vicepresidente: José Rivera Pozo
Vocales: Carlos Alberola Gómez-Escolar
M.^a Luz Amigo Lozano
Ana Isabel Antón García
Felipe Arriba de la Fuente
M.^a José Candela García
Horacio Cano Gracia
Almudena Cascales Hernández
Cristina Castilla Llorente
José Ignacio Español Morales
Julio Esteban Medina
Francisca Ferrer Marín
Rocío González-Conejero Hilla
Inmaculada Heras Fernando
David Hernández Espinosa
Pastoria Iniesta López
M.^a Luisa Lozano Almela
Constantino Martínez Gómez
José M.^a Moraleda Jiménez
Alfonso Morales Lázaro
José Nieto Campuzano
M.^a del Mar Osma Córdoba
Sonsoles Palacios Muñoz
Elena Pérez Ceballos
Vanessa Roldán Schilling
M.^a José Romero Orcajada
José Javier Sánchez Blanco
Ignacio Sánchez Serrano
Beatriz Sánchez Vega

COMITÉ CIENTÍFICO

Presidente: Eduardo Rocha Hernando
Vicepresidente: Javier Corral de la Calle
Vocales: Beatriz Arrizabalaga Amuchástegui
Concepción Boqué Genovard
Carmen Burgaleta Alonso de Ozalla
Enric Carreras Pons
Mercedes Corral Alonso
M.^a Consuelo del Cañizo Fernández-Roldán
M.^a Isabel Díaz Ricart
Francisco España Furió
Ana Isabel Heiniger Mazo
Gemma Iruin Irulegui
Ángel León Lara
Manuel Monreal Bosh
Francisco Ortuño Giner
Carlos Panizo Santos
Isidro Prat Arrojo
Jesús Villarrubia Espinosa

ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE HEMATOLOGÍA Y HEMOTERAPIA

Presidente: Evarist Feliu Frasnado
Vicepresidenta 1.^a: María Fernanda López Fernández
Vicepresidenta 2.^a: Carmen Burgaleta Alonso de Ozalla
Secretario general: Enric Contreras Barbeta
Secretario adjunto: Ramon Salinas i Argente
Tesorero: Rafael Martínez Martínez
Contador: Rafael de la Cámara de Llanza
Vocales: Lourdes Florensa Brichs
Fernando A. González Fernández
Ángel León Lara
Joaquín Martínez López
Teresa Molero Labarta
José María Raya Sánchez
Alfonso José Santiago Marí
Marta Torrabadella Reynoso
Ex presidentes: Agustín Aznar Gerner
Ricardo Castillo Cofiño
Gonzalo Díaz de Iraola
Pedro Farreras Valentí
José M.^a Fernández Rañada
Jerónimo Forteza Bover
Manuel Giralt Raichs
Luis Hernández Nieto
Antonio López Borrasca
Juan Maldonado Eloy-García
Julio Outeriño Hernanz
Antonio Raichs Solé
Agustín Ríos González
Eduardo Rocha Hernando
Juan M. Rodríguez Fernández
Ciril Rozman Borstnar
Miquel Rutllant Banyeres
José Sánchez Fayos
Vicente Vicente García

SOCIEDAD ESPAÑOLA DE TROMBOSIS Y HEMOSTASIA

Presidente: Pascual Marco Vera
Vicepresidentes: Francisco España Furió
José Antonio Páramo Fernández
Secretario: Juan Carlos Reverter Calatayud
Tesorero: José Mateo Arranz
Vocales: M.^a Ángeles Dasí Carpio
M.^a Isabel Díaz Ricart
Pere Doménech Santasusana
Saturnino Haya Guaita
Inmaculada Soto Ortega
Juana Vallés Giner
Virtudes Vila Liante
Ex presidentes: Justo Aznar Lucea
Francisco J. Batlle Fonrodona
Antonio López Borrasca
Fernando Martínez Brotons
Miquel Rutllant Bañeres
Carlos Villaverde Grote

Sumario

Programa Educativo

Coordinadores: E. Montserrat. Barcelona
J. Batlle. A Coruña

Tratamiento de la leucemia mieloide crónica: ¿qué hacer ante un enfermo resistente a imatinib?
F. Cervantes 3

Trombosis y trombofilia en niños: ¿se puede extrapolar la experiencia en adultos?
M.ªÁ. Dasí Carpio 7

Principles of the World Health Organization to classification of hematological malignancies. 2008 Update
M.A. Piris 16

La trombocitopenia inducida por heparina. ¿Qué problemas prácticos plantea su diagnóstico y qué implicaciones tienen en el tratamiento?
M.ªF. López Fernández, J. Batlle 18

Factor XIII de la coagulación en la diátesis hemorrágica y en trombosis: ¿pensamos en él?
F.J. Rodríguez Martorell 23

PET en linfomas: a quién, cuándo y para qué
M.ª. Canales Albendea, J. Coya Viña 28

Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos: más allá de los donantes familiares. Criterios de selección
G. Sanz 34

Viejas y nuevas enfermedades de la sangre vinculadas a la inmigración: lo que hay que saber
J.M.ª Moraleda, E. Salido, B. Carrilero, M. Segovia, A. Sánchez Salinas, M. Blanquer 42

Leucemia mieloide aguda: ¿qué aportan los nuevos marcadores moleculares en la clasificación, el pronóstico y el tratamiento?
S. Brunet, J.F. Nomdedéu, A. Aventín, M. Hoyos, J. Sierra 52

Tratamiento de los síndromes mielodisplásicos: hacia un nuevo algoritmo terapéutico
M.ªC. del Cañizo, O. López Villar, I. de la Fuente Graciani 60

Conferencia Inaugural

Presentación: V. Vicente. Murcia

Breve historia de la Asociación Española de Hematología y Hemoterapia (AEHH) y algunas reflexiones para el futuro
C. Rozman 67

XXI Lección Conmemorativa Antonio Raichs

Coordinadores: E. Feliu. Barcelona
E. Rocha. Pamplona

Inmunofenotipaje de hemopatías malignas: de la investigación básica a la práctica asistencial
A. Orfao, L. Ramudo, A. López, R. Rivas, M. González, J. Flores, J. Almeida, E. Jensen, S. Barrena, J. Ciudad, C. Teodosio, W. Nieto, M. Pérez-Andrés, B. Vidriales, J. Pérez, M.C. López-Berges, M. González, M.L. Sánchez, A.I. Rasillo, P. Bárcena, M. Jara-Acevedo, B. Paiva, M.A. García-Marcos, J.F. San Miguel 79

VII Lección Conmemorativa Ricardo Castillo

Coordinadores: P. Marco. Alicante
J. Corral. Murcia

Fisiopatología del sistema hemostático en la mujer
A. Estellés, J. Gilabert-Estellés, E. Zorio, L.A. Ramón, R. Cosín, F. España 89

SIMPOSIOS

Avances en el manejo de los síndromes linfoproliferativos con expresión leucémica no LLC

Coordinador: E. González-Barca. Barcelona

Aspectos biológicos del linfoma esplénico de la zona marginal
M. Mollejo, P. Algara, E. Ruiz-Ballesteros, A. Arribas, M.ª. Piris 106

Linfoma de la zona marginal esplénica. Manejo clínico y tratamiento
C. Montalbán 109

T-cell prolymphocytic leukaemia. Clinical and biological features, treatment and outcome
E. Matutes 113

La leucemia aguda en el anciano: cómo y cuándo tratar

Coordinador: M. Barrios. Málaga

La leucemia mieloide aguda en el anciano: alternativas de tratamiento y novedades terapéuticas

C. Martín Calvo, J. Román Gómez, A. Torres Gómez

119

Leucemia aguda linfoblástica en pacientes de edad avanzada: realidad actual y expectativas de futuro

J.M. Ribera, A. Oriol, J.M. Sancho, M. Morgades, B. Xicoy, M. Batlle, C. Ferrá, A. Flores, S. Vives, J. Juncà, F. Millá, E. Feliu

123

The role of allogeneic stem cell transplantation in the management of acute leukaemia in the elderly patient

E. Olavarría

131

Monitorización y tratamiento de la sobrecarga de hierro

Coordinador: F.A. González Fernández. Madrid

Valoración de la sobrecarga férrica mediante resonancia magnética

J.M. Alústiza, J.I. Empanaza, A. Castiella, A. Casado, A. Garrido, P. Aldazábal, M. San Vicente, N. García, A.B. Asensio, M. Uranga; Grupo Burnia

137

Utilización de los quelantes de hierro en los síndromes mielodisplásicos

C. Benavente Cuesta, F.A. González Fernández

141

Tratamiento de la sobrecarga de hierro en las anemias hereditarias

S. de la Iglesia, A. Lemes, T. Molero

147

Nuevas moléculas y nuevos papeles para viejas moléculas del sistema hemostático

Coordinador: J.C. Reverter. Barcelona

Proteínas de acción dual en la hemostasia

J.M. Hermida, C. Puy, J. López-Sagaseta, R. Montes

153

Las selectinas como nuevos determinantes en la coagulación

M.D. Tàssies Penella

155

Nuevas acciones biológicas del sistema de la proteína C

P. Medina, S. Navarro, E. Zorio, A. Estellés, F. España

161

El eosinófilo (Grupo CECH)

Coordinador: L. Escribano. Toledo

Morfología óptica y ultraestructural del eosinófilo

M. Rozman

171

Características inmunofenotípicas y ontogenia del eosinófilo

C. Fernández Giménez, S. Quijano, J.A. Flores, W. Nieto, E. Jensen, A. López, A. Orfao

174

Hematologic disorders associated with eosinophilia: update on diagnostics, classification, and therapy

P. Valent

182

Diagnóstico integrado de la leucemia linfática crónica

Coordinador: N. Gutiérrez. Salamanca

Estudio inmunofenotípico en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con leucemia linfática crónica

G. Ghita, G. Gutiérrez, N. Villamor

192

Citogenética y tecnología de *microarrays* en el estudio de la leucemia linfática crónica

A. Rodríguez, J.Á. Hernández, J.L. García, R. Benito, M. Arefi, M. González, N.C. Gutiérrez, J.M. Hernández

198

Marcadores moleculares de la leucemia linfática crónica: significado pronóstico

D. González de Castro

203

Optimización del uso de concentrados de plaquetas y plasma

Coordinador: M.A. Correa. Jerez de la Frontera (Cádiz)

Uso racional de plaquetas en la práctica transfusional diaria

J. Cid Vidal

208

Refractariedad plaquetaria: actualización diagnóstica y estrategias terapéuticas

M.Á. Álvarez Rivas, G. Fornés Torres, V. Martín Palanco, A. Torres Gómez

211

Uso del plasma fresco congelado: indicaciones basadas en la evidencia

J. Anguita Velasco

216

Gestión en hematología

Coordinador: R. Salinas. Barcelona

Sanidad, el nuevo concepto de hospital y la red de centros. Nuevos retos sanitarios para una economía deficitaria

M. Peiró

224

Laboratorio general o laboratorio especializado. Experiencias reales y adaptación al entorno actual <i>G. Ramírez, I. Caparrós, A. Gallardo</i>	228	Síndromes mieloproliferativos poco frecuentes <i>Coordinador: J.C. Hernández Boluda. Valencia</i>	
¿Sigue siendo útil el modelo de Servicio de Hematología y Hemoterapia clásico e integral? Organización actual y futuro previsible <i>V. Vicente, F. de Arriba, M.L. Amigo, I. Heras</i>	232	Deregulated tyrosine kinases as therapeutic targets in <i>BCR-ABL</i> negative atypical chronic myeloproliferative disorders <i>N.C.P. Cross, A. Reiter</i>	290
Epidemiología y fisiopatología de la trombosis venosa <i>Coordinador: J. Fontcuberta. Barcelona</i>		Diagnóstico y tratamiento de las mastocitosis <i>L. Escribano, I. Álvarez-Twose, L. Sánchez-Muñoz, M.J. Acevedo, C. Teodosio, I. Sánchez-Matas, A. García-Montero, A. Orfao</i>	293
Plasma lipids, lipoproteins and venous thrombosis: HDL dyslipoproteinemia <i>H. Deguchi, J.A. Fernández, J.H. Griffin</i>	239	The hypereosinophilic syndromes <i>A. Reiter, N.C.P. Cross</i>	297
Genómica en patología trombótica <i>J.M. Soria</i>	245	Aspectos psicosociales de los pacientes afectados de hemopatías malignas (niños y adultos) y su entorno <i>Coordinador: A. Fernández Jurado. Huelva</i>	
Trombofilia y ETEV: análisis del registro RIETE <i>R. Lecumberri, V. Roldán, J.F. Sánchez Muñoz-Torrero, V. Vicente, B. Brenner, E. Rocha, M. Monreal; los investigadores del RIETE</i>	249	El niño ante la enfermedad oncohematológica <i>M. Hernández Núñez-Polo, R. Lorenzo González</i>	303
Diátesis hemorrágicas por trombocitopatías <i>Coordinador: A. Cid. Valencia</i>		El adulto con hemopatía maligna: aspectos psicoterapéuticos <i>J. Barbero Gutiérrez</i>	307
Trastornos de receptores de membrana plaquetaria <i>L. Navarro-Núñez, M.L. Lozano, A.I. Antón, V. Roldán, C. Martínez, V. Vicente, J. Rivera</i>	253	Sexualidad y fertilidad: un reto tras el cáncer <i>A. García Nieto</i>	311
Patología intraplaquetaria de base genética <i>N. Pujol-Moix</i>	263	Novedades en el diagnóstico y tratamiento de alteraciones hemostáticas <i>Coordinador: V. Roldán. Murcia</i>	
Trombocitopatías adquiridas <i>J.M. Cesar, I. Delgado, J.V. García, Á.G. Avello</i>	269	Pruebas diagnósticas del sistema hemostático: ¿traducen la realidad? <i>M.L. Lozano, J. Rivera, L. Navarro-Núñez, V. Vicente</i>	316
Terapia celular en trasplante <i>Coordinador: C. Regidor. Madrid</i>		Nuevos fármacos antiagregantes: ¿más potentes, más seguros y más eficaces? <i>D. Vivas, J.C. García-Rubira, A. Fernández-Ortiz</i>	320
Profilaxis y tratamiento de la enfermedad del injerto contra el huésped: células mesenquimales y células T reguladoras <i>C. Regidor, R. Gonzalo-Daganzo, G. Bautista, T. Martín-Donaire, R. Cabrera, M. Nicolás Fernández</i>	276	Anticoagulantes: ¿qué nos espera? <i>J. Mateo</i>	325
Donor natural killer cell allorecognition of missing self in mismatched hematopoietic transplantation: from experimental models to clinical transplants <i>L. Ruggeri, A. Mancusi, M. Capanni, E. Burchielli, E. Urbani, F. Aversa, M.F. Martelli, A. Velardi</i>	283	Disfunción endotelial e inflamación <i>Coordinador: G. Escolar. Barcelona</i>	
Adoptive immunotherapy after allo-SCT <i>H. Einsele</i> (MANUSCRITO NO RECIBIDO)	288	Endothelial progenitors and circulating endothelial cells regeneration versus degeneration <i>F. Dignat-George</i>	333
		Disfunción endotelial y metabolismo del corazón en la insuficiencia cardiaca <i>A. López-Farré</i>	333

Disfunción endotelial en el trasplante de progenitores hematopoyéticos <i>E. Carreras, M. Palomo, M. Díaz-Ricart</i>	336	Trombosis en anemias hemolíticas <i>F. Ferrer, M.ªJ. Moreno, V. Roldán, V. Vicente</i>	398
Nuevos avances en síndromes mielodisplásicos de “bajo riesgo” <i>Coordinador: J.R. González Porras. Salamanca</i>		Paradoja entre activación y fallo de la función plaquetaria en síndromes mieloproliferativos <i>E. Bermejo, M.F. Alberto, S.S. Meschengieser, A. Sánchez Luceros, M.A. Lazzari</i>	405
Patogénesis molecular de los síndromes mielodisplásicos de bajo riesgo <i>J. Cervera, A. Valencia, E. Such, P. Montesinos, F. Moscardó, E. Marco, M.L. Senent, P. Bolufer, E. Barragán, G.F. Sanz, M.A. Sanz</i>	344	Avances en hematimetría <i>Coordinadora: T. Molero. Las Palmas de Gran Canaria</i>	
Treatment of low risk myelodysplastic syndromes <i>L. Malcovati, M.G. Della Porta, M. Cazzola</i>	352	Aplicación diagnóstica de los nuevos parámetros de serie roja en los autoanalizadores hematológicos <i>J.M.ª Jou</i>	410
Experiencia nacional y manejo práctico de lenalidomida en SMD de bajo riesgo <i>J. Sánchez-García, A. Fdez.-Jurado, G. Sanz, P. Montesinos, B. Nomdedeu, J. Bueno, F. Ramos, R. Andreu, J. Serrano, A. Torres-Gómez</i>	354	Avances en automatización del recuento diferencial leucocitario <i>J.R. Furundarena</i>	415
Otras gammopatías monoclonales <i>Coordinador: J. García Laraña. Madrid</i>		Nuevos parámetros plaquetarios y análisis de la médula ósea <i>L. García Alonso</i>	426
Amiloidosis primaria: aspectos diagnósticos y tratamiento actual <i>J. Bladé, M.T. Cibeira, J. Esteve, M. Rovira</i>	360	La última hora terapéutica <i>Coordinadores: E. Rocha. Pamplona J. Corral. Murcia</i>	
Macroglobulinemia de Waldenström <i>R. García Sanz, E.M. Ocio, M.E. Sarasquete, A. Balanzategui, M. Alcoceba, M.C. Chillón, M. González, J.F. San Miguel</i>	366	Análogos de la trombopoyetina en púrpura trombocitopénica inmune <i>V. Vicente, V. Pérez-Andreu, J. Rivera, M.L. Lozano</i>	434
POEMS syndrome: diagnosis and treatment <i>A. Dispenzieri</i>	380	Inhibidores orales del FXa y FIIa en la ETEV <i>M. Monreal</i>	439
Nuevas tecnologías en transfusión <i>Coordinador: M. Algora. Madrid</i>		Hemoglobinuria paroxística nocturna <i>Á. Urbano Ispizua</i>	439
Visión crítica sobre la inactivación de los componentes sanguíneos <i>M. Lozano Molero</i>	386	AMD 3100, un nuevo agente movilizador de progenitores hematopoyéticos <i>A. Alegre</i>	443
Hepatitis B, the hidden virus uncovered <i>N. Lelie</i> (MANUSCRITO NO RECIBIDO)	390	Nuevos fármacos en Oncología: desarrollo del laboratorio a la clínica <i>P. Maiso, E.M. Ocio, M. Garayoa, M.V. Mateos, A. Pandiella, J.F. San Miguel</i>	450
¿Qué pueden aportar las técnicas de <i>microarrays</i> y citometría a la práctica transfusional? <i>F. García Sánchez</i>	390	CASOS CLÍNICO-CITOLÓGICOS <i>Coordinadores: E. Luño. Oviedo M.L. Pérez-Sirvent. Valencia</i>	
Alteraciones hemostáticas en hemopatías <i>Coordinador: L.J. García Frade. Valladolid</i>		Caso 1	
Leucemias agudas: complicaciones hemorrágicas y trombóticas <i>M.ªJ. Peñarrubia Ponce</i>	394	Mastocitosis sistémica agresiva asociada a SMD/SMPC y mieloma múltiple <i>L. Florensa, L. Arenillas, A. Ferrer, E. Pérez-Vila, C. Pedro, E. Gimeno, C. Teodósio, M. Jara, A. Rasillo, S. Woessner, A. Orfao</i>	457

Caso 2

Mujer de 48 años con esclerosis múltiple y leucemia aguda
M. Mas Esteve, J. Marco Buades, R. García Boyero, E. Donato Martín, E. Barragán, M.C. Mas Ochoa, A. Escolá Rivas, E. Herrera de Pablo, P. Martínez Pons, I. García Navarro, T. Gozalbo, M. Guinot, G. Cañigral Ferrando

461

Caso 3

Paciente con bicitopenia, hepatoesplenomegalia y componente IgM
V. Pérez Andréu, M.L. Lozano, M.M. Osmá, A. Jerez, J.J. Sánchez Blanco, J. Sola, P. Giraldo, F.J. Ortuño, V. Vicente

463

Caso 4

Tricoleucemia variante con inmunofenotipo atípico
L. García-Alonso, F.I. Camacho, J.A. García Vela, M.A. Piris

465

Caso 5

Pancitopenia y fibrosis medular
A. Lemes, T. Molero, N. Navarro, S. de la Iglesia, J. López, J.C. Rivero, C. Rodríguez, C. Campo

468

Caso 6

Leucemia aguda mieloblástica y leucemia aguda linfoblástica T sincrónicas
J. Martín Sánchez, M. Alcoceba Sánchez, E. Colado Varela, J. Olazábal Herrero, M. Díez Campelo, N.C. Gutiérrez Gutiérrez, J.M. Hernández Rivas, M.D. Caballero Barrigón, J.F. San Miguel Izquierdo, M. González Díaz, M.A. García Marcos

471

PROGRAMA EDUCACIONAL

COORDINADORES: E. MONTSERRAT. *Barcelona*
J. BATLLE. *A Coruña*

Tratamiento de la leucemia mieloide crónica: ¿qué hacer ante un enfermo resistente a imatinib?

F. CERVANTES

Servicio de Hematología. Hospital Clínic. Universidad de Barcelona

Introducción

En la década de los ochenta se produjeron notables avances en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la patogenia de la leucemia mieloide crónica (LMC), que culminaron con la demostración del papel de la proteína tirosina quinasa BCR-ABL en la proliferación neoplásica¹. Estos avances constituyeron la base para los importantes progresos que se han producido en el tratamiento de la enfermedad, fundamentalmente la introducción del inhibidor de la proteína BCR-ABL imatinib mesilato (imatinib), paradigma del tratamiento diseñado a partir del conocimiento de la biología molecular de una neoplasia^{2,3}. Imatinib ha supuesto una auténtica revolución en el tratamiento de la LMC. Sin embargo, a pesar de su eficacia en la mayoría de los pacientes, una proporción de éstos no responde adecuadamente al fármaco, ya sea de manera primaria o tras haber conseguido una respuesta inicial. Además, algunos se ven obligados a abandonar el tratamiento por mala tolerancia al mismo. Por último, la terapéutica de las fases avanzadas de la LMC (fase de aceleración [FA] y crisis blástica [CB]) sigue siendo insatisfactoria. Todo ello ha hecho surgir la necesidad de disponer de tratamientos alternativos a imatinib.

La presente ponencia tiene por objeto realizar una puesta al día del tratamiento de los pacientes con LMC resistentes o intolerantes a imatinib, haciendo especial énfasis en los resultados proporcionados por los inhibidores de la tirosina quinasa de segunda generación y su papel como alternativa a imatinib. De forma resumida se discuten asimismo las indicaciones actuales del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos en esta enfermedad.

Imatinib: estado actual

En 1998 se inició un estudio en fase I de tratamiento con imatinib en pacientes con LMC en fase crónica (FC) resistentes a interferón (IFN) o en las fases avanzadas de la enfermedad³, que demostró la eficacia del fármaco, confirmada posteriormente en el estudio en fase II. En 2003, los resultados preliminares de un ensayo multicéntrico en fase III –el estudio *IRIS*– mostraron de manera concluyente la superioridad

de imatinib frente a IFN + Ara-C, tanto por su mayor eficacia como por su mejor tolerancia. En ese estudio, los pacientes tratados con imatinib en primera línea presentaron una tasa inusualmente baja de progresión a FA y CB⁴. Estos resultados permitieron establecer a imatinib como el tratamiento de elección para los pacientes con LMC en FC de nuevo diagnóstico. Las actualizaciones periódicas del estudio *IRIS* han confirmado la durabilidad de la eficacia de imatinib. Así, tras un seguimiento de 5 años, la supervivencia libre de evolución a FA y CB era del 93%⁵. Por tanto, en ese periodo, un 17% de los pacientes presentó resistencia primaria o secundaria a imatinib. Por otra parte, un 5% de los enfermos abandonaron el tratamiento debido a sus efectos secundarios. Ello significa que, aproximadamente, 1 de cada 4 pacientes con LMC en FC requiere un tratamiento alternativo a imatinib a corto o medio plazo.

En 2006 un grupo de expertos internacionales, bajo el patrocinio de la European LeukemiaNet, estableció los criterios de respuesta óptima, subóptima y fracaso a imatinib en los pacientes con LMC en FC de nuevo diagnóstico tratados con la dosis estándar del fármaco (400 mg/día)⁶. La Tabla 1 recoge los criterios de fracaso a imatinib según las recomendaciones del citado grupo. Dichos criterios están siendo objeto de actualización para recoger la nueva información disponible acerca de los resultados a largo plazo del tratamiento con imatinib así como sobre ciertos factores, tales como los niveles plasmáticos del fármaco, entre otros, que pueden influir en la consecución de una respuesta favorable. Por otra parte, en los últimos años se ha profundizado en el conocimiento de los mecanismos de resistencia a imatinib, destacando al respecto el papel preponderante de las mutaciones del gen *BCR/ABL*⁷.

Nuevos inhibidores de la tirosina quinasa

El éxito de imatinib ha estimulado la búsqueda de nuevos inhibidores de la tirosina quinasa con una mayor potencia y en algunos casos con un efecto inhibitorio no sólo de la proteína BCR/ABL, sino también de otras quinasas con un posible papel en la facilitación de la proliferación propia de la LMC. En este sentido, existe en la actualidad una auténtica pléyade de nuevos inhibidores de la tirosina quinasa para la

Tabla 1. Criterios de fracaso a imatinib^a en los pacientes con leucemia mieloide crónica en fase crónica de nuevo diagnóstico según las recomendaciones de la European LeukemiaNet

Tiempo	Tipo de respuesta
3 meses	No respuesta hematológica
6 meses	No RHC
	No respuesta citogenética (Ph+ > 95%)
12 meses	Respuesta citogenética < parcial
18 meses	No RCC
Cualquier momento	Pérdida RHC
	Pérdida RCC
	Mutación ^b

RCC: respuesta citogenética completa; RHC: respuesta hematológica completa.

^a 400 mg/día; ^b con alto nivel de insensibilidad a imatinib.

LMC, si bien la mayoría aún se encuentra en la fase preclínica de su desarrollo. La Tabla 2 recoge un listado de los principales fármacos de este tipo, así como su mecanismo de acción fundamental.

Dasatinib

Dasatinib es un inhibidor de BCR/ABL que inhibe asimismo las quinasas Src, que podrían intervenir en la activación de BCR/ABL. Este fármaco se une a las formas activa e inactiva de BCR/ABL y es 300 veces más potente que imatinib *in vitro*, donde se muestra activo frente a la mayoría de mutaciones de BCR/ABL, a excepción de la T315I. Tras constatarse en el estudio en fase I su eficacia en pacientes con LMC resistentes a imatinib⁸, los estudios posteriores han confirmado su eficacia en las diferentes fases de la enfermedad, especialmente en la FC⁹⁻¹¹.

En el estudio en fase II, en 186 pacientes con LMC en FC resistentes o intolerantes a imatinib, a los 8 meses de seguimiento dasatinib consiguió tasas de respuesta hematológica, respuesta citogenética mayor (RCM) y respuesta citogenética completa (RCC) del 90%, 52% y 41%, respectivamente⁹. En la actualización de dicho estudio, ampliada a 387 pacientes seguidos durante una mediana de 24 meses, estos porcentajes se elevaban al 91%, 62% y 53%. Las respuestas se han mantenido en la mayoría de los pacientes, lo que se ha traducido en una elevada tasa de supervivencia (Tabla 3). Dasatinib fue eficaz independientemente de la existencia de mutaciones, con la notable excepción de la T315I. Sus efectos secundarios más destacados fueron la plaquetopenia y la granulocitopenia, mientras que el derrame pleural constituyó su principal toxicidad extrahematológica. Un estudio de optimización de dosis del fármaco demostró que la dosis de 100 mg, administrada una vez al día, presenta la misma eficacia que la dosis más elevada repartida en

Tabla 2. Nuevos fármacos para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica

Fármaco	Diana terapéutica	Fase de desarrollo
Dasatinib	Abl, Src, PDGF, c-kit	III
Nilotinib	Abl, PDGF, c-kit	III
Bosutinib	Abl, Src (Lyn)	II
MK-0457	Aurora quinasas	II
LBH589	Sustrato	II
INNO-406	Abl, Src (Lyn)	I
PD166326	Abl, Src, PDGF	Preclínica
PD180970	Abl, Src	Preclínica
AZD0530	Abl, Src	Preclínica
CGP76030	Src	Preclínica
AP23464	Abl, Src	Preclínica
ON012380	Sustrato	Preclínica
PHA739358	Abl, Aurora quinasas	Preclínica
XL228	Abl, Aurora quinasas	Preclínica
ON01910	Abl, Src, Fyn, quinasas polo-like	Preclínica

dos tomas, con una frecuencia menor de plaquetopenia y derrames pleurales¹⁰. Los resultados preliminares de un estudio más reciente, en el que se comparaba dasatinib frente a imatinib a dosis altas en pacientes con LMC en FC resistentes a dosis de imatinib \leq 600 mg/día, indican una ventaja para dasatinib, ya que las tasas de respuesta fueron más altas (especialmente en los enfermos que habían sido tratados con una dosis de imatinib \leq 400 mg/día), lo que se tradujo en una mayor supervivencia libre de progresión¹¹.

En 107 pacientes con LMC en FA resistentes o intolerantes a imatinib, tras 8 meses de seguimiento dasatinib obtuvo un 64% de respuestas hematológicas mayores (RHM) (incluyendo un 39% de respuestas completas), un 33% de RCM y un 24% de RCC¹². En la actualización de este estudio, ampliada a 174 pacientes, las tasas de RHM, RCM y RCC a los 24 meses fueron del 64%, 40% y 33%, respectivamente, la supervivencia libre de progresión, del 46%, y la supervivencia global, del 72%. En los pacientes en CB resistente a imatinib, a los 8 meses las tasas de RHM y RCM fueron del 34% y 31% para los casos de fenotipo mieloide, y del 31% y 50% para los linfoides¹³. Estas respuestas se obtuvieron de forma rápida, si bien en la mayoría de los casos se perdieron a los pocos meses.

Nilotinib

Nilotinib es un inhibidor de BCR/ABL que comparte parte de su estructura química con imatinib y presenta una mayor afinidad por el bolsillo de unión al

Tabla 3. Resultados del tratamiento con dasatinib y nilotinib en pacientes con leucemia mieloide crónica en fase crónica resistentes o con intolerancia a imatinib

	Dasatinib (n = 387) ^a	Nilotinib (n = 321) ^b
RHC	91%	77% ^c
Respuesta citogenética:		
Mayor	62%	57%
Completa	53%	41%
Supervivencia libre de progresión	80%	64%
Supervivencia global	94%	91%

RHC: respuesta hematológica completa.

^a Seguimiento mediano: 24 meses.

^b Seguimiento mediano: 18 meses.

^c Sólo se consideraron los pacientes sin RHC al inicio del tratamiento.

ATP. Nilotinib se une exclusivamente a la forma inactiva de BCR/ABL y es 30 veces más potente que imatinib *in vitro*, donde es activo frente a la mayoría de las mutaciones de BCR/ABL, excepto la T315I, siendo su grado de inhibición de c-kit y PDGFR parecido al de imatinib. En el estudio en fase I, nilotinib se mostró eficaz en pacientes con LMC resistentes a imatinib, sobre todo en la FC de la enfermedad¹⁴.

En el estudio en fase II, realizado en 280 pacientes con LMC en FC resistentes o intolerantes a imatinib, tras un mínimo de 6 meses de tratamiento las tasas de RCM y RCC a nilotinib fueron del 48% y 31%, respectivamente¹⁵. En la actualización de dicho estudio, que incluía 321 pacientes seguidos durante una mediana de 18 meses, estos porcentajes aumentaron al 57% y 41%. Las respuestas se han mantenido en el 84% de los enfermos, lo que se ha traducido en una tasa de supervivencia superior al 90% (Tabla 3). Nilotinib fue eficaz independientemente de la existencia de mutaciones, a excepción de la T315I, y en general bien tolerado, con tasas de plaquetopenia y granulocitopenia severas inferiores a las registradas con dasatinib. En cuanto a los efectos secundarios extrahepatológicos de nilotinib, los más frecuentes fueron las alteraciones en los parámetros bioquímicos plasmáticos (en especial, el aumento de las enzimas pancreáticas, la hipofosfatemia y la hiperglicemia), en general moderadas, por lo que rara vez obligaron a la suspensión definitiva del tratamiento. Una vez excluidos de entrada los pacientes con un intervalo QT prolongado o con enfermedad coronaria, no se observó una incidencia significativamente elevada de complicaciones cardíacas durante el tratamiento.

En 119 pacientes con LMC en FA resistentes o con intolerancia a imatinib, tras un seguimiento mínimo de 6 meses, nilotinib consiguió un 47% de respuestas hematológicas y una tasa de RCM del 29%, con una supervivencia global del 75% a los 12 meses¹⁶. En los

enfermos con CB resistente a imatinib, la tasa de respuesta hematológica fue de alrededor del 20%, y la supervivencia al año, inferior al 50%.

Otros fármacos

En la actualidad se están llevando a cabo ensayos clínicos con dos nuevos inhibidores duales de BCR/ABL y Src –bosutinib (SKI-606)¹⁷ e INNO-406¹⁸– con resultados prometedores, ya que los dos son eficaces y por lo general bien tolerados. INNO-406 tiene la ventaja de atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que podría ser especialmente útil para el tratamiento de los pacientes con CB linfóide o infiltración del sistema nervioso central. Por otra parte, cabe destacar el inhibidor de las Aurora quinasa MK-0457, de administración intravenosa, que ha mostrado cierta eficacia en las resistencias a imatinib debidas a la mutación T315I¹⁹ y cuyo tratamiento constituye en el momento actual uno de los principales retos terapéuticos en la LMC.

Finalmente, se están ensayando fármacos como LBH589, inhibidor de las histonas deacetilasas, y ON012380, los cuales en rigor no son inhibidores de BCR/ABL, sino que actúan impidiendo la unión de la proteína con sus sustratos.

Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos

Otra posibilidad a tener en cuenta en los pacientes con LMC resistentes a imatinib es el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos, único tratamiento con capacidad curativa demostrada de la enfermedad, sobre todo cuando se realiza en la FC. Esta terapéutica se ve limitada por la disponibilidad de un donante compatible y, además, conlleva una mortalidad no desdeñable²⁰, sobre todo si consideramos los buenos resultados proporcionados por los nuevos inhibidores de la tirosina quinasa. Dichos resultados han convertido al trasplante alogénico en tratamiento de tercera línea para la mayoría de los pacientes con LMC resistentes o con intolerancia a imatinib. Así, en la actualidad se ha restringido la indicación del trasplante alogénico a tres situaciones concretas:

1. Los pacientes con fracaso a imatinib asociado a la mutación T315I.
2. Aquellos que presentan resistencia al fármaco y tienen un riesgo bajo para el procedimiento según el score del EBMT (Grupo Europeo para el Trasplante de Médula Ósea) (fundamentalmente, los pacientes muy jóvenes y con un donante adecuado).
3. Los sujetos en las fases avanzadas de la LMC una vez se ha conseguido una citorreducción adecua-

da administrando alguno de los inhibidores de la tirosina quinasa de segunda generación.

Conclusiones

Imatinib ha cambiado la historia natural de la LMC, al lograr tasas de respuesta citogenética y molecular hasta ahora nunca vistas en esta enfermedad, que se mantienen a medio y largo plazo en la mayoría de los casos. Además, los nuevos inhibidores de la tirosina quinasa se han mostrado eficaces en una proporción elevada de los pacientes con resistencia primaria o adquirida a imatinib. No parece, sin embargo, que la curación de la LMC pase por el uso exclusivo de los inhibidores de la tirosina quinasa. No obstante, los progresos en el tratamiento de la LMC están siendo tan rápidos que muchos vislumbran la curación de la enfermedad en un futuro no muy lejano.

Bibliografía

- Daley GQ, Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 1990; 247: 824-30.
- Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Müller M, Druker BJ, et al. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res* 1996; 56: 100-4.
- Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford M, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2001; 344: 1031-7.
- O'Brien S, Guilhot F, Larson R, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *New Engl J Med* 2003; 348: 994-1004.
- Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, et al. Five-year follow-up of imatinib therapy for newly diagnosed chronic myelogenous leukemia in chronic-phase. *New Engl J Med* 2006; 355: 2408-17.
- Baccarani M, Saglio G, Goldman J, Hochhaus A, Simonson B, Appelbaum F, et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia. Recommendations from a panel expert on behalf of the European Leukemianet. *Blood* 2006; 108: 1809-20.
- O'Hare T, Eide CA, Deininger M. Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2007; 110: 2242-9.
- Talpaz M, Shah NP, Kantarjian H, Donato N, Nicoll J, Paquette R, et al. Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia-chromosome positive leukemias. *New Engl J Med* 2006; 354: 2531-41.
- Hochhaus A, Kantarjian H, Baccarani M, Lipton J, Apperley J, Druker BJ, et al. Dasatinib induces notable, durable hematologic and cytogenetic responses in chronic phase chronic myeloid leukemia after failure of imatinib therapy. *Blood* 2007; 109: 2303-9.
- Hochhaus A, Kim DW, Rousset P, Dhorliac-Llacer PE, Milone J, Francis S, et al. Dasatinib (Sprycel) 50mg or 70mg BID versus 100mg or 140mg QD in patients with chronic myeloid leukaemia in chronic phase (CML-CP) resistant or intolerant to imatinib: results of the CA 180-034 study. *Blood* 2006; 108: 53a.
- Kantarjian H, Pasquini R, Hamerschlak N, Rousset P, Hellowiecki J, Jootar S, et al. Dasatinib or high-dose imatinib for chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure or first-line imatinib: a randomized phase 2 trial. *Blood* 2007; 109: 5143-50.
- Guilhot F, Apperley J, Kim DW, Bullarsky EO, Baccarani M, Roboz GJ, et al. Dasatinib induces significant hematologic and cytogenetic responses in patients with imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia in accelerated phase. *Blood* 2007; 109: 4143-50.
- Cortes J, Rousset P, Kim DW, Ritchie E, Hamerschlak N, Coutre S, et al. Dasatinib induces complete hematologic and cytogenetic responses in patients with imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia in blast crisis. *Blood* 2007; 109: 3207-13.
- Kantarjian HM, Giles F, Wunderle L, Bhalla K, O'Brien S, Wassmann B, et al. Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia-chromosome positive ALL. *New Engl J Med* 2006; 354: 2542-51.
- Kantarjian HM, Giles F, Gattermann N, Bhalla K, Alimena G, Palandri F, et al. Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, is effective in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase following imatinib resistance and intolerance. *Blood* 2007; 110: 3540-6.
- Le Coutre P, Ottmann OG, Giles F, Kim DW, Cortes J, Gattermann N, et al. Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, is active in patients with imatinib-resistant or -intolerant accelerated-phase chronic myelogenous leukemia. *Blood* 2008; 111: 1834-9.
- Gambacorti-Passerini C, Kantarjian H, Bruemmendorf T, Martinelli G, Baccarani M, Fischer T, et al. Bosutinib (SKI-606) demonstrates clinical activity among patients with AP and BP CML and Ph+ ALL. *Blood* 2007; 110: 155a.
- Kantarjian H, Cortes J, le Coutre P, Nagler A, Pinilla J, Hochhaus A, et al. A phase I study of INNO-406 in patients with advanced Philadelphia (Ph) chromosome-positive leukemias who are resistant or intolerant to imatinib and second-generation tyrosine kinase inhibitors. *Blood* 2007; 110: 144a.
- Giles F, Cortés J, Jones D, Bergstrom D, Kantarjian H, Freedman SJ. MK-0457, a novel kinase inhibitor, is active in patients with chronic myeloid leukemia or acute lymphocytic leukemia with the T315I BCR-ABL mutation. *Blood* 2007; 109: 500-2.
- Gratwohl A, Brand A, Apperley J, Crawley C, Ruutu T, Corradini P, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia in Europe 2006: transplant activity, long-term data and current results. An analysis by the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Haematologica* 2006; 91: 513-21.

Trombosis y trombofilia en niños: ¿se puede extrapolar la experiencia en adultos?

M.^aÁ. DASÍ CARPIO

Unidad de Hematología Pediátrica. Hospital Universitario La Fe. Valencia

Introducción

Aunque la incidencia del tromboembolismo (TE) en la edad pediátrica es considerablemente menor que en el adulto, actualmente es una realidad cotidiana en los hospitales terciarios donde se tratan niños críticamente enfermos y causa una importante morbimortalidad. Sin embargo, los estudios específicos aleatorizados en niños son todavía escasos, motivo por el cual en la última guía basada en la evidencia (Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy)¹ sobre el manejo de la enfermedad tromboembólica se alcanzaron niveles de consenso A (basados en resultados consistentes) en más del 50% de las recomendaciones para adultos y prácticamente en casi ningún caso para niños. Por ello, en ausencia de estos estudios, con frecuencia se utiliza la información obtenida de los estudios realizados en el adulto. Pero ¿se puede extrapolar la experiencia en adultos?

Los conocimientos que se van adquiriendo sobre el TE infantil ponen de manifiesto la existencia de importantes diferencias relacionadas con la edad, fundamentalmente en lo referente a la epidemiología, factores de riesgo, manifestaciones clínicas específicas, pruebas diagnósticas y farmacocinética de los antitrombóticos, etc., aspectos estos que vamos a revisar a continuación y que probablemente nos ayudarán a contestar la pregunta formulada.

Epidemiología

La práctica constata que el niño tiene una mayor tendencia a la hemorragia que a la trombosis. Esta especie

de “protección” frente al TE se explicaría por las peculiaridades del sistema de la coagulación en la infancia, con una franca disminución de la capacidad de generación de trombina, así como por la integridad del endotelio vascular.

La frecuencia con que se presentan los procesos de TE en los niños es considerablemente menor que en los adultos. Según los datos disponibles de varios registros publicados²⁻⁷ (Tabla 1), la incidencia anual de TE oscila entre el 0,07 y el 0,5 por cada 10.000 niños (1 mes-18 años), y se sitúa en 5,3 casos por cada 10.000 ingresos hospitalarios infantiles (excluidos los neonatos y los accidentes cerebrovasculares [ACV]), pero en general se subestima, ya que muchos casos no llegan a diagnosticarse. La trombosis venosa es más frecuente que la arterial, con excepción de los ACV⁸. Se estima que la incidencia anual de ACV en el niño es de 3-8 por cada 100.000⁹⁻¹¹ y alcanza a 25-35 casos por cada 100.000 nacidos vivos en el periodo neonatal¹¹. No hay diferencia de sexos, a excepción de la trombosis venosa renal, que al parecer es el doble de frecuente en el sexo masculino^{3,4}. La mayor tendencia a la trombosis se manifiesta en la primera infancia (neonato-lactante) y en la pubertad, y se estima que el 9-18% de todos los casos se presentan en el primer año de vida, y el 50-58%, en la segunda década^{2,6}. Durante el primer mes de vida el riesgo de padecer complicaciones trombóticas es 40 veces superior al de cualquier otra edad pediátrica, y la tasa se sitúa en 24 casos por cada 10.000 ingresos en las unidades de cuidados intensivos neonatales³. En los adolescentes, la incidencia es similar a la de los adultos jóvenes.

Las consecuencias del TE son importantes, pudiendo acarrear graves secuelas a los niños que las padecen,

Tabla 1. Registros sobre trombosis en niños

Registro	Años	Edad	Eventos	ACV	Mortalidad por todas las causas	Mortalidad directa	Recurrencia
Canadiense	1990-2	> 1 m-16 a	V/EP	No	9,5%	2,2%	18,5%
Canadá + Internacional	1990-3	Neonatos	V/A	No			
Alemán	1992-4	Neonatos	V/A	Sí			
Holandés	1997-9	0-18 a	V	Sí	17%	2%	7%
Reino Unido	2001-3	> 1 m-16 a	V/A	No	9%	1,5%	5,5%

a: años; A: Arterial; ACV: accidente cerebrovascular; EP: embolia pulmonar; m: mes; V: venoso.

Tabla 2. Factores de riesgo trombogénico

Hereditarios	
Deficiencia de proteína C	
Deficiencia de proteína S	
Deficiencia de antitrombina	
Resistencia a la proteína C activada/factor V Leiden	
Mutación de la protrombina 20210A	
Otros:	
· Hiperhomocisteinemia: polimorfismo MTHFR	
· Elevación de lipoproteína a (Lpa)	
· Disfibrinogenemia	
· Hipoplasminogenemia	
· Elevación de FVIII C (adquirido con contribución genética variable)	
· Deficiencia de ADAMTS 13	
Drepanocitosis	
Adquiridos	
Catéter endovascular	
Infección/Sepsis/Varicela	
Inmovilización	
Cáncer (leucemia, tratamiento con L-asparaginasa)	
Cirugía: ortopédica, cardiovascular (Fontan, fistulas, prótesis valvulares)	
Cardiopatía congénita o adquirida (miocardiopatía dilatada, fibrilación auricular, prótesis valvulares)	
Traumatismo	
Nutrición parenteral total	
Enfermedad renal. Síndrome nefrótico	
Tratamiento hormonal (corticoides, estrógenos, anticonceptivos)	
Síndrome antifosfolípido (anticuerpos anticardiolipina, anti-β2GPI, AL)	
Aumento de FVIII	
Asfisia perinatal	
Enfermedad vascular: vasculitis, displasias	
Enfermedad inflamatoria intestinal crónica	
Enfermedad reumática. Lupus eritematoso sistémico	
Diabetes mellitus	
Trombocitopenia inducida por heparina de tipo 2	
Trasplante de médula ósea, hepático, renal, cardíaco	
Fallo hepático	
Shock, hipovolemia, deshidratación	
Obesidad	
Hiperlipemia familiar	
Púrpura trombocitopénica trombótica/Síndrome hemolítico-urémico	

como embolia pulmonar (EP) (6-8%), síndrome posflebítico y tendencia a la recurrencia. La mortalidad por todas las causas se estima entre el 9 y el 17%²⁻⁶, mientras que la directamente atribuida a la trombosis venosa (TVP) y EP es del 1,5-2,2%². El riesgo de recurrencia después de una TVP espontánea se ha cifrado en el 6-21%^{1,5,12}; puede ser significativamente mayor asociado a un anticoagulante lúpico o en aquellos casos en que se combina un factor congénito con otro adquirido¹². Niveles elevados de FVIII, dímeros D o ambos al diagnóstico y la persistencia de al menos 1 de ellos después de los 3-6 meses de anticoagulación predice una mala evolución en niños con trombosis¹³. El síndrome posttrombótico lo desarrolla al menos un tercio de los pacientes con TVP. Usualmente es moderado y consiste en un aumento de la circunferencia de los miembros afectados, edema, venas varicosas, dolor y pigmentación^{14,15} (Tabla 1).

Factores de riesgo

Una de las diferencias más notables con respecto al adulto es la rareza de la trombosis espontánea. En las series publicadas sólo el 2-8,5% de los TE se producen de forma espontánea y generalmente en niños mayores (preadolescentes y adolescentes). Más del 80% de todos los procesos trombóticos durante la infancia se producen en niños enfermos o con factores predisponentes⁸. En las series publicadas sólo el 2-8,5% de los TE se producen de forma espontánea (generalmente en niños mayores, preadolescentes y adolescentes).

Los factores de riesgo protrombótico pueden ser congénitos o adquiridos (Tabla 2) y es frecuente que en un mismo paciente se acumulen 2 o más factores de riesgo.

Entre los factores de riesgo adquiridos, el catéter endovascular es el factor más importante (está presente en el 60% de los casos de trombosis en cualquier tramo de edad pediátrica y llega al 90% de los procesos TE neonatales¹). Hay que tener en cuenta que el catéter venoso central (CVC) se coloca en niños enfermos, afectados de patologías importantes que por sí solas ya predisponen al TE, tales como septicemia, hipoxia neonatal, cáncer, trauma, cirugía, cardiopatía congénita, lupus eritematoso sistémico, insuficiencia renal, síndrome nefrótico o enfermedad inflamatoria intestinal crónica^{5,16-19}. La inmovilización, la corticoterapia y en los adolescentes el uso de contraceptivos, embarazo, obesidad y tabaquismo son también situaciones de riesgo protrombótico. Existen diversas circunstancias en el neonato que pueden predisponerle al TE:

a) La fragilidad del sistema hemostático (deficiencia fisiológica de antitrombina [AT], proteína C [PC], proteína S [PS] y plasminógeno).

Tabla 3. Trombofilia hereditaria en la trombosis en el niño

Referencia	Casos estudiados	Tipo	Espontáneo (%)	CVC (%)	TH Total (%)	PC (%)	PS (%)	AT (%)	FVL (%)	MPro (%)
Ehrenforth	285	TE	41	18	79	14,4	14,4	6	42	NE
Kosch	261	TE	38	12	57	9,2	5,75	3,5	31,8	4,21
Van Ommen	84	TE	4	57	16	1,19	1,2	1,16	12,5	2,53
Revel-Vilk	171	TV	9	77	13	0,6	1,1	0	4,7	2,4
Bonduel	110	TV	3	67	15	5,5	2,7	0	7,2	2,7
Nowak-Gottl	18	TV	0	100	83	27,7	0	0	44,4	NE

AT: antitrombina; CVC: catéter venoso central; FVL: factor V Leiden; MPro: mutación de la protrombina; NE: no efectuado; PC: proteína C; PS: proteína S; TE: tromboembolismo; TV: trombosis venosa.

b) El aumento de la viscosidad sanguínea (como consecuencia del incremento del hematocrito).

c) Procesos patológicos concomitantes como distrés respiratorio, sepsis, asfixia, policitemia, insuficiencia y diabetes materna.

d) La presencia de catéter endovascular y la trombofilia congénita o adquirida.

Varios defectos genéticos de los factores que regulan la coagulación predisponen a la trombosis. Los más significativos son las deficiencias de PC, PS y AT^{12,13,16,19-21}. La resistencia a la PC activada/factor V Leiden y la mutación del gen de la protrombina G2021A tienen menos importancia en cuanto a riesgo trombogénico individual, pero son más frecuentes en la población general (especialmente en la raza caucásica) y adquieren importancia cuando se asocian a un segundo defecto genético o a un factor de riesgo adquirido. No está clara la contribución al TE de las deficiencias en la fibrinólisis. El papel de otros factores potenciales de condición trombofílica como la hiperhomocisteinemia, niveles altos de factor VIII y lipoproteína a (Lpa) aún no han sido bien establecidos en la población pediátrica. En niños con TE, el defecto congénito hallado con más frecuencia es el factor V Leiden (4,7-13%), seguido de la mutación de la protrombina (2,3-3%), deficiencia de antitrombina (1%), deficiencia de PC (0,6-1%), deficiencia de PS (1-1,2%), deficiencias combinadas (2-6%) y aumento de la Lpa (7,5%)^{22,23} (Tabla 3).

Manifestaciones clínicas

En el niño las trombosis pueden tomar formas clínicas infrecuentes en los adultos, como la *Purpura fulminans* en las deficiencias severas de PC o PS, o la localización inusual (senos venosos cerebrales) y extensa de la trombosis.

En el neonato muchos casos son asintomáticos. El primer signo de alarma puede ser el mal funcionamiento de un catéter o una trombocitopenia sin cau-

sa explicable. La trombosis venosa es más frecuente (50-76% según registros) y afecta a la vena umbilical, a la aurícula derecha y a las extremidades. Generalmente está relacionada con el catéter. En ausencia de éste, la trombosis con mayor incidencia es la de la vena renal.

La **trombosis de la vena renal** supone el 10% de las trombosis venosas neonatales. Clínicamente se caracteriza por la triada: nefromegalia, trombopeenia y hematuria. En el 24% de los casos es bilateral. Si en su progresión alcanza la cava inferior, se presenta edema y cianosis en los miembros inferiores. Deja como secuela afectación de la función renal en el 24% e hipertensión arterial en más de un tercio de los casos. También puede aparecer en niños mayores, usualmente secundaria a síndrome nefrótico, quemaduras, LED o trasplante renal.

La **trombosis de la porta** suele relacionarse con una mala posición del catéter umbilical. En general, no suele dar sintomatología clínica y deja como secuela hipertensión portal.

La **trombosis de la aurícula derecha**, como consecuencia del catéter venoso central, puede presentarse con signos de insuficiencia cardíaca derecha, sepsis persistente, malfuncionamiento del catéter o aparición de un soplo cardíaco.

La TVP en las extremidades suele presentar dolor, calor, tumefacción, cambio de coloración e ingurgitación venosa. Cuando la trombosis afecta a las extremidades inferiores puede haber dolor inguinal o abdominal. La trombosis en la **vena cava inferior** puede manifestarse por la presencia de venas cutáneas prominentes y disfunción hepática o renal dependiendo de la localización y extensión del trombo. La trombosis en la **vena cava superior** puede ser asintomática o presentar cianosis e hinchazón del cuello y la zona superior del tórax, circulación colateral y finalmente conducir a una insuficiencia cardíaca aguda.

Las complicaciones más temidas son la EP y el ACV y su incidencia se desconoce porque es difícil poder objetivarlas. La EP es de difícil diagnóstico en

Tabla 4. Diagnóstico por la imagen

Técnica	Ventajas	Inconvenientes
Eco-Doppler	No invasivo, sensible, disponible, no caro. Sistema venoso inferior, órganos abdominales	No sensible para vasos intratorácicos. Sistema venoso superior (excepto yugular interna)
Angiografía	Mayor sensibilidad	Invasivo. Requiere cateterismo arterial (femoral), radiólogo intervencionista o cardiólogo. Puede ser causa de trombosis <i>in situ</i> . No siempre disponible
Angiorresonancia	No invasiva. Sensible. Ideal para el SNC	Requiere sedación. Cara. No siempre disponible
TAC con contraste	No invasivo	Sedación. Caro. Irradiación

SNC: sistema nervioso central; TAC: tomografía axial computarizada.

los niños, en muchos casos porque no se sospecha y en otros por la dificultad de objetivarlo. Se ha llegado a encontrar hasta en un 20% de niños con trombosis²², y en el 24% de las autopsias de pacientes de UCI. La clínica puede consistir en taquipnea y disnea transitoria sin más, o bien presentar tos, febrícula, dolor torácico, sibilancias, arritmia, hemoptisis, derrame pleural e infiltrados pulmonares en la radiografía de tórax e incluso colapso cardiovascular con hipotensión y coma en el caso de la EP masiva. El EP recurrente puede pasar desapercibido hasta que se presenta hipertensión pulmonar o fallo cardiaco. Debería ser considerado en el diagnóstico diferencial del deterioro cardiopulmonar de todo niño críticamente enfermo.

En el caso de **trombosis arterial** la sintomatología clínica dependerá de la extensión y el grado de obstrucción al flujo sanguíneo y puede dar manifestaciones tan dispares como isquemia de miembros (los miembros afectados se encuentran pálidos, fríos con disminución de los pulsos y mala perfusión periférica), hipertensión arterial con o sin insuficiencia renal (arteria renal), enterocolitis necrotizante (arteria mesentérica) e incluso embolia cerebral (por la persistencia de foramen oval). El **ACV** podría ser mayor que en otras edades por las características de la circulación neonatal (*shunt* derecha-izquierda, persistencia de foramen oval). La trombosis/infarto a nivel del sistema nervioso central (SNC) puede manifestarse como una deficiencia focal con o sin convulsiones, letargo o coma. Muchos casos son asintomáticos. Puede dejar secuelas como hipertensión arterial, nefropatía, dismetría, claudicación, pérdida del miembro o paraplejía.

La **Purpura fulminans neonatal** es la manifestación clínica característica de las deficiencias severas de PC (tasas muy bajas de PC [$< 1\%$]) y de PS. Se caracteriza por la aparición, a las pocas horas de vida, de lesiones equimótico-purpúricas que van extendiéndose por todo el cuerpo y progresan hasta llegar

a la necrosis cutánea. El cuadro clínico se acompaña de anemia microangiopática y coagulación intravascular intensa. Tanto el cuadro clínico como el analítico ceden con la administración de plasma fresco congelado (PFC) y reaparecen a las 24-36 horas. Si no se trata con prontitud, deja importantes secuelas (neurológicas, renales), como, por ejemplo, ceguera²⁴.

Diagnóstico

El diagnóstico se basa en la determinación de los dímeros D y la prueba de imagen.

Dímeros D. La presencia de los dímeros D plasmáticos (> 500 mg/L) es de alta sensibilidad, aunque menor especificidad, para el diagnóstico de la trombosis y tiene un valor predictivo negativo evidente (superior al 95%).

Pruebas de imagen. La ecografía Doppler color, la tomografía computarizada (TC), TC helicoidal y la resonancia magnética (RM) son los métodos no invasivos de elección para el diagnóstico de la enfermedad tromboembólica en la infancia²⁵, aunque en determinadas ocasiones se requiere la angiografía para la confirmación diagnóstica (Tabla 4). La ecografía (eco-Doppler color) es el procedimiento más utilizado, tanto para el diagnóstico como para el seguimiento del proceso de TE. La incapacidad para comprimir completamente la luz venosa es diagnóstica de TVP, pero es difícil de valorar en presencia de catéter o por la baja presión del pulso de los neonatos. Tiene zonas ciegas, sobre todo a nivel del sistema venoso superior. Con la ecocardiografía podemos valorar la presencia de trombos intracardiacos y de grandes vasos. En los casos de trombosis relacionadas con la presencia de un catéter, puede ser útil la administración de contraste por el mismo. La TC con contraste y la angiorresonancia magnética son de utilidad para el estudio de trombosis de localización distinta a las extremidades (vena cava

superior, subclavia proximal y los vasos pélvicos) así como en la trombosis del SNC.

La angiografía es la exploración más específica y sensible pero no siempre es practicable en niños pequeños o críticamente enfermos, ya que requiere la cateterización generalmente de la femoral (lo que puede ser causa de trombosis local). El escáner de ventilación-perfusión sigue siendo una prueba recomendada para el diagnóstico del EP, aunque no suele ser practicable en niños pequeños, siendo una alternativa el escáner helicoidal, que ofrece alta especificidad (95%) y aceptable sensibilidad (72%). La eco-Doppler transcraneal se utiliza para valorar el riesgo de ACV en niños afectados de drepanocitosis.

Trombofilia. El papel de la investigación de los estados protrombóticos en la edad pediátrica permanece en controversia. En los niños, la presencia de factores de riesgo adquiridos que justifican por sí solos la presencia de la trombosis hace que en muchos casos no se investigue la coexistencia de factores genéticos protrombóticos, por lo que el impacto de la trombofilia primaria aún no ha sido correctamente evaluado. La búsqueda de trombofilia ante un proceso de TE puede estar justificado en función de la existencia de tratamiento específico (concentrados de AT, PC o PFC), y las consecuencias para el futuro manejo y el consejo familiar. El estudio de trombofilia se impone cuando la trombosis es espontánea o de severidad desproporcionada al factor presuntamente desencadenante, recurrente, con historia de TE familiar o de localización inusual (senos venosos cerebrales, mesentérica, renal, subclavia, cava, axilar, etc.). Parece razonable extender el estudio a la familia, tanto cuando el niño sea el *propositus* como cuando lo sean sus padres.

Tratamiento

La prevención y el tratamiento de la enfermedad tromboembólica en los niños difieren de los de los adultos por varias razones: por las diferencias fisiológicas en el sistema hemostático dependientes de la edad, por la diferente etiología y localización de los procesos tromboembólicos y por la distinta respuesta a los agentes antitrombóticos²⁶.

Heparina

La heparina es el fármaco de elección para el tratamiento de la TVP y la EP. Requiere de una tasa adecuada de AT para ejercer su acción anticoagulante y ésta está disminuida de forma fisiológica en el neonato y severamente disminuida en el prematuro enfermo. La farmacocinética de la heparina varía en fun-

ción de la edad, lo que se tendrá en cuenta a la hora de dosificarla (rápido aclaramiento debido al gran volumen de distribución del niño). En relación con el adulto, el niño generalmente precisa a) más dosis, b) con más frecuencia y c) más monitorización.

La **heparina no fraccionada** se administra por vía endovenosa, en perfusión continua a dosis adecuada a la edad y el peso corporal. El objetivo es conseguir un tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) entre 1,5 y 2,5 veces su valor basal o una actividad frente al factor X activado (anti-Xa) de entre 0,3 y 0,7 U/mL, lo que se consigue en el 90% de los casos utilizándola a dosis de 18 U/kg/h en adolescentes, de 20 U/kg/h en mayores de 1 año, y de 28 U/kg/h en menores de 1 año, tras un bolo de 75 U/kg a pasar en 10 minutos²⁷. La monitorización se efectuará a las 4 horas de iniciado el tratamiento y cada vez que se modifique la dosis administrada. Cuando se alcanza el nivel terapéutico, se controla diariamente el TTPA. La duración del tratamiento es de 5-10 días generalmente (7-14 días en caso de TVP extensa o EP), continuando la anticoagulación con antagonistas de la vitamina K (AVK). En neonatos se aconseja prolongar hasta la resolución del problema (10-14 días) y no se administra AVK.

Las heparinas de bajo peso molecular (HBPM)^{2,16,27-37} se emplean cada vez más en pediatría, tanto en el tratamiento como en la profilaxis (para sustituir a la heparina no fraccionada y a la AVK) porque tienen una serie de conocidas ventajas, sobre todo la administración subcutánea, menor interferencia con otras drogas y menor riesgo hemorrágico. Han resultado ser eficaces en el tratamiento de la trombosis venosa, incluyendo el embolismo pulmonar, las trombosis secundarias a catéter y la trombosis venosa cerebral. Como en el adulto, el objetivo terapéutico es conseguir un nivel de anti-Xa de 0,5-1 U/mL a las 4 horas de la administración, pero se diferencia de él fundamentalmente en dos aspectos: requiere más dosis (de forma inversamente proporcional a la edad) y es necesaria la monitorización del nivel de anti-Xa, ya que en muchas ocasiones se administra en niños con enfermedades de base importantes, con un riesgo aumentado de sangrado, disfunción renal o con mala perfusión, con lo que la reabsorción subcutánea puede ser irregular. Así como con la heparina no fraccionada con el esquema terapéutico propuesto se acierta en la mayoría de los casos, no ocurre lo mismo con la HBPM. De hecho, en los 2 últimos años se está evidenciando la necesidad de aumentar la dosis de enoxaparina en neonatos (1,7 mg/kg/12 h en neonato a término y 2 mg/kg/12 h en prematuros)³⁸. Las dosis empleadas y el ritmo de administración se reflejan en la Tabla 5. Se ha observado que la recurrencia de TE en los niños se asocia con frecuencia a niveles subóptimos de anti-Xa. La trombopenia inducida

Tabla 5. Dosificación de heparina recomendada en niños

Heparina no fraccionada	Dosis inicial	Dosis de mantenimiento	Objetivo a las 4 horas
	Bolo 75 U/kg en 10 min	Perfusión continua	TTPA: 1,5-2,5 veces el basal
< 1 año		28 U/kg	Anti-Xa: 0,35-0,7 U/mL
> 1 año		20 U/kg	
HBPM	Dosis terapéutica	Dosis profiláctica	Objetivo a las 4 horas
Enoxaparina	mg/kg/12 h	mg/kg/12 h	
< 2 meses	1,5	0,75	
> 2 meses	1	0,5	
Reviparina	UI/kg/12 h	UI/kg/12 h	
< 5 kg	150	50	Anti-Xa
> 5 kg	100	30	
Dalteparina	UI/kg/24 h	UI/kg/24 h	Tratamiento: 0,5-1,0 U/mL
	129 ± 43	92 ± 52	Profilaxis: 0,1-0,3 U/mL
Tinzaparina	UI/kg/24 h		
0-2 meses	275		
2-12 meses	250		
1 año - < 5 años	240		
5-10 años	200		
11-16 años	175		

Anti-Xa: actividad frente al factor X activado; HBPM: heparina de bajo peso molecular; TTPA: tiempo de tromboplastina parcial activada.

por heparina no se ha comunicado en casos en los que sólo se ha administrado HBPM^{39,40}.

Antagonistas de la vitamina K

Los derivados cumarínicos (acenocumarol, warfarina) inhiben la γ -carboxilación de las proteínas dependientes de la vitamina K, de lo cual resulta una disminución plasmática de los factores II, VII, IX, X y de la PC y la PS. Se emplean en el tratamiento de la TVP/EP, tras la heparina, durante 3-6 meses para evitar recurrencias. A largo plazo se administran en las deficiencias severas protrombóticas sintomáticas, en la profilaxis de determinadas cardiopatías y en portadores de prótesis valvulares.

Las recomendaciones del uso de AVK han sido extrapoladas del adulto. Sin embargo, como ocurre con

la heparina, se han identificado diferencias. En primer lugar, su uso en pediatría es problemático. La deficiencia fisiológica de los citados factores (en recién nacidos llega a ser del 50%), la menor capacidad para la generación de trombina durante la infancia (lo que aumenta el riesgo hemorrágico) hacen desaconsejable su uso en los primeros meses de vida. Los lactantes son muy sensibles a la AVK, ya que la leche materna tiene poca vitamina K. Las concentraciones de vitamina K varían de unas leches artificiales a otras. En los niños, los cambios dietéticos son necesarios durante los primeros meses de vida, y los procesos infecciosos intercurrentes tratados con antibióticos, vómitos y diarrea son más frecuentes que en otras edades, causando fluctuaciones en el INR, por lo que se precisa una monitorización más frecuente. A diferencia de los adultos, el control mensual de la AVK es suficiente en sólo el 20% de los niños. Requieren, por tanto, una monitorización más frecuente (en ocasiones hasta 4 veces al mes) dependiendo de la edad y la situación clínica.

Se ha observado que los requerimientos de AVK varían con la edad y que se necesitan más dosis cuanto más joven es el paciente^{41,42}. La dosis inicial de warfarina recomendada es de 0,2 mg/kg/día (máximo: 10-15 mg). No hay recomendaciones consensuadas con respecto al acenocumarol (Sintrom[®]) y se utiliza a dosis de 0,1 mg/kg/día entre 1 y 5 años, de 0,07 entre 6 y 10 años, y de 0,06 entre 11 y 18 años⁴³. Cuando se consigue INR ≥ 2 durante 2 días consecutivos, se retira la heparina. El solapamiento heparina/AVK suele durar 4-6 días, así que iniciaremos su administración en base a la duración prevista de la heparinoterapia. Posteriormente la dosis se va ajustando para mantener el INR en el rango deseado. No hay estudios clínicos que definan cuál es el rango de INR óptimo en niños; no obstante, se acepta el de 2,5 (2-3) para TVP extrapolando de las recomendaciones para adultos. Sin embargo, hay autores que avalan que un INR de 1,4-1,9 podría ser suficiente para un tratamiento eficaz y con menos riesgos en niños. En las deficiencias congénitas severas de PC o PS se requiere INR de 3,5-4,5 y de 2,5-3,5 para pacientes con prótesis valvulares cardíacas.

La duración del tratamiento va a estar relacionada con la patología asociada o la coexistencia de un defecto trombofílico congénito. En pacientes con un primer episodio de trombosis sin defecto protrombótico adicional, es recomendable mantener la anticoagulación durante 3-6 meses tras el episodio agudo, mientras que en niños con deficiencias homocigotas trombofílicas o con historia abigarrada de trombosis familiar se deberá considerar la anticoagulación indefinida. La principal complicación es la hemorragia, siendo muy infrecuente la calcificación traqueal, alopecia y desmineralización ósea o pérdida de audición. Se desco-

Indicaciones:

Trombosis arterial obstructiva resistente a la heparina
 Peligro para órgano o miembro
 Trombosis de la vena renal bilateral
 EP masivo resistente a heparina

Contraindicaciones^a:

Sangrado activo
 Cirugía general 10 días previos
 Procedimientos invasivos 3 días antes
 Convulsiones 48 horas antes
 Hipertensión
 Riesgo de sangrado en zonas críticas
 Neurocirugía < 3 semanas antes

Fármaco	Dosis inicial	Mantenimiento	Duración ^b
rt-PA ^c		0,1-0,5 mg/kg/h 0,03-0,06 mg/kg/h	6 h 12-24 h
Uroquinasa	4.400 U/kg en 10 min	4.400 U/kg/h	6-12 h

Asociar:

Heparina 10 U/kg/h
 Plasma fresco congelado 10 mL/kg en neonatos

Vigilar y mantener:

Fibrinógeno \geq 100 mg/dL
 Plaquetas \geq 50.000/ μ L

Monitorización ecográfica

Figura 1. Trombólisis sistémica en niños. ^a Las contraindicaciones formales en pediatría están por definir. ^b El riesgo de sangrado aumenta con la duración del tratamiento. ^c Diversas pautas con dosis inicial opcional y de mantenimiento a dosis inversamente proporcional a la duración del tratamiento.

noce la incidencia de necrosis cumarínica en niños y debe de ser muy escasa, quizá porque generalmente la administración de AVK se efectúa en niños previamente heparinizados.

Trombólisis

La actividad de los agentes trombolíticos depende de la conversión farmacológica del plasminógeno endógeno en plasmina. La capacidad total del sistema fibrinolítico se encuentra globalmente disminuida en la infancia, sobre todo en el neonato, que tiene una concentración de plasminógeno del 50% con relación al adulto, lo que da lugar a una lenta generación de plasmina.

La decisión de utilizar los trombolíticos requiere una cuidadosa evaluación, dados los importantes riesgos potenciales del tratamiento. A diferencia del adulto, disponemos de datos limitados en relación con la eficacia, dosificación y seguridad del empleo de antifibrinolíticos en niños, por lo que la indicación de

su uso debe ser siempre individualizada. La trombólisis sistémica está indicada en casos de oclusión arterial con compromiso de órgano o miembro, en la EP masiva que no responde al tratamiento con heparina y se discute su utilización en la TVP aguda y extensa. Esta modalidad terapéutica tiene un mayor riesgo hemorrágico, por lo que puede no estar indicada en pacientes que hayan sufrido procesos como los indicados en la Figura 1 y, en general, que presenten riesgo de sangrado en zonas críticas^{2,27,44-46}. Las contraindicaciones formales en pediatría están por definir. Antes de iniciar su administración se debe excluir la existencia de otras deficiencias asociadas como tromboopenia o hipofibrinogenemia. Asimismo, es conveniente la realización de eco para descartar hemorragia intracraneal (HIC) previa en los prematuros. Su eficacia se reduce con el tiempo transcurrido entre la presentación del proceso trombótico y el inicio de la trombólisis, por lo que se desaconseja en trombosis de más de 10 días de evolución. Es conveniente administrarlo conjuntamente con heparina convencional a bajas dosis o HBPM para evitar la progresión del trombo ini-

ciando la heparinización durante o inmediatamente después de la terapia trombolítica⁴⁶.

Los dos fármacos más empleados en nuestro medio son la uroquinasa y el activador tisular del plasminógeno (r-tPA). Se emplean en perfusión continua endovenosa, como se indica en la Figura 1. Parece que el riesgo hemorrágico disminuye utilizando dosis bajas de rtPA (0,01-0,06 mg/kg/h). La duración se estima entre 6 y 12 horas, pero en ocasiones requiere más tiempo. El control clínico y de laboratorio debe ser estricto por el riesgo de sangrado. Valoraremos la fibrinólisis con el incremento de los dímeros D y vigilarémos la consiguiente disminución de fibrinógeno. Si el citado incremento no se produce adecuadamente, pensaremos en la posibilidad de un déficit de plasminógeno fisiológico (neonatos) o adquirido y lo repondremos con PFC (10 mL/kg). Para evitar el sangrado debemos mantener el fibrinógeno por encima de 100 mg/dL. Las medidas de compresión local y terapia de soporte suelen ser suficientes para controlar el sangrado leve. En caso de hemorragia importante, se suspenderá la infusión y se administrará crioprecipitado (1 U/5 kg). Si hay riesgo vital, se añadirán antifibrinolíticos por vía endovenosa. Con este tratamiento se consigue una lisis parcial o total del trombo en el 70% de los casos. El riesgo de hemorragia mayor se estima en un 11% de los niños tratados y se observan sangrados menores en el 50% de los casos.

Comentarios

- El TE en el niño es una enfermedad emergente y multifactorial que rara vez se presenta de forma espontánea, acompañando en muchas ocasiones a enfermedades complejas que precisan de catéter endovascular.
- Los procesos tromboembólicos son diagnosticados con mayor frecuencia en dos picos de edad: en el primer año y en la adolescencia.
- A la hora del diagnóstico y de decidir el plan terapéutico se deben tener en cuenta los cambios evolutivos de la hemostasia y coagulación propios de la infancia.
- En los niños, la presencia de factores de riesgo adquiridos (catéter, infección, cáncer, cardiopatía, nutrición parenteral, quimioterapia, etc.) que justifican por sí solos la presencia de la trombosis hace que no se investigue, en muchos casos, la coexistencia de los factores genéticos de riesgo. El estudio de trombofilia debe realizarse cuando la trombosis es espontánea o de severidad desproporcionada al factor presuntamente desencadenante, recurrente, con historia de TE familiar o de localización inusual.
- El tratamiento debe ser siempre individualizado y en general se requiere mayor dosificación en re-

lación con el peso y más frecuente monitorización cuanto menor sea la edad del paciente. Sólo recientemente se han comenzado a establecer recomendaciones terapéuticas consensuadas, aunque la mayoría son de grado 2, es decir, en las mismas la relación riesgo-beneficio no es evidente. Las deficiencias fisiológicas de la coagulación del niño dificultan la acción de fármacos como la heparina (por la disminución de la antitrombina), los trombolíticos (por la disminución del plasminógeno) y los anticoagulantes orales (deficiencia de factores vitamina K-dependientes) empleados en el tratamiento del TE.

Bibliografía

1. Monagle P, Chan A, Massicotte P, Chalmers E, Michelson AD. Antithrombotic therapy in children: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* 2004; 126: 645S-687S.
2. Andrew M, David M, Adams M, Ali K, Anderson R, Barnard D, et al. Venous thromboembolic complications (VTE) in children: first analyses of the Canadian Registry of VTE. *Blood* 1994; 83: 1251-7.
3. Schmidt B, Andrew M. Neonatal thrombosis: report of a prospective Canadian and International registry. *Pediatrics* 1995; 96: 939-43.
4. Nowak-Gottl U, von Kries R, Gobel U. Neonatal symptomatic thromboembolism in Germany: two year survey. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 1997; 76: 163-7.
5. Monagle P, Adams M, Mahoney M, Ali K, Barnard D, Bernstein M, et al. Outcome of pediatric thromboembolic disease: a report from the Canadian Childhood Thrombophilia Registry. *Pediatr Research* 2000; 47: 763-6.
6. van Ommen CH, Heijboer H, Butler HR, Hirasings RA, Heijmans HS, Peters M. Venous thromboembolism in childhood: a prospective two year in the Netherlands. *J Pediatr* 2001; 139: 675-81.
7. Gibson BES, Chalmers EA, Bolton-Maggs P, Henderson DJ, Lynn R. Thromboembolism in childhood: a prospective two year BPSU study in the United Kingdom. February 2001-February 2003. *Thromb Haemost* 2003 1 (Supl. q): OC422.
8. Kuhle S, Massicotte P, Chan A, Adams M, Abdolele M, de Veber G, et al. Systemic thromboembolism in children: data from the 1-800-NO-CLOTS Consultation Service. *Thromb Haemost* 2004; 92: 722-8.
9. Giroud M, Lemesle M, Gouyon JB, Nivelon JL, Milan C, Dumas R. Cerebrovascular disease in children under 16 years of age in the city of Dijon, France: a study of incidence and clinical features from 1985 to 1993. *J Clin Epidemiol* 1995; 48: 1343-8.
10. Lynch J, Hirtz D, deVeber G, Nelson K. Report of the National Institute of Neurological Disorders and Stroke Workshop on perinatal and childhood stroke. *Pediatrics* 2002; 109: 116-23.
11. Chalmers EA. Perinatal stroke – risk factors and management. *Br J Haematol* 2005; 130: 333-43.
12. Nowak-Gottl U, Junker R, Kreuz W, von Eeckardstein A, Kosch A, None N et al. Childhood Thrombophilia Study Group. Risk of recurrent venous thrombosis in children with combined prothrombotic risk factors. *Blood* 2001; 97: 858-62.
13. Goldenberg NA, Knapp-Clevenger R, Manco-Johnson MJ. Elevated plasma factor VIII and D-dimer levels as predictors of poor outcomes of thrombosis in children. *N Engl J Med* 2004; 351: 1081-8.

14. Andrew M. Developmental hemostasis: relevance to thromboembolic complications in pediatric patients. *Thromb Haemost* 1995; 74: 415-25.
15. Kuhle S, Koloshuk B, Marzinotto V, Bauman M, Massicotte P, Andrew M, et al. A cross-sectional study evaluating post-thrombotic syndrome in children. *Thromb Res* 2003; 111: 227-33.
16. Schneppenheim R, Greiner J. Thrombosis in infants and children. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006: 86-96.
17. Manco-Johnson M. Disorders of hemostasis in childhood: risks factors for venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 1997; 78: 710-4.
18. Nowak-Göttl U, Kosch A, Schlegel N. Thromboembolism in newborns, infants and children. *Thromb Haemost* 2001; 86: 464-74.
19. Athale UH, Chan AK. Thrombosis in children with acute lymphoblastic leukemia, part I: epidemiology of thrombosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Thromb Res* 2003; 111: 125-31.
20. Ehrenforth S, Junker R, Koch HG, Kreuz W, Munchow N, Scharrer I, Nowak-göttl U. Multicentre evaluation of combined prothrombotic defects associated with thrombophilia in childhood; the Childhood Thrombophilia Study Group. *Eur J Pediatr* 1999; 158 (s): 97-104.
21. Kosch AK, Junker R, Kurnik K, Schobess R, Günter G, Koch HG, Nowak-Göttl U. Prothrombotic risk factors in children with spontaneous venous thrombosis and their asymptomatic parents: a family study. *Thrombosis Research* 2000; 99: 531-7.
22. van Ommen CH, Heijboer H, van den Dool EJ, Hutten BA, Peters M. Pediatric venous thromboembolic disease in one single center: congenital prothrombotic disorders and clinical outcome. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 2516-22.
23. Revel-Vilk S, Chan A, Bauman M, Massicotte P. Prothrombotic conditions in an unselected cohort of children with venous thromboembolic disease. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 915-21.
24. Estellés A, García-Plaza I, Dasí MA, Aznar J, Duart M, Sanz G, et al. Severe inherited "homozygous" protein C deficiency in a newborn infant. *Thromb Haemost* 1984; 52: 53-6.
25. Male C, Chait P, Ginsberg J, Hanna K, Anrew M, Halton J, et al. Comparison of venography and ultrasound for the diagnosis of asymptomatic deep vein thrombosis in the upper body in children: results of the PARKAA study. *Thromb Haemost* 2002; 87: 593.
26. Andrew M, Michelson AD, Bovill E, Leaker M, Massicotte P. Guidelines for antithrombotic therapy in pediatric patients. *J Pediatr* 1998; 132: 575-88.
27. Manco-Johnson MJ. How I treat venous thrombosis in children. *Blood* 2006; 107: 21-9.
28. Massicotte P, Adams M, Marzinotto V, Brooker LA, Andrew M. Low-molecular-weight heparin in pediatric patients with thrombotic disease: a dose finding study. *J Pediatr* 1996; 128: 313-8.
29. Dix D, Andrew M, Marziotto V, Charpentir K, Bridge S, Monagle P, et al. The use of low molecular weight heparin in pediatric patients: a prospective cohort study. *J Paediat* 2000; 136: 439-45.
30. Kuhle S, Massicotte P, Dinyari M, Vegh P, Mitchell D, Marzinotto V, et al. Dose-finding and pharmacokinetics of therapeutic doses of tinzaparin in pediatric patients with thromboembolic events. *Thromb Haemost* 2005; 94: 1164-71.
31. Nowak-Göttl U, Bidlingmaier C, Krümpel A, Göttl L, Kenet G. Pharmacokinetics, efficacy, and safety of LMWHs in venous thrombosis and stroke in neonates, infants and children. *British Journal of Pharmacology* 2008; 153: 1120-7.
32. Nohe N, Flemmer A, Rümmler R, Praun M, Auberger K. The low molecular weight heparin dalteparin for prophylaxis and therapy of thrombosis in childhood: a report on 48 cases. *Eur J Pediatr* 1999; 158: S134-S139.
33. Michaels LA, Gurian M, Hegyi T, Drachtman RA. Low molecular weight heparin in the treatment of venous and arterial thromboses in the premature infant. *Pediatrics* 2004; 114: 703-7.
34. Schobess R, Düring C, Bidlingmaier C, Heinecke A, Merkel N, Nowak-Göttl U. Long-term safety and efficacy data on childhood venous thrombosis treated with a low molecular weight heparin: an open-label pilot study of once-daily versus twice-daily enoxaparin administration. *Haematologica* 2006; 91: 1704-7.
35. Ho SH, Wu JK, Hamilton DP, Dix DB, Wadsworth LD. An assessment of published pediatric dosage guidelines for enoxaparin. *J Pediatr Hematol Oncol* 2004; 26: 561-6.
36. Hofmann S, Knoefler R, Lorenz N, Siegert G, Wendisch J, Mueller D, et al. Clinical experience with low-molecular weight heparins in pediatric patients. *Thromb Res* 2001; 103: 345-53.
37. Massicotte P, Julian JA, Marzinotto V, Gent M, Shields K, Chan AK, et al. Dose-finding and pharmacokinetic profiles of prophylactic doses of a low molecular weight heparin (reviparin-sodium) in pediatric patients. *Thromb Res* 2003; 109: 93-9.
38. Malowany JJ, Monagle P, Knoppert DC, Lee DS, Wu J, McCusker P, et al. Enoxaparin for neonatal thrombosis: a call for a higher dose for neonates. *Thromb Res* 2008 (en prensa).
39. Ranze O, Ranze P, Magnani HN, Greinacher A. Heparin-induced thrombocytopenia in paediatric patients-a review of the literature and a new case treated with danaparoid sodium. *Eur J Pediatr* 1999; 158: 130-3.
40. Newall F, Barnes C, Ignjatovic V, Monagle P. Heparin-induced thrombocytopenia in children. *J Paediatr Child Health* 2003; 39: 289-92.
41. Streif W, Andrew M, Marzinotto V, Massicotte P, Chan AKC, Julian JA, et al. Analysis of warfarin therapy in pediatric patients: a prospective cohort study. *Blood* 1999; 94: 3007-14.
42. Andrew M, Marzinotto V, Brooker L, Adamns M, Ginsberg J, Freedom R, et al. Oral anticoagulant therapy in pediatric patients: a prospective study. *Thromb Haemost* 1994; 1: 265-9.
43. Bonduel M, Sciuccati G, Hepner M, Torres AF, Pieroni G, Frontroth JP, Servidio RM. Acenocumarol therapy in pediatric patients. *J Thromb Haemost* 2003; 8: 1740-3.
44. Chalmers EA, Gibsin BES. Thrombolytic therapy in the management of pediatric thromboembolic disease. *Br J Haematol* 1999; 104: 14-21.
45. Knofler R, Dinger J, Kabus M, Müller D, Lauterbach I, Rupprecht E, et al. Thrombolytic therapy in children: clinical experiences with recombinant tissue-plasminogen activator. *Seminars in Thromb Hemost* 2001; 27: 169-74.
46. Manco-Johnson MJ, Nuss R, Hays T, Krupski W, Drose J, Manco-Johnson ML. Combined thrombolytic and anticoagulant therapy for venous thrombosis in children. *J Pediatr* 2000; 136: 446-53.

Principles of the World Health Organization to classification of hematological malignancies. 2008 Update

M.A. PIRIS

Programa de Patología Molecular. Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO). Madrid

The aim of this 2008 update was to:

- Identify specific clinicopathologic entities (diseases defined on the morphology and immunophenotype with clinical correlation).
- Whose diagnosis had a high reproducibility, based on low complexity techniques.
- Avoiding excessive subclassification, or the identification of entities without clinical specific meaning.
- Recognizing newly defined entities.
- Identifying early stages of the different diseases.

This has been based (additionally to the morphology) on:

- Genetic specific alteration of some lymphoma types, such as MCL, FL, or others.
- Characteristic immunophenotypic features of some lymphomas types, although more frequently a constellation of markers was used.
- An increasing weight is being attributed to the site of the disease, since it is being recognized that specific locations of the disease are associated with distinct molecular event, clinical features and treatment responses, in spite of similar morphological features.

A previous meeting with the Clinical Advisory Committee (Airlie, 2007) has allowed to a better mutual understanding between pathologists, haematologists and oncologists.

Some of the problems that this classification raises are:

- For many of these processes, we do not have yet specific immuno or molecular features, and the diagnosis of these tumours depend more on a constellation of features.
- Diagnostic criteria for some of the entities proposed are still vaguely defined, in special for the borderline cases.
- Some of the techniques needed for the diagnosis may not be available all over the world, and underdeveloped countries may have difficulties for using them.

This is not the last word. The future may give place to situations such as:

- New entities are recognised based on new basic findings, associated with a characteristic clinical picture.

- Subclassification of some of the lymphoma/leukemia types now recognised is made possible by the:
 - New markers.
 - New data on old markers.
 - Availability of automatic procedures for analysing cell growth fraction or other tumoural features.
- New tools in lymphoma treatment may modify, even radically, the current way of diagnosing lymphoma/leukaemia.

New entities now proposed or better defined

- Peripheral T-cell lymphoma, anaplastic is now divided between ALK+ and ALK- cases¹.
- B-cell lymphoma with intermediate features between Hodgkin's lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma is proposed^{2,3}.
- B-cell lymphoma with intermediate features between Burkitt lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma is now proposed^{4,6}.
- Unclassified splenic B-cell lymphoma⁷ is now proposed, including:
 - Diffuse red pulp small B-cell lymphoma^{7,8}, and
 - Hairy cell leukaemia variant⁹.
- Plasmablastic lymphoma is better described¹⁰.
- ALK-positive diffuse large B-cell lymphoma is now recognised¹¹.
- Lymphoplasmacytic lymphoma includes all Waldenström macroglobulinemia cases (as defined by the International Workshop on WM¹²) and additional cases with the same morphology and immunophenotype that may lack IgM monoclonal gammopathy.
- B prolymphocytic leukaemia is better defined, excluding cases with t11;14^{13,14}
- Early forms of CLL and other leukaemic disorders (monoclonal lymphocytosis)¹⁵, and follicular lymphoma (*in situ* FL)¹⁶ are recognised and described.
- Extranodal variants of follicular lymphoma are better defined.

References

1. Savage KJ, Harris NL, Vose JM, Ullrich F, Jaffe ES, Connors JM, et al. ALK-negative anaplastic large-cell lymphoma (ALCL) is clinically and immunophenotypically different from both ALK-positive ALCL and peripheral T-cell lymphoma,

- not otherwise specified: report from the International Peripheral T-Cell Lymphoma Project. *Blood* 2008.
2. García JF, Mollejo M, Fraga M, Forteza J, Muniesa JA, Pérez-Guillermo M, et al. Large B-cell lymphoma with Hodgkin's features. *Histopathology* 2005; 47: 101-10.
 3. Traverse-Glehen A, Pittaluga S, Gaulard P, Sorbara L, Alonso MA, Raffeld M, Jaffe ES. Mediastinal gray zone lymphoma: the missing link between classic Hodgkin's lymphoma and mediastinal large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 1411-21.
 4. Mossafa H, Damotte D, Jenabian A, Delarue R, Vincenneau A, Amouroux I, et al. Non-Hodgkin's lymphomas with Burkitt-like cells are associated with c-Myc amplification and poor prognosis. *Leuk Lymphoma* 2006; 47: 1885-93.
 5. McClure RF, Remstein ED, Macon WR, Dewald GW, Habermann TM, Hoering A, Kurtin PJ. Adult B-cell lymphomas with Burkitt-like morphology are phenotypically and genotypically heterogeneous with aggressive clinical behavior. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 1652-60.
 6. Au WY, Horsman DE, Gascoyne RD, Viswanatha DS, Klasa RJ, Connors JM. The spectrum of lymphoma with 8q24 aberrations: a clinical, pathological and cytogenetic study of 87 consecutive cases. *Leuk Lymphoma* 2004; 45: 519-28.
 7. Matutes E, Oscier D, Montalban C, Berger F, Callet-Bauchu E, Dogan A, et al. Splenic marginal zone lymphoma proposals for a revision of diagnostic, staging and therapeutic criteria. *Leukemia* 2008; 22: 487-95.
 8. Mollejo M, Algara P, Mateo MS, Sánchez-Beato M, Lloret E, Medina MT, Piris MA. Splenic small B-cell lymphoma with predominant red pulp involvement: a diffuse variant of splenic marginal zone lymphoma? *Histopathology* 2002; 40: 22-30.
 9. Matutes E, Wotherspoon A, Catovsky D. The variant form of hairy-cell leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2003; 16: 41-56.
 10. Colomo L, Loong F, Rives S, Pittaluga S, Martínez A, López-Guillermo A, et al. Diffuse large B-cell lymphomas with plasmablastic differentiation represent a heterogeneous group of disease entities. *Am J Surg Pathol* 2004; 28: 736-47.
 11. Gascoyne RD, Lamant L, Martín-Subero JI, Lestou VS, Harris NL, Muller-Hermelink HK, et al. ALK-positive diffuse large B-cell lymphoma is associated with Clathrin-ALK rearrangements: report of 6 cases. *Blood* 2003; 102: 2568-73.
 12. Owen RG, Treon SP, Al-Katib A, Fonseca R, Greipp PR, McMaster ML, et al. Clinicopathological definition of Waldenstrom's macroglobulinemia: consensus panel recommendations from the Second International Workshop on Waldenstrom's Macroglobulinemia. *Semin Oncol* 2003; 30: 110-5.
 13. Del Giudice I, Davis Z, Matutes E, Osuji N, Parry-Jones N, Morilla A, et al. IgVH genes mutation and usage, ZAP-70 and CD38 expression provide new insights on B-cell prolymphocytic leukemia (B-PLL). *Leukemia* 2006; 20: 1231-7.
 14. Ruchlemer R, Parry-Jones N, Brito-Babapulle V, Attolico I, Wotherspoon AC, Matutes E, Catovsky D. B-prolymphocytic leukaemia with t(11;14) revisited: a splenomegalic form of mantle cell lymphoma evolving with leukaemia. *Br J Haematol* 2004; 125: 330-6.
 15. Marti G, Abbasi F, Raveche E, Rawstron AC, Ghia P, Aurran T, et al. Overview of monoclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol* 2007; 139: 701-8.
 16. Cong P, Raffeld M, Teruya-Feldstein J, Sorbara L, Pittaluga S, Jaffe ES. In situ localization of follicular lymphoma: description and analysis by laser capture microdissection. *Blood* 2002; 99: 3376-82.

La trombocitopenia inducida por heparina. ¿Qué problemas prácticos plantea su diagnóstico y qué implicaciones tienen en el tratamiento?

M.ªF. LÓPEZ FERNÁNDEZ, J. BATLLE

Servicio de Hematología y Hemoterapia.

Complejo Hospitalario Universitario Juan Canalejo. A Coruña

Introducción

La trombocitopenia inducida por heparina (TIH) es un desorden protrombótico adquirido y transitorio, causado por anticuerpos IgG, que reconocen complejos multimoleculares del factor 4 plaquetario (F4P) unidos a heparina e inducen activación de plaquetar¹. Se caracteriza por la presencia de trombocitopenia, complicaciones trombóticas venosas y/o arteriales, asociadas a la presencia de autoanticuerpos IgG anti-F4P/heparina. Su evolución puede ser catastrófica, con una mortalidad del 20% y una incidencia de amputaciones del 2-3%.

Cuadro clínico

El perfil clínico de la TIH está bien definido y resumido en la regla nemotécnica conocida como las 4T: **T**rombocitopenia más **T**rombosis más **T** tiempo (momento de la aparición del cuadro en relación con la duración del tratamiento con heparina) y la ausencia de **O**tra explicación para el cuadro clínico².

La trombocitopenia inmune de la TIH, definida como un descenso del recuento plaquetario $\geq 50\%$, se presenta de forma típica entre el 4.º y 10.º día del tratamiento con heparina y se correlaciona con estudios serológicos en los que se demuestra la presencia de anticuerpos IgG-F4P/heparina. Es relativamente severa, con recuentos plaquetarios superiores a 20.000/ μ L (valor medio: 60.000/ μ L) y no se acompaña de sintomatología hemorrágica.

En un 3-5% de los casos la TIH aparece de forma diferida una vez suspendida la heparina (entre 9 y 40 días después; media: 14 días). Habitualmente se presenta en pacientes previamente expuestos a heparina que desarrollaron títulos altos de anticuerpos, en los que la TIH pasó desapercibida, y que reingresan con una trombosis arterial o venosa que se asocia a trombocitopenia tras la reexposición a heparina³. En otro 30%, la TIH aparece de forma brusca tras el inicio de la heparina (media: 10,5 h). Se observa al reexponer a heparina a pacientes con anticuerpos persistentes tratados con heparina en los 3 meses previos⁴. En algunos pacientes la administración de heparina se acompaña de un cuadro clínico de aparición brusca, a los pocos minutos de administrar la heparina, co-

nocido como reacción inflamatoria sistémica aguda. Fiebre, escalofríos, taquicardia, hipertensión, taquipnea, disnea, parada cardiorrespiratoria, cefalea, amnesia y diarrea son algunos de los síntomas y signos que pueden observarse asociados a descenso brusco de las plaquetas en este síndrome⁵.

A partir de todo lo anterior se recomienda efectuar recuentos plaquetarios en: 1) todos los pacientes antes del inicio de la heparina; 2) a las 24 h, en aquellos pacientes expuestos a heparina en los 100 días previos a la reexposición; 3) cada 48 h, en todos los pacientes que reciben heparina no fraccionada (HNF) entre los días 4 y 14 de tratamiento; 4) cada 48 h, en los pacientes quirúrgicos y médicos que reciben heparinas de bajo peso molecular (HBPM), entre los días 4 y 14. No son necesarios recuentos plaquetarios rutinarios en pacientes obstétricas⁶.

La trombosis arterial o venosa es la complicación más grave asociada a la TIH. Se presenta habitualmente entre el día 5.º y el 14.º del inicio de la heparina, en ocasiones con recuentos plaquetarios normales, y se localiza en el territorio venoso en el 61% de los casos y en el sistema arterial en el 14%⁷. Aproximadamente en el 50% de los pacientes, la TIH se diagnostica una vez ha presentado la complicación trombótica. Las manifestaciones más frecuentes de la trombosis venosa son la trombosis venosa profunda (TVP) en miembros inferiores y el embolismo pulmonar (EP). El EP es la causa más frecuente de mortalidad en estos pacientes, con una incidencia del 25%⁶. Otras posibles localizaciones son la TVP en miembros superiores y la trombosis de los senos venosos. Un episodio trombótico recurrente en pacientes con trombocitopenia que reciben dosis profilácticas o terapéuticas de heparina sugiere una TIH más que un fallo de la anticoagulación⁸.

La trombosis arterial puede manifestarse en forma de accidente cerebrovascular (ACV) (6%), infarto de miocardio (2,3%), isquemia de miembros inferiores (16,4%) que requiere amputación en el 2-3% de los casos, o infartos en diferentes órganos⁸.

Los episodios trombóticos de repetición y la asociación de trombosis arteriales y venosas en un mismo paciente son relativamente frecuentes, con un índice aproximado trombosis/paciente de 1,9⁸.

Otras posibles manifestaciones son la necrosis cutánea, presente en el 10-20% de los pacientes que re-

ciben HNF o HBPM, y la necrosis hemorrágica adrenal, con una incidencia del 3-5%⁹.

Microtrombosis inducida por cumarínicos. Existen dos formas de necrosis inducidas por cumarínicos: la necrosis cutánea clásica y la gangrena venosa de miembros inferiores (necrosis acral de la extremidad localizada habitualmente en una extremidad con TVP). Se debe a un desequilibrio del balance procoagulante-anticoagulante, en relación con el síndrome de hipercoagulabilidad inducido por la TIH, con incremento de la generación de trombina, y a un compromiso de la vía de la proteína C inducido por los dicumarínicos, que resulta en la formación de trombos en la microcirculación. Se presenta preferentemente en pacientes con INR > 5. Para su prevención se recomienda no iniciar los antagonistas de la vitamina K (AVK) hasta que las plaquetas sean > 100.000/ μ L y prolongar el tratamiento antitrombótico alternativo hasta la completa estabilización del INR¹⁰.

Métodos diagnósticos

El diagnóstico de TIH, basado únicamente en datos clínicos, no es fácil. En un estudio prospectivo en el que se incluyeron 497 pacientes con sospecha de clínica de TIH, en un tercio de los casos el estudio serológico no mostró la presencia de anticuerpos contra el complejo F4P/heparina⁶. Por ello se precisa disponer de un método de laboratorio que confirme el diagnóstico.

Para el diagnóstico de la TIH disponemos de dos grupos de pruebas de laboratorio: los métodos funcionales, como el test de liberación de serotonina (SRA), con una alta sensibilidad y especificidad, pero con metodología cara y compleja, y no siempre disponibles o restringidas a laboratorios especializados, y los métodos inmunológicos, rápidos y relativamente sencillos, también muy sensibles (91-97%) pero con baja especificidad (50%)¹¹. Existen diferentes métodos comerciales capaces de detectar, por enzimo-inmunoanálisis (EIA) o aglutinación de partículas coloreadas, los anticuerpos que reaccionan con complejos inmovilizados de F4P/heparina o F4P/polianiones. La frecuencia de resultados positivos difiere según la especificidad del método utilizado con el siguiente orden: anti-F4P/heparina IgG/A/M > anti-F4P/heparina IgG > método funcional (SRA), siendo la prueba funcional la que mejor se correlaciona con cuadro clínico de la TIH.

Los métodos comerciales detectan los tres tipos de inmunoglobulinas, IgG, IgA e IgM. Sin embargo, es bien conocido que sólo un subtipo de anticuerpos anti-F4P/heparina del tipo IgG es capaz de producir una significativa activación de las plaquetas y por tanto la TIH¹². Por el contrario, anticuerpos del

tipo IgA, IgM o algunas subclases de IgG, presentes en muchos pacientes, no activan las plaquetas o lo hacen débilmente, por lo que no causan TIH¹². Esto es especialmente evidente en pacientes postoperados cardíacos que han recibido HNF, donde la presencia de seroconversión subclínica puede ser incluso superior al 50%¹³. Ya que la trombocitopenia es frecuente en pacientes hospitalizados y puede explicarse por otras alternativas, se corre el riesgo de sobrediagnosticar TIH en pacientes con serologías positivas¹⁴.

El diagnóstico de TIH basándose únicamente en trombocitopenias y serología positivas debe evitarse.

- En primer lugar, porque el diagnóstico de TIH tiene un gran impacto en futuros tratamientos, ya que muchos médicos son reticentes a reutilizar heparina en estos pacientes.

- En segundo lugar, porque en la TIH aguda se requiere un tratamiento anticoagulante alternativo. Los anticoagulantes no heparínicos disponibles en la actualidad confieren un significativo incremento de las manifestaciones hemorrágicas, especialmente en pacientes en los que el descenso de plaquetas puede ser debido a otras causas y en los que la positividad de los anti-F4P/heparina puede ser un epifenómeno aislado. El riesgo de hemorragia mayor por día de tratamiento en pacientes con TIH y trombosis se estima en un 1,03% para la lepirudina y en un 0,84% para el argatroban, y en pacientes con trombocitopenia aislada, en un 0,97% y un 1,25%, respectivamente¹⁵.

De todo lo anterior se deduce que la presencia de anticuerpos inducidos por heparina, determinados por EIA, en ausencia del cuadro clínico característico, no son suficientes para el diagnóstico de TIH. Sin embargo, dado que este método posee un alto valor pronóstico negativo (> 95%), la negatividad de la prueba excluirá con seguridad el diagnóstico. Con el fin de optimizar los resultados de los métodos diagnósticos, se recomienda efectuar pruebas funcionales y, cuando éstas no están disponibles, evitar emitir los resultados de la prueba serológica (EIA) como "positivos", indicando las densidades ópticas (DO) obtenidas¹⁶.

Diagnóstico de la TIH

Para facilitar el diagnóstico se ha diseñado un "score clínico" que se debe realizar previamente a la solicitud de la prueba de laboratorio ante toda sospecha de TIH⁵. La puntuación de los criterios clínicos (4T) tal y como se indica en la Tabla 1, permite clasificar a los pacientes en: baja, moderada y alta probabilidad de TIH. Dado que entre los pacientes con baja probabilidad de TIH sólo un 0,9% tiene un incremento significativo de anticuerpos anti-F4P/heparina, parece razonable limitar su determinación, para confirmar el diagnóstico, a pacientes con "scores clíni-

Tabla 1. Pretest clínico para la sospecha de TIH²

Características clínicas	Puntuación
Trombocitopenia:	
• Descenso plaquetario > 50% o plaquetas > 20.000	+2
• Descenso plaquetario = 30-50% o 10.000-19.000 plaquetas	+1
• Descenso plaquetario < 30% o < 10.000 plaquetas	0
Momento del descenso plaquetario:	
• Claro descenso a los 5-10 días o descenso en ≤ 1 día en pacientes que recibieron heparina en los previos 30 días	+2
• Probable descenso a los 5-10 días pero con datos no claros (ausencia de recuentos plaquetarios) o descenso después del día 10 o descenso en ≤ 1 día en pacientes que recibieron heparina entre los 30 y los 100 días previos	+1
• Descenso plaquetario en < 4 días sin exposición previa	0
Trombosis u otras secuelas:	
• Nueva trombosis confirmada, necrosis cutánea o reacción inflamatoria aguda postinfusión de HNF en bolo	+2
• Trombosis recurrente o progresiva, lesiones cutáneas no necrotizantes (eritematosas) o sospecha de trombosis no confirmada con métodos objetivos	+1
• Ninguno	0
Presencia de otras causas de trombocitopenia:	
• Ninguna aparente	+2
• Posible	+1
• Definitiva	0
Pretest clínico:	score
• Baja probabilidad	0-3
• Moderada probabilidad	4-5
• Alta probabilidad	6-8

cos” de moderada o alta probabilidad que se relacionan en el 75% de los casos con DO > 1 o > 1,2 en los métodos de EIA¹⁶ (Figura 1).

La sospecha de TIH, en aproximadamente la mitad de los pacientes, se basa en la observación de una trombocitopenia “aislada”. En estos casos, cuando coexisten DO > 1, el riesgo de presentar un episodio trombotico sintomático en los 30 días siguientes a la suspensión de la heparina es del 36%^{2,8}, por lo que la suspensión de la heparina no es una medida terapéutica suficiente.

El 55,6% de los pacientes presentan una trombo- sis asociada a la TIH (TIH-T)⁸. Aunque habitualmente la trombocitopenia precede al episodio trombotico, en un 26,3% de los casos el diagnóstico se efectúa simultáneamente y en el 33,5% el descenso del recuento plaquetario se objetiva después de haber sido diagnosticado el episodio trombotico¹¹. Por lo tanto, en aquellos pacientes con un episodio trombotico diagnosticado entre el 5.º y el 14.º día (o incluso después) de iniciada la heparina, aunque no se observe trombocitopenia, debe investigarse una TIH-T. En estos casos la trombocitopenia se suele manifestar al administrar dosis terapéuticas de heparina indicadas para el tratamiento de la trombo- sis. Dado que la duración del tratamiento antitrombotico, en muchos casos, va a venir determinado por la presencia o no de una trombo- sis, debe confirmarse su diagnóstico por un método de imagen objetivo^{6,17}. Ante la alta

incidencia de trombo- sis venosa se recomienda también la realización de eco-Doppler en todos los casos de TIH aislada^{6,17}.

Tratamiento

La primera medida que debe tomarse ante un paciente con TIH es la inmediata suspensión de todo tipo de heparina, incluyendo la administración de bolos de heparina o la administrada para mantener la permeabilidad de los catéteres^{6,17}. Deben evitarse también las HBPM, ya que presentan reacción cruzada *in vivo* en aproximadamente el 50% de los casos y favorecen la producción de anticuerpos. La hemorragia es infrecuente en la TIH, y la transfusión de concentrados de plaquetas pueden contribuir a incrementar el riesgo trombotico, por lo que está relativamente contraindicada^{6,17}.

La suspensión de la heparina no previene la aparición de episodios tromboticos, ni su progresión o recurrencia, como lo evidencia el hecho de que el 61% de los episodios tromboticos tienen lugar en las primeras 24 h (media: 0,7 días) tras su retirada. Por tanto, es necesario instaurar lo antes posible un tratamiento antitrombotico alternativo, no sólo en pacientes con TIH-T, sino también en aquellos con TIH sin evidencia de trombo- sis, ya que dosis profilácticas de anticoagulación no son suficientes para prevenir la aparición de nuevos

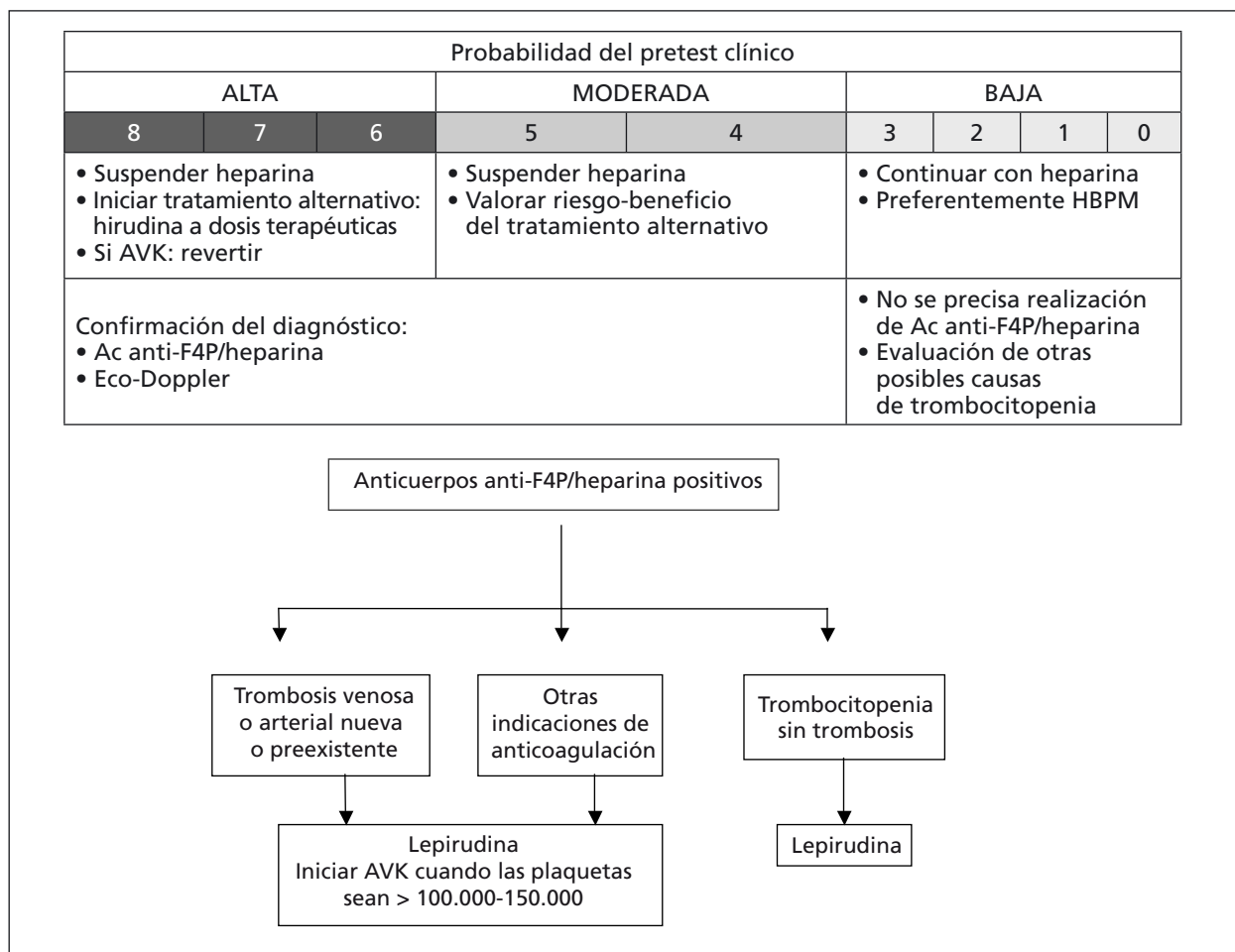


Figura 1. Algoritmo diagnóstico de la TIH. Ac: anticuerpos; AVK: antagonistas de la vitamina K; F4P: factor 4 plaquetario.

episodios trombóticos¹⁸ (Figura 1). En pacientes con *scores* de alta probabilidad debe iniciarse incluso antes de disponer de los resultados de las pruebas de laboratorio. El tratamiento debe mantenerse hasta la completa recuperación de las plaquetas^{6,17}.

En España el anticoagulante alternativo disponible para el tratamiento de la TIH es la lepirudina (Refludin®). Es un péptido de unos 7.000 Da obtenido por tecnología recombinante que actúa inhibiendo de forma irreversible la trombina libre y unida al coágulo. Tiene una vida media de 60-90 minutos y se excreta por el riñón.

Se ha demostrado su eficacia en tres estudios retrospectivos, *HAT1-3*, y dos metaanálisis, en los que se incluyeron pacientes con TIH aislada, TIH-T y cirugía en *bypass* cardiopulmonares¹⁵. La administración de lepirudina (0,1-0,4 mg/kg en bolo seguido de una infusión continua de 0,1 a 0,15 mg/kg/h) se asoció con un incremento rápido y significativo del recuento plaquetario en el 89% de los pacientes y una reducción significativa de la mortalidad, número de amputaciones y episodios tromboembólicos, en comparación con el

grupo control, que recibió danaparoides (25-30% vs. 52% en el día 35)¹⁵. Cuando el análisis se efectuó de forma individualizada para cada una de las variables, sólo se observó una reducción significativa de las complicaciones trombóticas. El test de la ecarina es el método más adecuado para mantener el adecuado nivel de anticoagulación. El análisis combinado de los tres estudios prospectivos puso en evidencia un incremento significativo de las complicaciones hemorrágicas, en pacientes tratados con lepirudina en comparación con el grupo control (17,6% vs. 5,8%)¹⁵, por lo que se recomienda eliminar el bolo inicial y reducir la dosis de la infusión a 0,1 mg/kg/h con estricto control del test de la ecarina posteriormente. Asimismo, debe tenerse una especial precaución en pacientes con insuficiencia renal, ya que la droga se elimina por el riñón y puede acumularse, y el efecto anticoagulante no se revierte fácilmente. Solo un 0,015% de los pacientes tratados por primera vez con este agente, y el 0,16% de los sometidos a un reexposición, presentaron complicaciones anafilácticas, a pesar de la alta incidencia de anticuerpos anti-hirudina detectados¹⁹.

Aunque las publicaciones disponibles con **fondaparinux** son limitadas, este pentasacárido puede teóricamente jugar un papel importante en el tratamiento de la TIH, ya que, aunque puede interactuar con el F4P, su longitud inferior a 10-12 sacáridos es insuficiente para generar anticuerpos anti-F4P/heparina^{8,19}. Otros agentes como el **danaparoides**, la **bivalirudina** o el **argatroban** se han utilizado con éxito en algunos pacientes con TIH.

Conclusiones

1. Se debe utilizar siempre que sea posible HBPM en lugar de HNF.

2. Si se objetiva un descenso de las plaquetas $\geq 50\%$ y/o se produce un nuevo episodio trombótico o una reacción cutánea entre el 4.º y el 14.º día del inicio de la heparina, debe sospecharse una TIH, y realizar el "score clínico". Grado C, nivel IV.

3. Si el pretest clínico es de probabilidad alta o moderada, se suspenderá la heparina y se iniciará el tratamiento antitrombótico alternativo con lepirudina a dosis terapéuticas, salvo contraindicaciones. Grado B, nivel III.

4. La confirmación del diagnóstico viene dada por la probabilidad clínica de TIH conjuntamente con la presencia de anticuerpos anti-F4P/heparina, determinados mediante una prueba funcional como la liberación de serotonina o EIA. En este caso, $DO > 1$ sugieren el diagnóstico de TIH. Grado C, nivel III.

5. Una trombocitopenia aislada puede ser debida a múltiples causas y la lepirudina incrementa el riesgo hemorrágico, por lo que debe evitarse el diagnóstico de TIH en pacientes con *scores* de baja probabilidad y DO en los tests de EIA < 1 .

6. Las trombosis deben ser confirmadas por un método de imagen objetivo. En pacientes asintomáticos (TIH aisladas), se efectuará un eco-Doppler de compresión.

7. No deben administrarse concentrados de plaquetas de forma profiláctica. Grado C, nivel IV.

8. La lepirudina debe administrarse inicialmente en dosis ajustadas al peso del paciente y posteriormente manteniendo rangos del test de la ecarina comprendidos entre 1,5 y 2,5. Grado B, nivel III

9. No se ha de iniciar la anticoagulación oral hasta que los recuentos plaquetarios sean > 100.000 . Deben evitarse $INR > 5$ y mantener el anticoagulante alternativo hasta que el INR esté en rango terapéutico en al menos dos determinaciones. Grado C, nivel IV.

Bibliografía

1. Amiral J, Bridley F, Dreyfuss M, Vissoc AM, Fressinaud E, Wolf M, Meyer D. Platelet factor 4 complexed to heparin is

- the target for antibodies generated in heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 1991; 10: 1-34.
2. Lo GK, Juhl D, Warkentin TE, Eichler P, Greinacher A. Evaluation of pretest clinical score (4Ts) for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia in two clinical sitting. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 759-65.
3. Warkentin TE, Kelton JG. Delayed-onset heparin-induced-thrombocytopenia and thrombosis. *Ann Intern Med* 2001; 135: 502-6.
4. Lubenow N, Kempf R, Eichner A, Eichler P, Carlsson LE, Greinacher A. Heparin-induced thrombocytopenia: temporal pattern of thrombocytopenia in relation to initial use or reexposure to heparin. *Chest* 2002; 122: 37-42.
5. Mims MP, Manian P, Rice L. Acute cardiorespiratory collapse from heparin: a consequence of heparin-induced thrombocytopenia. *Chest* 2005; 127: 1857-61.
6. Keeling D, Davidson S, Watson H; on behalf of the Haemostasis and Thrombosis Task Force of the British Committee for Standardization in Haematology. The management of heparin-induced thrombocytopenia. *Br J Haematol* 2006; 133: 259-69.
7. Warkentin TE, Kelton JG. A 14-year study of heparin induced thrombocytopenia. *Am J Med* 1996; 101: 502-7.
8. Greinacher A, Farner B, Kroll H, Kohlmann T, Warkentin TE, Eichler P. Clinical feature of heparin-induced thrombocytopenia including risk factors for thrombosis. A retrospective analysis of 408 patients. *Thromb Haemost* 2005; 94: 132-5.
9. Warkentin TE, Roberts RS, Hirsh J, Kelton JG. Heparin-induced skin lesions and other unusual sequelae of the heparin-induced thrombocytopenia syndrome: a nested cohort study. *Chest* 2005; 127: 1857-61.
10. Warkentin TE. Coumadin-induced skin necrosis and venous limb gangrene. En: Colman RW, Marder VJ, Clowes AW, George JN, Goldhaber SZ (eds.). *Haemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006: 1663-71.
11. Arnold DM, Kelton JG. Testing for heparin-induced thrombocytopenia: are we there yet? *J Thromb Haemost* 2007; 5: 1371-2.
12. Lo GK, Sigouin CS, Warkentin TE. What is the potential for overdiagnosis of heparin-induced thrombocytopenia? *Am J Haematol* 2007; 82: 1037-43.
13. Warkentin TE, Sheppard JL, Horsewood P, Simpson PJ, Moore JC, Kelton JG. Impact of the patient populations on the risk for heparin induced thrombocytopenia. *Blood* 2006; 96: 1703-8.
14. Greinacher A. Too many hits in HIT? *Am J Haematol* 2007; 82: 1035-6.
15. Lubenow N, Eichler P, Lietz T, Farner B, Greinacher A. Lepirudin in patients with heparin-induced thrombocytopenia. Results of the third prospective study (HAT 3) and a combined analysis of HAT-1, HAT-2 and HAT-3. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 2428-36.
16. Zwicker JJ, Uhl L, Huang WY, Shaz BH, Bauer KA. Thrombosis and ELISA optical density values in hospitalized patients with heparin-induced thrombocytopenia. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 2133-7.
17. Warkentin TE, Greinacher A. Heparin induced thrombocytopenia: recognition, treatment and prevention. The Seven ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic therapy. *Chest* 2004; 126: 311S-37S.
18. Lubenow N, Eichler P, Lietz T, Farner B, Greinacher A. Lepirudin for prophylaxis of thrombosis in patients with acute isolated heparin-induced thrombocytopenia: an analysis of 3 prospective studies. *Blood* 2004; 104: 3072.
19. Greinacher A, Vilpel H, Lubenow N, Kwasny H, Luz M. Heparin induced thrombocytopenia with thrombotic complications: meta-analysis of 2 prospective trials to assess the value of parenteral treatment with lepirudin and its therapeutic APTT range. *Blood* 2000; 96: 846-51.

Factor XIII de la coagulación en la diátesis hemorrágica y en trombosis: ¿pensamos en él?

F.J. RODRÍGUEZ MARTORELL

Servicio de Hematología. Hospital Universitario Puerta del Mar. Cádiz

Introducción

La hemostasia es un proceso dinámico en el tiempo y en el espacio en el que se integran diferentes mecanismos moleculares sobre superficies celulares¹ (la membrana plaquetaria o las células endoteliales, principalmente) con una doble finalidad: mantener la sangre en estado líquido para que realice sus funciones fisiológicas y favorecer su coagulación cuando aparece una lesión vascular para impedir la hemorragia. La coagulación plasmática es una de las fases de la hemostasia y su etapa final es la generación de una malla tridimensional de fibrina.

El factor XIII es una proteína con actividad transglutaminasa presente en el plasma, los megacariocitos, las plaquetas y los monocitos, donde se encuentra en forma de proenzima. Las transglutaminasas son enzimas que catalizan el entrecruzamiento de otras proteínas modificando sus propiedades. También se las denomina “factor estabilizante de la fibrina”, ya que su función principal es establecer puentes ϵ -(γ -glutamil)-lisina mediante enlaces covalentes en el polímero de fibrina soluble originando una estructura tridimensional más estable y resistente a la fibrinólisis^{2,3}.

Estructura y función. Polimorfismos

El factor XIII circula en plasma en forma de un heterotetramero, compuesto por 2 subunidades A y 2 subunidades B (A_2B_2)⁴. Las subunidades A son las funcionalmente activas y son sintetizadas por los megacariocitos y los precursores monocíticos en la médula ósea, así como en la placenta. Las subunidades B son sintetizadas por los hepatocitos y tienen capacidad transportadora y reguladora. El tetramero se ensambla en el plasma, donde tiene una prolongada vida media de 7-14 días y en gran parte circula unido al fibrinógeno. Se pueden encontrar homodímeros A_2 en las plaquetas y los monocitos circulantes, representando el 50% de la actividad total, así como en hígado, placenta, útero, próstata y dendrocitos cutáneos (“transglutaminasa tisular”).

La activación del factor XIII (Figura 1) es iniciada por la trombina, que libera un péptido de activación al romper el enlace Arg37-Gly38 de cada una de las

subunidades A. Posteriormente se disocian las subunidades B por acción del calcio, el cual también causa cambios conformacionales en la molécula que facilitan el acceso del sitio activo a su sustrato. El factor XIII plaquetario sufre una activación no proteolítica tras la movilización intracelular del calcio y su elevación en el citosol.

El factor XIIIa establece un enlace (“entrecruza”) entre la lisina de una cadena- γ con una glutamina de otra cadena- γ mediante transamidación. Además, se establecen enlaces entrecruzados adicionales entre cadenas α - α , α - γ y cadenas α con α_2 -antiplasmina o con fibronectina, aumentando la complejidad de la malla de fibrina así como su resistencia a la tracción mecánica y a la fibrinólisis. Las cadenas γ de la fibrina también son entrecruzadas con la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ de las plaquetas, anclando éstas a la malla y favoreciendo la retracción del coágulo, acercando los bordes de la herida. El anclaje de la fibronectina, una proteína adhesiva, favorece la migración celular, sobre todo de células musculares lisas, facilitando la reparación tisular y la cicatrización. La unión de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ con VEGFR-2 tendría además un efecto angiogénico⁵.

El factor XIII puede actuar sobre otras múltiples proteínas como sustrato, incidiendo en múltiples funciones del organismo. Una especialmente relevante es su papel facilitador del implante placenta-

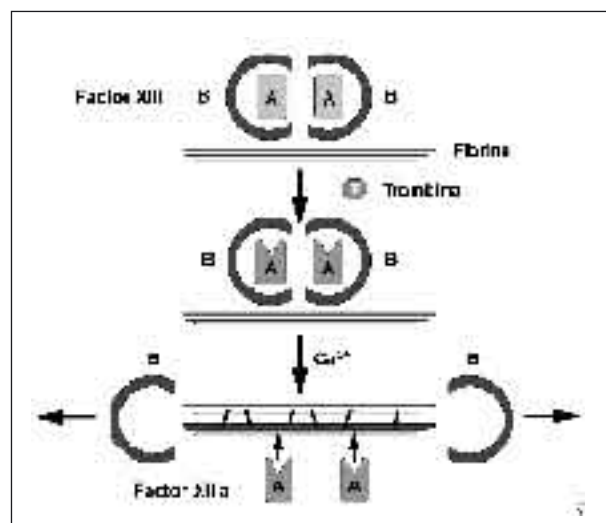


Figura 1. Activación del factor XIII de manera secuencial: liberación del péptido de activación de las subunidades A por la trombina, con posterior separación de las subunidades B por el calcio.

Tabla 1. Polimorfismos del factor XIIIa

Exón	Número de aa	Variantes
2	34	Val/Leu
3	77	Arg/Gly
3	78	Arg/Lys
3	88	Leu/Phe
5	204	Tyr/Phe
12	564	Pro/Leu
14	650	Val/Ile
14	651	Glu/Gln

aa: aminoácidos

rio⁶. Así, el factor XIII se ha encontrado en la decidua placentaria y en las semanas 5 a 8 de la gestación parece que, junto al fibrinógeno y la fibronectina, es necesario para la invasión y anclaje del citotrofoblasto en el endometrio.

De los mecanismos fisiológicos de control se conoce bastante poco. El dominio carboxiterminal presenta cierta homología con la zona de unión al receptor de la α_2 -macroglobulina, por lo que podría ser removido de la circulación a través de dicho receptor en el hígado y otros tejidos. Por otra parte, el óxido nítrico inhibe su actividad por nitrosilación de los grupos thiol de los residuos de cisteína, inhibiendo la estabilización del coágulo. Muy recientemente, se ha demostrado que las proteasas leucocitarias (elastasa, cathepsina-G, MMP-9) liberadas por los neutrófilos en el coágulo lisan el factor XIIIa y lo inactivan⁷ pudiendo ser su regulador fisiológico.

La incorporación de estudios de laboratorio funcionales en la cuantificación del factor XIII permitió detectar variaciones de hasta 8 veces en la población normal, no teniendo correlación con los niveles antigénicos. Algunas de estas variaciones sí se han podido correlacionar con variantes alélicas o polimorfismos en diferentes aminoácidos de la cadena proteica del factor XIII (Tabla 1)⁸. Las variantes con mayor significación han sido los polimorfismos ^{Val34}Leu y ^{Leu564}Pro cuyas variedades con Leu expresan una elevada actividad plasmática, y el polimorfismo ^{Tyr204}Phe, cuya variante con Phe expresa niveles funcionales plasmáticos más bajos y se ha relacionado recientemente con abortos de repetición y, paradójicamente, con ictus isquémico.

Déficit hereditario de factor XIII

Descrita por Duckert en 1960, es una diátesis hemorrágica muy infrecuente, de transmisión autosómica recesiva y con una prevalencia estimada de 1 caso entre cada 2-3 millones de habitantes^{3,9}.



Figura 2. Mutaciones descritas en el gen F13A como causa de déficit hereditario de factor XIII. Fuente: Nugent¹².

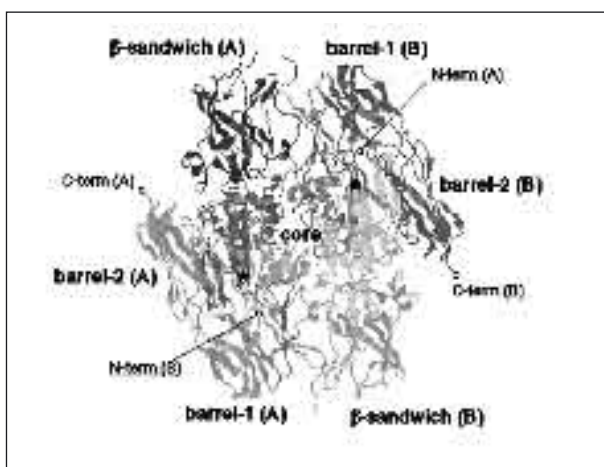


Figura 3. Estructura tridimensional del factor XIIIa. Consta de 5 dominios: péptido de activación (residuos 1-37), β -sandwich (38-183), núcleo central (184-513), "barrel-1" (514-628) y "barrel-2" (629-731). El dominio "central core" (núcleo central) contiene el sitio activo (Cys314) y dos residuos adicionales importantes para la actividad enzimática (His373, Asp396). Fuente: Ichinose².

Es causada por mutaciones en cualquiera de los 2 genes que codifican para sus 2 subunidades constitutivas (Figura 2). En la mayoría de los casos se debe a mutaciones del gen de la subunidad A, localizado en 6p24-25, donde se han descrito más de 60 mutaciones distribuidas a lo largo de todo el gen, la mitad de las cuales son de tipo *missense*. Los cambios originados en el dominio nuclear de la subunidad A (Figura 3) causan un severo defecto funcional. Más raramente se han identificado mutaciones del gen de la subunidad B, localizado en 1q31-32, que provocan un déficit de la subunidad transportadora B y, como consecuencia, una reducción de los niveles plasmáticos de las subunidades A por inestabilidad, con acortamiento de la vida media y un fenotipo clínico menos severo. La generalización de los estudios genéticos ha detectado la doble heterocigosidad en muchos casos, eliminando la consideración de la obligatoria consanguinidad.

Tabla 2. Medidas terapéuticas en el déficit de factor XIII

Medidas locales (taponamiento, gel de fibrina)
Antifibrinolíticos (EACA, AMCHA) como adyuvantes
Tratamiento sustitutivo: <ul style="list-style-type: none"> · Plasma · Crioprecipitado · Factor plasmático pasteurizado (Fibrogammin®) · FXIIIa recombinante (ensayo clínico)
Pacientes con déficit adquirido: asociar corticoides, inmunosupresores, plasmaféresis, etc.

AMCH: ácido tranexámico; EACA: ácido ϵ -aminocaproico; FXIIIa: factor XIIIa.

Desde el punto de vista clínico^{3,9,10}, se caracteriza por una diátesis hemorrágica grave de inicio precoz: frecuentemente la primera manifestación es el sangrado por el cordón umbilical, que se presenta hasta en el 80% de los casos. Son frecuentes también las equimosis y los hematomas de partes blandas, así como las gingivorragias durante la dentición. La hemorragia intracraneal espontánea recurrente se produce hasta en el 30% de los pacientes con déficit grave, puede dejar secuelas neurológicas graves y posee una alta tasa de mortalidad, lo que justifica *per se* el tratamiento “profiláctico” en esta entidad. Los hemartros aparecen en un 20% de los casos, pero no son tan frecuentes como en la hemofilia. El sangrado tardío (demora de 12-36 horas) tras un traumatismo o una cirugía es muy característico de este déficit. Puede aparecer menorragia o sangrado intraabdominal durante la menstruación, pero son mucho más característicos los abortos de repetición, que sufren hasta el 80% de las mujeres con este déficit. Un grupo de pacientes refiere también defectos en la cicatrización de heridas.

El estudio basal de coagulación (tiempo de protrombina, tiempo parcial de tromboplastina, tiempo de trombina, cuantificación del fibrinógeno por el método de Clauss) es rigurosamente normal, ya que la fibrinoformación inicial no está afectada. Los tests de escrutinio de la hemostasia primaria (tiempo de hemorragia, PFA) son también normales.

El test de *screening* habitualmente usado para su detección es el “test de estabilidad del coágulo”. Sin embargo, dicho test no está completamente estandarizado y según los centros se usan diferentes sustancias tanto para generar el coágulo (trombina, calcio o ambas) como para solubilizarlo (urea 5 molar, ácido monocloroacético al 1%, ácido acético al 2%), lo que interfiere en la sensibilidad global del test¹¹, por lo que se recomienda como combinación más sensible la trombina sin calcio y el ácido acético, que detectan todos los casos con niveles de factor XIII inferiores al 2%.

El diagnóstico debería confirmarse con un test funcional, existiendo kits comerciales basados en dos mé-

todos: la incorporación de aminos sintéticas a un coágulo de fibrina o la medición de la liberación de ión amonio por la reacción de transamidación. Se dispone asimismo de la medición por ELISA de los niveles antigénicos de los factores XIIIa y XIIIb, pero no tienen una correlación completa con los tests funcionales.

El diagnóstico diferencial se plantea con déficits adquiridos del factor XIII o con otros cuadros hemorrágicos que cursen con tests de *screening* normales (como las hipo o las disfibrinogenemias, y los raros déficits de α_2 -antiplasmina o de PAI-1). Respecto a los déficits adquiridos, se han descrito inhibidores en cuadros autoinmunes o en gammopatías monoclonales, pero los más frecuentes son IgG neutralizantes desencadenados por la administración de isoniazida. Se han descrito también déficits adquiridos no inmunes en las hepatopatías, CID y, de forma muy característica, en la enfermedad inflamatoria intestinal (con los niveles más bajos en los brotes) y en la púrpura de Schönlein-Henoch. En ellos pueden aparecer complicaciones hemorrágicas con niveles plasmáticos de factor XIII más altos (> 5%).

El tratamiento (Tabla 2) se basa en el aporte del factor deficitario. Como fuente del mismo se han utilizado el plasma y el crioprecipitado, pero hoy día se considera de elección el concentrado comercial de origen plasmático purificado sometido a pasteurización como método de inactivación viral (Fibrogammin®). Debido a que niveles plasmáticos del 3-5% son suficientes para una correcta hemostasia, la prolongada vida media del factor infundido (7-12 días) y la frecuencia y gravedad de las hemorragias intracraneales espontáneas, la profilaxis, con administración de 10-35 UI/kg cada 4-6 semanas y ajuste según niveles plasmáticos (con métodos funcionales) y por respuesta clínica, se considera hoy universalmente la pauta de elección^{3,9,12}. Es necesario recordar que en el embarazo la vida media del fármaco está acortada, por lo que habrá que administrarlo a intervalos más cortos. En el momento del parto se debe dar un bolo previo de 35 UI/kg. Recientemente se han publicado recomendaciones específicas para el manejo de la gestación en pacientes con este déficit de cara a evitar los abortos de repetición¹³. Un bolo similar se recomienda antes de una intervención quirúrgica. En los niños los datos farmacocinéticos son diferentes y, aunque se ha estudiado poco, parece más recomendable administrar 50 UI/kg cada 4 semanas¹⁴.

Si no se dispone del factor comercial, ante una urgencia se puede administrar plasma⁴ “crudo” (2-3 mL/kg peso) o inactivado con solvente-detergente (1 U de 200 mL), opciones estas que aportan el factor XIII suficiente para sobrepasar el margen de seguridad del 5%.

Recientemente se están realizando ensayos clínicos con un homodímero A (A₂) recombinante con resultados aún muy preliminares¹⁵.

Otras medidas terapéuticas son comunes con otras diátesis hemorrágicas. Especialmente útiles como fármacos adyuvantes son los antifibrinolíticos⁴, sobre todo en sangrados mucosos o tras cirugía orodental. Se recomienda un bolo de 5 g de ácido ϵ -aminocaproico (EACA), seguido de una infusión continua de 1 g/hora, o ácido tranexámico (AMCHA) 1,5 g/8 horas vía oral o i.v.

Respecto al tratamiento de los pacientes con inhibidor, se han ensayado dosis altas de factor XIII, corticoides, inmunosupresores, plasmaféresis e inmunoadsorción, pero en general los resultados son desfavorables^{16,17}.

Polimorfismos del factor XIII y enfermedad

Un aspecto controvertido acerca del factor XIII es la influencia que los polimorfismos genéticos del mismo podrían tener en la incidencia de complicaciones trombóticas (ETE, IAM, ACVA isquémico) o de hemorragia intracraneal espontánea.

El polimorfismo analizado en más estudios es el Val34^{Leu}, que afecta a un 25% de la población caucásica, siendo más raro en otros grupos étnicos. Afecta al péptido de activación y en las variantes con Leu la escisión del mismo por la trombina ocurre hasta 2,5 veces más rápido; sin embargo, los niveles de actividad funcional del factor XIII en plasma son similares¹⁸. A esta variante alélica se le adjudicó en algunos trabajos preliminares una cierta "capacidad protectora" frente a eventos trombóticos, tanto venosos como arteriales, pero existe gran controversia sobre este tema en la bibliografía¹⁹. Muy recientemente se han publicado dos metaanálisis independientes que evalúan el efecto de este polimorfismo sobre la incidencia de patología trombótica coronaria^{20,21}. En ambos casos se demuestra un descenso muy leve (15-20%; *odds ratios*: 0,79-0,81; 0,82-0,89) para los individuos con variantes Leu34 (heteros u homocigotos) respecto a la variante con Val34 homocigota. El mismo discreto efecto protector se ha encontrado sobre la aparición de enfermedad tromboembólica venosa en otro metaanálisis reciente²² (*odds ratios*: 0,89-0,85). En cualquier caso, ninguno de los estudios parece justificar la necesidad de analizar este polimorfismo dentro de los estudios de trombofilia hereditaria. Aún dificulta más la interpretación de estos resultados epidemiológicos el hecho de que las variantes Leu34 originan una malla de fibrina menos porosa²³, lo que explicaría la mayor resistencia descrita al tratamiento fibrinolítico del IAM en los sujetos con esta variante²⁴, pero no su efecto "protector" contra la trombosis. A este respecto, algunos trabajos indican que la carga genética del factor XIII se puede ver influida en su expresivi-

dad clínica por otros factores genéticos o ambientales¹⁸, entre los que el fibrinógeno parece ser muy relevante²⁵.

Por otra parte, dado el conocido riesgo de hemorragia intracraneal espontánea de los déficits de factor XIII, también se ha investigado ampliamente el posible papel de sus polimorfismos genéticos en la aparición de hemorragia intracraneal o de ACVA isquémico. En este campo los resultados también han sido controvertidos y así, mientras un metaanálisis reciente muy amplio con 18.000 pacientes²⁶ descarta un papel del gen del factor XIII en la aparición de ACVA isquémico, otro estudio muy reciente de casos y controles con unas 1.000 mujeres²⁷ encuentra un *odds ratio* de 9,1 para el polimorfismo Phe204 frente al Tyr204, con aparición de sinergias (*odds ratio*: 20) con la toma de anticonceptivos orales. Igualmente controvertida es su posible implicación en facilitar los abortos de repetición²⁸. Tanta controversia sugiere que el efecto, de existir, posiblemente sea muy discreto y que pueden existir "factores de confusión" no excluidos en los estudios originales que dificulten la interpretación de los resultados.

Conclusiones

El factor XIII es la proenzima de una transglutaminasa de localización plasmática, pero también está presente en algunas estirpes celulares, cuyas funciones, aparte de la puramente hemostática (estabilizante de la fibrina), están lejos de ser totalmente conocidas.

Su déficit cuantitativo, aunque poco frecuente, origina un cuadro hemorrágico grave que justifica la profilaxis indefinida de los pacientes afectados con la infusión periódica del factor plasmático purificado. Otras posibles implicaciones patológicas (hemorrágicas, trombóticas, abortos de repetición, defectos de cicatrización, etc.) son aún poco conocidas y objeto de investigación en la actualidad.

Bibliografía

- Hoffman M, Monroe DM 3rd. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost* 2001; 85: 958-65.
- Ichinose A. Physiopathology and regulation of factor XIII. *Thromb Haemost* 2001; 86: 57-65.
- Anwar R, Miloszewski KJA. Factor XIII deficiency. *Br J Haematol* 1999; 107: 468-84.
- Schwartz RA, Klujszo E, Gascon P, McKenna R. Factor XIII. Last Updated: Sep 26, 2007. <http://www.emedicine.com/MED/topic3491.htm>; acceso 19-03-2008.
- Inbal A, Dardik R. Role of coagulation factor XIII (FXIII) in angiogenesis and tissue repair. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2006; 35: 162-5.
- Asahina T, Kobayashi T, Okada Y, Goto J, Terao T. Maternal blood coagulation factor XIII is associated with the

- development of cytotrophoblastic shell. *Placenta* 2000; 21: 388-93.
7. Bagoly Z, Haramura G, Muszbek L. Down-regulation of activated factor XIII by polymorphonuclear granulocyte proteases within fibrin clot. *Thromb Haemost* 2007; 98: 359-67.
 8. Anwar R, Gallivan L, Edmonds SD, Markhan AF. Genotype/phenotype correlations for coagulation factor XIII: specific normal polymorphisms are associated with high or low factor XIII specific activity. *Blood* 1999; 93: 897-905.
 9. Israels SJ. Factor XIII deficiency. Last Updated: Aug 20, 2007. <http://www.emedicine.com/MED/topic3040.htm>; acceso 19-03-2008.
 10. Ivaskevicius V, Seitz R, Kohler HP, Schroeder V, Muszbek L, Ariens RA, et al. International registry on factor XIII deficiency: a basis formed mostly on European data. *Thromb Haemost* 2007; 97: 914-21.
 11. Jennings I, Kitchen S, Woods TAL, Preston FE. Problems relating to the laboratory diagnosis of factor XIII deficiency: a UK NEQAS study. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 2603-8.
 12. Nugent DJ. Prophylaxis in rare coagulation disorders – factor XIII deficiency. *Thromb Res* 2006; 118: S23-8.
 13. Asahina T, Kobayashi T, Takeuchi K, Kanayama N. Congenital blood coagulation factor XIII deficiency and successful deliveries: a review of the literature. *Obstet Gynecol Surv* 2007; 62: 255-60.
 14. Wiel E, Marciniak B, Wibaut B. Recurrent hematomas and normal standard hemostasis tests. *Ann Fr Anesth Reanim* 1998; 17: 61-4.
 15. Lovejoy AE, Reynolds TC, Visich JE, Butine MD, Young G, Belvedere MA, et al. Safety and pharmacokinetics of recombinant factor XIII-A2 administration in patients with congenital factor XIII deficiency. *Blood* 2006; 108: 57-62.
 16. Lorand L, Velasco PT, Murthy SN, Lefebvre P, Green D. Autoimmune antibody in a hemorrhagic patient interacts with thrombin-activated factor XIII in a unique manner. *Blood* 1999; 93: 909-17.
 17. Nijenhuis AVM, van Bergeijk L, Huijgens PC, Zweegman S. Acquired factor XIII deficiency due to an inhibitor: a case report and review of the literature. *Haematologica* 2004; 89: e46-8. <http://www.haematologica.org/cgi/reprint/89/5/ECR14.pdf>
 18. Berczky Z, Katona E, Muszbek L. Fibrin stabilization (factor XIII), fibrin structure and thrombosis. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003/2004; 33: 430-7.
 19. Balogh I, Szöke G, Kárpáti L, Wartiovaara U, Katona E, Komáromi I, et al. Val34Leu polymorphism of plasma factor XIII: biochemistry and epidemiology in familial thrombophilia. *Blood* 2000; 96: 2479-86.
 20. Vokó Z, Berczky Z, Katona E, Adány R, Muszbek L. Factor XIII Val34Leu variant protects against coronary artery disease. A meta-analysis. *Thromb Haemost* 2007; 97: 458-63.
 21. Shafey M, Anderson JL, Scarvelis D, Doucette SP, Gagnon F, Wells PS. Factor XIII Val34Leu variant and the risk of myocardial infarction: a meta-analysis. *Thromb Haemost* 2007; 97: 635-41.
 22. Wells PS, Anderson JL, Scarvelis D, Doucette SP, Gagnon F. Factor XIII Val34Leu variant is protective against venous thromboembolism: a HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2006; 164: 101-9.
 23. Kobbervig C, Williams E. FXIII polymorphisms, fibrin clot structure and thrombotic risk. *Biophys Chem* 2004; 112: 223-8.
 24. Marín F, González-Conejero R, Lee KW, Corral J, Roldán V, López F, et al. A pharmacogenetic effect of factor XIII valine 34 leucine polymorphism on fibrinolytic therapy for acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 25-9.
 25. Boekholdt SM, Sandhu MS, Wareham NJ, Luben R, Reitsma PH, Khaw KT. Fibrinogen plasma levels modify the association between the factor XIII Val34Leu variant and risk of coronary artery disease: the EPIC-Norfolk prospective population study. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 2204-9.
 26. Casas JP, Hingorani AD, Bautista LE, Sharma P. Meta-analysis of genetic studies in ischemic stroke: thirty-two genes involving approximately 18,000 cases and 58,000 controls. *Arch Neurol* 2004; 61: 1652-61.
 27. Pruissen DM, Slooter AJ, Roseendaal FR, van der Graaf Y, Algra A. Coagulation factor XIII gene variation, oral contraceptives, and risk of ischemic stroke. *Blood* 2008; 111: 1282-6.
 28. Sotiriadis A, Makrigrannakis A, Stefanos T, Paraskevaidis E, Kalantaridou SN. Fibrinolytic defects and recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol* 2007; 109: 1146-55.

PET en linfomas: a quién, cuándo y para qué

M.Á. CANALES ALBENDEA^{1,2}, J. COYA VIÑA³

¹ Servicio de Hematología. Hospital Universitario La Paz. Madrid

² Departamento de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid

³ Servicio de Medicina Nuclear. Hospital Universitario La Paz. Madrid

Introducción

La tomografía por emisión de positrones (PET, del inglés *positron emission-tomography*) es una técnica de imagen no invasiva que nos proporciona información única sobre la actividad metabólica de diferentes tejidos y, en consecuencia, sobre los cambios metabólicos y moleculares asociados con la enfermedad. Esta tecnología ha existido durante más de 30 años, pero no ha sido hasta los últimos 10-15 años cuando su aplicación clínica ha sido evidente, como consecuencia fundamentalmente de las mejoras técnicas y de la disponibilidad de ciclotrones necesarios para producir emisores de positrones de vida corta¹.

La PET requiere el empleo de radiofármacos dirigidos a procesos fisiológicos específicos como el metabolismo de la glucosa, el transporte de aminoácidos o la síntesis de ADN. En la práctica, un análogo de la glucosa marcado con un isótopo emisor de positrones (2-[¹⁸F]-fluoro-2-desoxi-D-glucosa [FDG]) es el radiofármaco más ampliamente utilizado. La cantidad de radiofármaco administrada es extremadamente pequeña (10^{-6} - 10^{-9}) y, por tanto, no tiene efecto farmacológico. La FDG es transportada al interior celular y fosforilada de forma similar a la glucosa. Sin embargo, FDG-6-fosfato no es sustrato de la glucosa-6-fosfato isomerasa y no se desfosforila, por lo que queda atrapada en la célula tumoral y alcanza un estado de equilibrio a los 60 minutos aproximadamente. El isótopo emisor de positrones unido a la FDG (¹⁸F) se desintegra tras chocar con un electrón y genera 2 fotones de 511-KeV (radiación γ) que salen en direcciones opuestas y son detectados por el escáner de la PET².

A pesar de la ausencia de ensayos aleatorizados bien diseñados, a lo largo de los últimos años se han llevado a cabo multitud de estudios retrospectivos y prospectivos que demuestran las ventajas de la PET basada en la FDG (PET-FDG), de modo que dependiendo de las necesidades clínicas específicas debe integrarse de forma progresiva en el proceso diagnóstico y terapéutico de los pacientes con linfoma³. La mayoría de los datos disponibles en la actualidad provienen de estudios con equipos de PET aislada, pero a lo largo de los últimos años se han introducido los equipos híbridos PET-TC que, mediante la fusión de imágenes, aportan mayor sensibilidad y especificidad que el resto de las técnicas metabólicas y de imagen, pues permite combinar la información mo-

lecular con la anatómica y así corregir algunas de las limitaciones de la PET observadas en la actualidad.

PET en linfomas: ¿a quién?

En condiciones patológicas, la sensibilidad de una técnica metabólica depende principalmente del grado de acumulación del radiotrazador en el tumor, independientemente de sus características estructurales. En general, la captación de FDG refleja la agresividad tumoral, de modo que la intensidad de captación estaría relacionada con el grado tumoral. Otro aspecto clave que influye en la sensibilidad de estas técnicas es el tamaño tumoral, de modo que en la actualidad, con la mayoría de los equipos PET la resolución espacial es de 5-6 mm; los tumores de tamaño superior a 1 cm son claramente identificados, mientras que la detección de lesiones entre 0,5 y 1 cm es variable y depende de las características técnicas de la PET y del metabolismo tumoral. La detección subóptima de lesiones de pequeño tamaño debido a un efecto parcial de volumen puede compensarse por un mayor contraste metabólico entre la lesión diana y el fondo (en inglés, *candle-by-night principle*). El empleo de sistemas híbridos PET-TC puede aumentar la detección de lesiones menores de 1 cm usando la parte de la TC de alta resolución³. En la Tabla 1 se resumen los factores que influyen en la sensibilidad y especificidad de la PET-FDG.

Diversos estudios han demostrado aumento de captación de FDG en la mayoría de los linfomas, sobre todo linfomas de Hodgkin y linfomas agresivos, con una correlación entre la intensidad de captación y el grado de malignidad y la actividad proliferativa. Los resultados en linfomas indolentes han sido variables, con captación positiva entre el 40% y el 98% de los casos (Tabla 2)^{4,5}. Algunos autores han intentado diferenciar linfomas indolentes de agresivos por la intensidad de captación de la FDG⁶, pero, más allá de ayudar a identificar la lesión óptima de la que se debe tomar la biopsia (aquella con valor de SUV [*standardized uptake value*] más alto), no parece probable que la PET-FDG pueda reemplazar a la biopsia en la confirmación de la transformación. En este sentido, hay evidencia de que la ¹⁸F-fluoro-timidina (FLT), como marcador de proliferación celular, tiene mayor capacidad que la FDG para diferenciar lesiones inflamato-

Tabla 1. Factores que influyen en la sensibilidad y especificidad de la PET-FDG en pacientes con linfoma

	Factores	Comentarios
Sensibilidad	Histología	FN: LLCP, LZM, LCTP, MALT
	Tamaño	FN: lesiones < 0,5 cm
	Fondo	FN: cerebro, tracto urinario
	Fisiología	FN: diabetes, hiperinsulinemia
Especificidad	Infecciones	FP: neumonía, tuberculosis, micosis, abscesos
	Enfermedades inflamatorias	FP: sarcoidosis, asbestosis, granulomatosis
	Procesos inflamatorios	FP: radioterapia, cirugía, biopsia
	Fisiología	FP: tracto GI, uréteres

FN: falsos negativos; FP: falsos positivos; LCTP: linfoma de células T periférico; LLCP: linfoma linfocítico de células pequeñas; LZM: linfoma de la zona marginal; MALT: tejido linfoide asociado a mucosas.

Tabla 2. Diferencias en la captación de FDG entre los diferentes tipos de linfomas (datos obtenidos del análisis de pacientes y de regiones anatómicas)

Histología	Pacientes	PET positivo	Regiones anatómicas	PET positivo	SUV máx. mediana
LDCG	51/51	100%	268/276	97%	9,9 (2,4-26,6)
LB			21/21	100%	9,9 (7,4-11,1)
LF	41/42	98%	175/193	91%	4,8 (1,4-15,5)
LCM	7/7	100%	51/51	100%	5,1 (3,5-6,8)
LZM	8/12	67%			
· MALT			89/109	82%	3,1 (1,2-14,8)
· LZM esplénico			10/19	53%	2,2 (1,2-4,8)
LCTP	2/5	40%	54/55	98%	8,8 (4-15,6)
LT/NK			30/30	100%	7,5 (4-14,5)
LACG			25/25	100%	12 (4,1-14,3)
LTAI			34/34	100%	8,6 (7,3-14,9)
LH	46/47	98%	73/75	97%	6,6 (2,1-17,1)

LACG: linfoma anaplásico de células grandes; LB: linfoma de Burkitt; LCM: linfoma de células del manto; LCTP: linfoma de células T periférico; LDCG: linfoma difuso de células grandes; LF: linfoma folicular; LH: linfoma de Hodgkin; LTAI: linfoma T angioinmunoblástico; LT/NK: linfoma de células T/NK; LZM: linfoma de la zona marginal; MALT: tejido linfoide asociado a mucosas; SUV: standardized uptake value.

rias de tumorales, linfomas indolentes de agresivos y detectar la transformación histopatológica⁷.

PET en linfomas: ¿cuándo?

Los linfomas más frecuentes (linfoma difuso de células grandes, linfoma folicular, linfoma del manto, linfoma de Hodgkin) muestran por tanto un aumento de captación de la FDG, con sensibilidad mayor del 80% y especificidad del 90%, por lo que la PET-FDG puede proporcionar información complementaria en tres momentos clave del proceso diagnóstico y terapéutico de los pacientes con linfoma: en el estudio inicial de extensión, en la valoración de la respuesta al final del tratamiento, sobre todo en pacientes con masas residuales, y en el seguimiento tras completar el tratamiento previsto.

Las recomendaciones de un panel de expertos sobre el momento más adecuado para la solicitud de la PET en pacientes con linfoma, principalmente en el contexto de ensayos clínicos, se resumen en la Tabla 3.

La PET en la estadificación inicial

Desde su introducción, la TC ha sido la técnica de imagen de elección en la estadificación y monitorización de la respuesta al tratamiento. En el estudio de extensión inicial, la TC tiene sensibilidad y especificidad relativamente altas, pero su especificidad es menor en la valoración de la respuesta al tratamiento, sobre todo en pacientes con enfermedad voluminosa, donde es común la persistencia de lesiones residuales tras completar el tratamiento. Así, la TC determina el tamaño y localización de las masas, pero es incapaz

Tabla 3. Recomendaciones para la realización de la PET o PET-TC en pacientes con linfoma

Histología	Pretratamiento (estadificación)	Pronóstico (respuesta precoz)	Reestadificación	Seguimiento
Linfoma difuso de células grandes	Sí	Ensayo clínico	Sí	No
Otros linfomas agresivos	No ^a	Ensayo clínico	No ^{a,b}	No
Linfoma folicular	No ^a	Ensayo clínico	No ^a	No
Otros linfomas indolentes	No ^a	Ensayo clínico	No ^{a,b}	No
Linfoma del manto	No ^a	Ensayo clínico	No ^a	No
Linfoma de Hodgkin	Sí	Ensayo clínico	Sí	No

^a En ensayos clínicos, sólo recomendado si la respuesta es el objetivo principal del estudio.

^b Sólo recomendado si la PET al diagnóstico es positiva.

Tabla 4. Resultados de sensibilidad, proporción de falsos positivos y máxima sensibilidad y especificidad conjuntas (mediante curvas ROC) en la estadificación de los pacientes con linfoma (los resultados se expresan como proporción e intervalo de confianza)

	N.º estudios	Verdaderos positivos (sensibilidad)	Falsos positivos (1-especificidad)	Máxima sensibilidad y especificidad conjunta
Datos basados en el análisis de pacientes				
Global	14	90,9 (88-93,4)	10,3 (7,4-13,8)	87,8 (85-90,7)
Linfoma Hodgkin	6	92,6 (88,4-95,6)	13,4 (8-20,6)	89,4 (84,5-94,3)
LNH	5	89,4 (82,8-94,1)	11,4 (5,6-19,9)	85 (78,2-82)
Datos basados en el análisis de lesiones				
Global	7	95,6 (93,9-97)	1 (0,6-1,3)	95,6 (93,1-98,1)

LNH: linfoma no Hodgkin.

de diferenciar la presencia de tejido tumoral viable de tejido necrótico o fibrótico. En estos casos, la escintigrafía con ⁶⁷Ga, una técnica metabólica que se basa en la acumulación del isótopo radiactivo en la células linfomatosas viables a través de su unión al receptor de la transferrina, mejora la especificidad de la TC, ya que puede diferenciar linfoma de tejido benigno con una sensibilidad y especificidad en torno al 90% y valores predictivos positivos del 70% al 85%, y negativos del 65% al 95%².

Diferentes estudios han demostrado la exactitud diagnóstica global de la PET-FDG en la estadificación y valoración de la respuesta en pacientes con linfoma, lo que ha sido confirmado en un metaanálisis que incluye 20 estudios con datos de 854 pacientes y 3.658 lesiones (Tabla 4)⁸.

La PET y la TC son concordantes en la estadificación del 80% al 90% de pacientes con linfoma difuso de células grandes, linfoma folicular y probablemente también linfoma del manto, mientras que en el linfoma de Hodgkin sólo son concordantes en el 60-80% de los casos. En los linfomas no hodgkinianos, en el 10-20% de los pacientes en los que se observa discordancia, la PET típicamente resulta en un aumento de estadio, mientras que los hallazgos discordantes en el linfoma de Hodgkin se comparten en las 2 direcciones². La técnica híbrida PET-TC ofrece ventajas adicionales en la estadificación respecto a la TC o PET

por separado. En pacientes con linfoma de Hodgkin y linfomas no hodgkinianos agresivos, la sensibilidad de la PET-TC y la TC fue del 94% y 88%, respectivamente, mientras que la especificidad fue del 100% y 86%, respectivamente⁹.

Dada la capacidad de la PET-FDG para detectar afectación ósea focal o multifocal, se ha planteado la posibilidad de evitar la realización de la biopsia de cresta iliaca. Sin embargo, la sensibilidad de la técnica es subóptima en todos los tipos de linfoma, por lo que estos hallazgos, sobre todo cuando suponen cambio de tratamiento, deberían ser confirmados por biopsia. En definitiva, la PET no puede sustituir a la biopsia de médula ósea en la estadificación de los linfomas^{10,11}.

La PET en la valoración de la respuesta al tratamiento

La utilidad de la PET-FDG como técnica funcional para diferenciar fibrosis de tejido tumoral viable fue por primera vez comunicada por Paul *et al.* en 1987¹². A partir de esa publicación diferentes estudios, a pesar de la heterogeneidad histopatológica, del pequeño número de pacientes y del corto seguimiento, han demostrado la eficacia de la PET-FDG, en comparación con la TC, en la evaluación de la respuesta al tratamiento (reestadificación)¹³. Estudios posteriores, en poblaciones de pacientes más homogéneas, con-

firman definitivamente que la PET es una alternativa válida para la reestadificación^{14,15}. Todo ello, unido a dos metaanálisis recientes^{16,17}, ha llevado a la revisión de los criterios de respuesta y la elaboración de recomendaciones para la inclusión de la PET en la valoración de la respuesta al tratamiento en pacientes con linfoma difuso de células grandes y linfoma de Hodgkin^{18,19}. Estos estudios coinciden en señalar el moderado valor predictivo positivo en el linfoma de Hodgkin, en torno al 60%, con un elevado valor predictivo negativo. La situación en los linfomas no hodgkinianos agresivos, fundamentalmente, el linfoma difuso de células grandes, no parece diferente, si bien tanto el valor predictivo positivo (90-100%) como el valor predictivo negativo (80-84%) son más altos^{16,17}. Ello implica que los pacientes con PET negativa pueden ser observados sin realizar ninguna prueba diagnóstica para confirmarlo, mientras que la recomendación actual en los pacientes con PET positiva es la realización de biopsia antes de cualquier cambio de actitud terapéutica^{1,20}. En definitiva, lo que conlleva la aceptación de estas nuevas recomendaciones para la valoración de la respuesta es que el número de falsos negativos será mucho menor que los falsos positivos que se observan con los criterios habituales, lo que evitará la administración de tratamientos innecesarios a un número significativo de pacientes.

La PET en el seguimiento postratamiento

En la actualidad, no hay ninguna evidencia que apoye el uso de la PET en el seguimiento de los pacientes con linfoma. Un estudio prospectivo en 36 pacientes con linfoma de Hodgkin demuestra que la PET diagnosticó la recaída sólo en 3 de los 36 pacientes pero con 6 falsos positivos²¹. Es decir, la PET no tiene ningún beneficio en pacientes asintomáticos, puesto que un resultado negativo no interfiere con la estrategia de seguimiento, pero un resultado positivo podría tratarse de un falso positivo que obligase a la realización de biopsia para confirmar el hallazgo¹. En esta situación, la técnica híbrida PET-TC reduce significativamente los falsos positivos y mejora la sensibilidad respecto a la PET².

PET en linfomas: ¿para qué?

Los avances en los métodos de estadificación y en la monitorización de la respuesta al tratamiento pueden mejorar de forma significativa el pronóstico de los pacientes con linfoma. El estudio de extensión es fundamental en el proceso diagnóstico y terapéutico de cualquier tipo de neoplasia, pero es crítico en pacientes con linfoma. Una estadificación correcta

permite la administración de la terapia adecuada a la extensión de la enfermedad, evitando, entre otras cosas, la administración de tratamientos innecesariamente tóxicos.

De forma global, la PET modifica la estadificación en el 20-40% de los pacientes, principalmente en enfermedad extraganglionar, pero sólo en la mitad de los casos conlleva cambios en la estrategia terapéutica. Por el momento se desconoce si estos cambios en el tratamiento tienen un efecto beneficioso, pero la mejor estadificación *per se* implica conseguir mejores resultados, tanto en los estadios localizados como en los estadios avanzados (fenómeno Will Rogers)²².

Hasta un 40% de los pacientes con linfoma presentan masas residuales tras completar el tratamiento inicial, pero menos del 20% recaerán. Así, uno de los principales objetivos de la PET-FDG será ofrecer al clínico la respuesta metabólica del tumor al tratamiento, definiendo si las masas residuales se corresponden con tejido tumoral viable o bien son lesiones inactivas o fibróticas. El enfoque más aceptado consiste en la realización de la PET-FDG al finalizar la terapia; de esta forma, además de una correcta definición del metabolismo de la lesión (con las consiguientes implicaciones terapéuticas), se obtiene una información pronóstica de gran valor fuertemente relacionada con la evolución del paciente. Diversos estudios demuestran el elevado valor predictivo de la PET-FDG en la evaluación de las lesiones residuales al final del tratamiento en pacientes con linfoma de Hodgkin y linfomas agresivos¹³⁻¹⁵, lo que se traduce en mayor supervivencia libre de progresión y supervivencia global en los pacientes con PET negativa al finalizar el tratamiento^{14,15}.

En 1998 Römer *et al.* demuestran que la disminución de la intensidad de captación se produce de forma tan precoz como a los 7 días, con mayor poder discriminativo en cuanto a supervivencia cuando se analiza la intensidad de captación a los 42 días de iniciar el tratamiento (es decir, tras 2 ciclos CHOP)²³. Un estudio reciente analiza el valor predictivo de la PET realizada tras el primer ciclo de quimioterapia y al finalizar el tratamiento, tratando así de identificar de forma precoz los pacientes refractarios al tratamiento administrado. Los pacientes con PET positiva tras el primer y el último ciclo presentaron menor supervivencia libre de progresión, si bien el valor predictivo negativo tras el primer ciclo fue mejor que al final del tratamiento²⁴. De esta forma, la PET-FDG es capaz de identificar de forma precoz aquellos casos que se beneficiarían de programas más intensivos de tratamiento. Diferentes estudios han analizado el valor pronóstico de la PET después de 2 o 3 ciclos de tratamiento²⁵⁻²⁸, pero posiblemente sea el trabajo conjunto de Gallamini y Hutchings el que mejor defina la PET como herramienta pronóstica que puede predecir los resultados al trata-

miento cuando se realiza de forma precoz, independiente además de variables clínicas²⁹.

Por tanto, en pacientes con linfoma de Hodgkin, tratados con el esquema ABVD, el impacto pronóstico de la valoración precoz de la respuesta (tras 2 ciclos de tratamiento) es lo suficientemente importante como para permitir estratificar el tratamiento en base a los resultados de la PET³⁰. Sin embargo, se desconoce si el valor pronóstico de la PET precoz será diferente entre subtipos histológicos y/o regímenes terapéuticos. Así, en la actualidad, en el linfoma difuso de células grandes y otros linfomas agresivos, la PET precoz ha demostrado también su valor pronóstico, pero no se ha establecido todavía su relevancia clínica.

Conclusiones

La introducción de la PET-FDG en la práctica clínica ha revolucionado el manejo de los pacientes con linfoma. La información proporcionada por esta técnica metabólica permite mejorar la estadificación, definir mejor el pronóstico y planificar el tratamiento más adecuado en función de la respuesta, principalmente en linfoma de Hodgkin y linfomas agresivos. En los linfomas de bajo grado son todavía necesarios más estudios para definir mejor su papel. La introducción de los sistemas híbridos PET-TC y de nuevos radiofármacos como la FLT permitirá resolver algunas de las limitaciones actuales de los equipos de PET y de la FDG.

Bibliografía

- Fletcher JW, Djulbegovic B, Soares HP, Siegel BA, Lowe VJ, Lyman GH, et al. Recommendations on the use of 18F-FDG PET in oncology. *J Nucl Med* 2008; 49 (3): 480-508.
- Seam P, Juweid ME, Cheson BD. The role of FDG-PET scans in patients with lymphoma. *Blood* 2007; 110 (10): 3507-16.
- Belhocine T, Spaepen K, Dusart M, Castaigne C, Muyllé K, Bourgeois P, et al. 18FDG PET in oncology: the best and the worst (Review). *Int J Oncol* 2006; 28 (5): 1249-61.
- Elstrom R, Guan L, Baker G, Nakhoda K, Vergilio JA, Zhuang H, et al. Utility of FDG-PET scanning in lymphoma by WHO classification. *Blood* 2003; 101 (10): 3875-6.
- Tsukamoto N, Kojima M, Hasegawa M, Oriuchi N, Matsuhashima T, Yokohama A, et al. The usefulness of (18)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography ((18)F-FDG-PET) and a comparison of (18)F-FDG-pet with (67)gallium scintigraphy in the evaluation of lymphoma: relation to histologic subtypes based on the World Health Organization classification. *Cancer* 2007; 110 (3): 652-9.
- Schoder H, Noy A, Gonen M, Weng L, Green D, Erdi YE, et al. Intensity of 18fluorodeoxyglucose uptake in positron emission tomography distinguishes between indolent and aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2005; 23 (21): 4643-51.
- Buck AK, Bommer M, Stilgenbauer S, Juweid M, Glatting G, Schirrmeister H, et al. Molecular imaging of proliferation in malignant lymphoma. *Cancer Res* 2006; 66 (22): 11055-61.
- Isasi CR, Lu P, Blafox MD. A metaanalysis of 18F-2-deoxy-2-fluoro-D-glucose positron emission tomography in the staging and restaging of patients with lymphoma. *Cancer* 2005; 104 (5): 1066-74.
- Schaefer NG, Hany TF, Taverna C, Seifert B, Stumpe KD, von Schulthess GK, et al. Non-Hodgkin lymphoma and Hodgkin disease: coregistered FDG PET and CT at staging and restaging--do we need contrast-enhanced CT? *Radiology* 2004; 232 (3): 823-9.
- Pakos EE, Fotopoulos AD, Ioannidis JP. 18F-FDG PET for evaluation of bone marrow infiltration in staging of lymphoma: a meta-analysis. *J Nucl Med* 2005; 46 (6): 958-63.
- Schaefer NG, Strobel K, Taverna C, Hany TF. Bone involvement in patients with lymphoma: the role of FDG-PET/CT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007; 34 (1): 60-7.
- Paul R. Comparison of fluorine-18-2-fluorodeoxyglucose and gallium-67 citrate imaging for detection of lymphoma. *J Nucl Med* 1987; 28 (3): 288-92.
- Jerusalem G, Beguin Y, Fassotte MF, Najjar F, Paulus P, Rigo P, et al. Whole-body positron emission tomography using 18F-fluorodeoxyglucose for posttreatment evaluation in Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma has higher diagnostic and prognostic value than classical computed tomography scan imaging. *Blood* 1999; 94 (2): 429-33.
- Spaepen K, Stroobants S, Dupont P, Thomas J, Vandenberghe P, Balzarini J, et al. Can positron emission tomography with [(18)F]-fluorodeoxyglucose after first-line treatment distinguish Hodgkin's disease patients who need additional therapy from others in whom additional therapy would mean avoidable toxicity? *Br J Haematol* 2001; 115 (2): 272-8.
- Spaepen K, Stroobants S, Dupont P, Van Steenweghen S, Thomas J, Vandenberghe P, et al. Prognostic value of positron emission tomography (PET) with fluorine-18 fluorodeoxyglucose ([18F]FDG) after first-line chemotherapy in non-Hodgkin's lymphoma: is [18F]FDG-PET a valid alternative to conventional diagnostic methods? *J Clin Oncol* 2001; 19 (2): 414-9.
- Zijlstra JM, Lindauer-van der Werf G, Hoekstra OS, Hooft L, Riphagen II, Huijgens PC. 18F-fluoro-deoxyglucose positron emission tomography for post-treatment evaluation of malignant lymphoma: a systematic review. *Haematologica* 2006; 91 (4): 522-9.
- Terasawa T, Nishihashi T, Hotta T, Nagai H. 18F-FDG PET for posttherapy assessment of Hodgkin's disease and aggressive Non-Hodgkin's lymphoma: a systematic review. *J Nucl Med* 2008; 49 (1): 13-21.
- Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, Gascoyne RD, Specht L, Horning SJ, et al. Revised response criteria for malignant lymphoma. *J Clin Oncol* 2007; 25 (5): 579-86.
- Juweid ME, Stroobants S, Hoekstra OS, Mottaghy FM, Dietlein M, Guermazi A, et al. Use of positron emission tomography for response assessment of lymphoma: consensus of the Imaging Subcommittee of International Harmonization Project in Lymphoma. *J Clin Oncol* 2007; 25 (5): 571-8.
- Schaefer NG, Taverna C, Strobel K, Wastl C, Kurrer M, Hany TF. Hodgkin disease: diagnostic value of FDG PET/CT after first-line therapy--is biopsy of FDG-avid lesions still needed? *Radiology* 2007; 244 (1): 257-62.
- Jerusalem G, Beguin Y, Fassotte MF, Belhocine T, Hustinx R, Rigo P, et al. Early detection of relapse by whole-body positron emission tomography in the follow-up of patients with Hodgkin's disease. *Ann Oncol* 2003; 14 (1): 123-30.
- Hampson FA, Shaw AS. Response assessment in lymphoma. *Clin Radiol* 2008; 63 (2): 125-35.
- Romer W, Hanauske AR, Ziegler S, Thodtmann R, Weber W, Fuchs C, et al. Positron emission tomography in non-Hodgkin's lymphoma: assessment of chemotherapy with fluorodeoxyglucose. *Blood* 1998; 91 (12): 4464-71.
- Kostakoglu L, Goldsmith SJ, Leonard JP, Christos P, Furman RR, Atasever T, et al. FDG-PET after 1 cycle of therapy pre-

- dicts outcome in diffuse large cell lymphoma and classic Hodgkin disease. *Cancer* 2006; 107 (11): 2678-87.
25. Mikhaeel NG, Hutchings M, Fields PA, O'Doherty MJ, Timothy AR. FDG-PET after two to three cycles of chemotherapy predicts progression-free and overall survival in high-grade non-Hodgkin lymphoma. *Ann Oncol* 2005; 16 (9): 1514-23.
 26. Haioun C, Itti E, Rahmouni A, Brice P, Rain JD, Belhadj K, et al. [18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography (FDG-PET) in aggressive lymphoma: an early prognostic tool for predicting patient outcome. *Blood* 2005; 106 (4): 1376-81.
 27. Hutchings M, Loft A, Hansen M, Pedersen LM, Buhl T, Jurlander J, et al. FDG-PET after two cycles of chemotherapy predicts treatment failure and progression-free survival in Hodgkin lymphoma. *Blood* 2006; 107 (1): 52-9.
 28. Gallamini A, Rigacci L, Merli F, Nassi L, Bosi A, Capodanno I, et al. The predictive value of positron emission tomography scanning performed after two courses of standard therapy on treatment outcome in advanced stage Hodgkin's disease. *Haematologica* 2006; 91 (4): 475-81.
 29. Gallamini A, Hutchings M, Rigacci L, Specht L, Merli F, Hansen M, et al. Early interim 2-[18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography is prognostically superior to international prognostic score in advanced-stage Hodgkin's lymphoma: a report from a joint Italian-Danish study. *J Clin Oncol* 2007; 25 (24): 3746-52.
 30. Gallamini A, Hutchings M, Avigdor A, Polliack A. Early interim PET scan in Hodgkin lymphoma: where do we stand? *Leuk Lymphoma* 2008; 49 (4): 659-62.

Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos: más allá de los donantes familiares. Criterios de selección

G. SANZ

Servicio de Hematología. Hospital Universitario La Fe. Valencia

Introducción

El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (TPH) de hermano HLA-idéntico es el tratamiento de elección de diversas neoplasias hematológicas, síndromes de insuficiencia medular e inmunodeficiencias y errores congénitos del metabolismo. La limitación que supone para su empleo la no disponibilidad de un hermano HLA-idéntico en más de dos tercios de los casos¹ y la demostración de la eficacia del TPH de donante no emparentado (DNE) HLA compatible^{2,3} condujo en los años ochenta a la creación de registros nacionales⁴ e internacionales⁵ de donantes voluntarios adultos no emparentados que disponen en la actualidad de más de 12 millones de potenciales donantes⁶. Los resultados del TPH de DNE HLA compatible en diversas enfermedades, tanto empleando médula ósea (MO) como sangre periférica como fuente de progenitores hematopoyéticos (PH), han mejorado sustancialmente en la última década^{2,7-11}. Este progreso se ha debido fundamentalmente a la disponibilidad de técnicas de tipaje HLA más precisas, lo que garantiza una mejor compatibilidad del donante con el receptor¹¹⁻¹⁵, a la mayor experiencia de los centros de trasplante con esta modalidad y a las mejoras en los cuidados de soporte, especialmente del manejo de las diversas complicaciones infecciosas^{16,17} y de la enfermedad del injerto contra huésped¹⁸. Aunque todavía es objeto de controversia, en algunas series recientes los resultados a largo plazo han sido similares a los que se obtienen con TPH alogénico de hermano HLA-idéntico^{19,22} y en algunas situaciones, como cuando el donante familiar es de avanzada edad y el DNE es joven, el TPH de DNE podría ser preferible^{23,24}. Desafortunadamente, el TPH de DNE adulto presenta importantes limitaciones que impiden el trasplante en muchos pacientes que lo precisan. De hecho, más del 60% de las búsquedas de DNE adulto fracasan porque, a pesar del gigantesco *pool* actual de donantes voluntarios, no se encuentra un donante suficientemente compatible o porque el paciente se deteriora o muere durante el periodo de tiempo requerido para localizarle y realizar el trasplante (mediana: 2-4 meses)^{25,26}.

En la última década, el trasplante de sangre de cordón umbilical (TSCU) de DNE se ha convertido en una alternativa real, tanto en niños como en adultos,

al TPH de MO o sangre periférica movilizada de DNE adulto²⁷⁻³³. Los objetivos de esta revisión son mostrar los resultados clínicos del TSCU, las vías de investigación en marcha para aumentar su uso y mejorar sus resultados futuros, y revisar los criterios a seguir en la selección de unidades de sangre de cordón umbilical (SCU). Finalmente, pretende ofrecer, a la luz de la evidencia actual, un algoritmo de toma de decisiones en la búsqueda de un DNE adulto o de una unidad de SCU para los pacientes que carecen de donante familiar HLA-idéntico. El empleo de donantes familiares HLA haploidénticos³⁴⁻³⁹ o DNE no HLA-idénticos⁴⁰, alternativas posibles pero todavía minoritarias, queda fuera del alcance de esta revisión.

Ventajas e inconvenientes de la SCU como fuente de PH

La principal aportación del TSCU es que aumenta intensamente la probabilidad de trasplante. La menor reactividad inmunológica de la SCU permite realizar el trasplante con mucho mayor grado de disparidad HLA, lo que incrementa notablemente la probabilidad de éxito de la búsqueda, y ello a pesar de disponer solamente de 300.000 unidades de SCU⁴¹. Además, el menor tiempo necesario para llevar a cabo el trasplante con SCU (1-4 semanas)⁴²⁻⁴⁵ hace preferible esta fuente de progenitores hematopoyéticos en los casos en los que el trasplante debe realizarse con urgencia⁴⁶. Otras ventajas adicionales de la SCU son la ausencia de riesgo para el donante, la menor probabilidad de contaminación viral y la mayor flexibilidad para programar el trasplante²⁷⁻³².

La menor cantidad absoluta de progenitores hematopoyéticos de una unidad de SCU en comparación con la obtenida en una donación de MO o de sangre periférica movilizada de un adulto se traduce en que el tiempo requerido para el prendimiento mieloide y plaquetario sea superior y en una tasa global de injerto hematopoyético inferior²⁷⁻³². Este inconveniente, que llevó a suponer erróneamente que la SCU no podría emplearse en pacientes de peso corporal elevado, ha frenado notablemente el desarrollo del TSCU en adultos. En la actualidad, se han efectuado cerca de 10.000 TSCU (6.000 en niños y 4.000 en adultos), la inmensa mayoría de ellos, en pacientes con neoplasias hematológicas.

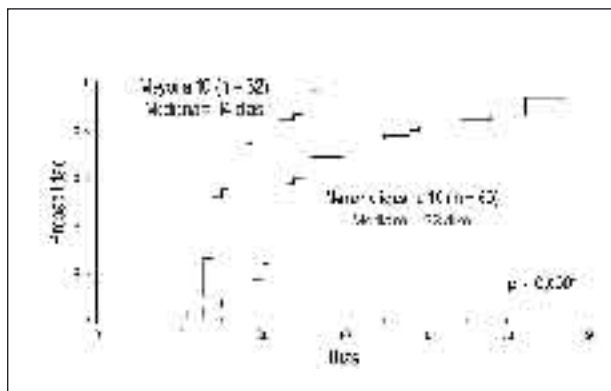


Figura 1. Probabilidad acumulada de injerto mieloide según la cifra absoluta de células CD34+ infundidas ($\times 10^6$) en 92 adultos con neoplasias hematológicas sometidos a TSCU en el Hospital Universitario La Fe de Valencia.

TSCU en niños

En niños, las indicaciones del TSCU son las mismas que las de TPH alogénico de MO o SP de DNE. No obstante, los mejores resultados se obtienen en: *a*) leucemias agudas; *b*) síndromes mielodisplásicos y mieloproliferativos; *c*) inmunodeficiencias primarias, y *d*) enfermedades metabólicas de depósito^{30,47-56}. Los resultados alcanzados en hemoglobinopatías (talasemia y anemia de células falciformes) y síndromes de insuficiencia medular (aplasia medular adquirida y anemia de Fanconi), pese a recientes mejoras, no son tan buenos⁵⁷⁻⁵⁹.

Una serie reciente conjunta del Center for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR) y del Cord Blood Program de Nueva York ha comparado, en niños con leucemia aguda, los resultados de 282 TPH de MO de DNE con compatibilidad 6 de 6 a nivel alélico en HLA-A, -B y -DRB1 con los de 503 TSCU de DNE con compatibilidad 4-6 de 6 a nivel antigénico en HLA-A y -B y alélico en HLA-DRB1⁵¹. La supervivencia libre de leucemia a 5 años fue similar, con MO compatible y SCU con 1 o 2 incompatibilidades HLA, y pareció algo mejor con SCU compatible. Estos datos, así como un metaanálisis de los datos disponibles³³, apoyan el uso de entrada, sin esperar al fracaso de la búsqueda de DNE adulto, del TSCU con compatibilidad 4-6 de 6 en niños con leucemia aguda que precisan TPH y carecen de donante familiar HLA-idéntico^{31,60}.

TSCU en adultos

TSCU con una única unidad de SCU y acondicionamiento mieloablativo

La experiencia publicada de TSCU con una única unidad de SCU y empleando acondicionamiento

mieloablativo estándar en adultos con neoplasias hematológicas muestra notables discrepancias entre las series, probablemente como consecuencia de su heterogeneidad y tamaño, de diferencias en los criterios de selección de pacientes y unidades, de los regímenes de acondicionamiento empleados y de la experiencia de los centros⁶¹⁻⁶⁷. La serie publicada más amplia, del registro europeo Eurocord, incluyó 171 pacientes con enfermedades hematológicas malignas, la gran mayoría leucemia (83%) y en muchos casos en fase avanzada al trasplante (53%)⁶¹. La edad mediana fue de 29 años, la mayoría recibió una unidad de SCU con 1-2 disparidades HLA (87%), y la mediana de células nucleadas y CD34+ infundidas fue de $2,1 \times 10^7$ y 1×10^5 por kg de peso del receptor, respectivamente. La incidencia acumulada de injerto mieloide fue del 72%, con una mediana de tiempo a más de $0,5 \times 10^9$ neutrófilos/L de 28 días, y la incidencia acumulada de injerto plaquetario fue del 46%, con una mediana de tiempo a más de 20×10^9 plaquetas/L de 84 días. La tasa acumulada de enfermedad injerto contra huésped (EICH) aguda de grados II-IV y III-IV fue del 32% y 16%, respectivamente, y la de EICH crónica extensa a los 2 años, del 36%. La incidencia acumulada de mortalidad relacionada con el trasplante (MRT) y de recaída a los 2 años fue del 51% y 22%, respectivamente. Finalmente, la supervivencia libre de enfermedad (SLE) y global a los 2 años fue del 27% y 33%⁶¹. Como ocurre con otras técnicas aún no estandarizadas, los resultados de los centros con más amplia experiencia en TSCU son claramente superiores a las comunicadas por registros internacionales^{63,65-70}.

Actualmente se reconocen diversas características que influyen en los resultados del TSCU en adultos. La tasa y velocidad del injerto depende fundamentalmente de la dosis celular de la unidad trasplantada, ya sea considerando la cifra de células nucleadas o CD34+ infundidas (Figura 1)^{61,63-70}. Asimismo, el uso de G-CSF (factor estimulante de colonias granulocíticas) se asocia a un injerto mieloide más precoz⁶¹. La incidencia de EICH depende fundamentalmente del régimen de acondicionamiento empleado⁶⁹. La MRT es superior en pacientes de mayor edad, en los que desarrollan EICH y en pacientes trasplantados en fase avanzada^{61,62,63-70}. Como ocurre con otras modalidades de TPH, la MRT se ha reducido en años recientes. En la experiencia del grupo Eurocord la MRT al día 100 fue del 51% en el periodo 1994-1999, del 34% en 2000-2002 y del 27% en 2003-2006 (V. Rocha *et al.*, datos no publicados). La tasa de recaída es superior en pacientes en fase avanzada al trasplante, y podría ser menor en leucemia mieloide crónica y mayor en leucemia linfoblástica aguda^{61,69,70}. La fase de la enfermedad al trasplante es la variable más estrechamente asociada con la SLE^{61,62,69}. En pacientes

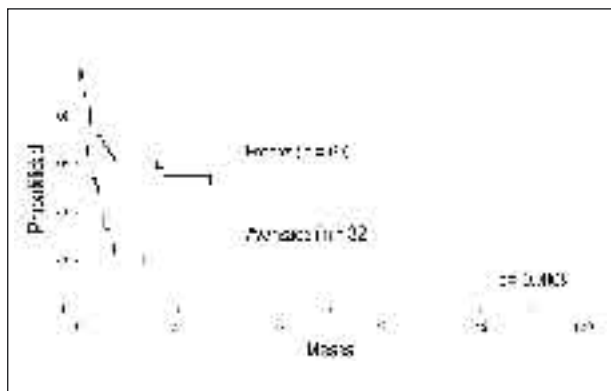


Figura 2. Probabilidad actuarial de supervivencia libre de enfermedad según el estado de la enfermedad al trasplante en 92 adultos con neoplasias hematológicas sometidos a TSCU en el Hospital Universitario La Fe de Valencia (enfermedad precoz, leucemia aguda en primera o segunda remisión completa, leucemia mieloide crónica en fase crónica, síndrome mielodisplásico de alto riesgo no tratado o en remisión y otras neoplasias hematológicas en remisión completa o parcial quimiosensible; enfermedad avanzada, todas las demás).

con leucemia trasplantados en primera remisión la probabilidad de SLE a los 2 años es superior al 40%, mientras que en pacientes trasplantados en recaída es inferior al 20%^{61,68,69}. En la Figura 2 se muestra la SLE según la fase de la enfermedad al trasplante en la serie del Hospital Universitario La Fe de Valencia.

Otros factores que han determinado mayor SLE en algunos estudios, pero no en otros, son mayor dosis celular infundida⁶², menor edad^{68,69}, compatibilidad de grupo ABO (Eurocord, datos no publicados), seronegatividad del receptor frente a CMV (Eurocord, datos no publicados) y sexo masculino⁶¹. El grado de compatibilidad HLA no parece tan relevante en adultos como en niños^{61,62,69}, aunque hay que señalar que en los niños su importancia no fue evidente hasta que se dispuso de una casuística considerable⁷¹⁻⁷³. El posible impacto de la discordancia HLA a nivel alélico es aún incierto, pero no parece muy relevante^{74,75}. Recientemente, se ha comunicado que la incompatibilidad con el ligando KIR (*killer cell immunoglobulin-like receptors*) en dirección injerto contra huésped se asocia a mayor SLE en pacientes con leucemia aguda, especialmente mieloblástica, en remisión al trasplante por reducir de forma significativa el riesgo de recaída sin modificar la incidencia de MRT⁷⁶.

Se dispone de varios estudios retrospectivos que han comparado los resultados del TSCU y los del TPH de MO de DNE en adultos con enfermedades hematológicas⁷⁷⁻⁷⁹, pero el relativamente escaso número de pacientes analizado y su heterogeneidad hacen imposible determinar con propiedad el lugar relativo que ocupa cada modalidad de trasplante en el algoritmo de tratamiento. En todos estos estudios

comparativos el empleo de SCU se ha asociado a un prendimiento mieloide y plaquetario más lento y a una menor incidencia y severidad de EICH, especialmente aguda⁷⁷⁻⁷⁹. Asimismo, en todos ellos la tasa de recaída ha sido muy similar, lo que desecha la teórica desventaja en términos de efecto injerto contra leucemia que teóricamente se esperaba de la SCU dado el menor riesgo de EICH que comporta⁷⁷⁻⁷⁹. Las discrepancias entre estudios son evidentes en los resultados a largo plazo. En el estudio cooperativo estadounidense en pacientes con leucemia, el TSCU fue inferior en términos de MRT y de SLE al TPH de MO de DNE HLA-idéntico y ofreció resultados similares a los alcanzados con MO de DNE con una disparidad HLA⁷⁷. En la serie cooperativa europea en pacientes con leucemia aguda, la MRT y SLE con SCU y MO de DNE HLA-idéntico no fue claramente diferente⁷⁸. Finalmente, en el estudio de una única institución japonesa, la MRT fue inferior y la SLE superior en los receptores de SCU⁷⁹. Este mismo grupo ha comunicado resultados a largo plazo comparables a los obtenidos con TPH de hermano HLA-idéntico⁸⁰.

Otras modalidades de TSCU

El mayor escollo que afronta el TSCU en adultos para que se extienda su empleo es reducir la MRT. La principal causa de MRT es la infección, debida principalmente a la lenta reconstitución inmunológica, a la toxicidad de los regímenes de acondicionamiento mieloablativos convencionales y al retraso del injerto hematopoyético.

Una estrategia que está ganando una gran popularidad en años recientes es el TSCU con dos unidades de SCU. Esta modalidad, desarrollada por la Universidad de Minnesota⁸¹, está basada en el reconocimiento de la importancia pronóstica de la dosis celular en el TSCU y en la posibilidad de que las dos unidades produzcan un efecto sinérgico^{82,83}. Aunque este procedimiento no ha demostrado acelerar el injerto, ofrece unos resultados notables en términos de tasa de injerto mieloide (91%), MRT (18% a 6 meses), recaída (22% a 2 años) y SLE (55% a 2 años)⁸¹. Estos resultados han animado a muchas instituciones a considerarlo en pacientes que no dispongan de una unidad de SCU con una dosis celular adecuada.

Los resultados preliminares con regímenes de acondicionamiento de intensidad reducida y empleando dos unidades de SCU en la mayoría de los casos muestran tasas de MRT y SLE muy aceptables para pacientes que, por su avanzada edad, estado general o por presentar comorbilidad, no se consideran candidatos a un acondicionamiento mieloablativo estándar⁸⁴⁻⁸⁷. En esta modalidad de TSCU la característica que influye más en los resultados a largo plazo es la

Tabla 1. Factores a considerar en la selección de unidades de SCU y de DNE adultos

Fuente de progenitores	Factores fundamentales	Factores secundarios
DNE adulto	Compatibilidad HLA	Edad
		Sexo
		Peso
		Serología a CMV
		Grupo ABO
		País de origen
Unidad de SCU	Dosis celular (CN y CD34+)	Grupo ABO
	Compatibilidad HLA ^a	Banco de SCU
		Incompatibilidad KIR ^b
		Año de congelación

CD34+: células CD34 positivas; CMV: citomegalovirus; CN: células nucleadas; DNE: donante no emparentado; KIR: killer cell immunoglobulin-like receptor; SCU: sangre de cordón umbilical.

^a Criterios diferentes en enfermedades benignas y neoplasias hematológicas (ver texto).

^b En pacientes con leucemia aguda en remisión al trasplante (ver texto).

presencia al trasplante de factores de alto riesgo de MRT⁸⁵, y sus resultados parecen comparables a los obtenidos con acondicionamiento de intensidad reducida en TPH de hermano HLA-idéntico⁸⁶. Otra alternativa innovadora para reducir la MRT precoz infecciosa asociada a la lentitud del injerto ha sido el empleo adicional de células CD34+ de un donante adulto, que prenderían de forma rápida y transitoria recortando la fase de neutropenia inicial⁸⁸. La expansión *ex vivo* de parte de la unidad de SCU como método de aumentar la dosis celular está siendo evaluada actualmente en ensayos clínicos^{89,90}.

Criterios de selección de unidades de SCU

Los resultados del TSCU mejorarán de forma sustancial si se siguen las recomendaciones recientes que deben guiar la selección de la unidad de SCU⁷³. Es importante recalcar que estos criterios, extraídos del análisis pormenorizado realizado por expertos en TSCU de los factores pronósticos de diversos estudios, no pueden considerarse todavía como basados en la evidencia y, con alta probabilidad, deberán ser modificados en breve. Además, no está claro si se deben emplear los mismos criterios en niños y en adultos. El proceso de selección de unidades de SCU es más complejo que el de DNE adulto porque, a diferencia de esta última modalidad de TPH, la posibilidad de disponer de más de una unidad adecuada para trasplante (en la mayoría, 5 o más) es casi universal. Además, los criterios son diferentes. En la Tabla 1 se ofrece una comparación de los criterios a emplear en ambas modalidades de trasplante. Actualmen-

te se considera que las dos características principales a tener en cuenta son la dosis celular y el grado de compatibilidad HLA^{30-32,71-73}. Aunque no es posible establecer un umbral mínimo de dosis celular, algunos expertos consideran que, si solamente se tiene en cuenta la celularidad nucleada (CN) como criterio de dosis celular, la unidad de SCU debería contener a la criopreservación más de 3×10^7 CN por kg de peso del receptor (equivalente a más de $2,5 \times 10^7$ CN por kg de peso del receptor infundidas)⁷³. Si se considera además la dosis de células CD34+ de la unidad, lo que aumenta la probabilidad de elegir una unidad de mayor calidad, la unidad debería contener al menos 2×10^7 células nucleadas por kg de peso del receptor y 1×10^5 células CD34+ por kg de peso del receptor. Siguiendo estos criterios, la tasa y velocidad de injerto en adultos son similares a las encontradas en niños que reciben unidades con una CN mucho más alta^{68-70,91}. El acuerdo en cuanto al umbral de compatibilidad HLA de la unidad con el receptor es absoluto: sólo se deben aceptar para trasplante unidades que presenten como máximo 2 diferencias HLA, considerando HLA-A y -B a nivel antigénico y -DRB1 a nivel alélico^{30-32,71-73}. No obstante, el orden de prioridad según la compatibilidad HLA es diferente según se trate de enfermedades benignas o malignas. Un mayor grado de incompatibilidad HLA se traduce en una tasa de injerto inferior en ambos subgrupos pero también en una reducción del riesgo de recaída en pacientes con neoplasias hematológicas^{51,73}. Así, en adultos con neoplasias hematológicas, la SLE es similar con unidades que no presentan o presentan una o dos incompatibilidades⁷³. Por este motivo, en pacientes con neoplasias hematológicas, el grado de compatibilidad HLA no es crítico. Por el contrario, en pacientes con enfermedades benignas será siempre preferible elegir la unidad que presente el mayor grado de compatibilidad HLA posible. Existe una interacción entre dosis celular y compatibilidad HLA, de tal manera que una mayor dosis celular puede contrarrestar el efecto negativo sobre el injerto de una mayor incompatibilidad HLA^{72,73}. Sin embargo, no es posible todavía establecer con certeza el incremento de la dosis celular que equivale a aumentar en un grado la incompatibilidad HLA. Como se ha comentado anteriormente la compatibilidad alélica en HLA-A, -B, -C, -DP y DQ no ha demostrado hasta la fecha determinar con claridad el curso del TSCU^{74,75}, por lo que no es preciso tenerlo en cuenta en el proceso de selección.

Otros factores a considerar en el proceso de cribado de unidades de SCU para trasplante incluyen la compatibilidad de grupo sanguíneo ABO, el banco de cordón y la fecha de congelación de la unidad, y la existencia de incompatibilidad al ligando KIR con el receptor en dirección injerto contra huésped. Como

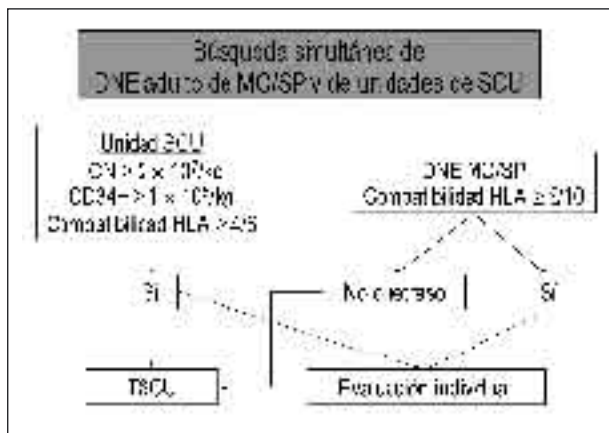


Figura 3. Posible algoritmo de toma de decisión en la búsqueda de DNE adulto y de unidades de SCU. CN: células nucleadas; kg: kilogramos de peso del receptor; MO: médula ósea; SP: sangre periférica.

ocurre en otras modalidades de TPH, en las que la incompatibilidad ABO se ha asociado a diversas complicaciones⁹², incluyendo una menor supervivencia⁹³, en el TSCU se ha comunicado su relación con un retraso del injerto hematopoyético⁹⁴, y datos no publicados de Eurocord sugieren que la incompatibilidad ABO mayor podría reducir la supervivencia global (V. Rocha, comunicación personal). Así, la compatibilidad ABO podría ayudar a discernir entre dos unidades con similar dosis celular y compatibilidad HLA. Aunque no existe evidencia publicada, parece lógico preferir unidades almacenadas en bancos de cordón acreditados y que ofrecen un mayor control de calidad y las almacenadas en años más recientes. Finalmente, en pacientes con leucemia aguda en remisión al trasplante podría ser beneficioso elegir unidades con incompatibilidad al ligando KIR⁷⁶.

Algoritmo de toma de decisión en la búsqueda de DNE adulto o de unidad de SCU

La información disponible indica de forma tajante que la SCU de DNE es una fuente alternativa de progenitores hematopoyéticos segura y eficaz para el trasplante de pacientes sin donante familiar o no emparentado. En niños los datos demuestran claramente que la SCU debe ser considerada como la fuente estándar y, de hecho, ya ha superado a la MO y sangre periférica de DNE³¹. Aunque en adultos los datos no son tan evidentes, el uso de SCU está creciendo de forma considerable^{95,96}, especialmente cuando no se dispone de un DNE adulto compatible en un tiempo razonable.

Por estos motivos, la búsqueda de DNE adulto y de unidades de SCU debe iniciarse de forma simul-

tánea en todos los casos. Al iniciarla debe definirse si el trasplante se considera urgente (demora permitida inferior a 2 meses). En estos casos, si se dispone de una unidad de SCU aceptable, el TSCU estaría indicado de forma inmediata tanto en niños como en adultos. En los casos no urgentes, la decisión sobre la fuente de progenitores hematopoyéticos a emplear debería evaluarse a los 3 meses de iniciada la búsqueda y cada 3 meses, teniendo en cuenta que la probabilidad de encontrar un DNE compatible a partir de los 6 meses de iniciar la búsqueda es prácticamente nula²⁶. En la Figura 3 se ofrece un posible algoritmo de toma de decisión.

Conclusiones

Las posibilidades de mejora de los resultados del TSCU en un futuro cercano son considerables. Además de las estrategias expuestas anteriormente, la simple disponibilidad de un mayor número de unidades de SCU aumentará la probabilidad de encontrar unidades con mayor dosis celular y grado de compatibilidad HLA, lo que indudablemente incrementará las posibilidades de éxito del trasplante. En este sentido, países como España y Estados Unidos están implementando programas nacionales de SCU destinados a financiar el coste que supondrá adecuar los inventarios de unidades de SCU a las necesidades venideras^{97,98}.

En conclusión, los datos disponibles indican, sin ninguna duda, que la SCU de DNE es una fuente de progenitores que puede beneficiar potencialmente a miles de pacientes, niños y adultos, que precisan un trasplante y no disponen de un donante adulto apropiado, especialmente si lo precisan con urgencia.

Bibliografía

1. Beatty PG, Clift RA, Mickelson EM, et al. Marrow transplantation from related donors other than HLA identical siblings. *N Engl J Med* 1985; 313: 765-71.
2. McGlave D, Scott E, Ramsay N, et al. Unrelated donor bone marrow transplantation therapy for chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1987; 70: 877-81.
3. Ash R, Casper JT, Chitambar CR, et al. Successful allogeneic transplantation of T cell depleted bone marrow from closely HLA matched unrelated donors. *N Engl J Med* 1990; 332: 485-94.
4. McCullough J, Hansen J, Perkins H, Stronck D, Bartsch G. The National Marrow Donor Program: How it works, accomplishments to date. *Oncology* 1989; 3: 63-8.
5. Oudshoorn M, van Leeuwen A, vd Zanden HG, van Rood JJ. Bone Marrow Donors Worldwide: a successful exercise in international cooperation. *Bone Marrow Transplant* 1994; 14: 3-8.
6. Bone Marrow Donors Worldwide. Total number of stem cell donors and cord blood units. <http://www.bmdw.org/index.php?id=statistics> (accessed on May 19, 2008).

7. McGlave P, Bartsch G, Anasetti C, et al. Unrelated donor marrow transplantation therapy for chronic myelogenous leukemia: initial experience of the National Marrow Donor Program. *Blood* 1993; 81: 543-50.
8. Szydlo R, Goldman JM, Klein JP, et al. Results of allogeneic bone marrow transplants for leukemia using donors other than HLA-identical siblings. *J Clin Oncol* 1997; 15: 1767-77.
9. Weisdorf DJ, Anasetti C, Antin JH, et al. Allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia: comparative analysis of unrelated versus matched sibling donor transplantation. *Blood* 2002; 99: 1971-7.
10. Spyridonidis A, Bertz H, Ihorst G, Grüllich C, Finke J. Hematopoietic cell transplantation from unrelated donors as an effective therapy for older patients (> or = 60 years) with active myeloid malignancies. *Blood* 2005; 105: 4147-8.
11. Gupta V. Alternative donor transplants for high-risk acute myeloid leukaemia. *Curr Opin Hematol* 2008; 15: 115-20.
12. Lee SJ, Klein J, Haagenson M, et al. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood* 2007; 110: 4576-83.
13. Loiseau P, Busson M, Balere ML, et al. HLA Association with hematopoietic stem cell transplantation outcome: the number of mismatches at HLA-A, -B, -C, -DRB1, or -DQB1 is strongly associated with overall survival. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007; 13: 965-74.
14. Shaw BE, Gooley TA, Malkki M, et al. The importance of HLA-DPB1 in unrelated donor hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2007; 110: 4560-6.
15. Maury S, Balère-Appert ML, Chir Z, et al. Unrelated stem cell transplantation for severe acquired aplastic anemia: improved outcome in the era of high-resolution HLA matching between donor and recipient. *Haematologica* 2007; 92: 589-96.
16. Falagas ME, Vardakas KZ, Samonis G, et al. Decreasing the incidence and impact of infections in neutropenic patients: evidence from meta-analyses of randomized controlled trials. *Curr Med Res Opin* 2008; 24: 215-35.
17. Robenshtok E, Gafter-Gvili A, Goldberg E, et al. Antifungal prophylaxis in cancer patients after chemotherapy or hematopoietic stem-cell transplantation: systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol* 2007; 25: 5471-89.
18. Deeg HJ. How I treat refractory acute GVHD. *Blood* 2007; 109: 4119-26.
19. Kiehl MG, Kraut L, Schwerdtfeger R, et al. Outcome of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation in adult patients with acute lymphoblastic leukemia: no difference in related compared with unrelated transplant in first complete remission. *J Clin Oncol* 2004; 22: 2816-25.
20. Yakoub-Agha I, Mesnil F, Kuentz M, et al. Allogeneic marrow stem-cell transplantation from human leukocyte antigen-identical siblings versus human leukocyte antigen-allelic-matched unrelated donors (10/10) in patients with standard-risk hematologic malignancy: a prospective study from the French Society of Bone Marrow Transplantation and Cell Therapy. *J Clin Oncol* 2006; 24: 5695-702.
21. Moore J, Nivison-Smith I, Goh K, et al. Equivalent survival for sibling and unrelated donor allogeneic stem cell transplantation for acute myelogenous leukaemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007; 13: 601-7.
22. Mielcarek M, Storer BE, Sandmaier BM, et al. Comparable outcomes after nonmyeloablative hematopoietic cell transplantation with unrelated and related donors. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007; 13: 1499-507.
23. Mehta J, Gordon LI, Tallman MS, et al. Does younger donor age affect the outcome of reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematologic malignancies beneficially? *Bone Marrow Transplant* 2006; 38: 95-100.
24. Carreras E, Jiménez M, Gómez-García V, et al. Donor age and degree of HLA matching have a major impact on the outcome of unrelated donor haematopoietic cell transplantation for chronic myeloid leukaemia. *Bone Marrow Transplant* 2006; 37: 33-40.
25. General Accounting Office. Bone marrow transplants: despite recruitment successes, national programs may be underutilized. Washington, D.C.: General Accounting Office, 2002 (GAO-03-182).
26. ONT. Memoria REDMO 2006. En: www.ont.es/Estadistica?accion=1&id_nodo=19&id_estadistica=54&perfil= (accessed on 19 May 2008).
27. Sanz MA, Sanz GF. Unrelated donor umbilical cord blood transplantation in adults. *Leukemia* 2002; 16: 1984-91.
28. Grewal SS, Barker JN, Davies SM, Wagner JE. Unrelated donor hematopoietic cell transplantation: marrow or umbilical cord blood? *Blood* 2003; 101: 4233-44.
29. Sanz MA. Cord-blood transplantation in patients with leukemia – a real alternative for adults. *N Engl J Med* 2004; 351: 2328-30.
30. Rocha V, Sanz G, Gluckman E; Eurocord and European Blood and Marrow Transplant Group. Umbilical cord blood transplantation. *Curr Opin Hematol* 2004; 11: 375-85.
31. Brunstein CG, Setubal DC, Wagner JE. Expanding the role of umbilical cord blood transplantation. *Br J Haematol* 2007; 137: 20-35.
32. Barker JN. Umbilical Cord Blood (UCB) Transplantation: an alternative to the use of unrelated volunteer donors? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007: 55-61.
33. Hwang WY, Samuel M, Tan D, Koh LP, Lim W, Linn YC. A meta-analysis of unrelated donor umbilical cord blood transplantation versus unrelated donor bone marrow transplantation in adult and pediatric patients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007; 13: 444-53.
34. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002; 295: 2097-100.
35. Huang XJ, Liu DH, Liu KY, et al. Haploidentical hematopoietic stem cell transplantation without in vitro T-cell depletion for the treatment of hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant* 2006; 38: 291-7.
36. Ruggeri L, Mancusi A, Capanni M, et al. Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value. *Blood* 2007; 110: 433-40.
37. Koh LP, Rizzieri DA, Chao NJ. Allogeneic hematopoietic stem cell transplant using mismatched/haploidentical donors. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007; 13: 1249-67.
38. Aversa F. Haploidentical haematopoietic stem cell transplantation for acute leukaemia in adults: experience in Europe and the United States. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41: 473-81.
39. Ogawa H, Ikegame K, Kaida K, et al. Unmanipulated HLA 2-3 antigen-mismatched (haploidentical) bone marrow transplantation using only pharmacological GVHD prophylaxis. *Exp Hematol* 2008; 36: 1-8.
40. Ayuk F, Diyachenko G, Zabelina T, et al. Anti-thymocyte globulin overcomes the negative impact of HLA mismatching in transplantation from unrelated donors. *Exp Hematol* 2008 (en prensa).
41. Bone Marrow Donors Worldwide. Total number of cord blood units. http://www.bmdw.org/index.php?id=statistics_cordblood (accessed on 19 May 2008).
42. Barker JN, Krepski TP, DeFor TE, Davies SM, Wagner JE, Weisdorf DJ. Searching for unrelated donor hematopoietic stem cells: availability and speed of umbilical cord blood versus bone marrow. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002; 8: 257-60.
43. Dalle JH, Duval M, Moghrabi A, et al. Results of an unrelated transplant search strategy using partially HLA-mismatched cord blood as an immediate alternative to HLA-matched bone marrow. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33: 605-11.

44. Heemskerk MB, van Walraven SM, Cornelissen JJ, et al. How to improve the search for an unrelated haematopoietic stem cell donor. *Faster is better than more! Bone Marrow Transplant* 2005; 35: 645-52.
45. Oudshoorn M, van Walraven SM, Bakker JN, et al. Hematopoietic stem cell donor selection: the Europdonor experience. *Hum Immunol* 2006; 67: 405-12.
46. Dini G, Valsecchi MG, Micalizzi C, et al. Impact of marrow unrelated donor search duration on outcome of children with acute lymphoblastic leukemia in second remission. *Bone Marrow Transplant* 2003; 32: 325-31.
47. Barker JN, Davies SM, DeFor T, Ramsay NK, Weisdorf DJ, Wagner JE. Survival after transplantation of unrelated donor umbilical cord blood is comparable to that of human leukocyte antigen-matched unrelated donor bone marrow: results of a matched-pair analysis. *Blood* 2001; 97: 2957-61.
48. Michel G, Rocha V, Chevret, et al. Unrelated cord blood transplantation for childhood acute myeloid leukemia: a Eurocord group analysis. *Blood* 2003; 102: 4290-7.
49. Jacobsohn DA, Hewlett B, Ranalli M, Seshadri R, Duerst R, Kletzel M. Outcomes of unrelated cord blood transplants and allogeneic-related hematopoietic stem cell transplants in children with high-risk acute lymphocytic leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2004; 34: 901-7.
50. Eapen M, Rubinstein P, Zhang MJ, et al. Comparable long-term survival after unrelated and HLA-matched sibling donor hematopoietic stem cell transplantations for acute leukemia in children younger than 18 months. *J Clin Oncol* 2006; 24: 145-51.
51. Eapen M, Rubinstein P, Zhang MJ, Stevens C, Kurtzberg J, Scaradavou A, et al. Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. *Lancet* 2007; 369: 1947-54.
52. Bhattacharya A, Slatter MA, Chapman CE, et al. Single centre experience of umbilical cord stem cell transplantation for primary immunodeficiency. *Bone Marrow Transplant* 2005; 36: 295-9.
53. Gennery AR, Cant AJ. Cord blood stem cell transplantation in primary immune deficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007; 7: 528-34.
54. Díaz de Heredia C, Ortega JJ, Díaz MA, et al. Unrelated cord blood transplantation for severe combined immunodeficiency and other primary immunodeficiencies. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41: 627-33.
55. Staba SL, Escolar ML, Poe M, et al. Cord-blood transplants from unrelated donors in patients with Hurler's syndrome. *N Engl J Med* 2004; 350: 1960-9.
56. Martin PL, Carter SL, Kernan NA, et al. Results of the cord blood transplantation study (COBLT): outcomes of unrelated donor umbilical cord blood transplantation in pediatric patients with lysosomal and peroxisomal storage diseases. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12: 184-94.
57. Pinto FO, Roberts I. Cord blood stem cell transplantation for haemoglobinopathies. *Br J Haematol* 2008; 141: 309-24.
58. Gluckman E, Rocha V, Ionescu I, et al. Results of unrelated cord blood transplant in Fanconi anemia patients: risk factor analysis for engraftment and survival. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007; 13: 1073-82.
59. Gluckman E, Wagner JE. Hematopoietic stem cell transplantation in childhood inherited bone marrow failure syndrome. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41: 127-32.
60. Rocha V, Gluckman E. Outcomes of transplantation in children with acute leukaemia. *Lancet* 2007; 369: 1947-54.
61. Arcese W, Rocha V, Labopin M, et al. Unrelated cord blood transplants in adults with hematologic malignancies. *Hematologica* 2006; 91: 223-30.
62. Laughlin MJ, Barker J, Bambach B, et al. Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. *N Engl J Med* 2001; 344: 1815-22.
63. Sanz GF, Saavedra S, Planelles D, et al. Standardized, unrelated donor cord blood transplantation in adults with hematologic malignancies. *Blood* 2001; 98: 2332-8.
64. Long GD, Laughlin M, Madan B, et al. Unrelated umbilical cord blood transplantation in adult patients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003; 9: 772-80.
65. Ooi J, Iseki T, Takahashi S, et al. Unrelated cord blood transplantation for adult patients with de novo acute myeloid leukemia. *Blood* 2004; 103: 489-91.
66. Ooi J, Iseki T, Takahashi S, Tomonari A, Tojo A, Asano S. Unrelated cord blood transplantation for adult patients with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2004; 18: 1905-7.
67. Ooi J, Iseki T, Takahashi S, et al. Unrelated cord blood transplantation for adult patients with advanced myelodysplastic syndrome. *Blood* 2003; 101: 4711-3.
68. Sanz G, Lorenzo I, Moscardó F, et al. Outcome and prognostic factors after unrelated donor umbilical cord blood transplantation in adult patients with hematologic malignancies transplanted in early disease stages. *Blood* 2004; 104: 2149 (abstract).
69. Sanz G, Cantero S, Larrea L, et al. Long-term outcome and prognostic factors after single-unit umbilical cord blood transplantation for adults with hematologic malignancies. *Blood* 2006; 108: 3129 (abstract).
70. Sanz J, Lorenzo I, Montesinos P, et al. Unrelated donor umbilical cord blood transplantation (UD-UCBT) for adult patients with high-risk acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood* 2007; 110: 2024 (abstract).
71. Kamani N, Spellman S, Hurley CK, et al. State of the art review: HLA matching and outcome of unrelated donor umbilical cord blood transplants. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; 14: 1-6.
72. Gluckman E, Rocha V, Arcese W, et al. Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: guidelines for donor choice. *Exp Hematol* 2004; 32: 397-407.
73. Gluckman E, Rocha V. Donor selection for unrelated cord blood transplants. *Curr Opin Immunol* 2006; 18: 565-70.
74. Kogler G, Enczmann J, Rocha V, Gluckman E, Wernet P. High-resolution HLA typing by sequencing for HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ in 122 unrelated cord blood/patient pair transplants hardly improves long-term clinical outcome. *Bone Marrow Transplant* 2005; 36: 1033-41.
75. Liao C, Wu JY, Li Y, et al. Indiscernible benefit of high-resolution HLA typing in improving long-term clinical outcome of unrelated cord blood transplant. *Bone Marrow Transplant* 2007; 40: 201-8.
76. Willemze R, Arrais Rodrigues C, Labopin M, et al. Inhibitory KIR-ligand incompatibility is associated with decreased relapse incidence and improved disease-free survival and overall survival after unrelated umbilical cord blood stem cell transplantation in patients with acute leukemia in complete remission. *Blood* 2007 (submitted).
77. Laughlin MJ, Eapen M, Rubinstein P, et al. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N Engl J Med* 2004; 351: 2265-75.
78. Rocha V, Labopin M, Sanz G, et al. Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N Engl J Med* 2004; 351: 2276-85.
79. Takahashi S, Iseki T, Ooi J, et al. Single-institute comparative analysis of unrelated bone marrow transplantation and cord blood transplantation for adult patients with hematological malignancies. *Blood* 2004; 104: 3813-20.
80. Takahashi S, Ooi J, Tomonari A, et al. Comparative single-institute analysis of cord blood transplantation from unrelated donors with bone marrow or peripheral blood stem-cell transplants from related donors in adult patients with hematologic malignancies after myeloablative conditioning regimen. *Blood* 2007; 109: 1322-30.

81. Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, et al. Transplantation of two partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood* 2005; 105: 1343-7.
82. Nauta AJ, Krusselbrink AB, Lurvink E, et al. Enhanced engraftment of umbilical cord blood-derived stem cells in NOD/SCID mice by cotransplantation of a second unrelated cord blood unit. *Exp Hematol* 2005; 33: 1249-56.
83. Scaradavou A, Sung D, Rubinstein P. Combined neonatal blood transplants in a parent-to-F1 mouse model: improved survival rates and stable long-term engraftment. *Am J Hematol* 2007; 82: 961-9.
84. Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, Blazar BR, Miller JS, Wagner JE. Rapid and complete donor chimerism in adult recipients of unrelated donor umbilical cord blood transplantation after reduced-intensity conditioning. *Blood* 2003; 102: 1915-9.
85. Brunstein CG, Barker JN, Weisdorf DJ, et al. Umbilical cord blood transplantation after nonmyeloablative conditioning: impact on transplant outcomes in 110 adults with hematological disease. *Blood* 2007; 110: 3064-70.
86. Majhail NS, Brunstein CG, Tomblyn M, et al. Reduced-intensity allogeneic transplant in patients older than 55 years: unrelated umbilical cord blood is safe and effective for patients without a matched related donor. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; 14: 282-9.
87. Ballen KK, Spitzer TR, Yeap BY, et al. Double unrelated reduced-intensity umbilical cord blood transplantation in adults. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007; 13: 82-9.
88. Magro E, Regidor C, Cabrera R, et al. Early hematopoietic recovery after single unit unrelated cord blood transplantation in adults supported by co-infusion of mobilized stem cells from a third party donor. *Haematologica* 2006; 91: 584-7.
89. Shpall EJ, Quinones R, Giller R, et al. Transplantation of ex vivo expanded cord blood. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002; 8: 368-76.
90. de Lima M, McMannis J, Gee A, et al. Transplantation of ex vivo expanded cord blood cells using the copper chelator tetraethylenepentamine: a phase I/II clinical trial. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41: 771-8.
91. Sanz J, Arcese W, Hernández-Boluda JC, et al. Low transplant-related mortality in patients with hematologic malignancies undergoing umbilical cord blood transplantation (UCBT) with thiotepa (TT), once-daily intravenous (IV) busulfan (BU), fludarabine (FLU) and anti-thymocyte globulin (ATG). *Blood* 2007; 110: 618 (abstract).
92. Seebach JD, Stussi G, Passweg JR, et al. ABO blood group barrier in allogeneic bone marrow transplantation revisited. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11: 1006-13.
93. Michallet M, Le QH, Mohty M, et al. Predictive factors for outcomes after reduced intensity conditioning hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies: a 10-year retrospective analysis from the Société Française de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire. *Exp Hematol* 2008; 36: 535-44.
94. Tomonari A, Takahashi S, Ooi J, et al. Impact of ABO incompatibility on engraftment and transfusion requirement after unrelated cord blood transplantation: a single institute experience in Japan. *Bone Marrow Transplant* 2007; 40: 523-8.
95. Gratwohl A, Baldomero H, Frauendorfer K, et al. The EBMT activity survey 2006 on hematopoietic stem cell transplantation: focus on the use of cord blood products. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41: 687-705.
96. ONT. Memoria de trasplante de progenitores hematopoyéticos 2006. En: www.ont.es/estadisticas/ficherosZip/memtp2006.zip (accessed on 21 May 2008).
97. ONT. Plan nacional de sangre de cordón umbilical. En: www.ont.es/Consenso?accion=0&posicion=4&id_nodo=263 (accessed on 21 May 2008).
98. Committee on Establishing a National Cord Blood Stem Cell Bank Program. Institute of Medicine of the National Academies. Cord blood: establishing a national hematopoietic stem cell bank program. Meyer EA, Hanna K, Gebbie K (eds.). Washington, DC: The National Academies Press; 2005.

Viejas y nuevas enfermedades de la sangre vinculadas a la inmigración: lo que hay que saber

J.M.^a MORALEDA¹, E. SALIDO¹, B. CARRILERO², M. SEGOVIA², A. SÁNCHEZ SALINAS¹, M. BLANQUER¹

¹Servicio de Hematología y Hemoterapia. ²Servicio de Microbiología.

Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. Murcia

Introducción

El fenómeno de la inmigración en España está relacionado con el importante desarrollo económico y social que ha experimentado nuestro país en las últimas décadas. Este y otros factores como el turismo, la cooperación internacional, el comercio y otros aspectos producto de la globalización han determinado la aparición de nuevas enfermedades o la reemergencia de algunas que, como la malaria, estaban erradicadas. Muchas de estas enfermedades entran de lleno en la actividad asistencial del hematólogo, ya sea porque se trata de enfermedades intrínsecas de la sangre o porque precisan de él para un diagnóstico adecuado. En este apartado no pretendemos ser exhaustivos sino revisar las patologías que con más frecuencia se están produciendo en nuestro país, y para ello es importante tener en consideración algunos datos epidemiológicos de los flujos migratorios. La población inmigrante ha crecido exponencialmente en España: actualmente registra la cifra de 4.519.554 de personas, lo que supone el 10% del total de la población (Figura 1). Por otra parte, su distribución geográfica es irregular alcanzando en algunas comunidades como la de Murcia el 14,5% de la población (Figura 2). En este contexto resulta trascendente conocer las enfermedades endémicas en el país de origen del inmigrante. Según cifras del Instituto Nacional de Estadística, los flujos migratorios no comunitarios provienen principalmente de Marruecos (576.344 personas), Ecuador (421.384), Colombia (258.726), Bolivia (198.770), Argentina (139.711) y China (104.997). Las enfermedades paradigmáticas que vamos a considerar son la anemia de células falciformes –como ejemplo de hemopatía congénita que requiere cuidados clínicos especiales–, la tripanosomiasis –por su impacto en la política transfusional– y la malaria –que puede afectar no sólo a los inmigrantes de zonas endémicas sino a los españoles que, cada vez con mayor frecuencia, viajan a esos países–.

Anemia de células falciformes

La anemia de células falciformes (ACF) es una enfermedad hereditaria autosómica dominante incompleta. Se halla muy extendida por todo el mundo, especialmente en individuos oriundos de África ecuatorial. En

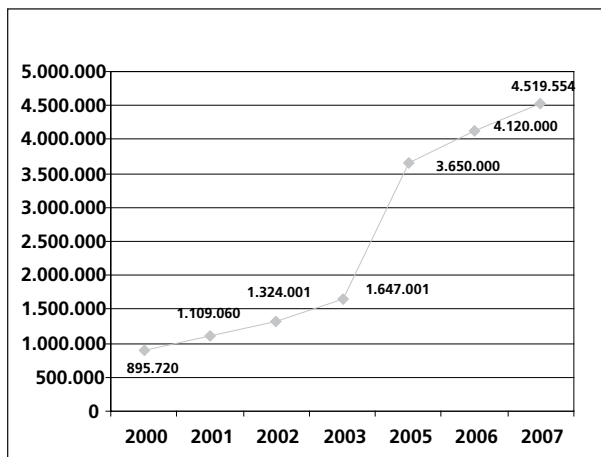


Figura 1. Población extranjera empadronada en España (INE).

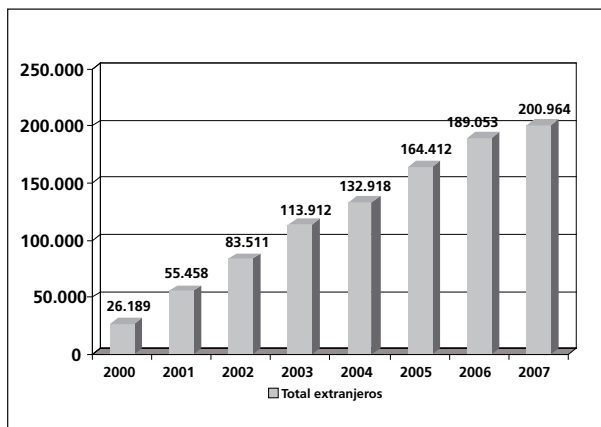


Figura 2. Evolución de la inmigración en la Comunidad de Murcia (INE).

su forma homocigota (HbSS) es causante de la drepanocitosis o ACF y, junto con la hemoglobinopatía C, constituye la hemoglobinopatía estructural más frecuente. Debido a que los hematíes portadores de hemoglobina S (HbAS) son resistentes a la infección por *P. falciparum*, la distribución geográfica de la hemoglobinopatía es paralela a las áreas en las que existe o ha existido el paludismo. La mayor incidencia de HbS corresponde al África ecuatorial, donde el 45% de la población es portadora y la enfermedad SS alcanza una

prevalencia del 2-3%. En Latinoamérica la prevalencia de los portadores es del 1%. En España la incidencia está creciendo debido al aumento de la población inmigrante procedente de estas zonas. En estudios recientes de cribado neonatal de hemoglobinopatías, uno de cada 400 recién nacidos de padres oriundos de África tropical son homocigotos SS^{1,2}.

Fisiopatología. Nuevos conocimientos

La HbS es el resultado de la sustitución de la base timina por la adenina en el codón 6 del gen β (Cr.11) de la globina, lo que supone la sustitución del aminoácido glutámico (carga negativa) por valina (carga neutra): $\beta 6(A3)Glu \rightarrow Val$. Existen diferentes haplotipos β^S (patrones polimórficos de DNA que flanquea el gen β , y que se reconocen por PCR y utilizando endonucleasas de restricción), que se correlacionan la intensidad del cuadro clínico y dan una idea de las corrientes migratorias.

El paradigma de la enfermedad es la falciformación, polimerización o *sickling*. Como consecuencia de la mutación $\beta 6(A3)Glu \rightarrow Val$, la hemoglobina desoxigenada (desoxi-Hb) sufre un proceso espontáneo de polimerización en el que adopta la estructura de un gel paracrystalino (cuerpo tactoide). Cada polímero está formado por 14 tetrámeros de desoxi-Hb que se disponen formando haces cilíndricos longitudinales entre sí. Esta estructura es insoluble y rígida, y modifica el aspecto del hematíe, que adopta forma de hoz. Cuando la HbS se desoxigena, se produce un cambio conformacional que permite que los residuos de valina, generados por la mutación en $\beta 6$, que son hidrofóbicos, interaccionen con lugares hidrofóbicos complementarios en cadenas beta de globina adyacentes iniciando la polimerización. Este proceso no es instantáneo: primero se da un periodo de latencia en el cual se forman pequeños agregados de desoxi-Hb y, en fase posterior, los haces o fibras. Este cambio conformacional, inicialmente reversible, es dependiente de una serie de factores; de ellos, el más importante es la disminución de la presión parcial de oxígeno, aunque también influyen la concentración intraeritrocitaria de HbS y de HbF, el pH, la temperatura y fuerza iónica¹⁻³.

Pero mientras que el *sickling* es un evento citoplasmático, la membrana del hematíe tiene una importante implicación fisiopatológica y sufre alteraciones secundarias. En los últimos años se le está dando mucha importancia a la función de los fosfolípidos de membrana. La membrana de los hematíes es una bicapa fluida, compuesta por fosfolípidos, colesterol no esterificado y, en menor proporción, por ácidos grasos y glucolípidos. Los fosfolípidos se distribuyen de forma asimétrica situándose, en la parte externa de la bicapa, la fosfatidilcolina y la esfingomielina, mientras

que, en la parte interna, predominan los aminofosfolípidos fosfatidilserina (FS) y fosfatidiletanolamina (FE). Esta distribución asimétrica se mantiene durante toda la vida del hematíe gracias a un transportador de FS y FE dependiente de ATP denominado flipasa (aminofosfolípido-translocasa), que transporta FS y FE desde la superficie externa de la membrana hacia la parte interna. Como consecuencia de repetidos ciclos de *sickling* y *unsickling*, se produce un estrés oxidativo que reduce o inhibe la actividad translocasa en una gran proporción de hematíes, lo que redundará en una permanente exposición de la FS en la parte externa de la bicapa. Los mecanismos de esta inhibición parecen estar relacionados con la generación de especies reactivas de oxígeno (superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales libres), derivada de la formación de los cuerpos tactoides que inhiben la flipasa. Ello altera la permeabilidad de la membrana y aumenta la permeabilidad pasiva al potasio con el consiguiente aumento de la concentración intracelular de calcio, que también puede inhibir a la flipasa^{2,3}.

La disposición anormal de la FS tiene como consecuencias: 1) se produce la adhesión directa de la PS a la trombospondina de la matriz subendotelial con la consiguiente activación de la coagulación, de las plaquetas y disminución de la supervivencia de los hematíes (hemólisis); 2) la FS en la parte externa de la bicapa la hace vulnerable a la hidrólisis por la fosfolipasa A₂ de secreción (FLA_{2s}); esta enzima actúa sobre las membranas que han perdido la asimetría fosfolipídica generando lisofosfolípidos, ácidos grasos libres como el ácido araquidónico y sus productos metabólicos (prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos), importantes mediadores inflamatorios, que reclutan a los leucocitos y cuyos niveles se correlacionan con el grado de daño vascular⁴.

Otro aspecto fisiopatológico importante es la producción de óxido nítrico (ON), que juega un papel fundamental en la función endotelial. Los niveles de ON dependen de su sustrato, la arginina. El ON, producto de la acción de distintas isoformas de óxido nítrico sintasa (ONS) sobre la arginina (Arg), y las prostaglandinas generadas por ciclooxigenasas a partir del ácido araquidónico son importantes mediadores de la neovascularización. La arginasa, otra enzima involucrada en este proceso, utiliza el mismo sustrato que la ONS, la arginina; la arginasa y la ONS compiten por la arginina y existe una regulación recíproca entre ambas vías metabólicas. En los pacientes con ACF los niveles de arginina están prácticamente normales, pero en las crisis disminuyen drásticamente; también en las crisis parece disminuir la actividad ONS y aumentar la actividad arginasa. Cuando los niveles de arginina son escasos, ésta se deriva mayoritariamente hacia el ciclo de la urea a través de la arginasa produciéndose ornitina, prolina, citrulina, urea y poliaminas que pue-

Tabla 1. Principales órganos diana de las crisis vasooclusivas (fase aguda)

ÓRGANO	SÍNDROME	CLÍNICA
Vasos pulmonares	Síndrome torácico agudo	· Fiebre, distrés respiratorio, infiltrados pulmonares y dolor torácico agudo · Es una complicación frecuente · Constituye la causa más frecuente de hospitalización de estos pacientes y puede ser fatal
Huesos	Crisis óseas	· Dolor óseo generalizado (en huesos largos, crisis dolorosas condrocostales o vertebrales)
Capilares extremidades	Dactilitis; síndrome mano-pie	· Dolor agudo y tumefacción subcutánea e impotencia funcional de dedos de manos y pies
Vasos mesentéricos	Infarto mesentérico	· Abdomen agudo
Bazo	Secuestro esplénico	· Son de inicio temprano, a partir del segundo-tercer mes de vida y de mortalidad alta · Se estima una recurrencia después del primer episodio del 50% · Se caracteriza por caída súbita de la Hb y hematocrito, esplenomegalia y <i>shock</i> hipovolémico
Vasos cerebrales	Accidente vascular cerebral	· Hemiplejía, monoplejía, convulsiones, afasia · El origen del ACV es en el 80% de los casos trombótico, y en menos del 20%, hemorrágico · El 10% de los niños entre 2 y 10 años presentan infartos clínicos y el 17% silentes

Tabla 2. Fases de las crisis dolorosas

FASE	DURACIÓN	DOLOR	FALCIFORMACIÓN	OTRAS CARACTERÍSTICAS
Prodrómica	3 días	+	+	—
Inicial	2 días	+++	++++	Leucocitosis Anemia Trombopenia Reticulocitosis
Crisis establecida	4 días	++++	Establecida	Aumento marcadores inflamatorios (mayor leucocitosis, aumento PCR) y de hemólisis (mayor anemia, más reticulocitosis, elevación LDH)
Resolución	3 días	+	Disminución	Estado de hipercoagulabilidad: trombocitosis y aumento fibrinógeno

den afectar a una remodelación patológica del hueso. En caso de hemólisis el proceso se acentúa, pues ésta disminuye los niveles de arginina y la hemoglobina libre secuestra el ON producido. Otras acciones del ON son vasodilatación, disminución de la agregación plaquetaria, disminución de los niveles de moléculas de adhesión endotelial (VCAM, ICAM, e-selectina) y disminución de las especies reactivas de O₂^{2,3}.

Por tanto, la ACF es actualmente reconocida como una enfermedad inflamatoria en la que participa primariamente el hematíe, pero en la que están involucrados los leucocitos y plaquetas produciendo el daño inflamatorio. El recuento leucocitario es un fuerte predictor de la severidad de la crisis y los niveles de PCR se pueden usar como marcadores del grado de inflamación en los pacientes con ACF²⁻⁴.

Clínica

Pasados los 4-6 primeros meses de vida, en los que es poco manifiesta debido al efecto protector de la HbF, la enfermedad pasa por una serie de etapas:

1.ª: Fase estacionaria (1-4 años), caracterizada por un síndrome hemolítico moderado-severo e hiperesplenismo con esplenectomía funcional.

2.ª: Fase de expresividad aguda, a partir de los 4 años, caracterizada por anemia hemolítica más severa y por la aparición de crisis vasooclusivas cuya principal manifestación es el dolor.

Las crisis dolorosas agudas pueden aparecer espontáneamente, aunque suele existir un factor desencadenante (infecciones, hipotermia, acidosis, hipoxemia, fiebre, deshidratación, menstruación) y se deben a oclusiones de la microvasculatura que pueden afectar a cualquier órgano (Tabla 1). En la mayoría de los pacientes, la crisis dolorosa sigue una evolución escalonada cuyas características se muestran en la Tabla 2.

Las infecciones son frecuentes en esta fase y representan la principal causa de mortalidad, particularmente en niños menores de 5 años. Dado que la infección favorece las crisis vasooclusivas, constituye un temible círculo vicioso que se debe prevenir. La infección, consecuencia de la asplenia funcional y del déficit de actividad opsónica, es ocasionada por gérmenes capsulados como *S. pneumoniae*, *H. influenzae*,

Tabla 3. Principales manifestaciones de la fase de expresividad crónica

ÓRGANO	CLÍNICA
Sistema musculoesquelético	Retraso del crecimiento, lesiones osteoarticulares, necrosis avascular de caderas
A nivel del bazo	Autoesplenismo
A nivel de SNC	Isquemia e infarto que da lugar a secuelas motoras, disfunción neurocognitiva, retraso psicomotor
A nivel pulmonar	Insuficiencia respiratoria obstructiva y fibrosis pulmonar progresiva que conduce a un cuadro de hipertensión pulmonar (HTP)
A nivel renal	Necrosis papilar por microtrombosis de las asas de Henle. La primera manifestación es la hipostenuria. Posteriormente, tubulopatía renal distal, necrosis papilar, esclerosis glomerular e insuficiencia renal crónica. Posibilidad de carcinoma medular renal
Corazón	Cardiomegalia por anemia crónica, insuficiencia cardíaca que puede ser secundaria a la HTP, HTA secundaria a insuficiencia renal o a hemosiderosis postransfusional
A nivel ocular	Oclusión de pequeños vasos de la retina que da lugar a neovascularización, hemorragia vítrea y desprendimiento de retina
A nivel hepático	Hepatomegalia y litiasis biliar por hemólisis crónica. Insuficiencia hepatocelular por hemosiderosis postransfusional
Otros	Úlceras maleolares, impotencia y priapismo

Tabla 4. Indicaciones TPH en caso de disponer de donante HLA compatible

Infarto cerebral o ACV de más de 24 h de duración o recurrente
Función neuropsicológica anormal con RM craneal alterada
Síndrome torácico agudo recurrente o que ha requerido exanguinotransfusión
Crisis vasooclusivas dolorosas graves recurrentes
Priapismo recurrente
Nefropatía falciforme (filtrado glomerular < 30-50% del valor normal)
Retinopatía proliferativa bilateral
Osteonecrosis de varias articulaciones
Aloinmunización de hematíes (2 o más anticuerpos)

zae, y *M. pneumoniae*. También son más frecuentes las infecciones por meningococo, *S. aureus*, *S. viridans*, *E. coli* y *Salmonella*, y los que tienen sobrecarga férrica tienen más riesgo de infección por *Yersinia enterocolitica*, así como crisis aplásicas por parvovirus B19.

3.ª: Fase de expresividad crónica. Es propia de la adolescencia y edad adulta, y se caracteriza por daño crónico en diferentes órganos (Tabla 3).

Los cuadros clínicos más característicos son los accidentes vasculares cerebrales (ACV) y el síndrome torácico agudo. El riesgo de ACV es del 0,5-1% por año, pero aumenta al 10% si la velocidad sanguínea en la arteria cerebral media supera los 200 cm/s. Una vez que un paciente ha presentado un infarto, el riesgo de recurrencia es muy alto (50%). La ultrasonografía Doppler transcraneal (UDT) sirve para identificar a los pacientes de alto riesgo; éstos deben tratarse con trasfu-

siones profilácticas que previenen el 90% de los ACV. Las crisis pulmonares, fisiopatológicamente relacionadas con la producción de ON, determinan fibrosis pulmonar progresiva e hipertensión pulmonar (HTP). Esta última se define como una velocidad de regurgitación tricuspídea $\geq 2,5$ m/s, y es una complicación que afecta a más del 40% de los pacientes con ACF. El péptido NT pro-BNP es un marcador indirecto de la HTP⁵.

Poco a poco, las crisis dolorosas agudas dan lugar a otro tipo de dolor más crónico. La fisiopatología de esta transición es poco conocida. Existen dos tipos de dolor crónico: el que se produce por causas orgánicas objetivables (úlceras, necrosis avascular, osteomielitis) y otro, más difícil de controlar, sin una causa objetivable clara, que puede aparecer tras las crisis agudas no tratadas adecuadamente⁶.

Tratamiento

El único tratamiento curativo disponible para la ACF es el trasplante de progenitores hematopoyéticos. Sin embargo, dada su elevada morbimortalidad, esta opción está limitada a pacientes menores de 16 años con donante HLA-compatible que tengan determinados factores de riesgo (Tabla 4). La supervivencia a cinco años en pacientes seleccionados es del 70-85%. Sin embargo, los resultados empeoran con la edad y no está claro que se revierta el daño orgánico acumulado, particularmente del SNC⁷. Los resultados recientes de los trasplantes con acondicionamiento de intensidad reducida abren una nueva perspectiva a esta opción terapéutica⁸.

Por tanto, para la mayoría de los pacientes con drepanocitosis el tratamiento se basa en la prevención de

Tabla 5. Pautas generales de tratamiento

Tomar ácido fólico diariamente
Administración de penicilina profiláctica hasta los 6 años
Mantener un buen estado de hidratación mediante la ingesta de 8-10 vasos de agua al día (adultos)
Evitar los ambientes excesivamente fríos y calurosos
Evitar el ejercicio físico intenso y el estrés
Procurar un máximo de reposo
Realizar controles médicos periódicos

las crisis agudas vasooclusivas, en la evitación de todas aquellas situaciones que favorezcan su aparición (infecciones, exposiciones al frío, acidosis, hipoxemia) y en el seguimiento estrecho de los pacientes, a los que se les efectuarán exploraciones complementarias cada 6-12 meses: radiografía de tórax, función pulmonar, UDT, ecografía abdominal, electrocardiograma, ecocardiograma, función renal y fondo de ojo. El Sickle Cell Information Center de Georgia (www.scinfo.org) recomienda unas pautas básicas fáciles de cumplir (Tabla 5). Los únicos tratamientos con eficacia preventiva demostrada son la hipertransfusión y la terapia con hidroxurea y la hipertransfusión¹.

Hidroxurea

El tratamiento con hidroxurea incrementa la HbF, lo que mejora los síntomas, reduce la frecuencia de las crisis y prolonga la supervivencia. Los pacientes con valores más elevados de neutrófilos y reticulocitos son los que mejor responden. Se administra en dosis inicial de 15-20 mg/kg/día, aumentando 5 mg/kg/día cada 2-3 meses hasta conseguir niveles de HbF > 20% o mientras que se evidencie toxicidad (dosis máxima 30 mg/kg/día). Se debe comprobar el incremento de VCM que refleja fielmente el aumento de la HbF. La hidroxurea está indicada en pacientes con crisis dolorosas vasooclusivas frecuentes, síndrome torácico agudo, anemia sintomática y otras complicaciones graves como el priapismo⁹.

Transfusiones periódicas

También disminuyen la incidencia de las crisis y prolongan la supervivencia. Son el estándar para la prevención primaria y secundaria de las crisis. A pesar de la excelente tolerancia a la anemia de estos pacientes, se aconsejan niveles de Hb adecuados, sin superar los 100-110 gr/L por el riesgo de hiperviscosidad. El objetivo del régimen hipertransfusional es disminuir la concentración de HbS por debajo del 30%. Esto se

consigue mediante la administración de transfusiones cada 4 semanas, durante un tiempo que oscila entre los 2-3 años, y siempre que persista la causa que motivó su inicio. Las indicaciones de la hipertransfusión son la prevención del infarto cerebral primario y recurrente, y si no hay respuesta a hidroxurea en las crisis vasooclusivas dolorosas recurrentes.

Aparte del riesgo infeccioso (el principal es el VHC) y la sobrecarga férrica, la hipertransfusión conlleva el riesgo de aloinmunización que puede darse hasta en un 25% de los pacientes, y de síndrome hiperinmune. En este sentido, se recomienda fenotipado extenso del paciente antes de empezar el programa y transfundir hematíes compatibles para los sistemas Rh y Kell.

Tratamiento de las complicaciones y novedades terapéuticas

El tratamiento de las infecciones y otras complicaciones es de importancia capital para un manejo adecuado de estos pacientes, e implica medidas de soporte multifactoriales que se resumen en la Tabla 6. También se han iniciado estrategias terapéuticas basadas en nuevos conocimientos fisiopatológicos, pero aún se consideran experimentales:

- Óxido nítrico inhalado. Podría ser útil en el síndrome torácico agudo.
- Sildenafil. Es un fármaco que aumenta el ON y la HbF y podría ser útil para la HTP primaria. Está aprobada en Estados Unidos.
- Ácidos grasos de cadena corta. Parece que aumentan la HbF.
- Agentes que bloquean el transporte catiónico de membrana.

Malaria

La malaria puede ser causada por cuatro especies de *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*. Se transmite por la picadura de la hembra del mosquito *Anopheles*. El parásito tiene un ciclo de desarrollo en el intestino del mosquito que es dependiente de la temperatura (> 15 °C y no menos de 8 °C por la noche), lo que explica su distribución geográfica en los trópicos y subtropicales, excepto en áreas por encima de 2.000 metros (Figura 3). Constituye la principal enfermedad infecciosa en el mundo y es endémica en más de 100 países, aunque, debido a la emigración, más del 40% de la población mundial está expuesta¹⁰. Existen 500 millones de casos de malaria/año siendo la causa de muerte de más de 2 millones de personas/año, el 75% de las cuales son niños. La mortalidad es del 100% en los casos no tratados y del 15-20% en los tratados. Los grupos de

Tabla 6. Tratamiento de las complicaciones de la drepanocitosis

COMPLICACIÓN	TRATAMIENTO
Infecciones	Vacuna antineumocócica. Vacuna antimeningocócica conjugada, vacuna anti- <i>Haemophilus b</i> , anti-hepatitis B y vacuna de la gripe. Penicilina oral profiláctica: 125 mg/12 h de los 3 meses a los 3 años y 250 mg/12 h desde los 3 a los 5 años. Después, opcional
Crisis de dolor	Hidratación, oxigenoterapia, antibioterapia y analgesia precoz AINE. Opiáceos. Vía oral para dolor moderado e intravenosa en severo En dolor neuropático: anticonvulsivante, antidepresivos Antieméticos y benzodiacepinas si es preciso
Transfusión terapéutica	Indicada en ACV agudo, anemia aguda o anemia crónica sintomática, neumonía con hipoxia, crisis de secuestro esplénico, crisis aplásicas y crisis dolorosas
Exanguinotransfusión	En ACV agudo y síndrome torácico agudo con hipoxia Indicada en pacientes con Hb \geq 90 g/L ya que un aumento de Hb alrededor de 110 g/L puede incrementar la viscosidad En estos casos hay que disminuir la concentración de HbS por debajo del 30%
ACV	Suelen ocurrir en el polígono de Willis Exanguinotransfusión en las formas agudas graves establecidas Transfusiones periódicas como prevención primaria, aunque también se puede usar la hidroxiurea como prevención primaria o secundaria
Quelación	Desferrioxamina en situaciones agudas relacionadas con la sobrecarga de hierro (insuficiencia cardíaca congestiva). En situaciones crónicas se están evaluando los quelantes orales (deferisirox y deferiprona)



Figura 3. Áreas endémicas de malaria y puntos de resistencia de *Plasmodium falciparum*. (FUENTE: OMS, 2005.)

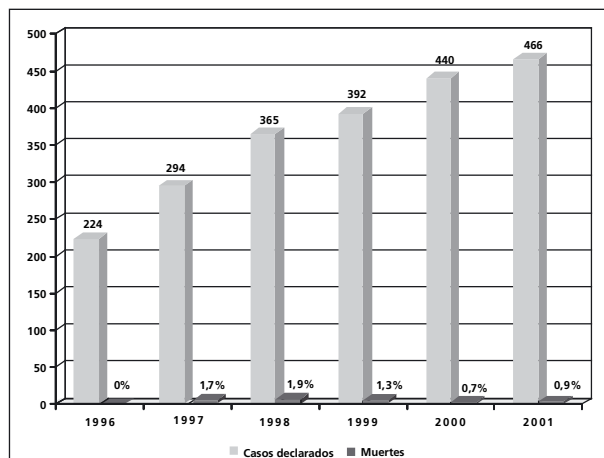


Figura 4. Paludismo importado en España.

más alto riesgo son los niños, las gestantes y los viajeros no inmunizados. En este sentido conviene recordar que el 25% de los españoles viaja anualmente al trópico; también, que el paludismo en nuestro país ha experimentado un notable crecimiento en los últimos años como consecuencia de la inmigración, y que la mayoría de los casos son debidos a *P. falciparum* (Figuras 4 y 5).

En la Figura 6 se expone el ciclo vital del parásito: el proceso se inicia en el intestino del mosquito donde los gametocitos se transforman en esporozoitos, que son inoculados por la saliva de la picadura a los seres humanos. Los esporozoitos llegan al hígado, donde se multiplican y destruyen al hepatocito tras-

formándose en merozoítos que pasan a la sangre infectando los hematíes. En el caso de *P. vivax* y *P. ovale* algunos parásitos permanecen latentes en los hepatocitos (hipnozoítos) y pueden reactivarse posteriormente causando recaídas de la enfermedad hasta 12 meses más tarde del episodio inicial. Dentro de los glóbulos rojos continúan su multiplicación y maduración de trofozoíto a esquizonte y finalmente nuevos merozoítos que, al romperse el hematíe, infectan otras células. Éste tiene una duración variable dependiendo del tipo de parásito. Algunos merozoítos no se transforman en trofozoítos sino en gametocitos que permanecen dentro de los hematíes y son ingeridos por los mosquitos en la picadura, completándose así el ciclo. El *P. vivax* necesita el antígeno Duffy (Fya

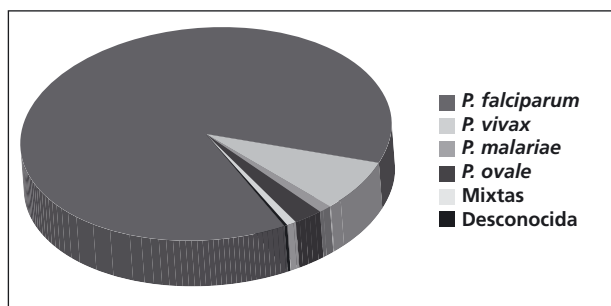


Figura 5. Tipos de paludismo en Europa 2006.

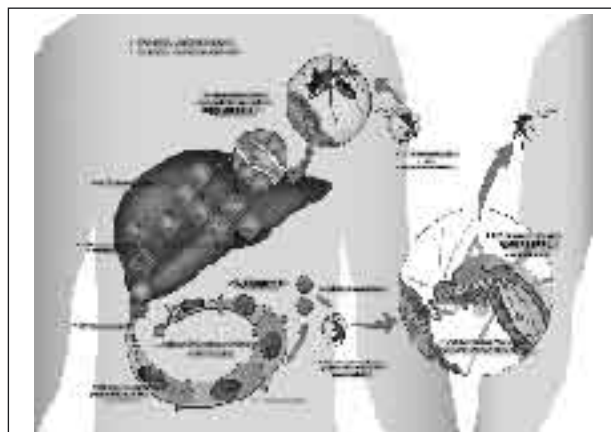


Figura 6. Ciclo vital del plasmodio.

Fyb) para facilitar su penetración en los hematíes, por lo que la ausencia de dicho antígeno confiere una inmunidad natural hacia la malaria. La presencia de hemoglobina S protege contra el *P. falciparum* y también la deficiencia de piruvato quinasa^{11,12}.

Clínica

Tras un periodo de incubación de 10-30 días, la enfermedad se manifiesta por fiebre de hasta 40 °C, con tiritona y sudación profusa, acompañadas de cefalea, malestar general, artromialgias, náuseas y vómitos. Las clásicas fiebres tercianas o cuartanas son raras. Es típica la aparición de anemia, ictericia y esplenomegalia debida a la hemólisis.

La malaria grave suele ser secundaria a infección por *P. falciparum*, en la que los hematíes rellenos de esquizontes poco deformables y más frágiles se adhieren a receptores específicos de los capilares del cerebro, riñones, hígado, intestino y otros órganos, causando obstrucción mecánica y liberación de toxinas y citoquinas que determinan disfunción orgánica (Tabla 7). Se da con más frecuencia en los pacientes no inmunizados, en los niños y en las embarazadas¹³.

Tabla 7. Características clínicas y biológicas de la malaria grave por *P. falciparum*

ÓRGANO AFECTO	CLÍNICA
Sistema nervioso central	· Convulsiones, coma, pérdida de conciencia, comportamiento anómalo
Riñón	· Hemoglobinuria (<i>blackwater fever</i>) · Oliguria, uremia, insuficiencia renal
Sistema hematopoyético	· Anemia hemolítica severa · Diseritropoyesis · Coagulación intravascular diseminada, trombocitopenia
Respiratorio	· Síndrome de distrés respiratorio del adulto. · Edema pulmonar
Cardiovascular	· Colapso circulatorio y <i>shock</i>
Metabolismo	· Hipoglucemia · Acidosis metabólica · Hipertrigliceridemia
Gastrointestinal	· Ictericia, diarrea · Rotura esplénica

Diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico se basa en la demostración de los parásitos en la sangre, al realizar un frotis fino o con una gota gruesa, teñido con Giemsa (Figura 7). Deben examinarse al menos tres preparaciones separadas 12-24 horas y aprovechar para cuantificar el porcentaje de hematíes parasitados, un importante factor pronóstico. También se han desarrollado métodos de detección de antígeno, que aunque no son muy específicos resultan útiles en lugares con pocos recursos. Los métodos serológicos no tienen valor diagnóstico. Las técnicas de PCR que detectan el ácido nucleico del parásito son muy útiles en las parasitemias bajas, incluso subclínicas, y para la determinación de especie.

El tratamiento debe iniciarse inmediatamente y estar guiado por la especie de plasmodio infectante, la gravedad clínica y la sensibilidad a los antiparasitarios, determinada por el área donde se ha contraído la infección^{14,15}. Hasta hace poco el tratamiento de elección era la cloroquina 600 mg seguida de tres dosis de 300 mg repartidas en 48 h. Sin embargo, la emergencia de resistencias es prácticamente generalizada, por lo que actualmente se recurre a combinaciones de varios fármacos (Tabla 8).

Malaria y transfusión sanguínea

Todas las especies de plasmodio pueden sobrevivir durante al menos 3 semanas en la sangre refrigerada, por lo que pueden transmitirse con la transfusión de cual-

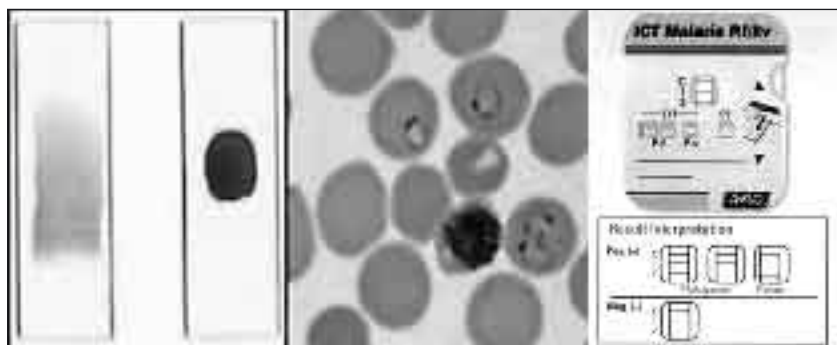


Figura 7. Diagnóstico del paludismo.

Gota gruesa.

ICT test rápido.

quier componente sanguíneo que contenga hematíes con parásitos viables. Esto constituye un grave problema en los países endémicos, pero la incidencia máxima de malaria vehiculada por la transfusión en países no endémicos es de 2 casos por millón de donaciones^{16,17}. En España se realiza un cuestionario de predonación dirigido en el que se investiga si se han visitado zonas endémicas de malaria y, en tal caso, durante cuánto tiempo. Dado que no existen técnicas lo suficientemente sensibles para la detección de anticuerpos antiplasmodio, y puesto que el examen directo del parásito en sangre depende de personal experto y es muy poco práctico a gran escala, habitualmente se excluye definitivamente a los donantes que han padecido la malaria y se excluye temporalmente a los que hayan visitado zonas endémicas de 6 meses a 3 años dependiendo del tiempo de residencia.

Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, o tripanosomiasis americana, es una parasitosis causada por protozoo flagel-

lado denominado *Trypanosoma cruzi* que afecta a una población de entre 16 y 18 millones de personas y se considera una de las zoonosis endémicas más importantes en América central y Sudamérica. En Brasil la cifra de infectados se calcula en torno a los cinco millones. La OMS estima que existen no menos de 300.000 casos nuevos y de 50.000 muertes anuales debidas a esta enfermedad. Los flujos migratorios tienen un gran impacto sobre la extensión de la enfermedad a zonas no endémicas¹⁸.

El *Trypanosoma cruzi*, un protozoo de la familia de las *Trypanosomatidae*, se localiza en la sangre de los vertebrados en forma de tripomastigote, con un tamaño que oscila entre 15-20 micras (Figura 8). Los principales reservorios del *T. cruzi* son los marsupiales, los roedores, los pequeños carnívoros y los mamíferos. El vector es un insecto hematófago de la subfamilia *Triatominae* que se nutre durante la noche y deposita las heces y la orina infectadas con el parásito en el momento de la picadura. Los seres humanos se infectan al penetrar el parásito a través de pequeñas erosiones en la piel o de las mucosas íntegras, siendo fagocitados por los macrófagos donde

Tabla 8. Tratamiento del paludismo grave por *Plasmodium falciparum*

MEDICAMENTO	DOSIS DE ATAQUE	DOSIS DE MANTENIMIENTO
Quinina (sal)	20mg/kg i.v. diluido en 10 mL/kg glucosado a pasar en 2-4h	10 mg/kg/8h i.v. diluido en 10 mL/kg glucosado a pasar en 2-4 h
MÁS (ya sea al mismo tiempo que la quinina o inmediatamente después)		
Doxiciclina	100 mg/12 h p.o. 7 d. niños > 8 a 2 mg/kg/12 h. No embarazo	
Ciindamicina	10 mg/kg (dosis ataque) i.v., seguido de 5 mg/kg/8 h. Hasta negativizar parasitemia	
Fansidar®	3 comp. dosis única, niños ½ comp/10 kg	
NOTAS:		
■ Se pasará a la vía oral lo antes posible.		
■ La dosis de ataque no se administrará si el paciente ha recibido antes la quinina o derivados.		
■ En infecciones mixtas P vivax, P ovale los hipnozoitos hepáticos pueden producir recaídas (cura radical con primaquina 0,25-0,5 mg/kg/d × 14 d).		
■ P. malariae suele ser sensible a cloroquina 25 mg/kg en 3 d.		

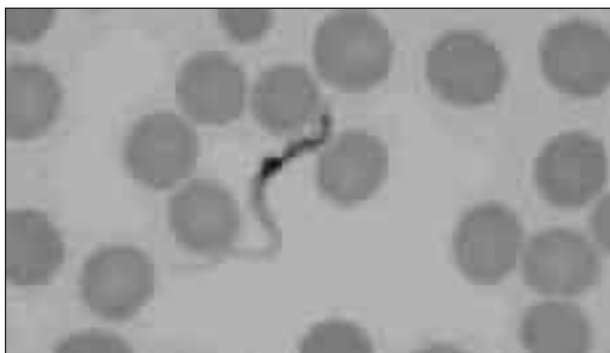


Figura 8. *Tripanosoma cruzi* en la sangre.



Figura 9. Signo de Romaña.

se multiplican provocando la rotura celular y su liberación a la sangre. Al picar de nuevo, el insecto absorbe la sangre infectada, y se produce una nueva replicación en su tubo digestivo, completándose el ciclo vital del tripanosoma. Otras formas de transmisión son la transfusión sanguínea, que alcanza un 20% de la tasa de infección, la vía placentaria (Chagas congénito), lactancia materna, trasplantes y accidentes laborales.

Clínica

La enfermedad de Chagas tiene una fase aguda y otra crónica.

En la mayoría de los casos la fase aguda es asintomática. Los pacientes sintomáticos suelen ser niños con un periodo de incubación entre 1 a 2 semanas de duración. Los signos clínicos de la puerta de entrada, si ésta es conjuntival, se caracterizan por una conjuntivitis y un típico edema bpalpebral unilateral (signo de Romaña, Figura 9). Si la inoculación es cutánea, aparece un nódulo eritematoso (chagoma) con una adenopatía satélite (Figura 10). Puede haber fiebre diaria, intensa astenia, adenopatías generalizadas y hepatoesplenomegalia, y (raramente) meningoencefalitis y miocarditis aguda. Habitualmente, los pacientes se recuperan espontáneamente en uno o dos meses.

Tras un periodo de latencia asintomático de muchos años, un 10-30% de los pacientes desarrollan la fase crónica de la enfermedad de Chagas. La patogenia de esta fase está poco clara, aunque se postula una respuesta autoinmune desencadenada por la infección inicial, más que una respuesta directa a la presencia continuada de parásitos. En esta fase, la afectación cardíaca es la más importante y grave, pudiendo aparecer arritmias, insuficiencia cardíaca, aneurismas y tromboembolismos. La afectación gastrointestinal se manifiesta por la dilatación progresiva del tracto gastrointestinal, provocando megaesófago con



Figura 10. Chagoma.

disfagia y neumonías por aspiración, y megacolon que cursa con estreñimiento pertinaz.

Diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico de la fase aguda se realiza por la detección de anticuerpos IgM anti-*T. cruzi* a títulos superiores a 1:10 con la técnica de inmunofluorescencia directa. En esta fase el parásito puede visualizarse en la sangre periférica (Figura 8).

En la fase crónica la parasitemia es baja y el diagnóstico se realiza por la detección de anticuerpos IgG mediante inmunofluorescencia, o hemaglutinación indirectas o ELISA, que tienen una alta sensibilidad y especificidad, aunque se requiere la realización de dos de estas técnicas para asegurar el diagnóstico. La técnica de la PCR está siendo utilizada en algunos centros con una especificidad del 100% y una sensibilidad entre el 45 y el 95%.

El tratamiento está indicado en los pacientes con infección aguda y en los niños menores de 10 años con

infección crónica, en trasplante con donante infectado y receptor predispuesto y como quimioprofilaxis en los accidentes laborales del laboratorio. Se realiza con benzonidazol a dosis de 5-10 mg/kg/día durante 60 días. La profilaxis se basa en la lucha contra el vector con insecticidas y en la mejora de las condiciones de vida e higiene en las áreas endémicas^{19,20}.

Enfermedad de Chagas y transfusión sanguínea

Se desconoce la incidencia real de la enfermedad de Chagas adquirida mediante transfusión sanguínea. Puesto que la fase crónica puede durar décadas y ser asintomática, el riesgo de transmitir la enfermedad permanece un gran número de años.

T. cruzi puede sobrevivir hasta 18 días en la sangre almacenada a 4 °C y es resistente a la criopreservación y descongelación, por lo que, además de por la transfusión de hematíes, se puede transmitir por el plasma fresco congelado, el crioprecipitado, y los concentrados de plaquetas y de leucocitos. Existen varias actuaciones que pueden prevenir la transmisión transfusional, y que van desde la selección y exclusión diferida de los donantes de riesgo, la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* u otras técnicas de laboratorio en la sangre donada, el uso de filtros de leucorreducción y, más recientemente, la inactivación fotoquímica de los parásitos en el plasma y concentrados de plaquetas. Las estrategias usadas varían en cada país y son dependientes de si éste es endémico y de los recursos económicos. En los países endémicos, además de la selección predonación con cuestionarios específicamente diseñados, la OMS recomienda la realización de al menos un test de ELISA de alta sensibilidad en el escrutinio del donante. En Estados Unidos se excluye a todos los donantes que hayan nacidos o son hijos de nacidos o que hayan sido trasfundidos en regiones endémicas. España, que tiene más de 1,5 millones de residentes procedentes de Latinoamérica, ha adoptado las recomendaciones de la OMS, para no perder donantes innecesariamente.

Conclusiones

La inmigración es un fenómeno derivado de la globalización e íntimamente relacionado con el desarrollo económico, que afecta a nuestro país directamente por su posición geográfica estratégica. El sistema de salud en general y los hematólogos en particular deben estar preparados para enfrentarse a enfermedades nuevas o que habían sido erradicadas. Los conocimientos epidemiológicos y la colaboración estrecha con los servicios de microbiología y medicina tropi-

cal son fundamentales para un manejo adecuado de las mismas. De igual modo, es necesario implementar nuevas técnicas que permitan un diagnóstico y tratamiento adecuado de estos pacientes, y estrategias clínicamente rentables para mantener la seguridad y la eficacia de los productos sanguíneos, aprovechando la oportunidad para captar eventuales donantes.

Bibliografía

1. Stuart MJ, Nagel RL. Sick cell disease. *Lancet* 2004; 364: 1343-60.
2. Ward Hagar, Elliott Vichinsky. Advances in clinical research in sickle cell disease. *Br J Haematol* 2008; 141: 346-56.
3. Telen MJ. Role of adhesion molecules and vascular endothelium in the pathogenesis of sickle cell disease. *ASH Educational Program Book. Hematology 2007*: 84-90.
4. Ataga KI, Moore CG, Hillery CA, Jones S, Whinna HC, Strayhorn D, et al. Coagulation activation and inflammation in sickle cell disease-associated pulmonary hypertension. *Haematologica* 2008; 93: 20-6.
5. Machado RF, Anthi A, Steinberg MH, Bonds D, Sadchev V, Kato GJ, et al. N-Terminal Pro-Brain natriuretic peptide levels and risk of death in sickle cell disease. *JAMA* 2006; 296: 310-8.
6. Ballas SK. Current issues in sickle cell pain and its management. *ASH Educational Program Book. Hematology 2007*: 97-105.
7. Locatelli F, De Stefano P. New insights into hematopoietic stem cell transplantation for patients with haemoglobinopathies. *Br J Haematol* 2004; 125: 3-11.
8. Locatelli F. Reduced-intensity regimens in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for haemoglobinopathies. *ASH Educational Program Book. Hematology 2006*: 398-401.
9. Platt O. Hydroxiurea for the treatment of sickle cell anemia. *N Engl J Med* 2008; 358: 1362-9.
10. Hay SI, Guerra CA, Tatem AJ, Noor AM, Snow R. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *Lancet Infect Dis* 2004; 4: 327-36.
11. Williams TN. Human red blood cell polymorphisms and malaria. *Curr Opin Microbiol* 2006; 9: 389-94.
12. Ayi, K, Min-Oo G, Serghides L, Crockett M, Kirby-Allen M, Quirt I, Gros P, Kain KC. Pyruvate Kinase Deficiency and Malaria. *N Engl J Med* 2008; 358: 1805-10.
13. Ladhani S, Aibara RJ, Riordan AI, Shingadia D. Imported malaria in children: a review of clinical studies. *Lancet Infect Dis* 2007; 7: 349-57.
14. Guidelines for the treatment of malaria. Geneva: World Health Organization, 2006. (Document no. WHO/HTM/MAL/2006.1108.) (Accessed May 11, 2008, at <http://www.who.int/malaria/docs/TreatmentGuidelines2006.pdf>.)
15. Baird KJ. Effectiveness of antimalarial drugs. *N Engl J Med* 2005; 352: 1565-72.
16. Ditchen AD, Chiodini PL. Malaria and blood transfusion. *Vox Sang* 2006; 90: 77-84.
17. Blajchman MA, Vamvakis EC. The continued risk of transfusion-transmitted infections. *N Engl J Med* 2006; 355: 1303-5.
18. Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Kumaresan J, Sachs SE, Sachs JD, Savioli L. Control of neglected tropical diseases. *N Engl J Med* 2007; 357: 1018-23.
19. Gascon J. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas importada. *Med Clin (Barc)* 2005; 125: 230-5.
20. Dias JCP. The treatment of Chagas disease (South American Trypanosomiasis). *Ann Intern Med* 2006; 144: 772-4.

Leucemia mieloide aguda: ¿qué aportan los nuevos marcadores moleculares en la clasificación, el pronóstico y el tratamiento?

S. BRUNET, J.F. NOMDEDÉU, A. AVENTÍN, M. HOYOS, J. SIERRA

Servei de Hematologia Clínica. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona
Universitat Autònoma de Barcelona

Introducción

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una enfermedad heterogénea caracterizada por la proliferación clonal de precursores hematopoyéticos con alteraciones en los mecanismos normales de crecimiento celular, proliferación y diferenciación^{1,2}. En la LMA se detectan alteraciones cromosómicas estructurales y/o numéricas en un 55% de los pacientes. Los hallazgos del estudio citogenético al diagnóstico constituyen, junto a la edad, el factor pronóstico más importante que determina la respuesta al tratamiento y la supervivencia¹⁻³. A partir de dichos hallazgos, los pacientes con LMA se clasifican en tres grupos citogenéticos: favorable, intermedio y desfavorable³. El avance en el conocimiento de la genética molecular en los últimos 15 años ha permitido la identificación de más de 100 mutaciones y/o reordenamientos de genes, que reflejan la heterogeneidad de la enfermedad⁴⁻⁹, contribuyen a establecer mejor el pronóstico de la LMA y proporcionan claves para identificar dianas moleculares.

Fisiopatología molecular de la LMA

Existen varios datos que indican la necesidad de más de una mutación para que aparezca una leucemia aguda^{1,3,6}. Los genes de fusión RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO) o el CBF β -MYH11, que resultan de la t(8;21)(q22;q22) y la inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22), respectivamente, son capaces de bloquear la diferenciación pero solos no determinan un fenotipo leucémico. Por otra parte, los miembros de las familias FLT3 y RAS inducen sólo un fenómeno mieloproliferativo sin bloqueo en la diferenciación. Adicionalmente, las raras leucemias congénitas apoyan que diferentes mutaciones actúan conjuntamente en la patogénesis de la leucemia. Un ejemplo es la pérdida de función heterocigótica en las mutaciones del factor de transcripción RUNX1 asociadas a la alteración plaquetaria familiar con propensión a leucemia aguda. Si bien las mutaciones están presentes en la línea germinal, los individuos afectados no desarrollan la leucemia hasta una edad avanzada, tras la adquisición de nuevas anomalías citogenéticas. Otro ejemplo son las mutaciones en el factor de transcripción CEBPA, que se han descrito en raros casos de LMA familiar. Finalmente en muchos casos es

porádicos se puede detectar más de una mutación. Por el contrario, en leucemias en las que está implicado el gen MLL, existen evidencias de que éstas pueden ser el resultado de un sólo evento genético^{2,5}.

Las alteraciones genéticas que ocurren en diferentes etapas pertenecen a dos amplios grupos que se complementan entre sí de acuerdo con el modelo propuesto por Gilliland *et al.*². Los que activan las señales de transducción (tipo I) y los que alteran los factores de transcripción (tipo II) (Figura 1)^{2,4,7}. Las del tipo I confieren ventaja proliferativa y/o de supervivencia como consecuencia de una activación aberrante de las señales de transducción sin afectar a la diferenciación. Incluyen la activación de los receptores tirosincinasas FLT3 y c-KIT, y las mutaciones oncogénicas del RAS y de las proteínas tirosina fosfatasa. Las alteraciones del tipo II, con impacto en los factores de transcripción o en los coactivadores, bloquean la diferenciación hematopoyética y la autorrenovación. Ejemplos de este tipo de alteraciones son las que afectan al factor de unión al core (CBF), al receptor α del ácido retinoico (RAR- α), al gen de la leucemia de línea-mixta o linfóide-mieloide (MLL), mutaciones de CEBPA y posiblemente las mutaciones del gen de la nucleofosmina (NPM1)². Estos dos grupos cooperan en la leucemogénesis, de manera que es frecuente la coexistencia de alteraciones de los dos grupos en un mismo paciente.

La pregunta inicial ¿Qué aportan los nuevos marcadores moleculares al diagnóstico, pronóstico y tratamiento? es oportuna en un momento de gran avance en el conocimiento molecular. Para responderla, analizaremos cuáles son los genes implicados en la leucemogénesis, la utilidad de los estudios del perfil de expresión génica en la LMA no promielocítica y el impacto de todos estos hallazgos moleculares en la toma de decisiones terapéuticas¹⁰.

Mutaciones que alteran las señales de transducción (clase I)

Mutaciones del gen FLT3

El receptor tirosincinasa FLT3 y su ligando son importantes para la proliferación y diferenciación de los precursores hematopoyéticos tempranos y se expresa

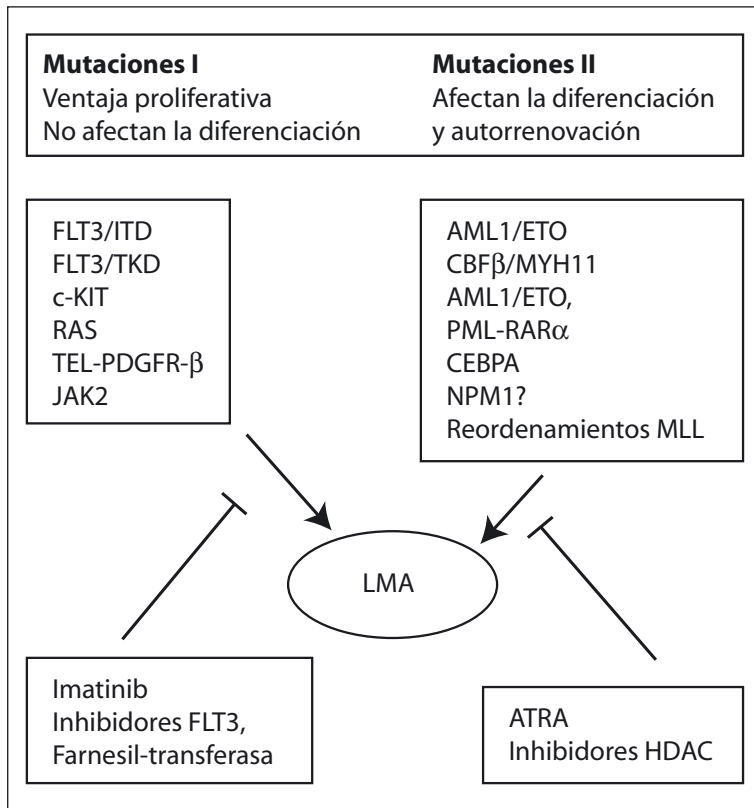


Figura 1. Modelo cooperativo en la leucemia mieloide aguda. Dos tipos de alteraciones moleculares se asocian con la leucemia mieloide aguda. Las mutaciones de tipo I activan las señales de transducción, tienen ventaja proliferativa y no afectan a la diferenciación. Incluyen los receptores tirosinasa, receptores del FLT3 y del c-KIT. El tratamiento incluye inhibidores de las mutaciones tirosinasa y potencialmente inhibidores de la farnesiltransferasa. Las de tipo II afectan a la diferenciación y autorrenovación, como en el caso de los genes de fusión AML1/ETO, CBFβ/MYH11, PML/RAR-α o las mutaciones puntuales en AML1/CEBPA. El tratamiento incluye agentes que inducen la diferenciación celular con el ácido all-transretinoico y los inhibidores de las histonas desacetilasas.

en progenitores hematopoyéticos normales así como en los blastos de la LMA, en una proporción del 20-27%. Ésta es una de las mutaciones más frecuentes en la LMA^{2,5-9} y también se asocia a la progresión de síndrome mielodisplásico a LMA secundaria y a la leucemia promielocítica aguda (LPA). Las mutaciones somáticas que resultan en activación constitutiva del gen FLT3 se han identificado en dos dominios funcionales del receptor: *a*) el dominio yuxtamembrana en forma de duplicaciones internas en tándem (FLT3-ITD), que pueden variar en longitud desde 3 hasta 400 nucleótidos entre los exones 14 y 15 del cromosoma 13q12, y *b*) mutaciones puntuales del dominio tirosinasa (FLT3-TKD). También puede observarse la sobreexpresión del gen FLT3 no asociada a mutaciones del gen. La FLT3-ITD codifica una proteína anómala que conduce a la dimerización y activación constitutiva de señales intracelulares, que incluyen las vías de STAT5, JAK2 y MAPK. Estas alteraciones provocan un aumento de la proliferación y supervivencia de las células y un bloqueo de la diferenciación a través de la inhibición de CEBPA y Pu.1. La FLT3-ITD se presenta en el 25-34% de las LMA con citogenética normal (LMA-CN), en la LPA y en la LMA con t(6;9). La activación del bucle del TKD es consecuencia de mutaciones puntuales (codón D835), pequeñas inserciones o deleciones (codón I836), lo que se observa en un 11-14% de pacientes con LMA-CN. Una pequeña proporción de pacientes presenta ambas mutaciones^{2,5-9,11}, FLT3-ITD y del TKD.

Desde el punto de vista clínico, estas mutaciones son relevantes por su impacto pronóstico y porque son una diana atractiva para la terapia molecular. Los pacientes con la FLT3-ITD presentan una cifra de leucocitos elevada y gran proporción de blastos en médula ósea; además, tienen con mayor frecuencia LMA *de novo* comparados con los que tienen el gen FLT3 en línea germinal (FLT3-WT). Múltiples estudios han demostrado que la presencia de FLT3-ITD en pacientes con LMA-CN se asocia a mal pronóstico, con una supervivencia global (SG) disminuida debido a mayor riesgo de recaída (RR)^{2-9,11-13}. El pronóstico parece desfavorable, particularmente en ausencia de expresión del alelo germinal o cuando la ratio FLT3-ITD: FLT3-WT está aumentada^{2,9,11,12}.

Por su parte, el pronóstico de los pacientes con mutaciones puntuales del TKD es controvertido^{2,5,8}. En un análisis reciente de 3.082 pacientes¹⁴, no se observó impacto pronóstico de la FLT3-TKD (4,8%), a diferencia de la FLT3-ITD, que influyó negativamente. Fue llamativo además que se demostró un impacto pronóstico favorable en los pacientes FLT3-TKD con mutaciones de los genes NPM1 o CEBPA. Este dato debe ser tenido en cuenta cuando se analizan diferentes series de pacientes, puesto que las discrepancias observadas pueden deberse a que no se ha valorado el efecto de otras mutaciones genéticas de gran importancia pronóstica.

Se ha publicado una asociación entre las anomalías del gen MLL y las del gen FLT3⁷, mientras que existe

una exclusión mutua entre aparición de mutaciones del FLT3 y del gen RAS¹⁵.

De todo lo mencionado se desprende que en pacientes con citogenética normal es muy importante conocer si existe una mutación del gen FLT3 y de qué tipo, porque este dato es fundamental para el esquema global de tratamiento.

Desde el punto de vista terapéutico, existe acuerdo en que los pacientes con FLT3-ITD tienen mal pronóstico con quimioterapia convencional. Actualmente, se mantiene la controversia sobre si el trasplante hematopoyético, alogénico o autólogo mejora los resultados de los pacientes con mutaciones del gen FLT3^{13,16,17}.

Existen al menos 4 ensayos clínicos con inhibidores del FLT3, como PKC-412, CEP-701, MLN518 y SU11248^{2,7,10}. Estos agentes tienen actividad en pacientes en recaída, pero las respuestas se limitan a una disminución transitoria de la cifra de blastos en sangre periférica, y raramente consisten en respuestas hematológicas duraderas. El empleo de inhibidores de FLT3 también puede ser útil en pacientes sin mutaciones del gen FLT3, ya que su sobreexpresión es frecuente en la LMA. Actualmente se investiga la asociación de inhibidores de FLT3 y quimioterapia.

Mutaciones del gen *c-KIT*

El protooncogén KIT está localizado en el cromosoma 4q12 y codifica una glicoproteína transmembrana, miembro de los receptores TK, cuyo ligando es el *stem cell factor*. Aproximadamente el 80% de los pacientes con LMA tiene blastos que expresan el c-KIT. Las mutaciones pueden ser de 2 tipos, las localizadas en la porción extracelular del exón 8 y las mutaciones del bucle de activación, en el codón 816 del exón 17^{2,9,18,19}. La frecuencia global de estas mutaciones en la LMA es baja (del 6-8% y 2%, respectivamente). En ciertos subgrupos de LMA la proporción de mutaciones de c-KIT es más elevada, del 12 y 16% en pacientes con LMA con t(8;21) y de entre el 22 y el 13% en pacientes con inv(16)/t(16;16), respectivamente. Desde el punto de vista morfológico, el 70% de los pacientes con mutación del gen c-KIT se clasifican como M2 de la FAB^{18,20}. En la LMA con t(8;21), la mutación del gen c-KIT se asocia a leucocitosis al diagnóstico. La incidencia de c-KIT no difiere significativamente entre la LMA *de novo*, LMA secundaria a SMD y LMA secundaria a tratamiento con quimioterapia. Se ha descrito una asociación negativa entre mutaciones de los genes c-KIT y FLT3. Una posible explicación sería la redundancia funcional, debido a que dos mutaciones del mismo tipo TK se encuentran raramente en un mismo individuo. Este fenómeno

no explicaría también que las mutaciones de c-KIT y FLT3 se asocien a distintos tipos citogenéticos de la LMA, LMA-CBF y LMA-CN, respectivamente^{7,18}. En la LMA-CBF, las mutaciones de c-KIT, en el codón 816 y en el exón 8, parecen predecir una alta incidencia de recaídas¹⁸⁻²⁰. En algunos estudios la mutación de c-KIT en el codón 17 también se asoció con una supervivencia y duración de la remisión significativamente inferior¹⁸⁻²⁰. La importancia clínica de la mutación de c-KIT en la LMA con inv(16) es más controvertida^{2,18-20}. Globalmente estos datos indican que las mutaciones de c-KIT en las leucemias CBF tienen un impacto negativo y, por ello, se recomienda su estudio para estratificar el tratamiento ajustado al riesgo. Dada la existencia de múltiples inhibidores de TK que son activos frente a mutaciones de c-KIT, es imprescindible conocer el tipo de mutación, no solamente para predecir el pronóstico, sino porque pueden representar una diana terapéutica.

Mutaciones de los genes RAS

Los oncogenes RAS regulan señales de transducción mediante la unión a gran variedad de receptores de membrana. Estos oncogenes tienen un papel importante en la proliferación y supervivencia de los progenitores hematopoyéticos. Existen tres genes funcionales: K-RAS, N-RAS y H-RAS. Las mutaciones puntuales de los genes N-RAS y K-RAS, presentes en el 25 y el 15% de los pacientes con LMA, respectivamente, resultan de la sustitución de una sola base en los codones 12, 13 o 61, y conducen a la activación constitutiva del RAS. En la LMA, la frecuencia de las mutaciones RAS es independiente de la edad, sexo, cifra de leucocitos inicial, clasificación de la OMS, LMA *de novo* y secundaria^{6,7,15}. Los subgrupos de LMA con inv(16)/t(16;16) o inv(3)/t(3;3) tienen una alta frecuencia de mutaciones del RAS, entre el 35 y el 27%, respectivamente, a diferencia de la baja frecuencia en la LPA^{15,21}. La coexistencia de mutaciones de los genes RAS y FLT3 es poco frecuente (2%)¹⁵. Esta rareza concuerda con el modelo cooperativo de leucemogénesis antes descrito. La mayoría de estudios no han demostrado impacto pronóstico de las mutaciones del gen RAS en la SG, supervivencia libre de enfermedad (SLE) y RR, aunque se cree que las mutaciones del gen RAS pueden representar un factor de progresión^{7,15,21}.

Mutaciones del gen *PTPN11*

El gen PTPN11 está localizado en el 12q24. La prevalencia de estas mutaciones en la LMA del adulto es baja (1,7-2,6%) y no se ha evaluado cuál es el impacto pronóstico en esta población^{7,22}.

Otros genes mutados

El gen JAK2 tiene un papel clave en la señal de transducción iniciada por múltiples receptores de factores de crecimiento y citocinas requeridas en la hematopoyesis. La mutación activa somática JAK2 V617F se ha publicado en un 2-8% de los pacientes con LMA^{4,7}. Estudios recientes sugieren que esta mutación puede cooperar como mutación de clase I en la leucemogénesis en la LMA con t(8;21)/AML1-ETO⁷.

Mutaciones que alteran las señales de transcripción (clase II)

Mutaciones del complejo CBF

Citogenéticamente, el grupo CBF se define por la presencia de t(8;21)(q22;q22) o la inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22). Ambos subgrupos representan el 15% de las LMA, se consideran de pronóstico favorable, con altas tasas de RC y SG prolongada¹⁻³. El gen RUNX1 (AML1) está localizado en el cromosoma 21q22 y codifica para una de las dos subunidades del complejo CBF, mientras que la proteína CBFβ está codificada en el cromosoma 16q22, siendo ambas esenciales para la hematopoyesis normal. La mayoría de las alteraciones del complejo CBF son consecuencia de anomalías cromosómicas balanceadas^{2,5-7}. Las translocaciones cromosómicas que afectan al gen RUNX1 (AML1) conducen a la formación de genes de fusión que codifican para proteínas quiméricas. En la LMA la translocación característica es la t(8;21), que da lugar al gen de fusión RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO). Se ha comentado previamente que existen diferentes mecanismos de inactivación del gen RUNX1 (AML1) a través de mutaciones puntuales, mutaciones del gen AML1 en línea germinal (en los raros casos de enfermedad plaquetaria familiar) y adquirida (6-10% de LMA esporádica). En caso de mutación adquirida, casi siempre es monoalélica, y se asocia a menudo a la trisomía 21, trisomía 13, deleción del cromosoma 9 o a mutaciones de los genes FLT3, P53 y N-RAS. Estos hallazgos sugieren que las mutaciones monoalélicas no son suficientes para inducir leucemia y se precisa de un segundo evento, como anomalías citogenéticas o mutaciones de clase I que afecten a los genes FLT3, RAS, c-KIT o JAK2, entre otros, para la aparición de la leucemia⁷. Se ha comentado previamente la rareza de las FLT3-ITD en la LMA-CBF, si bien se han descrito FLT3-TKD en la LMA con inv(16). Por otra parte, sí existe una frecuente asociación con mutaciones de c-KIT.

Los pacientes con t(8;21) e inv(16)/t(16;16) se benefician de tratamiento de consolidación con dosis altas de citarabina¹⁻⁵. Algunos estudios muestran una SG superior en pacientes con inv(16)/t(16;16), comparados a aquellos con t(8;21)⁵.

Mutaciones del gen CEBPA

El factor de transcripción CEBPA está localizado en el cromosoma 19q13.1 y está implicado en la diferenciación de los progenitores hematopoyéticos a neutrófilos maduros. Las mutaciones de CEBPA contribuyen al bloqueo de la maduración de los progenitores mieloides en la LMA²³. Se asocian frecuentemente a los tipos M1 y M2 de la FAB, y se han observado en un 7-9% de casos de LMA^{7,23}. En pacientes con LMA y t(8;21)(q22;q22), que se asocia a la morfología M2, la proteína de fusión AML1-ETO inhibe la expresión CEBPA a niveles insuficientes para la diferenciación neutrófila²³. Estos datos y el hallazgo de que el bloqueo de la diferenciación observado en ratón *knockout cebpa* es similar al fenotipo M2 apoyan la hipótesis de que la mutación de CEBPA y la t(8;21) pueden tener una vía común en la patogénesis de la LMA²³. Existen 2 tipos de mutaciones, la N-terminal, que evita la plena expresión de la proteína, y la C-terminal, que resulta en una unión deficiente al ADN o a que inhiben la capacidad de dimerización^{7,23}. Algunos pacientes presentan una única mutación, mientras que otros tienen múltiples mutaciones. Las mutaciones de CEBPA se han asociado a SG y SLE favorables, se han descrito en pacientes con citogenética de pronóstico intermedio y no se han observado en leucemias de pronóstico favorable, es decir, las leucemias CBF^{7,23}. Los datos clínicos sugieren respuesta favorable a la quimioterapia con dosis altas de citarabina, con SG similar a la obtenida en las leucemias CBF^{1,2,5,6,23}.

Mutaciones de los genes MLL y WT1

El gen MLL, localizado en el cromosoma 11q23, presenta aberraciones cromosómicas recurrentes en los pacientes con leucemia aguda¹⁹. Así, el 15% de los pacientes con leucemia aguda, mieloides, linfoides, *de novo* o secundaria a tratamiento con inhibidores de la topoisomerasa II tienen alteraciones en este gen tales como translocaciones, deleciones y duplicaciones que afectan a 11q23^{5,8}. También se observa duplicación parcial en tándem (MLL-PTD) de la parte 5' del gen, fundamentalmente en los pacientes con citogenética normal (8%) o con trisomía 11. Su presencia en algunas series se asocia a duración de la RC breve y corta SLE^{2,5,8,13,24}. No se han observado diferencias en las características biológicas de los pacientes con LMA con o sin MLL-PTD. Un 30-40% de los pacientes con MLL-PTD tienen FLT3-ITD, mientras que la coexistencia de MLL-PTD con mutaciones de CEBPA o NPM1 es rara^{9,13}. No se ha identificado una diana terapéutica específica en la MLL-PTD, aunque Whitman *et al.*²⁵ han demostrado que la combinación de decitabina y un inhibidor de las histonas desacetilasas puede reactivar la

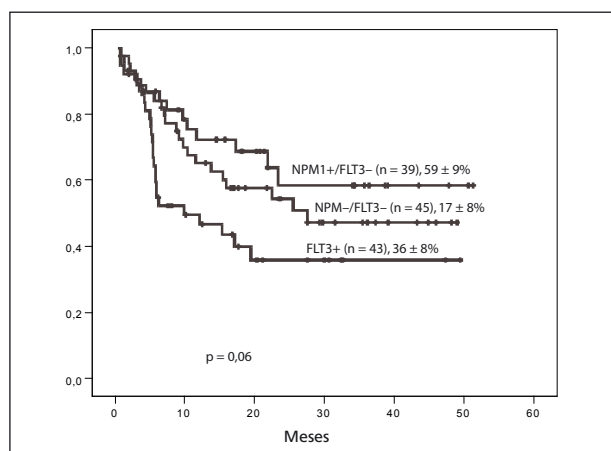


Figura 2. Supervivencia libre de enfermedad. NPM1+/FLT3-: Mutación NPM1 sin duplicación FLT3; NPM1-/FLT3-: no mutación de NPM1 ni duplicación de FLT3; FLT3+: duplicación del gen FLT3.

transcripción del alelo germinal. Esta inducción de la expresión del alelo germinal MLL se asoció a un incremento de la muerte celular de los blastos MLL-PTD.

El gen WT1 o tumor de Wilms está localizado en la banda 11p13. El papel del gen WT1 en la hemopoiesis está aún por clarificar, pero se ha demostrado sobreexpresión del gen en varios tipos de leucemia, particularmente en la LMA, por lo que se puede utilizar como marcador de enfermedad residual mínima^{2,7}. Se han observado mutaciones del gen en el 10-15% de casos de LMA^{2,7}.

Mutaciones de los genes implicados en el ciclo celular y en la apoptosis

Mutación del gen NPM1

El gen de la nucleofosmina localizado en el cromosoma 5q35 es una fosfoproteína expresada ubicuamente y que hace de lanzadera entre el núcleo y el citoplasma^{5-7,26}. Este gen está implicado en la respuesta apoptótica al estrés, se le han atribuido funciones oncogénicas y puede modular la actividad y estabilidad de la p53. Con pocas excepciones, las mutaciones de NPM1 se restringen al exón 12 (nucleótido 960, mutación A) y producen una localización aberrante de la proteína en el citoplasma de las células leucémicas que conduciría a alteración de la p53. Las mutaciones son específicas de la LMA *de novo*^{5-7,26}, se asocian a hiperleucocitosis, a los subtipos M4, 5 y 5b de la FAB; los leucoblastos leucémicos presentan núcleo hendido (*cuplike*) y el fenotipo leucémico demuestra una baja expresión de CD34. La incidencia de la mutación del NPM1 es del 30% de todas las LMA, es muy rara en las leucemias CBF, se observa en el 50-60% de los pacientes con citogenética normal y es, por tanto, la anomalía genéti-

ca más frecuente en pacientes con LMA²⁶. La mutación de NPM1 se asocia significativamente a la FLT3-ITD, a la FLT3-KTD y en algunas series a una baja prevalencia de mutaciones de CEBPA y MLL-PTD^{2,7,13,25,27}. Las mutaciones de c-KIT y RAS no presentan diferente distribución en los pacientes con NPM1 mutado o no mutado^{7,26}. Diversos estudios demostraron inicialmente que la mutación de NPM1 se asociaba globalmente a buen pronóstico. Posteriormente se ha demostrado que la mutación de NPM1 se asocia a buen pronóstico solamente en ausencia de FLT3-ITD^{2,5,7-9,17,26}, con una probabilidad de SG a los 5 años del 60%, similar a la observada en las LMA con CBF^{1-7,26} o con cariotipo normal y CEBPA (Figura 2)^{13,26,28}. Es de destacar que el trasplante alogénico no ha mostrado ningún beneficio a los pacientes con FLT3-WT y NPM mutado^{13,28}.

Sobreexpresión génica

La sobreexpresión de los genes BAALC, ERG, MN1 o EVI1, en ausencia de reordenamientos, ha demostrado tener importancia pronóstica en la LMA.

El gen BAALC, localizado en el cromosoma 8q22.3, se expresa en progenitores hematopoyéticos y en tejidos derivados del neuroectodermo. En pacientes con LMA-CN, la sobreexpresión del gen BAALC se asoció a inferior SG, SLE en pacientes con FLT3-WT^{2,5,8,29}.

El gen ERG pertenece a una familia de factores de transcripción implicados en la regulación de la diferenciación celular, diferenciación y apoptosis. La sobreexpresión se encontró en pacientes con cariotipo complejo con amplificación crítica del cromosoma 21. En pacientes con LMA-CN la sobreexpresión de este gen se asocia a pronóstico adverso^{2,8,30}.

El gen MN1 se ha encontrado reordenado en la t(12;22)(p13;q11-12), que da lugar al gen de fusión MN1-ETV6. Se asocia a fracaso en la inducción en pacientes con LMA-CN^{2,8}.

La sobreexpresión del gen EVI1 ha demostrado tener un impacto adverso en pacientes con LMA y citogenética de pronóstico intermedio².

Perfil de expresión génica

El estudio del perfil de expresión génica (PEG), mediante la tecnología de los *microarrays*, permite el análisis simultáneo de miles de genes en una sola hibridación y permite distinguir la LMA de la leucemia linfocítica aguda^{2,31}. También se ha demostrado que diferentes patrones de expresión génica se asocian a anomalías citogenéticas y moleculares específicas^{9,32-34}. Recientemente, Bullinger *et al.*³⁴ han definido un perfil de 20 genes que es predictivo de la FLT3-

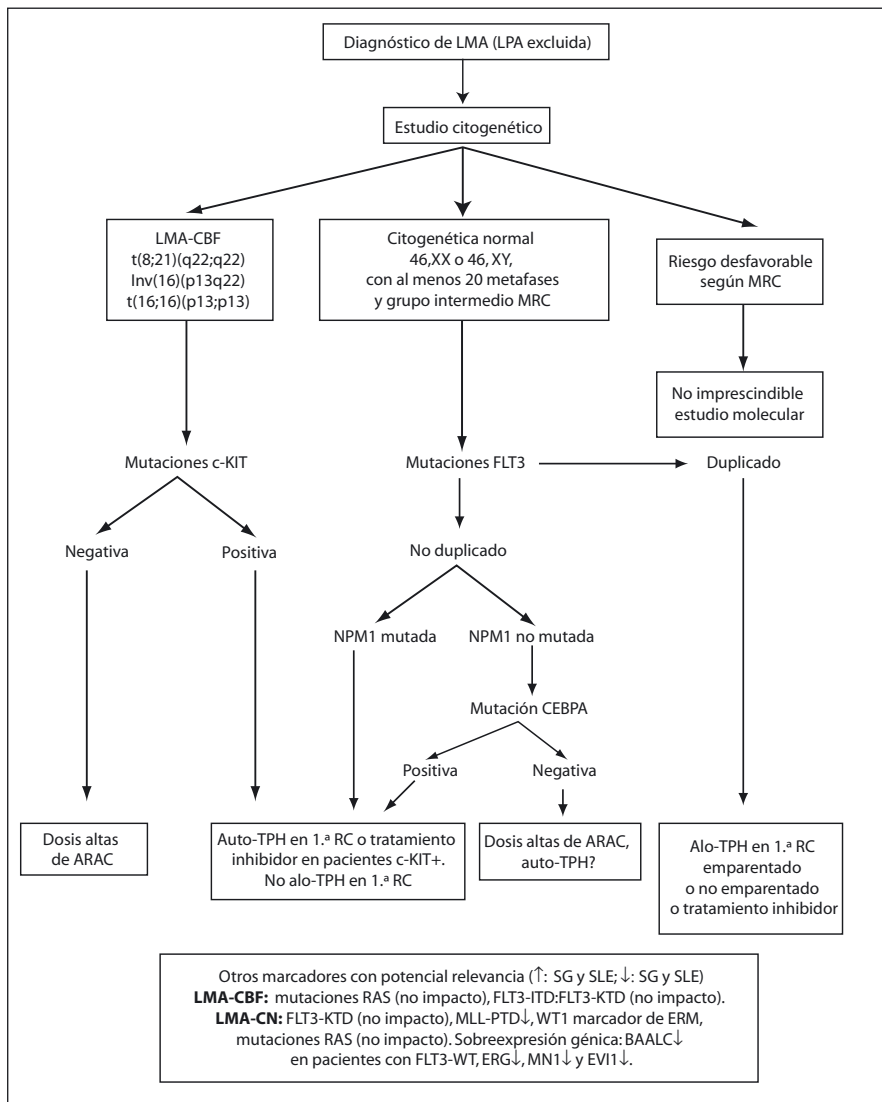


Figura 3. Propuesta de estudio diagnóstico y terapéutico en la LMA ajustado a los factores pronósticos citogenéticos y moleculares. ARAC: citarabina; LMA-CBF: leucemia mieloide aguda-factor de unión al core; MRC: Medical Research Council; TPH: trasplante de progenitores hematopoyéticos.

ITD. Mediante este panel fueron capaces de predecir la recaída, la SG y la SLE en pacientes con LMA-CN, hallazgo no explicable por la presencia de otras mutaciones como NPM1, MLL-PTD o CEBPA, de características como la edad, la cifra de leucocitos, la LDH u otras.

Cooperación entre mutaciones de genes

¿Cuál es el significado de la gran cantidad de mutaciones descritas en la LMA y cómo cooperan en la leucemogénesis? De los estudios moleculares se desprenden diversas consideraciones:

1. Existe inestabilidad en el genoma de los leucoblastos leucémicos y esta inestabilidad conduce a la adquisición de alteraciones moleculares que contribuyen al desarrollo de la leucemia. Esta inestabilidad predispone a más de un evento, circunstancia necesaria para que aparezca la enfermedad, de acuerdo con la cooperación entre las mutaciones de clase I y las de clase II. Dado su

valor pronóstico, es muy importante el estudio de estas mutaciones, particularmente en la LMA-CN.

2. Se ha observado una asociación preferente entre mutaciones de clase I y algunas proteínas de fusión como mutaciones de c-KIT, RAS y LMA-CBF, y también entre mutaciones de clase I y mutaciones AML1. Sobre la base de este modelo de cooperación entre los 2 tipos de mutaciones, la frecuente asociación de mutaciones de NPM1 y FLT3 favorece el papel de la NPM1 en la diferenciación hematopoyética.

3. Otro mecanismo parece provenir de un fenotipo mutante de base, asociado a la historia de la enfermedad o a una enfermedad genética que predispone a leucemia, como el síndrome de Down, entre otras. En estos casos, los diferentes estudios sugieren que las mutaciones de clase II preexisten a las de clase I. A favor de esta hipótesis juega el que algunos pacientes con la FLT3-ITD al diagnóstico no muestran dicha mutación en la recaída.

2. Finalmente, otro mecanismo es la desregulación, en los leucoblastos leucémicos, de los genes impli-

cados en el mantenimiento del fenotipo de la célula *stem*. Un estudio no supervisado de PEG separó claramente la LMA con la NPM1 mutada de la NPM1 no mutada, independientemente de la mutación o no de FLT3 o de otros reordenamientos cromosómicos, apoyando el concepto de que la LMA con mutación de la NPM1 es una entidad distinta³⁵.

Conclusiones y recomendaciones prácticas

¿Cuál es el estudio ideal de mutaciones en una LMA al diagnóstico?

En primer lugar, ante cualquier LMA, el estudio básico inicial debe incluir la caracterización citogenética por su valor pronóstico.

En la Figura 3 se esquematiza una propuesta de estudio molecular de la LMA al diagnóstico.

En los pacientes del grupo citogenético intermedio y fundamentalmente en la LMA-CN, se deben analizar las mutaciones del gen FLT3, por ser la FLT3-ITD un factor pronóstico adverso conocido. De existir esta alteración, hay datos que apoyan la indicación de trasplante alogénico si existe donante emparentado o no emparentado^{15,16}. Otra opción es administrar tratamiento con inhibidores anti-FLT3, dentro de ensayos clínicos. Simultáneamente, debe realizarse el estudio de la mutación de la NPM1, que es otra mutación con relevancia clínica en este subgrupo de pacientes, en ausencia de la FLT3-ITD. Los pacientes con LMA-CN, NPM1 mutada y FLT3-WT deberían equipararse a las leucemias CBF y evitar el trasplante alogénico en primera RC. Asimismo, y dado el pronóstico favorable de la LMA-CN con mutación de CEBPA, en pacientes sin mutación de la NPM1 ni de FLT3, se tiene que estudiar la mutación de CEBPA dado que, de existir, los datos de SG se pueden equiparar a los resultados de las leucemias CBF. Posteriormente se pueden realizar otros estudios tales como las mutaciones de los genes FLT3-TKD, MLL-PTD, RAS y WT1 (muy útil para el seguimiento de enfermedad residual), así como el estudio de la sobreexpresión de los genes BAALC, ERG, MN1, EVI1 para estratificar mejor el pronóstico.

En las leucemias CBF, se ha de realizar sistemáticamente el estudio de c-KIT, debido a que la mutación conlleva un alto riesgo de recaída y, por tanto, estos pacientes deben dirigirse a tratamiento con trasplante o a tratamiento inhibidor.

En resumen, la integración de los conocimientos moleculares adquiridos en el diagnóstico de la LMA, una enfermedad heterogénea, compleja y con múltiples vías de activación implicadas, es ya una realidad. Con todo, se precisa de un algoritmo diagnóstico útil y de fácil seguimiento para la correcta estratificación y el tratamiento ajustado a los factores pronósticos. La combinación de diferentes modalidades de trata-

miento, con agentes clásicos y los tratamientos diana puede conducir a una mejora de los resultados terapéuticos en esta enfermedad.

Bibliografía

1. Estey E, Döhner H. Acute myeloid leukemia. *Lancet* 2006; 368: 1894-907.
2. Döhner H. Implication of the molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007: 412-9.
3. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. *Blood* 1998; 92: 2322-33.
4. Gilliland G, Jordan CT, Felix CA. The molecular basis of leukemia. *American Society of Hematology Education Program Book* 2004; 80-97.
5. Frankfurt O, Licht JD, Tallman MS. Molecular characterization of acute myeloid leukemia and its impact on treatment. *Curr Opin Oncol* 2007;19: 635-49.
6. Fröhling S, Scholl C, Gilliland DG, Levine RL. Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. *J Clin Oncol* 2005; 23: 6285-95.
7. Baldus CD, Mrózek K, Marcucci G, Bloomfield CD. Clinical outcome of de novo acute myeloid leukaemia patients with normal cytogenetics is affected by molecular genetic alterations: a concise review. *Br J Haematol* 2007; 137: 387-400.
8. Mrózek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman SP, Bloomfield CD. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood* 2007; 109: 431-48.
9. Renneville A, Roumier C, Biggio V, Nibourel O, Boissel N, Fenaux P, et al. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia* 2008; 1-17.
10. Brunet S, Sierra J. Nuevos fármacos en el tratamiento de la LMA. *Haematologica* 2006; 91 (s1): 275-8.
11. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood* 2001; 98: 1752-9.
12. Fröhling S, Schlenk RF, Breitruck J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, et al. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood* 2002; 100: 4372-80.
13. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2008; 358: 1909-18.
14. Bacher U, Haferlach C, Kern W, Haferlach T, Schnittger S. Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters--an analysis of 3082 patients. *Blood* 2008; 111: 2527-37.
15. Bowen DT, Frew ME, Hills R, Gale RE, Wheatley K, Groves MJ, et al. RAS mutation in acute myeloid leukemia is associated with distinct cytogenetic subgroups but does not influence outcome in patients younger than 60 years. *Blood* 2005; 106: 2113-9.
16. Gale RE, Hills R, Kottaridis PD, Srirangan S, Wheatley K, Burnett AK, Linch DC. No evidence that FLT3 status should be considered as an indicator for transplantation in acute myeloid leukemia (AML): an analysis of 1135 patients, ex-

- cluding acute promyelocytic leukemia, from the UK MRC AML10 and 12 trials. *Blood* 2005; 106: 3658-65.
17. Brunet S, Sánchez-González B, Esteve J, Nomdedéu JF, Ribera JM, Berlanga, et al. Significado pronóstico de las mutaciones de NPM y de FLT3 en la leucemia mieloide aguda con cariotipo normal. *Haematologica* (ed. esp.) 2007; 92 (Supl 2): 1 (SP-02).
 18. Schnittger S, Kohl TM, Haferlach T, Kern W, Hiddemann W, Spiekermann K, Schoch C. KIT-D816 mutations in AML1-ETO-positive AML are associated with impaired event-free and overall survival. *Blood* 2006; 107: 1791-9.
 19. Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, Mrózek K, Chen H, Kittles RA, et al.; Cancer and Leukemia Group B. Adverse prognostic significance of KIT mutations in adult acute myeloid leukemia with inv(16) and t(8;21): a Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol* 2006; 24: 3904-11.
 20. Cairoli R, Beghini A, Grillo G, Nadali G, Elice F, Ripamonti CB, et al. Prognostic impact of c-KIT mutations in core binding factor leukemias: an Italian retrospective study. *Blood* 2006; 107: 3463-8.
 21. Bacher U, Haferlach T, Schoch C, Kern W, Schnittger S. Implications of NRAS mutations in AML: a study of 2502 patients. *Blood* 2006; 107: 3847-53.
 22. Nomdedéu J, Carricondo MT, Lasa A, Perea G, Aventin A, Sierra J. Low frequency of exon 3 PTPN11 mutations in adult de novo acute myeloid leukemia. Analysis of a consecutive series of 173 patients. *Haematologica* 2005; 90 (3): 412-3.
 23. Fröhling S, Schlenk RF, Stolze I, Bihlmayr J, Benner A, Kreitmeier S, et al. CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J Clin Oncol* 2004; 22: 624-33.
 24. Muñoz L, Nomdedéu JF, Villamor N, Guardia R, Colomer D, Ribera JM, et al. Acute myeloid leukemia with MLL rearrangements: clinicobiological features, prognostic impact and value of flow cytometry in the detection of residual leukemic cells. *Leukemia* 2003; 1: 76-82.
 25. Whitman SP, Liu S, Vukosavljevic T, Rush LJ, Yu L, Liu C, et al. The MLL partial tandem duplication: evidence for recessive gain-of-function in acute myeloid leukemia identifies a novel patient subgroup for molecular-targeted therapy. *Blood* 2005; 106: 345-52.
 26. Falini B, Nicoletti I, Martelli MF, Mecucci C. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features. *Blood* 2007; 109: 874-85.
 27. Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli MF, et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood* 2005; 106: 3733-9.
 28. Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rücker FG, Corbacioglu A, et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood* 2005; 106: 3740-6.
 29. Langer C, Radmacher MD, Ruppert AS, Whitman SP, Paschka P, Mrozek K, et al. High BAALC expression associates with other molecular prognostic markers, poor outcome and a distinct gene-expression signature in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B (CALGB) study. *Blood* 2008; [epub ahead of print].
 30. Marcucci G, Maharry K, Whitman SP, Vukosavljevic T, Paschka P, Langer C, et al.; Cancer and Leukemia Group B Study. High expression levels of the ETS-related gene, ERG, predict adverse outcome and improve molecular risk-based classification of cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3337-43.
 31. Bullinger L, Valk PJ. Gene expression profiling in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2005; 23: 6296-305.
 32. Alcalay M, Tiacci E, Bergomas R, Bigerna B, Venturini E, Minardi SP, et al. Acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic nucleophosmin (NPMc+ AML) shows a distinct gene expression profile characterized by up-regulation of genes involved in stem-cell maintenance. *Blood* 2005; 106: 899-902.
 33. Radmacher MD, Marcucci G, Ruppert AS, Mrózek K, Whitman SP, Vardiman JW, et al.; Cancer and Leukemia Group B. Independent confirmation of a prognostic gene-expression signature in adult acute myeloid leukemia with a normal karyotype: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood* 2006; 108: 1677-83.
 34. Bullinger L, Döhner K, Kranz R, Stirner C, Fröhling S, Scholl C, et al. An FLT3 gene-expression signature predicts clinical outcome in normal karyotype AML. *Blood* 2008; 111: 4490-5.

Tratamiento de los síndromes mielodisplásicos: hacia un nuevo algoritmo terapéutico

M.ªC. DEL CAÑIZO, O. LÓPEZ VILLAR, I. DE LA FUENTE GRACIANI
Servicio de Hematología. Hospital Universitario de Salamanca

Introducción

Los SMD son una serie de enfermedades con gran variabilidad desde el punto de vista clínico y pronóstico, lo que hace que la elección de un tratamiento adecuado no sea tarea fácil. Durante los últimos años las posibilidades de tratamiento en estos pacientes se han incrementado de forma exponencial. Hasta hace relativamente poco tiempo nos planteábamos únicamente si el paciente podría o no ser sometido a un trasplante alogénico y, si esto no era posible, lo que sucedía en la mayoría de los casos, los pacientes pasaban a tratamiento de soporte. La tendencia actual es planificar desde el diagnóstico un tratamiento individualizado para cada paciente.

Para poder alcanzar este objetivo es muy importante estratificar a los pacientes dependiendo de ciertas características clínico-pronósticas y tres son las fundamentales a tener en cuenta: subgrupo pronóstico, edad del paciente y comorbilidades que presenta.

Con respecto al primer punto, el índice pronóstico internacional (IPSS)¹ es el más ampliamente aceptado. Sin embargo, recientemente el grupo de Pavía ha planteado un nuevo esquema de estratificación pronóstica que por su relevancia puede llegar a sustituir al anterior² y que, al ser menos conocido, incluimos en la Tabla 1. Éste incluye como variables el subtipo de síndrome mielodisplásico (SMD) atendiendo a la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el estudio citogenético y las necesidades transfusionales. Lo relevante de esta propuesta es que es un esquema dinámico, de tal manera que ha demostrado también su validez si reestratificamos al paciente a lo largo de su evolución.

Con relación a los otros dos puntos es difícil establecer a quién podemos considerar paciente de edad avanzada o con comorbilidades. Probablemente una buena forma de establecer una indicación es considerar si el paciente es o no candidato a ser tratado

agresivamente. Existen índices de comorbilidad que se han mostrado útiles para valorar la realización de un trasplante como es el de Sorror³. En ausencia de un índice específico para pacientes con SMD, podría ser útil su aplicación.

Pacientes de bajo riesgo (IPSS bajo e int-1, o WPSS muy bajo, bajo e intermedio)

Los pacientes de bajo riesgo deben estratificarse al diagnóstico según el cariotipo, con el objetivo de valorar la presencia o no de una delección a nivel del brazo largo del cromosoma 5 (5q-). Sin embargo, creemos que los pacientes jóvenes de bajo riesgo y que puedan tolerar un trasplante deben ser controlados periódicamente para tomar en consideración dicho tratamiento en caso de que progresase la enfermedad, considerando como progresión no únicamente el aumento de blastos sino citopenias con importante repercusión clínica⁴.

Como comentábamos, independientemente de la edad, en estos pacientes hay que analizar la presencia de un cromosoma 5q-. Si esta alteración está presente, la opción terapéutica debería ser la lenalidomida.

Justificación: la lenalidomida es un agente inmunomodulador que puede influir en varios de los mecanismos implicados en el desarrollo de los SMD⁵. Los datos del ensayo clínico llevado a cabo por List *et al.* en pacientes que presentaban la antedicha alteración cromosómica⁶ demostraron que el 76% obtuvo una respuesta eritroide y que en el 67% se alcanzaba la independencia transfusional; el 45% alcanzó una respuesta citogenética completa, y el 28%, parcial. Las respuestas fueron similares en pacientes con alteración aislada del 5q o con otras anomalías citogenéticas asociadas. Sólo dos variables condicionaron la respuesta de forma significativa: la trombopenia y la edad del paciente.

En pacientes de bajo riesgo, que no presenten esta alteración citogenética debemos plantearnos la utilización de factores eritropoyéticos solos o con G-CSF.

Justificación: una proporción no desdeñable de pacientes con SMD puede responder al uso de estos factores, con disminución de las necesidades transfusionales, e incluso alcanzar la independencia transfusional. El Grupo Nórdico ha establecido un modelo predictivo de respuesta⁷ que incluye la concentración

Tabla 1. Índice pronóstico WPSS

Variable	0	1	2	3
Dco	AR, ARSA, 5q-	CRDM, CRDM-SA	AREB-1	AREB-2
Cariotipo	Bueno	Intermedio	Malo	-
Necesidad	No	Sí	-	-

Grupos de riesgo: muy bajo: 0; bajo: 1; intermedio: 2; alto: 3-4; muy alto: 5-6.

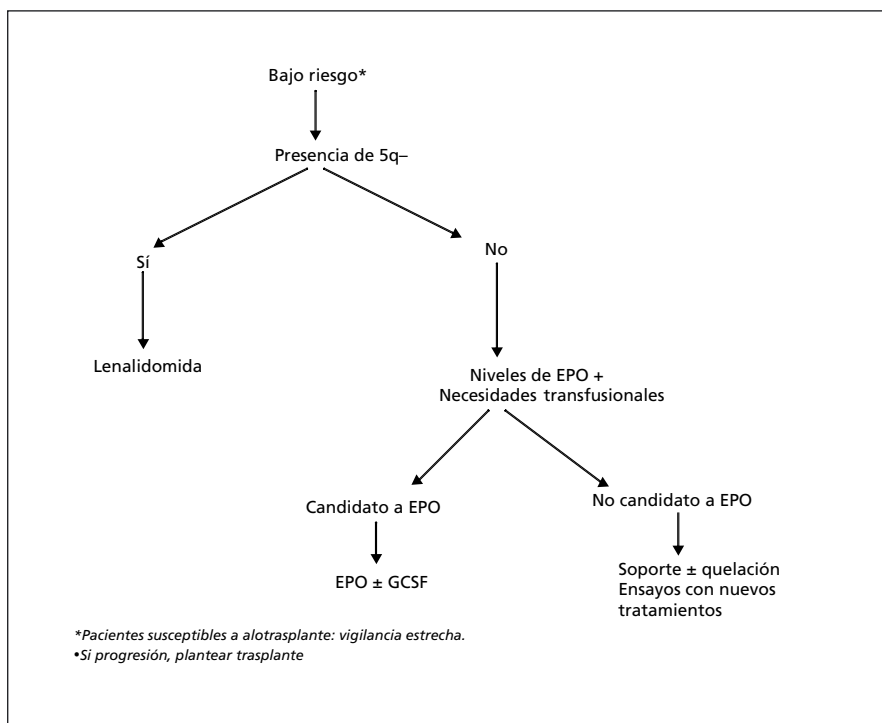


Figura 1. Árbol de toma de decisiones en pacientes de bajo riesgo. EPO: eritropoyetina.

sérica de eritropoyetina (EPO) junto con las necesidades transfusionales. La probabilidad de respuesta varía entre el 74% de los pacientes en el grupo favorable y el 7% en el grupo predictivo de respuesta más desfavorable. Además, existe evidencia de que aquellos pacientes con respuesta al tratamiento no sólo mejoran su calidad de vida⁹, sino que además tiene mayor supervivencia⁹.

Finalmente, aquellos pacientes que no reúnan criterios para recibir estos factores o que tras un periodo de tiempo no respondan al mismo serán candidatos a incluirse en ensayos clínicos con drogas en investigación o a recibir tratamiento de soporte con hemoterapia y en estos pacientes debemos valorar el uso o no de tratamiento con quelantes del hierro.

Justificación: El objetivo de la transfusión de concentrados de hemáties en pacientes con SMD es doble: preservar la calidad de vida y prevenir la morbilidad relacionada con la anemia.

La transfusión de concentrados de hemáties de forma crónica provoca de manera inequívoca sobrecarga férrica en estos pacientes. La absorción intestinal de hierro es de 1-2 mg/día, y cada concentrado de hemáties aporta unos 200-250 mg de hierro¹⁰.

El organismo carece de mecanismo fisiológico de eliminación del exceso de hierro, y sólo se elimina hierro mediante la pérdida de hemáties (sangrado o sangrías terapéuticas) o mediante el tratamiento quelante. La sobrecarga férrica crónica produce daño orgánico a distintos niveles: pituitaria (alteraciones del crecimiento e infertilidad), tiroides (hipotiroidismo), corazón (miocardiopatía e insuficiencia cardíaca), hí-

gado (cirrosis hepática), páncreas (diabetes mellitus), gónadas (hipogonadismo).

En el año 2005, Malcovati *et al.* observaron una disminución de la supervivencia global en los pacientes con SMD dependientes de transfusión frente a aquellos que tenían independencia transfusional¹⁰. Posteriormente, el mismo grupo describió cómo la sobrecarga férrica crónica produce una disminución de la supervivencia global en los pacientes con SMD, siendo ésta inferior cuanto mayores son los niveles de ferritina sérica de los pacientes, y ello llevó al establecimiento de una clasificación pronóstica (WPSS) para pacientes con SMD que incluye entre sus parámetros la dependencia transfusional².

Recientes estudios han objetivado que el adecuado tratamiento quelante en pacientes con SMD dependientes de transfusión es beneficioso y puede mejorar la supervivencia global de estos pacientes^{11,12}. Sin embargo, estas observaciones deben refrendarse en otros estudios.

Pacientes de alto riesgo (riesgo int-2, riesgo alto del IPSS, y alto o muy alto del WPSS)

El pronóstico adverso de estos pacientes nos obliga a buscar tratamientos más agresivos que permitan alargar su supervivencia. Hasta hace poco estos pacientes únicamente podían recibir tratamiento de soporte, pero actualmente existen nuevos medicamentos que pueden variar el curso natural de la enfermedad¹³. En estos pacientes es en los que es imprescindible

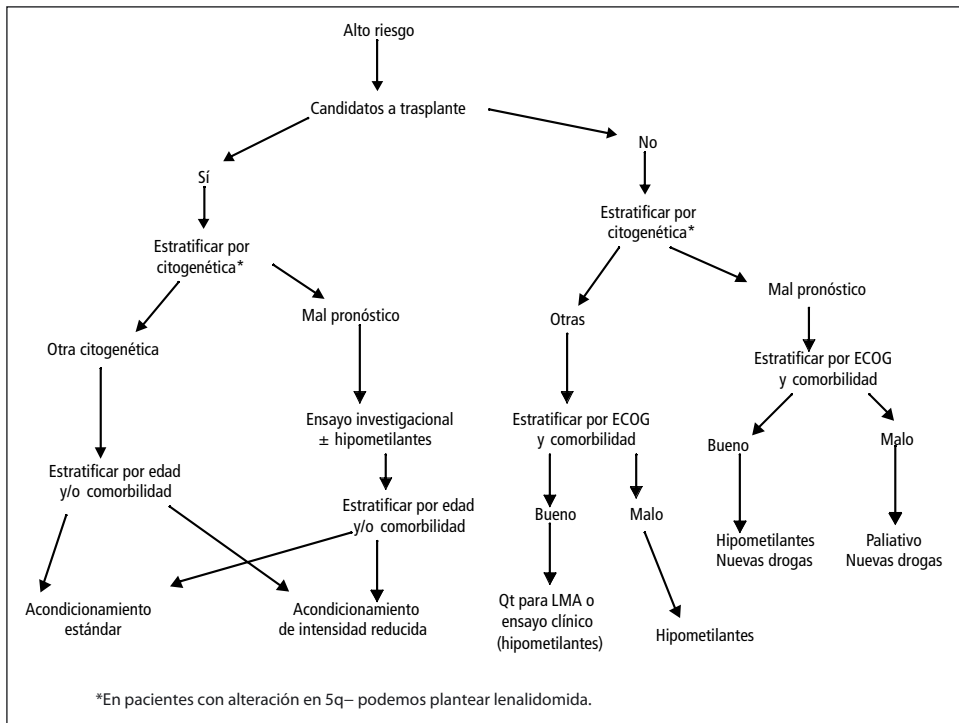


Figura 2. Árbol de toma de decisiones en pacientes de alto riesgo. Qt: quimioterapia.

dible valorar la probabilidad de tolerancia a un trasplante alogénico y para ello es imprescindible tener en cuenta no sólo la edad sino también el índice de comorbilidad³. Evidentemente, también se tendrá en cuenta según la edad la disponibilidad de un donante adecuado. Los pacientes que se consideren apropiados para trasplante alogénico deberán recibir dicho tratamiento. Debemos tener en cuenta que la posibilidad de llevar a cabo trasplante alogénico con regímenes de acondicionamiento de intensidad reducida ha hecho que el número de pacientes con SMD candidatos a este tipo de tratamiento se haya incrementado de forma significativa.

Justificación: los pacientes de alto riesgo no candidatos a trasplante alogénico deben ser estratificados según los hallazgos citogenéticos. Es bien conocido por todos que el subgrupo citogenético según el IPSS es una de las variables pronósticas más importantes^{1,2}.

Los pacientes jóvenes con citogenética normal pueden recibir quimioterapia agresiva de tipo LAM.

Justificación: como los enfermos con LAM, para poder obtener una respuesta adecuada, estos pacientes deben recibir tratamiento de inducción y consolidación¹³. Un 50-60% de estos pacientes pueden alcanzar respuesta completa, y un 20% pueden llegar a ser largos supervivientes. Sin embargo, dados los resultados esperanzadores de los agentes hipometilantes, habrá que plantearse ensayos clínicos en estos pacientes con tratamiento combinado.

Por el contrario, la mayoría de los pacientes con citogenética de alto riesgo no alcanzan la respuesta

completa con la quimioterapia convencional y si lo hacen recaen precozmente. Para estos pacientes con citogenética desfavorable o porque, por su edad o condiciones físicas, no podamos plantearnos el tratamiento agresivo, la opción más adecuada en el momento actual son los agentes hipometilantes.

Justificación: los agentes hipometilantes disponibles en la actualidad son la decitabina y la 5-azacitidina. Ambos compuestos han mostrado su eficacia en el tratamiento de los SMD. Los primeros resultados publicados por Silverman *et al.* hace ya 6 años comparando 5-azacitidina frente a placebo¹⁴ pusieron de manifiesto que con estos agentes se podían obtener un número significativo de respuestas y que esto podía tener un impacto en la supervivencia. Resultados similares se obtuvieron con la decitabina¹⁵.

En un ensayo llevado a cabo más recientemente¹⁶ en el que se comparaba 5-azacitidina con otros tres posibles brazos –soporte, Ara-C a bajas dosis o quimioterapia de tipo leucemia mieloide aguda (LMA)– se comprobó que con el agente hipometilante se alcanzaba una supervivencia casi 9 meses más larga que en el grupo control. Cuando la comparación se realizó con cada uno de los grupos de tratamiento, la diferencia era significativa al comparar la 5-azacitidina con soporte o Ara-C a bajas dosis. Esta diferencia no se alcanzaba al comparar con quimioterapia agresiva, entre otras razones por el escaso número de pacientes incluidos en este grupo. Debemos además tener en cuenta que en algunos casos, pese a no haber alcanzado una remisión citogenética, se consiguió la independencia transfusional, lo cual no tiene impacto

únicamente sobre la supervivencia, sino sobre la calidad de vida de estos pacientes¹⁷.

Pese a que todavía quedan cuestiones que responder sobre la mejor dosis, el mejor esquema de tratamiento con estos agentes hipometilantes o la combinación con otros compuestos, debemos plantearnos siempre que podamos la inclusión de nuestros pacientes en ensayos clínicos que nos permitan dar respuesta a estos interrogantes.

Un dato interesante con estos medicamentos y que debe ser tenido en cuenta en el momento de diseñar un protocolo de tratamiento es que son los únicos que parecen ser eficaces en pacientes con citogenética de mal pronóstico.

Algo a tener en consideración es que en pacientes de alto riesgo y que tengan alteraciones a nivel del 5q- puede plantearse el uso de **lenalidomida**, dado que se han obtenido respuestas no desdeñables pese a existir alteraciones citogenéticas añadidas⁶.

En aquellos pacientes que por su edad muy avanzada o por sus condiciones físicas no sean candidatos a ninguno de estos tratamientos, puede plantearse la inclusión en ensayos clínicos con nuevos agentes en investigación o simplemente realizar tratamiento de soporte o paliativo.

Otros tratamientos

Existen otros tratamientos en proceso de desarrollo clínico que han mostrado su eficacia en estas enfermedades pero que deben ser utilizados todavía en el contexto de ensayos clínicos. Entre éstos se cuentan los **inhibidores de las histona deacetilasas**, los **inhibidores de la farnesil transferasa**, la **clofarabina**, los **inhibidores de tirosina quinasas**, etc. Es probable que en los próximos años, si demuestran claramente su eficacia, el árbol de toma de decisiones para estos pacientes varíe e incluso que debamos plantearnos tratamientos combinados.

Consideraciones finales

Los SMD son un conjunto de procesos con gran variabilidad clínico-pronóstica. El desarrollo durante los últimos años de nuevos fármacos, que han mostrado su eficacia en estos procesos, hace que en el momento actual debamos evaluar cuidadosamente al paciente en el momento del diagnóstico antes de elegir un tipo de tratamiento. Esta necesidad hace que la toma de decisiones sea más complicada para el facultativo encargado del tratamiento, pero ha permitido alargar la supervivencia de un número significativo de nuestros pacientes y mejorar la calidad de vida en muchos de ellos. Sin embargo, los resultados no son óptimos

en todos los casos y sólo encontraremos mejores aproximaciones terapéuticas para nuestros pacientes con la realización de ensayos clínicos.

Bibliografía

- Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997; 89: 2079-88.
- Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, Della Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, et al. Time dependent prognostic score system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3503-10.
- Sorror ML, Maris MB, Storb R, Baron F, Maloney DG, Storer B. Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a novel tool for risk assesment before allogeneic HCT. *Blood* 2006; 106: 2912-9.
- Cutler CS, Lee SJ, Greenberg P, Deeg HJ, Pérez WS, Anasetti C, et al. A decision analysis of allogeneic bone marrow transplantation for the myelodysplastic syndromes: delayed transplantation for low-risk myelodysplasia is associated with improved outcome. *Blood* 2004; 105: 579-85.
- González Porras JF, López O, Del Cañizo MC. Avances terapéuticos en síndromes mileodislásicos. *Haematologica* 2007; Supl. 1: 5-8.
- List A, Dewald G, Bennett J, Giagounidis A, Raza A, Feldman E, et al. Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *N Engl J Med* 2006; 355: 1456-65.
- Hellström-Lindberg E, Negrin R, Stein R, Krantz S, Lindberg G, Vardiman J, et al. Erythroid response to treatment with G-CSF plus erythropoietin for the anaemia of patients with myelodysplastic syndromes: proposal for a predictive model. *Br J Haematol* 1997; 99: 344-51.
- Hellström-Lindberg E, Gulbrandsen N, Lindberg G, Ahlgren T, Dahl IM, Dybedal I, et al.; Scandinavian MDS Group. A validated decision model for treating the anaemia of myelodysplastic syndromes with erythropoietin + granulocyte colony-stimulating factor: significant effects on quality of life. *Brit J Haematol* 2003; 120: 1037-46.
- Järdersten M, Montgomery SM, Dybedal I, Porwitt-McDonanld A, Hellström-Lindberg E. Long-term outcome of treatment of anemia in MDS with erythropoietin ang G-CSF. *Blood* 2005; 106: 903-11.
- Malcovati L, Della Porta M, Pascutto C. Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: a basis for clinical decision-making. *J Clin Oncol* 2005; 23: 7594-603.
- Leitch HA, Goodman TA, Wong KK, Vickars LM, Galbraith PF, Leger ChS. Improved survival in patients with myelodysplastic syndrome receiving iron chelation therapy. *Blood* 2006; 108: [abstract 249].
- Rose C, Brechignac S, Vassilief D, Beyne-Rauzy O, Stamatoullas A, Larbaa D, et al. Positive impact of iron chelation therapy on survival in regularly transfused MDS patients. A prospective analysis by the GFM. *Blood* 2007; 110 (Abstract 249).
- Gatterman N, Kungden A, Germing U. Treatment of patients with high-risk myelodysplastic syndromes. *Cancer Treat Rev* 2007 (en prensa).
- Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, Kornblith AB, Holland JC, Odchimar-Reissig R, et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol* 2002; 20: 2429-40.
- Kantarjian H, Oki Y, García-Manero G, Huang X, O'Brien S, Cortes J, et al. Results of a randomized study of 3 schedules

- of low-dose decitabine in higher-risk myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 2007; 109: 52-7.
16. Fenaux P, Mufti G, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, Schoch R, et al. Azacitidine treatment prolongs overall survival in higher-risk MDS compared with conventional care regimens: results of AZA-001 phase III study. *ASH* 2007.
17. Balducci L. Transfusion independence in patients with myelodysplastic syndromes: impact on outcomes and quality of life. *Cancer* 2006; 106: 2087-94.

CONFERENCIA INAUGURAL

PRESENTACIÓN: V. VICENTE. *Murcia*

Breve historia de la Asociación Española de Hematología y Hemoterapia (AEHH) y algunas reflexiones para el futuro

C. ROZMAN

Catedrático de Medicina.

Profesor Emérito de la Universidad de Barcelona

Introducción

La celebración del 50 Congreso de la AEHH constituye una efeméride lo suficientemente importante como para merecer una mirada hacia atrás. Agradezco profundamente al Prof. Vicente que me haya encargado esta tarea. Sospecho que me ha seleccionado por dos motivos: a) por un lado, he tenido el privilegio de haber sido uno de los espectadores de excepción de este medio siglo de vida de la AEHH; y b) por otro, he realizado ya anteriormente algunas incursiones históricas en esta materia^{1,2} que aquí reproduzco en parte. La limitación lógica del presente contexto me obliga a realizar una revisión temática muy breve. De antemano me excuso por todas las omisiones que forzosamente habré de cometer. Adicionalmente expresaré algunas reflexiones para el futuro, pues de siempre he creído que las consideraciones históricas adquieren una dimensión más importante si sirven para modificar actuaciones futuras.

Antecedentes

El desarrollo de la hematología española y la aparición de sus grandes figuras no ha obedecido a una programación estructurada, sino al surgimiento de necesidades, en ocasiones desvinculadas de la propia especialidad y, en cierto modo, colaterales. En este sentido cabe citar el hecho de que *Plasmodium* sea un parásito eritrocitario y que las necesidades de la lucha palúdica hagan aparecer al precursor de la hematología española, Gustavo Pittaluga (1876-1956). Florentino de nacimiento, Pittaluga llegó a España en 1903 para luchar contra el paludismo, empeño en el cual tuvo un notable éxito, con el consiguiente prestigio científico y social (Figura 1). La trágica contienda civil española (1936-1939) determinó las necesidades de transfusión sanguínea, lo cual generó figuras como Frederic Duran Jordà (1905-1957) (Figura 2) en el bando republicano y Carlos Elósegui Sarasola (1903-1981) (Figura 3) en el nacional. La casualidad de que la monarquía española quedase emparentada con la reina Victoria de Inglaterra, heredando de ella la hemofilia, impulsó las actividades del ya citado Elósegui. En



Figura 1. Gustavo Pittaluga.



Figura 2. Frederic Duran Jordà.



Figura 3. Carlos Elósegui Sarasola.

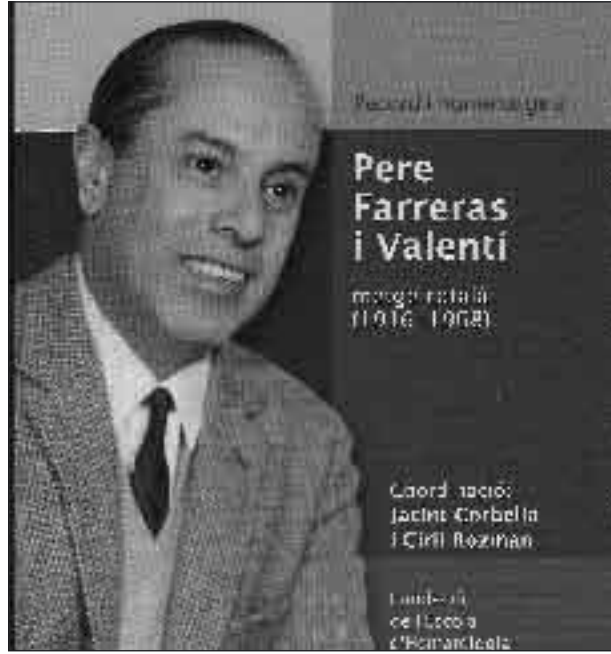


Figura 5. Pedro Farreras Valentí.



Figura 4. Jordi Guasch Sagrera.

efecto, fue nombrado médico de cámara de la monarquía española, función en la que sustituyó en realidad a su maestro Pittaluga, para quien dicho cometido no se consideró idóneo dadas sus convicciones republicanas. Por otro lado, en el seno de los laboratorios clínicos se percibió la necesidad de citólogos dedicados a las enfermedades de la sangre, lo cual facilitó la aparición de Guasch, Vives-Mañé, Paniagua, así como el paso de la bacteriología a la citología de

Forteza-Bover. Entre ellos, el de mayor prestigio internacional fue Jordi Guasch Sagrera (1903-1988) (Figura 4), quien se había formado al lado del destacado citólogo suizo Otto Naegeli (1871-1938) y que a partir de 1929 desarrollaría una amplia labor tanto de hematología clínica como de laboratorio en dos centros: en la Clínica Médica B del profesor Ferrer Solervicens del Hospital Clínico, y en la Clínica Platón, ambas de Barcelona. A la vez, los internistas sintieron la necesidad de conocer con más detalle los aspectos clínicos de las enfermedades de la sangre, lo cual generó, entre otras, la figura de Farreras Valentí (1916-1968) (Figura 5). Su destacado protagonismo en la medicina interna y la hematología españolas fue recordado recientemente en un libro-homenaje³. Por último, en la gran red de hospitales de la Seguridad Social desarrollada a partir de la mitad del siglo XX, nacieron las necesidades hemoterapéuticas para facilitar las tareas quirúrgicas, y que darían lugar a la proliferación de los servicios de hematología y hemoterapia. Emergieron así varias figuras, entre las cuales situaría como más paradigmática la de Antonio Raichs Solé (1920-1988) (Figura 6), a quien seguimos recordando cada año en la correspondiente lección conmemorativa.

Nacimiento de la AEHH

En los antecedentes de la creación de la AEHH es preciso mencionar de nuevo a los ya referidos Carlos Elósegui y Jordi Guasch. Ciertamente tan distintos en muchos aspectos, tenían en común, además de su año de nacimiento (1903) y de sus grandes dotes personales



Figura 6. Antonio Raichs Solé.

y científicas, de su agudeza y claridad de criterios, de su laboriosidad y enorme capacidad de trabajo, condiciones de carácter sumamente peculiares, producto de acendrado individualismo y su talante crítico y categórico, que los llevaba a menudo a posiciones de excesiva intransigencia. El trabajo diario con ellos resultaba a veces difícil. No fueron capaces de crear a su alrededor una verdadera escuela y actuaron en sus numerosos y destacados logros de un modo personal y aislado. No eran hombres de equipo.

Durante muchos años, Guasch y Elósegui siguieron caminos alejados y, de hecho, no se conocían. Sin embargo, sus anhelos científicos y su afán de divulgarlos (al respecto habían tenido ya diversas iniciativas personales), así como su temperamento de grandes luchadores y de obstinados defensores de sus ideas, hicieron que se uniesen en una iniciativa común. En efecto, en 1956 fundaron, a sus expensas y sin protección oficial alguna, *Sangre. Revista de Biología y Patología Sanguíneas y Hemoterapia* (Figura 7), que, además de las aportaciones científicas propias, basó su continuidad sobre las colaboraciones obtenidas de conexiones internacionales de ambos, especialmente de Guasch, bien conocido por entonces en los ambientes hematológicos de todo el mundo. Como buen madrileño “trasplantado” —ya que siempre blasonó de sus orígenes vascos—, Elósegui tenía gran fe en la resolución de los problemas de la hemoterapia mediante la promulgación de decretos y normativas oficiales. Los intentos normalizadores, además de tener escaso resultado práctico, generaron una notable animadversión entre los hemoterapeutas. En 1958, Elósegui y Guasch, con la colaboración de Antonio Raichs, elaboraron un proyecto de estatalización de la he-



Figura 7. Portada del primer número de *Sangre*.

moterapia mediante la creación de una Red Nacional, siguiendo a grandes rasgos el modelo francés.

La idea no parecía mala, vistos los resultados obtenidos en Francia e Inglaterra, aunque no pudo lograr el gran soporte económico que el plan requería. Pero, sobre todo, los hemoterapeutas españoles no quisieron someterse a una organización regida por Elósegui y Guasch. No estaban dispuestos a renunciar a sus organizaciones privadas u hospitalarias en las que —casi siempre con acierto y honradez— ejercían la especialidad según sus propios criterios: no deseaban perder la libertad de su ejercicio profesional. Para poder luchar, los especialistas españoles decidieron agruparse en torno a una asociación. Adviértase, pues, que el Nacimiento de la AEHH no obedeció a un afán científico, sino a razones de índole gremial. El proceso administrativo de su legalización chocó con fuertes resistencias administrativas, puesto que ya existía una asociación creada por Elósegui con los diplomados en Hematología y Hemoterapia, provenientes de sus cursillos de Madrid, que jamás mantuvo actividad corporativa alguna.

La AEHH requirió para nacer fuertes apoyos políticos que se arrojaron en la persona del Dr. Agustín

Tabla 1. Primera Junta Directiva de la AEHH

Presidente	Agustín Aznar Gerner
Vicepresidente primero	Pedro Farreras Valentí
Vicepresidente segundo	Juan Picazo Guillén
Secretario	Julio Rivera Bandrés
Tesorero	Eduardo de Yraola y Rodríguez Guerra
Vocales	Manuel Miserachs Rigalt
	Gonzalo Díaz de Yraola
	Sandro Machetti Croso
	Patricio de Agustín Jiménez
	Vicente Goyanes Álvarez
	Tomás Corral Nogales
	Gregorio Paniagua Rodríguez
	Gerónimo Forteza Bover

Tabla 2. Presidentes de la AEHH

Periodo	Presidente
1959-1961	Agustín Aznar Gerner
1961-1965	Pedro Farreras Valentí
1965-1967	Gerónimo Forteza Bover
1967-1969	Gonzalo Díaz de Yraola
1969-1971	José Sánchez Fayos
1971-1975	Antonio Raichs Solé
1975-1977	Ciril Rozman
1977-1979	Juan Maldonado Eloy-García
1979-1981	Julio Outeriño Hernanz
1981-1983	Ricardo Castillo Cofiño
1983-1985	Agustín Ríos González
1985-1987	Antonio López Borrasca
1987-1989	Miquel Rutllant Bañeres
1989-1991	Manuel Giralt Raichs
1991-1993	José M. ^a Fernández-Rañada
1993-1995	Juan M. Rodríguez Fernández
1995-1999	Eduardo Rocha Hernando
1999-2003	Vicente Vicente García
2003-2007	Luis Hernández Nieto
2007-	Evarist Feliu Frasnado

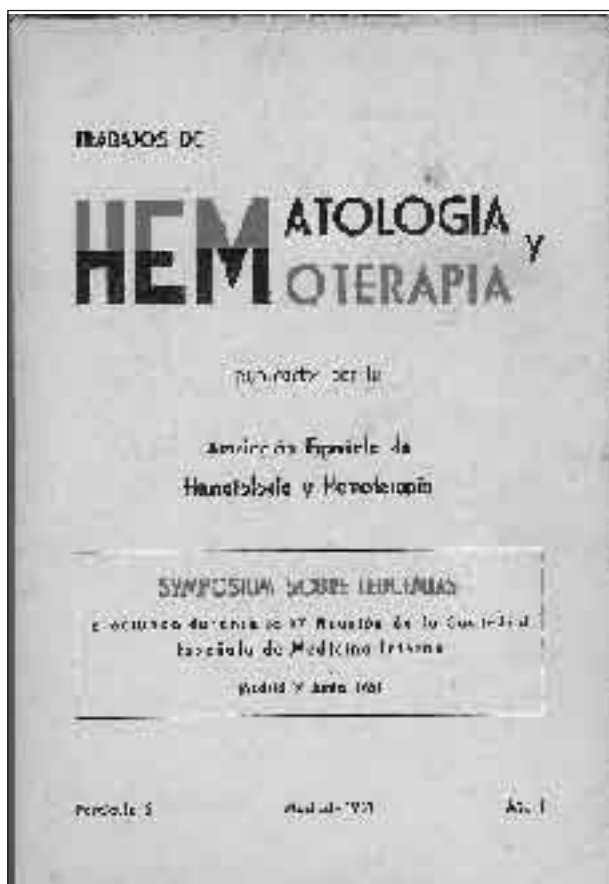


Figura 8. Portada de la revista *Trabajos de Hematología y Hemoterapia*.

Aznar Gerner, personalidad de gran ascendencia en las altas esferas de entonces, aunque sin especial dedicación a la hematología –su actividad profesional se centraba en los análisis clínicos en general–: fue él

quien prestó todo su apoyo en la lucha, hasta dejar a la AEHH en plenas condiciones de funcionamiento.

La AEHH se constituyó en el Colegio de Médicos de Madrid el día 22 de mayo de 1959 con la asistencia personal o delegada de 217 especialistas, cifra que integraba en aquel momento a la práctica totalidad de los hematólogos españoles. La Asamblea eligió por 211 votos a favor y 6 en contra su primera Junta Directiva (Tabla 1). Ésta realizó varias gestiones personales para que Elósegui y Guasch se integraran en la nueva Asociación. Ambos declinaron la invitación. Más tarde, olvidando tensiones pasadas y en reconocimiento de sus indudables méritos, Guasch y Elósegui fueron elegidos y aceptaron ser Miembros de Honor de la AEHH, el primero a propuesta de Farreras en 1965, y el segundo a propuesta de Raichs en 1973.

Aunque una parte de los miembros de la AEHH estaba interesada, sobre todo, en los aspectos corporativistas en el terreno de la hemoterapia, otra importante fracción mostraba inquietudes científicas. Fruto de ello se organizaron las reuniones anuales, cuya quincuagésima edición celebramos hoy.

Algunos hitos históricos

El contexto de esta presentación me impide realizar un estudio detallado de la AEHH a lo largo de este casi medio siglo. Por esta razón he seleccionado algunos hitos históricos que bajo la dirección de veinte presidentes (Tabla 2) ha podido vivir nuestra sociedad.



Figura 9. Portada de *Sangre* tras su fusión con *Trabajos de Hematología y Hemoterapia*.

Órgano oficial de la AEHH

Como queda ya señalado, en 1956 Guasch y Elósegui fundaron *Sangre* que llevaba por subtítulo *Revista de Biología y Patología Sanguíneas y Hemoterapia*, con Antonio Raichs –que entonces estaba aún en Barcelona con el primero de ellos– de Secretario de Redacción. Cuando poco después Raichs se trasladó a Zaragoza para ocupar la dirección del recién creado Servicio Regional de Hematología y Hemoterapia de la Residencia Sanitaria José Antonio (ahora Miguel Servet), se llevó consigo la edición de la revista, que quedó definitivamente instalada en la capital aragonesa. Mientras tanto, en 1961 la AEHH comenzó a editar su propia revista, llamada *Trabajos de Hematología y Hemoterapia* (Figura 8). Entre los miembros de la asociación crecía el convencimiento de que era absurdo disponer en España de dos revistas hematológicas, y por ello comenzaron las gestiones dirigidas a su fusión. En una memorable asamblea celebrada en 1969 en Badajoz y presidida por Díaz de Yraola, se sentaron las bases para tal logro, el cual se consiguió definitivamente en 1971 bajo la presidencia de Sánchez-Fayos. A partir de

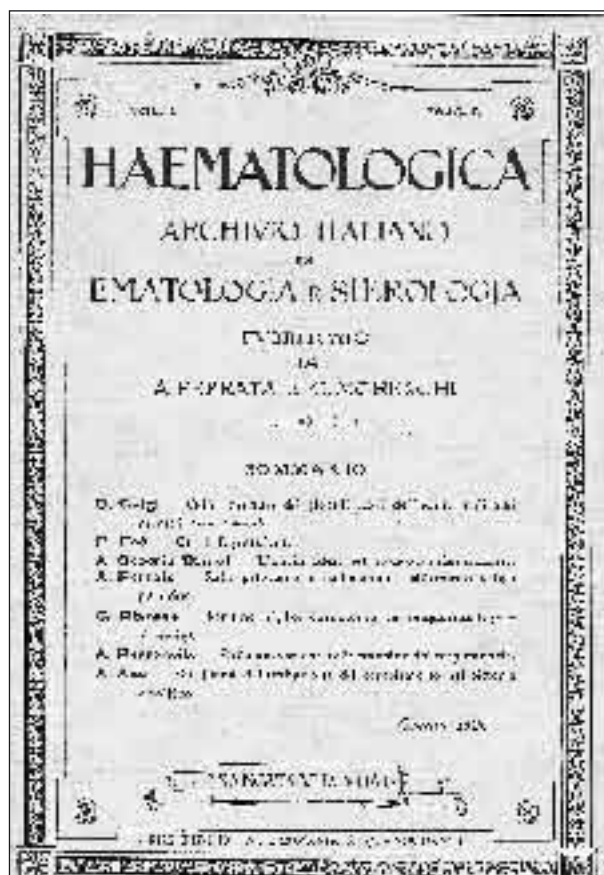


Figura 10. Portada del primer número de *Haematologica*.

ese momento, *Sangre* lleva por subtítulo *Trabajos de Hematología y Hemoterapia* (Figura 9), y se convierte progresivamente en órgano oficial de numerosas sociedades hematológicas de Hispanoamérica. El prestigio de *Sangre* llegó a ser muy notable, gracias sobre todo a Antonio Raichs, quien con su gran dedicación, seriedad y “oficio” editorial mantuvo unas cotas de indudable calidad.

Transcurridos los años, y siguiendo los ejemplos de otras sociedades científicas, comenzó a percibirse entre algunos miembros de la AEHH la convicción de que convendría disponer de un órgano oficial publicado, en parte o del todo, en inglés, condición imprescindible para conseguir la idónea difusión y el correspondiente impacto en la bibliografía internacional. Bajo la presidencia del Dr. Rocha, se llevaron a cabo entre la AEHH, Ediciones Doyma y la Fundación Ferrata-Storti (propietaria de la revista *Haematologica*) diversas gestiones bastante complejas que culminaron en el acuerdo para que ésta, a partir del mes de enero de 1997, fuera convertida en órgano oficial de la asociación. La revista italiana, fundada en 1920 (Figura 10), había evolucionado en los años recientes en el sentido no tan sólo de aparecer íntegramente en inglés, sino también de experimentar un progresi-



Figura 11. Portada de *Haematologica*, convertida en órgano oficial de la AEHH.



Figura 12. Portada de *Haematologica/The Hematology Journal*, convertida en órgano oficial de EHA.

vo aumento de su calidad. Dicho acuerdo conllevaba una publicación especial para los hematólogos españoles, así como la de todos los documentos científicos correspondientes a nuestros congresos (Figura 11).

Unos años más tarde se produjo otro paso trascendental, pues la *European Hematology Association* (EHA), tras una serie de experiencias poco afortunadas con la edición de su propia revista, llegó al acuerdo con la Fundación Ferrata-Storti para la aparición de la revista *Haematologica/The Hematology Journal*, como órgano oficial de todos los hematólogos europeos (Figura 12). En esta fusión es preciso reconocer el mérito político de Emili Montserrat –a la sazón, presidente electo de EHA–, la eficacia y dedicación de Mario Cazzola, así como la contribución de un amplio grupo de editores asociados y miembros de diversos comités –entre ellos, numerosos hematólogos españoles–. En la actualidad esta revista disfruta de un merecido prestigio y notable visibilidad internacional.

Programas y grupos cooperativos

La AEHH ha demostrado a lo largo de su historia una gran vitalidad, puesto que no se ha limitado a la

celebración de su encuentro anual. Todo lo contrario, ha desarrollado numerosas actividades mediante la creación de programas y grupos cooperativos. Aquí me ocupo brevemente tan sólo de los dos primeros y, probablemente, los más paradigmáticos: el PABAS y el PETHEMA.

Programa de Acreditación de Bancos de Sangre (PABAS)

Entre los miembros de la AEHH existía cierta preocupación por la calidad de la transfusión sanguínea en el país, lo que llevó a la creación del PABAS el 7 de octubre de 1972, bajo la presidencia de Antonio Raichs. El primer cometido del programa consistió en elaborar unas normas de calidad que constituyeran la base para las inspecciones voluntarias de los bancos de sangre y que se recogieron en el llamado *Libro verde*. En 1974 se acreditó el primer banco, dirigido por Ricardo Castillo en el Hospital Clínico de Barcelona. Cuando en 1975 accedí a la presidencia de la AEHH, estimulé la puesta en práctica del programa, por lo menos entre los miembros de la junta, y así, en 1980 ya se habían acreditado 19 bancos de este tipo



Figura 13. Asistentes a la reunión de PETHEMA, a los 20 años de su creación.

en todo el país. En 1989 nació la Sociedad Española de Transfusión Sanguínea (SETS) y los miembros de la misma reclamaban la acreditación por parte de la nueva sociedad. Hubo un notable acuerdo en considerar que era ilógica la coexistencia de dos comités de acreditación, gracias a lo cual, en 1996 se llegó a un acuerdo entre ambas sociedades, AEHH y SETS, para compartir la responsabilidad científica, económica y funcional del PABAS. A la vez, se cambió su nombre por el de Comité de Acreditación en Transfusión (CAT). Y, como señala muy acertadamente Carmen Martín-Vega en su excelente trabajo histórico sobre la transfusión en España, hay que reconocer la gran labor desarrollada “por este comité que, sin ánimo de lucro y gracias al altruismo de sus integrantes, ha elevado a los bancos de sangre del país al nivel europeo”⁴.

Programa para el Estudio y la Terapéutica de las Hemopatías Malignas (PETHEMA)

La creación de este grupo se llevó a cabo el 27 de noviembre de 1973 bajo la iniciativa de los doctores Antonio Raichs y Jordi Estapé. Estapé asumió las funciones de Secretario y Coordinador del Grupo hasta 1993. Durante ese periodo PETHEMA tuvo una importante función educativa en el ámbito de la hematología española. En el seno del grupo se diseñaron los primeros estudios protocolizados y ensayos clínicos del país. El día 17 de diciembre de 1993 se celebró, en homenaje a Jordi Estapé, la reunión conmemorativa de los veinte años de actividad de PETHEMA (Figura 13), bajo la generosa organización del Dr. Juan Maldonado, en Málaga⁵. Este hito constituyó a la vez un momento de cambio generacional. Las funciones de Coordinador del grupo y de Secretario General las asumieron los Dres. Joaquín Díaz-Mediavilla y Joan Bladé, respectivamente, quienes realizaron una magnífica labor, potenciando, sobre todo, los aspectos organizativos y la productividad científica. Desde 2001 hasta la actualidad la Coordinación y la Secretaría

General recaen en los Dres. Miguel Ángel Sanz y José M.^a Ribera, respectivamente⁶. De otro lado, ante la necesidad de un apoyo logístico y administrativo, en 1995 se creó la Fundación PETHEMA. En esta iniciativa del grupo tuvieron un papel fundamental los Dres. Joaquín Díaz-Mediavilla, Joan Bladé y Juan-José Lahuerta. En la actualidad, la Fundación PETHEMA cuenta con un Director Ejecutivo y una Secretaria a tiempo completo, tiene contratadas a unas 15 personas, necesarias para llevar a cabo los distintos proyectos, administra un presupuesto importante y se ha convertido en promotor de la mayoría de ensayos clínicos que llevan a cabo los investigadores de este importante colectivo⁷.

Séptimo Congreso de la ‘International Society of Haematology, European and African Division’ (Barcelona, 4-9 septiembre de 1983)

Hace ahora 25 años que tuvo lugar la auténtica presentación de la hematología española en el ámbito internacional (Figura 14). Acudieron más de 1500 asistentes de 45 países. Aunque yo tuve el honor de ocupar la presidencia del acontecimiento, deseo destacar en estos momentos los importantes apoyos que fueron cruciales para mí en su desarrollo. En primer lugar, es preciso recordar que el congreso fue organizado por la AEHH (Figura 15), cuya junta presidida por Juan Maldonado (1977-1979) asumió el riesgo económico que suponía celebrar dicho evento en España. Ésta fue la condición que puse para aceptar la presidencia. La Junta presidida por Ricardo Castillo (1981-1983) decidió con gran sentido común que ese año no se iba a celebrar la reunión anual de la AEHH, y que el Congreso Internacional rellenaba sobradamente ese hueco. Y aunque muchos hematólogos españoles se volcaron con entusiasmo a favor del éxito de ese acontecimiento, deseo citar específicamente, aparte de las dos personas ya mencionadas, la enorme tarea desarrollada por el Secretario General Antonio Raichs y por el Tesorero Miquel Rutllant, quien merced a una brillante labor aseguró la viabilidad económica del acontecimiento.

Fundación Española de Hematología y Hemoterapia (FEHH)

Bajo la fructífera presidencia de Eduardo Rocha (1995-1999) se produjeron dos grandes hitos históricos. El primero fue ya el mencionado acuerdo para que *Haematologica* se convirtiese en órgano oficial de la Asociación; y el segundo, la creación de la FEHH. Ésta se constituyó mediante escritura pública autorizada por el notario de Barcelona don Joan Rubies

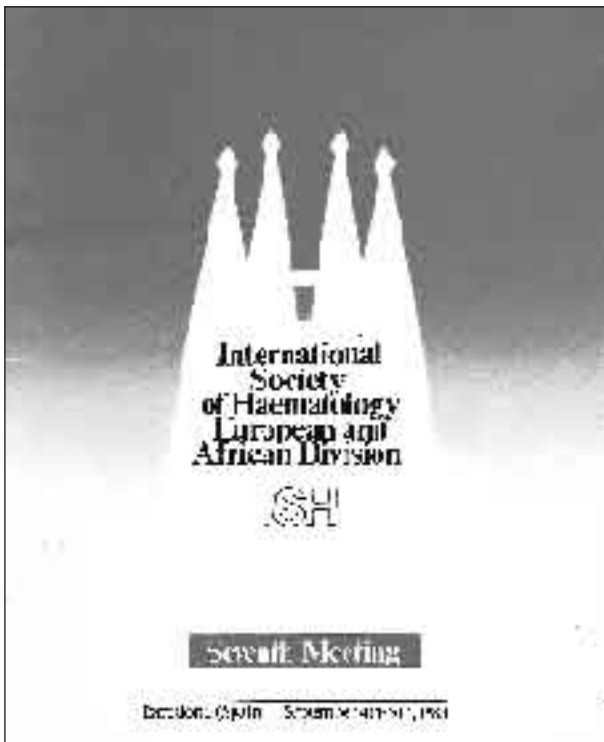


Figura 14. Portada del programa del Congreso Internacional de Hematología celebrado en Barcelona en 1983.



Figura 15. Portadilla del programa del Congreso Internacional de 1983, en la cual se puede observar que fue organizado por la AEHH.

Mallol el día 30 de octubre de 1996, y ha constituido un gran soporte logístico en numerosas iniciativas de la AEHH, tales como la profesionalización a la hora de organizar las reuniones anuales, desarrollo de importantes actividades en la educación continuada con celebración de diversos cursos, un amplio fondo editorial con publicación de libros y otro material diverso, así como la concesión de bolsas de viaje, becas y premios. Estos dos hitos históricos fueron consolidados bajo la brillante presidencia de Vicente Vicente (1999-2003).

Algunas reflexiones para el futuro

Se refieren esencialmente a las relaciones de la AEHH con las tres sociedades afines: la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia (SETH), la Sociedad Española de Transfusión Sanguínea (SETS) y la *European Hematology Association* (EHA).

AEHH y SETH

A pesar de que la AEHH tenía y sigue teniendo como objetivo cubrir todas las vertientes de esta amplia especialidad, hubo compañeros que, sin abandonar el seno de la asociación madre, sintieron

el deseo de crear una sociedad que cultivase de forma más específica las áreas de hemostasia y trombosis. Existía una percepción de que en la AEHH se daba una excesiva preferencia a la oncohematología clínica y biológica, en detrimento de las demás áreas. Por otro lado, la trombosis rebasaba el ámbito de la propia hematología y podía ser un ámbito de interés común con otras especialidades médicas tales como la cardiología, la neurología o la angiología. A pesar de algunas reticencias iniciales respecto a la necesidad de crear una nueva asociación, el entusiasmo de algunos expertos de esta área hizo que a finales de 1973 (octubre-noviembre) se fundase la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia (SETH). Pese a ser uno de los inicialmente reacios, fue elegido como el primer presidente Miquel Rutllant⁹. En la Tabla 3 se detalla la composición de la primera Junta Directiva según consta en el Acta Fundacional firmada ante notario. Se decidió convocar reuniones cuatrimestrales sobre temas monográficos, así como un congreso bianual con la consiguiente publicación de las ponencias, simposios y comunicaciones. Fue un acierto anteponer el término *trombosis* al de *hemostasia*. Ignoro si ello se debió a la mejor conveniencia fonética o porque sus autores vislumbraban que en el futuro tendrían mayor importancia los estudios de la trombofilia que los dirigidos a las diátesis hemorrágicas.

Tabla 3. Primera Junta Directiva de la SETH

Presidente	Miquel Rutllant
Vicepresidente primero	José-Luis Fernández-Chacón
Vicepresidente segundo	José Antonio Iriarte
Vicepresidente tercero	Juan Vera Peris
Secretario	Manuel Sánchez Moya
Tesorero	Joaquín Lasierra
Vocales	Justo Aznar
	Jasone Monasterio
	Juana Vallés
	Antonio Medarde

La sociedad ha celebrado 17 congresos por separado de la AEHH, el último de ellos en La Coruña en 2001. La inteligencia y el sentido común de los dirigentes de ambas sociedades hizo que a partir de 1997 se vengan celebrando conjuntamente la Reunión Anual de la AEHH y el Congreso de SETH, con notable satisfacción de sus protagonistas.

AEHH y SETS

Pese a que la AEHH había nacido, sobre todo, debido al movimiento corporativista de los hemoterapeutas, en un determinado momento éstos sintieron la legítima necesidad de crear su propio foro científico. De este modo, en 1989 nació la SETS⁴, cuya primera Junta Directiva figura en la Tabla 4. La nueva sociedad celebró su primer congreso oficial en Valencia, y después le siguieron los demás con periodicidad anual. En estos momentos, dicha actividad va ya por la XVII edición, y en 2007 tuvo lugar en Madrid el congreso conjunto de la SETS con la *International Society of Blood Transfusion*. Recientemente, su nombre ha cambiado por el de Sociedad Española de Transfusión y Terapia Celular. Como no podía ser de otra manera, a la AEHH y la SETS les siguen uniendo importantes vínculos. Uno es el ya mencionado PABAS, creado por la AEHH en 1972 y cuya responsabilidad científica, económica y técnica comparten ambas sociedades desde 1996 bajo el nuevo nombre de Comité de Acreditación en Transfusión (CAT). Hace dos años, en octubre de 2006, se firmó un acuerdo entre cuatro partes: la Organización Nacional de Trasplantes (ONT), el *Joint Accreditation Committee of ISCT-EBMT* (JACIE), la AEHH y la SETS, para crear un comité de acreditación conjunto ONT-CAT-JACIE, dirigido a los centros donde se obtienen, procesan e implantan las células progenitoras de la hematopoyesis. Mi sugerencia a los responsables de las dos sociedades, la AEHH y la SETS, sería la de considerar, aun manteniendo cada una su personalidad se-

Tabla 4. Primera Junta Directiva de la SETS

Presidente	José A. Montoro Alberola
Vicepresidente	Carmen Martín Vega
Secretario	Antonio Fernández Moya
Tesorero	Juan Grifols Espés
Vocales	Crisógono de la Cámara Mendizábal
	Francisco Carbonell Uberos
	Antonio Gelabert Blanes
	Miguel Ángel Pérez Albéniz
	Antonio Salat Martí

parada, la posibilidad de celebrar alguno de sus congresos conjuntamente, tal como ya lo están haciendo la AEHH y la SETH.

AEHH y EHA

Durante muchos años, sobre todo en sus inicios, la AEHH tenía una notable vocación hispanoamericana. La demostración de ello es el gran número de sociedades hematológicas de Sudamérica y Centroamérica que tenían *Sangre* como su órgano oficial. Personalmente he defendido siempre en nuestra sociedad la idea de que el espejo en el que debíamos mirarnos eran los países más avanzados que el nuestro. Y por ello, sin abandonar las iniciativas que pudieran favorecer el desarrollo de la hematología hispanoamericana, debíamos promover en España una mayor actividad internacional, particularmente en el seno de la pujante EHA, nacida en junio de 1992⁹. Esta nueva sociedad tiene actualmente 2700 miembros de 92 países y está desarrollando un importante papel en los ámbitos de la asistencia, docencia e investigación en hematología. Y si bien es satisfactorio comprobar el creciente protagonismo de algunos grupos y autores españoles en ese contexto, no quiero dejar pasar la ocasión sin señalar la necesidad de progresar aún más en este terreno. Como queda patente en la Tabla 5, entre los miembros activos de la EHA, el número de hematólogos españoles es relativamente bajo, en contraste con países más pequeños. Al igual que en otros ámbitos, España necesita un mayor esfuerzo de internacionalización también en hematología.

Conclusión

A lo largo de este casi medio siglo, la AEHH me ha proporcionado innumerables satisfacciones, no tan sólo en el terreno intelectual, sino también en la órbita afectiva, pues entre sus miembros figuran varios

Tabla 5. Número de miembros de EHA según diversos países

PAÍS	NÚM.
Reino Unido	261
Italia	207
Países Bajos	198
Alemania	179
Francia	158
Estados Unidos	146
Grecia	111
Suiza	99
Bélgica	97
Suecia	74
España	67

de mis mejores amigos. El enorme orgullo que siento al contemplar su historia no me impide, empero, señalar algunos caminos que sería deseable seguir en el futuro.

Bibliografía

1. Raichs A, Rozman C. Veintidós años después. Anotaciones para la historia de la Asociación Española de Hematología y Hemoterapia (AEHH). *Sangre* 1982; 27: 377-85.
2. Rozman C. Breve historia de la Hematología Española. En: Fernández J, Rozman C, Ríos A, Giralt M, Vigil Fuente C (eds.). *Pasado, presente y futuro de la hematología española. Trabajos dedicados a don Celestino Vigil Fuente con motivo de su jubilación*. KRK Ediciones, Oviedo 1998; 81-128.
3. Corbella J, Rozman C. Record i homenatge a Pere Farreras Valentí, metge català (1916-1968). Barcelona: Fundació de l'Escola d'Hematologia "Farreras Valentí"; 2007.
4. Martín-Vega C. 1936-2006: setenta años de Transfusión en España. *SETS – Sociedad Española de Transfusión Sanguínea* 2006; 18: 3-10.
5. PETHEMA. Veinte años de experiencia. Reunión extraordinaria. Málaga, 17 de diciembre de 1993. *Sangre* 1994; 39: 469-93.
6. Bladé J. Comunicación personal.
7. Santiago Marí AJ. PETHEMA: la respuesta eficaz. *Metástasis Óseas* 2006; 5: 18-24.
8. Rutllant M. Comunicación personal.
9. de Vlaming A, EHA Executive Office. Comunicación personal.

XXI LECCIÓN

CONMEMORATIVA

ANTONIO RAICHS

COORDINADORES: E. FELIU. *Barcelona*
E. ROCHA. *Pamplona*

Inmunofenotipaje de hemopatías malignas: de la investigación básica a la práctica asistencial

A. ORFAO¹, L. RAMUDO¹, A. LÓPEZ¹, R. RIVAS¹, M. GONZÁLEZ², J. FLORES¹, J. ALMEIDA¹, E. JENSEN¹, S. BARRENA¹, J. CIUDAD¹, C. TEODOSIO¹, W. NIETO¹, M. PÉREZ-ANDRÉS¹, B. VIDRIALES³, J. PÉREZ³, M.C. LÓPEZ-BERGES³, M. GONZÁLEZ³, M.L. SÁNCHEZ¹, A.I. RASILLO¹, P. BÁRCENA¹, M. JARA-ACEVEDO¹, B. PAIVA¹, M.A. GARCÍA-MARCOS³, J.F. SAN MIGUEL³

¹ Centro de Investigación del Cáncer. Departamento de Medicina y Servicio General de Citometría.

Universidad de Salamanca. ² Servicio de Hematología. Hospital Clínico Universitario de Salamanca.

³ Servicio de Hematología. Hospital Universitario de Salamanca

Introducción

La hematología en general, y de forma específica las hemopatías malignas, constituye una de las áreas de la medicina en las que las aplicaciones de la citometría de flujo han alcanzado mayor desarrollo en las últimas décadas. Esto es debido en gran medida a que las muestras hematológicas contienen células en suspensión (o que pueden colocarse fácilmente en suspensión), adaptándose de forma óptima a los análisis que emplea la citometría de flujo. Además, las células del sistema hematopoyético han constituido la principal fuente de antígenos a la hora de producir anticuerpos monoclonales (AcMo), lo que se ha traducido en la disponibilidad de un número exponencialmente creciente de reactivos dirigidos a la identificación de marcadores presentes en las mismas¹. Estas características únicas de las células y muestras hematológicas, junto a los avances continuos que han tenido lugar en campos tan diversos como la tecnología láser, la óptica, la química de los fluorocromos, la tecnología de microesferas, la electrónica, la informática y la producción de AcMo, han contribuido a modular la forma en que se utiliza la citometría de flujo en hematología, a la vez que han impulsado la expansión de sus aplicaciones. Así, en la actualidad, la citometría de flujo constituye el método de elección para la caracterización inmunofenotípica de las hemopatías malignas al diagnóstico y para la investigación de enfermedad mínima residual (EMR) tras el tratamiento¹. Además, la citometría de flujo constituye una herramienta diagnóstica esencial en otras hemopatías clonales, como la hemoglobinuria paroxística nocturna y las mastocitosis sistémicas, en trombocitopatías congénitas (p. ej.: la enfermedad de Glanzmann y el síndrome de Bernard-Soulier), así como para la detección de anticuerpos antiplaquetarios o el control de calidad tanto de productos de transfusión como de trasplante^{1,2}. El incremento de la aplicación clínica de los estudios inmunofenotípicos por citometría de flujo se debe en gran medida a la relativa sencillez de la técnica, a su elevada sensibilidad y especificidad, y a la posibilidad de proporcionar resultados clínicamente útiles en un corto periodo de tiempo.

A continuación revisaremos, desde una perspectiva histórica, las aplicaciones más recientes de la citometría de flujo en el diagnóstico y la monitorización de hemopatías malignas (Tabla 1), particularmente aquellas que se relacionan con la identificación, recuento y caracterización de células leucémicas/linfomatosas.

Caracterización diagnóstica de hemopatías malignas mediante inmunofenotipo

Inmunofenotipado convencional

Inicialmente –desde finales de los años setenta hasta mediada la década de los noventa–, la utilidad del inmunofenotipado de hemopatías malignas por citometría de flujo se centró en la caracterización de células leucémicas de sangre periférica (SP) y médula ósea (MO) y la clasificación de la enfermedad, una vez establecido ya su diagnóstico³. Para este fin se marcaban células mononucleares de SP y/o MO con combinaciones simples de un número relativamente restringido de AcMo no conjugados directamente con fluorocromos⁴. Un ejemplo ilustrativo que refleja el empleo de este tipo de estrategias lo constituye la clasificación propuesta en 1995 por el grupo EGIL (European Group for the Immunological classification of Leukemias) para el establecimiento del origen linfoide *versus* mieloide de células blásticas de pacientes con leucemias agudas y la subclasificación de las leucemias linfoblásticas agudas (LLA), tanto de precursores T (LLA-pT) como B (LLA-pB), de acuerdo con los patrones de expresión de marcadores asociados a línea y estadio madurativo⁵: pro-T/TI (CD7+ y CyCD3+, en ausencia de otros marcadores T), pre-T/TII (CD7+, CyCD3+, sCD3–, CD1a– y CD2+ y/o CD8+ y/o CD5+), T-común/TIII (CD7+, CyCD3+, CD1a+), T-madura/TIV (CD7+, sCD3+, CD1a–) y pro-B/BI (CD19+, CyCD79a+, Ig–, CD10–), B-común/BII (CD19+, CyCD79a+, CD10+, Ig–), pre-B/BIII (CD19+, CyCD79a+, CyIgu+, sIg–) y B-madura/BIV (CD19+, cCD79a+, sIg+), respectivamente. Progresivamente, algunos marcadores fenotípicos se asociaron con el pronóstico de la enfermedad. Así, a

Tabla 1. Aplicaciones clínicas del inmunofenotipado por citometría de flujo multiparamétrica al estudio de las hemopatías malignas

Tipo de hemopatía	Diagnóstico	Aplicación			Identificación de dianas terapéuticas	EMR
		Clasificación	Estadía	Estratificación pronóstica		
LLA-pB		×	×	×		×
LLA-pT		×	×	×		×
LMA		×				×
SLPC-B	×	×	×	×	×	×
SLPC-T	×	×	×		×	×
GM	×	×				×
SMD	×	×		×		
LMC	×					

EMR: enfermedad mínima residual; GM: gammapatías monoclonales; LLA-pB: leucemia linfoblástica aguda de precursores B; LLA-pT: leucemia linfoblástica aguda de precursores T; LMA: leucemia mieloblástica aguda; LMC: leucemia mieloide crónica; SLPC: síndromes linfoproliferativos crónicos; SMD: síndromes mielodisplásicos.

modo de ejemplo, en la leucemia linfática crónica B (LLC-B) se refirió de forma secuencial el valor pronóstico adverso de marcadores como CD38, CyZAP-70 y, más recientemente, CD49d^{6,7}. Con la demostración de la utilidad clínica de un número creciente de marcadores, los paneles empleados se fueron ampliando progresivamente^{8,9}.

En paralelo, la disponibilidad de un número creciente de AcMo de calidad (conjugados además con un número cada vez mayor de fluorocromos susceptibles de ser evaluados de forma simultánea en citómetros de flujo robustos y cada vez más fáciles de utilizar) proporcionó un impulso definitivo al empleo de paneles en los que los marcajes simples se sustitúan por combinaciones múltiples de AcMo³. Al extenderse el empleo de paneles que incluían combinaciones de 3, 4 o más AcMo, se diseñaron nuevas estrategias para la identificación y caracterización de diferentes subpoblaciones de células normales presentes en diversos tipos de muestras hematológicas. Su implantación ha ido reduciendo progresivamente la necesidad de emplear procedimientos de enriquecimiento de células neoplásicas (p. ej.: separación de células mononucleares en gradiente de densidad) previamente a su estudio inmunofenotípico. Paralelamente, se reconoció la necesidad de incluir, en las distintas combinaciones de AcMo que conforman un panel, marcadores dirigidos a la identificación de las poblaciones celulares de interés¹⁰. Entre otros marcadores, se han considerado especialmente útiles: CD45 en leucemias agudas en general¹⁰, y CD19 y CD7 en LLA-pB y LLA-pT, respectivamente³. A su vez, en las neoplasias linfoides más maduras, se seleccionaron CD19 y/o CD20 en los síndromes linfoproliferativos cróni-

cos B (SLPC-B)¹¹ y CD38, en combinación o no con CD138, en las gammapatías monoclonales (GM)^{12,13} como los marcadores (o combinación de marcadores) más útiles a la hora de identificar las células neoplásicas de estos grupos de enfermedades (Tabla 2). Con esta nueva estrategia, la caracterización inmunofenotípica de hemopatías malignas empleando aproximaciones de citometría de flujo multiparamétrica (CFM) demostró poseer una elevada sensibilidad y especificidad a la hora de identificar células leucémicas/mielomatosas y diferenciarlas de sus correspondientes contrapartidas normales, incluso cuando dichas células neoplásicas están presentes en una muestra en muy baja frecuencia, entre una mayoría de células hematopoyéticas normales¹⁴. Con ello se inició una nueva era en la que se amplió la utilización de la CFM a la detección de enfermedad mínima para el estadía de la enfermedad al diagnóstico o la monitorización de la respuesta al tratamiento –EMR–. Además, la posibilidad de discriminar entre células normales y neoplásicas también está contribuyendo a que la CFM adquiera un papel cada vez más relevante en el rastreo diagnóstico de primera línea de algunas hemopatías malignas¹⁵.

Aplicaciones recientes de los estudios inmunofenotípicos mediante citometría de flujo multiparamétrica al diagnóstico de hemopatías malignas

Desde hace décadas, se tratan de identificar antígenos específicos de células tumorales en diferentes hemopatías. Este esfuerzo se ha visto compensado, al

Tabla 2. Frecuencia de fenotipos aberrantes y marcadores comunes más útiles para la identificación de subpoblaciones de células neoplásicas en distintos subtipos diagnósticos de hemopatías malignas

Tipo de hemopatía	Marcadores útiles para identificación de células neoplásicas	Casos con fenotipo aberrante (%)
LLA-pB	CD19, CD45	> 95%
LLA-pT	CD7, CD45	> 99%
LMA	CD34, CD45	> 80%
SLPC-B	CD19	> 95%
GM	CD38, CD138, CD45	> 90%
SMD	CD34, CD45	> 55%*

GM: gammapatías monoclonales; LLA-pB: leucemia linfoblástica aguda de precursores B; LLA-pT: leucemia linfoblástica aguda de precursores T; LMA: leucemia mieloblástica aguda; SLPC-B: síndromes linfoproliferativos crónicos B; SMD: síndromes mielodisplásicos.

* Porcentaje referido exclusivamente a expresión aberrante de CD56, CD7 y otros marcadores linfoides.

menos en parte, por la identificación de algunos antígenos específicos de células leucémicas/linfomas/mielomatosas. De ellos, merece ser destacada la proteína idiotípica en neoplasias de células B maduras (SLPC-B y GM) y distintas proteínas de fusión que resultan de translocaciones cromosómicas concretas, en leucemias agudas (p. ej.: BCR/ABL, E2A/PBX, TEL/AML1, PML/RAR α , entre otras) y leucemia mieloide crónica (BCR/ABL)¹⁶. Sin embargo, desde el punto de vista práctico, la mayoría de estos antígenos específicos de tumor no han llegado a utilizarse de forma habitual en la rutina diagnóstica, para la identificación de células neoplásicas de pacientes con hemopatías malignas^{1,14}. Entre otros motivos, esto es debido a la escasa calidad de muchos de los reactivos disponibles para su identificación, sus niveles de expresión relativamente bajos y su gran variabilidad, –en el caso de las proteínas idiotípicas– o complejidad –una proteína de fusión suele asociarse con diferentes puntos de corte a nivel genético–. En contraposición, la identificación de alteraciones en los patrones de expresión en células neoplásicas, de una o varias proteínas normales –inmunofenotipos asociados a leucemia/linfoma (LAIP)–, ha demostrado tener una gran aplicabilidad a la hora de discriminar entre células normales y neoplásicas^{1,14}. En este sentido, hoy se conoce que prácticamente todos los pacientes con LLA-pT (> 99%), LLA-pB (> 95%), SLPC-B (> 95%) y GM (> 90%), así como la mayoría de las leucemias mieloblásticas agudas (LMA; > 80%), muestran fenotipos aberrantes que permiten distinguir sus células tumorales de células hematopoyéticas normales (Tabla 2)^{1,14}. Más recientemente, se ha

demostrado también la presencia de alteraciones fenotípicas en diferentes compartimentos de células inmaduras y diferenciadas de pacientes con síndromes mielodisplásicos (SMD), correspondiendo una proporción significativa de estas alteraciones a fenotipos aberrantes¹⁷. Merece destacar que los fenotipos aberrantes presentes en células leucémicas habitualmente varían de forma notable entre diferentes hemopatías; además, los LAIP también difieren entre distintos pacientes, dentro de un mismo subgrupo diagnóstico de hemopatía, y dentro de un paciente, entre diferentes subpoblaciones de células tumorales¹⁸. Asimismo, el grado de heterogeneidad de los LAIP es, en general, más notorio entre las LMA y los SMD que en las neoplasias linfoides^{1,14}. A modo de ejemplo, los pacientes con LLC-B típica muestran de forma sistemática (> 95% de los casos) expresión anormalmente débil de CD22, CD20, sIg y/o CD81 en células B maduras CD23+/CD5+^{11,19}. A su vez, la sobreexpresión de Bcl-2 en células B neoplásicas con fenotipo centrofoliolar (CD10+, CD38+) constituye un marcador característico de linfoma folicular (LF) con t(14;18)¹¹. De acuerdo con estas observaciones, para estos casos pueden diseñarse combinaciones únicas de múltiples AcMo, con el propósito de identificar células neoplásicas de pacientes con estos subtipos concretos de SLPC-B^{1,14}. Por el contrario, en las LMA y, en menor medida, también en las LLA, la mayoría de los fenotipos aberrantes comúnmente detectados hasta la fecha sólo está presente, como máximo, en alrededor de un 30-50% de los pacientes¹⁴.

Aplicación del inmunofenotipado por citometría de flujo multiparamétrica al rastreo diagnóstico de hemopatías malignas

Estudios recientes sugieren que el inmunofenotipado por CFM constituye un método rápido, sensible y específico para el rastreo diagnóstico de la presencia de células linfoides neoplásicas/clonales en SP, MO, y otros tipos de muestras hematológicas o no hematológicas. Así, nuestro grupo ha demostrado recientemente que la utilización de una sola combinación de 7 AcMo (CD8– sIgk/CD56– sIg λ /CD4– CD19/CD3) para el rastreo diagnóstico de linfocitosis absolutas en adultos mayores de 40 años permite la identificación de SLPC-B en estos sujetos con una sensibilidad y especificidad del 100%, superior a la observada cuando empleamos aproximaciones diagnósticas basadas en la utilización secuencial de técnicas morfológicas, inmunofenotípicas y moleculares, según criterios convencionales¹⁵. Esta estrategia, combinada con el empleo de paneles relativamente amplios de AcMo dirigidos frente a diferentes miembros de las familias TCRV β y TCRV γ /V δ , resulta también de uti-

alidad contrastada en el diagnóstico de clonalidad T, particularmente cuando se combina con la identificación de LAIP^{20,21}. De forma similar, el empleo de esta aproximación al estudio de tejido linfóide (p. ej.: ganglio linfático) obtenido mediante punción-aspiración con aguja fina ha demostrado ser de gran utilidad diagnóstica al combinarse con estudios citológicos e histopatológicos convencionales²². Más recientemente se ha demostrado, además, la utilidad diagnóstica de los estudios fenotípicos mediante CFM para la identificación de enfermedad leptomeníngea en pacientes con linfomas B agresivos y otras hemopatías, permitiendo la identificación de pequeñas cantidades de células neoplásicas (< 1 célula en 50 µL) en líquido cefalorraquídeo²³⁻²⁶.

Clasificación de las hemopatías malignas

Una vez demostrada la presencia de células leucémicas/neoplásicas en una muestra, los estudios inmunofenotípicos por CFM permiten un recuento y caracterización precisa de las mismas. Durante años, en la caracterización fenotípica de células leucémicas, se le ha dado especial relevancia a las similitudes existentes entre las células patológicas y su contrapartida normal³. Fundamentándonos en este tipo de información, a lo largo de décadas hemos podido asignar células leucémicas a las líneas mielóide y linfoides T y B, y clasificarlas según su grado de diferenciación en células inmaduras (CD34+ y/o CD45+débil y/o CD117+ y/o tdt+, típicas de las leucemias agudas) y diferenciadas (características de los SLPC y GM con fenotipo CD3+/TCR+ en la membrana celular o Ig+)^{3,5}. Esta información representa uno de los pilares fundamentales en los que durante años se ha sostenido la utilidad clínica del inmunofenotipado, contribuyendo de forma decisiva a la clasificación diagnóstica de las hemopatías malignas. Algunos ejemplos concretos sobre dicha utilidad incluyen: 1) el diagnóstico de la línea de las células blásticas en las leucemias agudas; 2) la identificación de las leucemias agudas bifenotípicas, y 3) la clasificación fenotípica de las LLA⁵, de acuerdo con lo mencionado previamente.

Además, la disponibilidad, en los últimos años, de un conocimiento mucho más detallado acerca de los patrones fenotípicos normales de diferentes líneas hematopoyéticas y sus compartimentos madurativos ha contribuido a la identificación de nuevos subtipos de leucemias agudas no linfoblásticas (LANL). Un claro ejemplo lo constituye un pequeño porcentaje de LANL en las que los blastos muestran características similares a las de los precursores de células dendríticas plasmocitoides normales y que se refleja en fuerte reactividad para HLADR y CD123, jun-

to a positividad para CD4 y CD36, en ausencia de marcadores intracelulares altamente característicos de otras líneas como la línea monocítica o de granulocito neutrófilo (p. ej.: CyMPO-, Cylisozima-); sin embargo, a diferencia de las células dendríticas plasmocitoides normales, los precursores leucémicos muestran coexpresión de CD56 y 7.1, junto a reactividad anormalmente baja para CD45, en ausencia de CD34^{27,28}. De este modo, la inclusión, en los paneles de AcMo, de combinaciones de marcadores que permitan identificar de forma temprana los precursores comprometidos hacia las diferentes líneas hematopoyéticas mayoritarias y minoritarias ha contribuido a una mejor clasificación de las LMA de acuerdo con las líneas celulares involucradas²⁹. Así, el marcaje simultáneo para CD36 y CD64 ha demostrado ser más sensible que el uso aislado de CD14 para la identificación de compromiso madurativo de los blastos leucémicos a línea monocítica^{29,30}. De forma similar, la expresión citoplasmática de triptasa se ha asociado con subtipos de LMA que muestran un grado variable de compromiso madurativo a granulocito basófilo y/o mastocito³¹.

Además de las similitudes observadas entre células hematopoyéticas normales y neoplásicas, como hemos comentado previamente, se ha constatado la presencia de fenotipos aberrantes (LAIP) en la mayoría de las hemopatías malignas. Estos fenotipos aberrantes se considera que podrían reflejar alteraciones citogenéticas subyacentes presentes en la célula neoplásica y/o anomalías en su interacción con el micro-medio ambiente tumoral^{3,11,14,32,33}. Por este motivo, la caracterización detallada de LAIP no sólo permite la discriminación entre células normales y neoplásicas, sino que viene utilizándose cada vez con más frecuencia en la identificación de casos portadores de anomalías genéticas concretas en los que deban realizarse de forma rápida estudios moleculares que confirmen la presencia de dichas alteraciones. En este aspecto, es necesario considerar las asociaciones fenotipo-genotipo que ocurren tanto en las leucemias agudas como en los síndromes linfoproliferativos crónicos B^{3,11,14,32}. Así, entre las LMA, los blastos leucémicos de los pacientes con leucemia promielocítica aguda (LPA) portadores de t(15;17) muestran compromiso madurativo a granulocito neutrófilo (CyMPO+, CD33+, CD13+), con bloqueo en el estadio de promielocito (HLADR-/débil, CD13+heterogéneo, CD33++, CD117-/+, CD11b-). No obstante, a diferencia del promielocito normal/reactivo, carecen de expresión fuerte para CD15²⁹. A su vez, en la LLA-pB BCR/ABL+ del adulto, las células blásticas muestran un fenotipo correspondiente a un precursor B inmaduro (CD34++, CD19+débil, CD13-/débil), asociado a expresión anormalmente débil y heterogénea de CD38³⁴. En contraposición, los niños con LLA-pB

y reordenamientos de los genes TEL/AML1 y MLL, de forma característica presentan un fenotipo BII/común asociado a una expresión heterogénea de CD34 en ausencia de reactividad para CD20³⁵, o un fenotipo pro-B/BI asociado a expresión de 7.1, CD15 y/o CD65³⁶, respectivamente.

Caracterización inmunofenotípica de los síndromes mielodisplásicos

Durante años, la utilización de los estudios inmunofenotípicos para la caracterización de pacientes con SMD se ha visto limitada por el uso de marcajes simultáneos de dos o tres marcadores. Aun así, estudios iniciales en los que se han empleado este tipo de aproximaciones metodológicas ya demostraron la existencia de alteraciones fenotípicas en estos pacientes²⁹. Entre estas anomalías, se incluía: expresión disminuida de los antígenos CD35, CD11b, CD15, CD16, CD11a, CD54 y CD116, junto con porcentajes significativamente más elevados de células de línea de granulocito neutrófilo CD33+, CD87+, CD14+, CD44+ y CD64+ en la SP de una proporción variable de casos (entre el 18% y el 80% de los casos)²⁹. De forma similar, se observaba un incremento de la expresión de marcadores de inmadurez como CD117, HLADR, CD34, CD33 y CD13, además de una menor reactividad para antígenos asociados a diferenciación terminal de células mieloides (p. ej.: CD11b, CD11c, CD16 y NAT-9) en la MO de pacientes con SMD²⁹. Con la introducción de la CFM fundamentada en el uso de marcajes múltiples con > 3 fluorocromos, enfocada a la identificación y caracterización fenotípica de compartimentos bien definidos de células hematopoyéticas de MO identificadas de acuerdo con su linaje y estadio madurativo, se ha reavivado en la última década el interés por los estudios inmunofenotípicos en este grupo de pacientes, particularmente en casos con citopenias idiopáticas de significado incierto (ICUS), en los que los estudios morfológicos y genéticos no son concluyentes²⁹. No obstante, merece destacar que en la mayoría de estos trabajos las alteraciones detectadas afectan principalmente a los precursores de los leucocitos y, en menor medida, también a los precursores eritroides, mientras que la información disponible acerca de las anomalías fenotípicas presentes en la línea megacariocítica sigue siendo muy limitada^{17,37-39}. En términos globales, los patrones fenotípicos más frecuentemente alterados incluyen: 1) un incremento en el número de mieloblastos, asociado a un descenso de los precursores CD34+ de línea B y de células dendríticas plasmocitoides; 2) alteraciones en la granularidad (SSC, del inglés *sideward light scatter*) de las células que maduran a línea granulo-

monocítica, que suelen mostrar además; 3) patrones alterados de expresión de CD13/CD16/CD11b y positividad para CD56 y marcadores asociados a línea linfóide en una proporción variable de casos, y 4) asincronismos madurativos en la expresión de CD36, CD71, glicoforina A, CD45 y CD105, en precursores eritroides²⁹.

Relación de enfermedad mínima y monitorización del tratamiento de hemopatías malignas mediante citometría de flujo multiparamétrica

Aparte de la aplicación de los estudios inmunofenotípicos por CFM al diagnóstico y clasificación de las leucemias agudas, SLPC-B y SMD, la identificación de células fenotípicamente aberrantes ha demostrado ser de gran utilidad en la detección de enfermedad mínima, tanto para el estadiaje de la enfermedad como para la monitorización de los efectos del tratamiento en pacientes con LMA, LLA, LLC y mieloma múltiple (MM). Así, la evaluación de la presencia de pequeñas cantidades de células neoplásicas en SP, MO o líquido cefalorraquídeo representa una de las aplicaciones más extendidas de la CFM para evaluar el grado de extensión de la enfermedad en SLPC-B y T y en pacientes con LLA, respectivamente^{11,23-26}. A su vez, la monitorización de los niveles de EMR después de instaurado el tratamiento ha demostrado ser uno de los factores pronósticos más relevantes a la hora de predecir la posible ocurrencia de una recaída, tanto en la LMA y LLA¹⁴ como en la LLC-B y el MM^{1,40}. Finalmente, los estudios inmunofenotípicos por CFM pueden emplearse también para predecir la respuesta a tratamientos dirigidos frente a antígenos celulares concretos, identificar nuevas posibles dianas terapéuticas o evaluar el efecto *in vitro* de múltiples fármacos sobre células tumorales vs. células normales^{2,41,42}.

Avances recientes en la caracterización fenotípica de hemopatías malignas por citometría de flujo

En los últimos 5 años hemos asistido a un incremento en las herramientas disponibles para el análisis inmunofenotípico de hemopatías malignas por CFM. Entre otros avances merece destacar los producidos a nivel de instrumentación y la química de fluorocromos, la tecnología de microesferas y el análisis de datos. Así, en un número creciente de laboratorios de hematología, hoy disponemos de citómetros de flujo de 8 o más colores, junto a paneles amplios de AcMo conjugados con un número creciente de fluorocromos que, asociados a los avances informáticos, per-

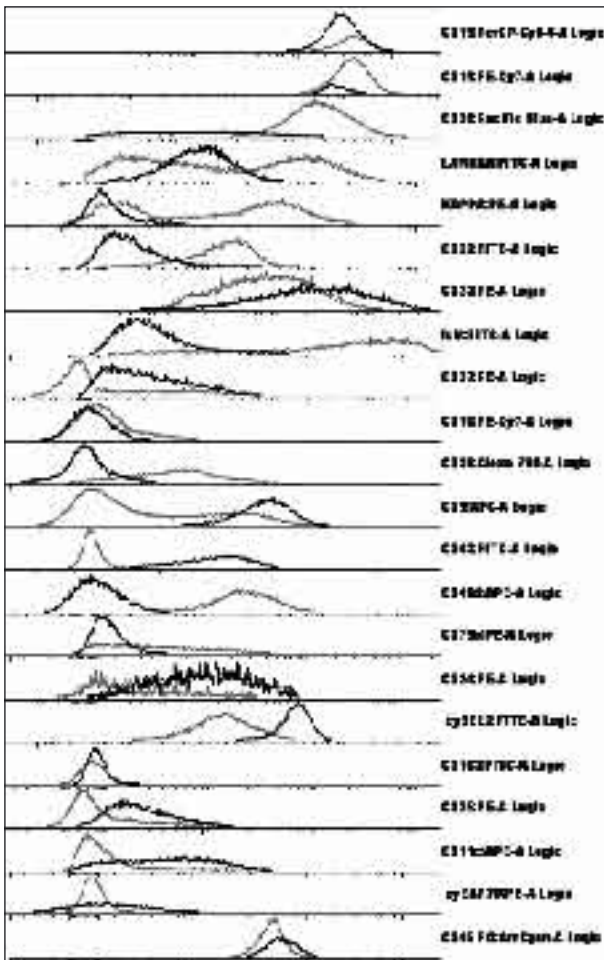


Figura 1. Ejemplo representativo del fenotipo de las células B de SP de un paciente con LLC-B (líneas negras) respecto a linfocitos B normales (líneas grises) de SP donde se ilustran las diferencias observadas para un grupo de 21 marcadores.

miten el análisis simultáneo de un número infinito de marcadores en células individuales de una o más poblaciones celulares⁴³ (Figura 1). Estos avances, junto a la disponibilidad de citómetros separadores de cuatro vías, más rápidos y eficaces, han facilitado también la posibilidad de purificar distintas poblaciones celulares de interés, presentes en una muestra; ello permite la posterior realización de estudios genéticos y moleculares sobre poblaciones puras de células neoplásicas. Esta posibilidad abre todo un campo de nuevas aplicaciones de la CMF en áreas tan diferentes como la caracterización de las alteraciones genéticas de células tumorales presentes en baja frecuencia en la muestra (p. ej.: en el caso de las GM)⁴⁴, la evaluación del grado de extensión de la enfermedad en mastocitosis sistémicas agresivas⁴⁵, el diagnóstico de clonalidad en pacientes con sospecha de SMD (p. ej.: ICUS vs. SMD)⁴⁶ o la distinción entre LMA *de novo* y LMA secundaria o LMA asociada a displasia multilineal, entre otras aplicaciones.

Particularmente atractivas son las innovaciones tecnológicas que el grupo europeo EuroFlowTM ha introducido recientemente en el diagnóstico de las hemopatías. Merece destacar de forma especial el desarrollo y la disponibilidad de sistemas de microesferas que permiten la identificación simultánea de dos o más proteínas de fusión resultantes de translocaciones cromosómicas concretas como la proteína de fusión *bcr/abl*⁴⁷. Con ello se amplía, además, la aplicación de la CFM al diagnóstico de la leucemia mieloide crónica. Aunque, por el momento, la determinación de proteínas de fusión como *bcr/abl* ha de hacerse sobre lisados celulares, es posible que en un futuro pueda llevarse a cabo también a nivel intracelular, sobre células individuales⁴⁸.

BIBLIOGRAFÍA

1. Stewart C, Nicholson JKA (eds). Immunophenotyping. Wiley-Liss Inc, New York 2000; 239-59.
2. Orfao A, Ruiz-Arguelles A, Lacombe F, Ault K, Basso G, Danova M. Flow cytometry: its applications to Haematology. *Haematologica* 1995; 80: 69-81.
3. Orfao A, Schmitz G, Brando B, Ruiz-Argüelles A, Basso G, Braylan R, et al. Clinically useful information provided by the flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies: current status and future directions. *Clin Chem* 1999; 45: 1708-17.
4. Rowan RM, Bain BJ, England M, Matutes E, Stephens AD, Lewis SM, et al. Immunophenotyping in the diagnosis of chronic lymphoproliferative disorders. General Haematology Task Force of BCSH. *J Clin Pathol* 1994; 47: 871-5.
5. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995; 9: 1783-6.
6. Bosch F, Montserrat E. Prognostic Indicators of Chronic Lymphocytic Leukemia. En: Faguet GB (ed.). *Chronic Lymphocytic Leukemia. Molecular Genetics, Biology, Diagnosis, and Management*. Totowa, New Jersey: Human Press; 2004: 193-200.
7. Gattei V, Bulian P, Del Principe MI, Zucchetto A, Maurillo L, Buccisano F, et al. Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008; 111: 865-73.
8. Braylan RC, Orfao A, Borowitz MJ, Davis BH. Optimal number of reagents required to evaluate hematolymphoid neoplasias: results of an international consensus meeting. *Cytometry* 2001; 46: 23-7.
9. Wood BL, Arroz M, Barnett D, DiGiuseppe J, Greig B, Kussick SJ, et al. 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. *Cytometry B* 2007; 72 (Suppl 1): S14-22.
10. Borowitz MJ, Guenther KL, Shults KE, Stelzer GT. Immunophenotyping of acute leukemia by flow cytometric analysis. Use of CD45 and right-angle light scatter to gate on leukemic blasts in three-color analysis. *Am J Clin Pathol* 1993; 100: 534-40.
11. Orfao A, Almeida J, Sánchez ML, San Miguel JF. Immunophenotypic diagnosis of leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders other than chronic lymphocytic leuke-

- mia. En: Faguet GB (ed.). *Chronic Lymphocytic Leukemia. Molecular Genetics, Biology, Diagnosis, and Management*. Totowa, New Jersey: Human Press; 2004: 173-190.
12. Pérez-Andrés M, Santiago M, Almeida J, Mateo G, Porwit-MacDonald A, Björklund E, et al.; European Working Group on Clinical Cell Analysis; Spanish Network on Multiple Myeloma. Immunophenotypic approach to the identification and characterization of clonal plasma cells from patients with monoclonal gammopathies. *J Biol Regul Homeost Agents* 2004; 18: 392-8.
 13. Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, Bezdicikova L, Brooimans RA, Bumba H, et al.; European Myeloma Network. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica* 2008; 93: 431-8.
 14. Szczepanski T, Orfao A, van der Velden VH, San Miguel JF, van Dongen JJ. Minimal residual disease in leukaemia patients. *Lancet Oncol* 2001; 2: 409-17.
 15. Costa ES, Arroyo ME, Pedreira CE, García-Marcos MA, Taberero MD, Almeida J, et al. A new automated flow cytometry data analysis approach for the diagnostic screening of neoplastic B-cell disorders in peripheral blood smears with absolute lymphocytosis. *Leukemia* 2006; 20: 1221-30.
 16. Bench AJ, Erber WN, Follows GA, Scott MA. Molecular genetic analysis of haematological malignancies II: mature lymphoid neoplasms. *Int J Lab Hematol* 2007; 29: 229-60.
 17. Loken MR, van de Loosdrecht A, Ogata K, Orfao A, Wells DA. Flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from a working conference. *Leuk Res* 2008; 32: 5-17.
 18. Sánchez ML, Almeida J, González D, González M, García-Marcos MA, Balanzategui A, et al. Incidence and clinicobiologic characteristics of leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders with more than one B-cell clone. *Blood* 2003; 102: 2994-3002.
 19. Barrena S, Almeida J, Yunta M, López A, Fernández-Mosteirin N, Giralt M, et al. Aberrant expression of tetraspanin molecules in B-cell chronic lymphoproliferative disorders and its correlation with normal B-cell maturation. *Leukemia* 2005; 19: 1376-83.
 20. Langerak AW, van Den Beemd R, Wolvers-Tettero IL, Boor PP, van Lochem EG, Hooijkaas H, et al. Molecular and flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire for clonality assessment in mature TCRalpha T-cell proliferations. *Blood* 2001; 98: 165-73.
 21. Sandberg Y, Almeida J, González M, Lima M, Bárcena P, Szczepanski T, et al. TCRgamma delta(+) large granular lymphocyte leukemias reflect the spectrum of normal antigen-selected TCRgamma delta(+) T-cells. *Leukemia* 2006; 20: 505-13.
 22. Barrena S, López A, García MC, Rivas R, Almeida J, Orfao A. Utility of flow cytometry for the screening of chronic lymphoproliferative disorders from lymphoid tissue samples obtained by fine-needle aspiration. XXII International congress of the international society for analytical cytology (ISAC). *Cytometry A* 2004; 59: 38.
 23. Hegde U, Filie A, Little RE, Janik JE, Grant N, Steinberg SM, et al. High incidence of occult leptomeningeal disease detected by flow cytometry in newly diagnosed aggressive B-cell lymphomas at risk for central nervous system involvement: the role of flow cytometry versus cytology. *Blood* 2005; 105: 496-502.
 24. Subira D, Castanon S, Aceituno E, Hernández J, Jiménez-Garofano C, Jiménez A, et al. Flow cytometric analysis of cerebrospinal fluid samples and its usefulness in routine clinical practice. *Am J Clin Pathol* 2002; 117: 952-8.
 25. Shams'ili S, de Beukelaar J, Gratama JW, Hooijkaas H, van den Bent M, van 't Veer M, Sillevs Smitt P. An uncontrolled trial of rituximab for antibody associated paraneoplastic neurological syndromes. *J Neurol* 2006; 253: 16-20.
 26. Kraan J, Gratama JW, Haioun C, Orfao A, Plonquet A, Porwit A, et al. Flow cytometric immunophenotyping of cerebrospinal fluid. En: Robinson JP, Darzynkiewicz Z, Dean PD, Orfao A, Rabinovitch PS, Stewart CC, et al. (eds.). *Current Protocols in Cytometry*. Nueva York: John Wiley & Sons; 2008: 6.25.1-6.25.16.
 27. Bueno C, Almeida J, Lucio P, Marco J, García R, de Pablos JM, et al. Incidence and characteristics of CD4(+)/HLA DRhi dendritic cell malignancies. *Haematologica* 2004; 89: 58-69.
 28. Garnache-Ottou F, Feuillard J, Saas P. Plasmacytoid dendritic cell leukaemia/lymphoma: towards a well defined entity? *Br J Haematol* 2007; 136: 539-48.
 29. Orfao A, Ortuno F, de Santiago M, López A, San Miguel J. Immunophenotyping of acute leukemias and myelodysplastic syndromes. *Cytometry* 2004; 58: 62-71.
 30. Villeneuve P, Kim DT, Xu W, Brandwein J, Chang H. The morphological subcategories of acute monocytic leukemia (M5a and M5b) share similar immunophenotypic and cytogenetic features and clinical outcomes. *Leuk Res* 2008; 32: 269-73.
 31. Samorapoompichit P, Kiener HP, Scherthaner GH, Jordan JH, Agis H, Wimazal F, et al. Detection of tryptase in cytoplasmic granules of basophils in patients with chronic myeloid leukemia and other myeloid neoplasms. *Blood* 2001; 98: 2580-3.
 32. Mateo G, Castellanos M, Rasillo A, Gutiérrez NC, Montalbán MA, Martín ML, et al. Genetic abnormalities and patterns of antigenic expression in multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 3661-7.
 33. Pérez-Andrés M, Almeida J, Martín-Ayuso M, Moro MJ, Martín-Núñez G, Galende J, et al.; Spanish Network on multiple myeloma (G03/136); the Spanish Network of Cancer Research Centers (C03/10). Clonal plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma and plasma cell leukemia show different expression profiles of molecules involved in the interaction with the immunological bone marrow microenvironment. *Leukemia* 2005; 19: 449-55.
 34. Taberero MD, Bortoluci AM, Alaejos I, López-Berges MC, Rasillo A, García-Sanz R, et al. Adult precursor B-ALL with BCR/ABL gene rearrangements displays a unique immunophenotype based on the pattern of CD10, CD34, CD13 and CD38 expression. *Leukemia* 2001; 15: 406-14.
 35. De Zen L, Orfao A, Cazzaniga G, Masiero L, Cocito MG, Spinelli M, et al. Quantitative multiparametric immunophenotyping in acute lymphoblastic leukemia: correlation with specific genotype. I. ETV6/AML1 ALLs identification. *Leukemia* 2000; 14: 1225-31.
 36. De Zen L, Bicciato S, te Kronnie G, Basso G. Computational analysis of flow-cytometry antigen expression profiles in childhood acute lymphoblastic leukemia: an MLL/AF4 identification. *Leukemia* 2003; 17: 1557-65.
 37. van de Loosdrecht AA, Westers TM, Westra AH, Dräger AM, van der Velden VH, Ossenkoppele GJ. Identification of distinct prognostic subgroups in low- and intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes by flow cytometry. *Blood* 2008; 111: 1067-77.
 38. Matarraz S, López A, Barrena S, Fernández C, Jensen E, Flores J, et al. The immunophenotype of different immature, myeloid and B-cell lineage-committed CD34+ hematopoietic cells allows discrimination between normal/reactive and myelodysplastic syndrome precursors. *Leukemia* 2008; 22: 1175-83.
 39. Ogata K, Kishikawa Y, Satoh C, Tamura H, Dan K, Hayashi A. Diagnostic application of flow cytometric characteristics of CD34+ cells in low-grade myelodysplastic syndromes. *Blood* 2006; 108: 1037-44.
 40. San Miguel JF, Almeida J, Mateo G, Bladé J, López-Berges C, Caballero D, et al. Immunophenotypic evaluation of

- the plasma cell compartment in multiple myeloma: a tool for comparing the efficacy of different treatment strategies and predicting outcome. *Blood* 2002; 99: 1853-6.
41. Harris M. Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer. *Lancet Oncol* 2004; 5: 292-302.
 42. Staib P, Staltmeier E, Neurohr K, Cornely O, Reiser M, Schinköthe T. Prediction of individual response to chemotherapy in patients with acute myeloid leukaemia using the chemosensitivity index Ci. *Br J Haematol* 2005; 128: 783-91.
 43. Perfetto SP, Chattopadhyay PK, Roederer M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 648-55.
 44. Gutiérrez NC, Ocio EM, de Las Rivas J, Maiso P, Delgado M, Ferriñán E, et al. Gene expression profiling of B lymphocytes and plasma cells from Waldenström's macroglobulinemia: comparison with expression patterns of the same cell counterparts from chronic lymphocytic leukemia, multiple myeloma and normal individuals. *Leukemia* 2007; 21: 541-9.
 45. García-Montero AC, Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sánchez ML, Núñez R, Prados A, et al. KIT mutation in mast cells and other bone marrow hematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood* 2006; 108: 2366-72.
 46. Valent P, Horny HP, Bennett JM, Fonatsch C, Germing U, Greenberg P, et al. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leuk Res* 2007; 31: 727-36.
 47. Weerkamp F, Hobert W, Nordberg M, Liu Y, Staal F, Lam K, Van Dongen J. Assessment of BCR-ABL1 fusion protein in sample using a novel cytometric bead array immunobead system. *Inter J Lab Hematol* 2008; 30: 127-8.
 48. Van Dongen JJM. Method and probes for the detection of a fusion protein (Application of FRET technology for fusion proteins). International Patent: PCT/NL 2003/000776; European Patent: appl. no. 02079666.0 .

VII LECCIÓN

CONMEMORATIVA

RICARDO CASTILLO

COORDINADORES: P. MARCO. *Alicante*
J. CORRAL. *Murcia*

Fisiopatología del sistema hemostático en la mujer

A. ESTELLÉS¹, J. GILABERT-ESTELLÉS², E. ZORIO³, L.A. RAMÓN¹, R. COSÍN¹, F. ESPAÑA¹

¹ Centro de Investigación. ² Servicio de Ginecología. ³Servicio de Cardiología.

Hospital Universitario La Fe. Valencia.

Introducción

A lo largo de la vida de la mujer existen diversas situaciones, tales la anticoncepción hormonal, la terapia hormonal sustitutiva, la gestación y el puerperio, en las que se puede manifestar un estado de hipercoagulabilidad y, por tanto, una mayor tendencia a fenómenos trombóticos. Es más, ciertas complicaciones obstétricas como los abortos de repetición, el feto muerto intraútero, el desprendimiento prematuro de placenta normalmente inserta (DPPNI) y la preeclampsia grave también podrían considerarse manifestaciones de trombofilia. Por otra parte, con las técnicas de reproducción asistida y, en particular con la fertilización *in vitro*, se han descrito cuadros trombóticos, fundamentalmente ligados al desarrollo del síndrome de hiperestimulación ovárica. Por tanto, es importante conocer las modificaciones del sistema hemostático en estas situaciones para poder explicar este aumento de los eventos trombóticos.

La primera referencia de los efectos trombóticos de las hormonas sexuales data de 1961¹, cuando se publicó el caso de una paciente con endometriosis que desarrolló un tromboembolismo pulmonar después de un tratamiento con estrógenos. Desde entonces hasta la actualidad se ha constatado que las hormonas sexuales, tanto endógenas como exógenas, pueden incrementar el riesgo trombótico.

Pero el sistema hemostático, en general, y el sistema fibrinolítico, en particular, no sólo tienen importancia por su relación con los cuadros trombohemorrágicos, sino también por su intervención en otros procesos como la angiogénesis, la invasión tumoral y la reproducción. Estos procesos pueden ser claves en patologías tan prevalentes en la mujer como el cáncer de mama y la endometriosis.

Fisiopatología del sistema hemostático durante la gestación y el puerperio

Cambios hemostáticos durante la gestación normal

Durante la gestación normal se producen modificaciones del sistema hemostático que tienen como finalidad fundamental garantizar una correcta hemostasia durante el parto y el alumbramiento²⁻⁵ (Tabla 1). Dichas modificaciones afectan simultáneamente a

la coagulación, dando lugar a una hipercoagulabilidad, y al sistema fibrinolítico, produciendo una disminución de la actividad fibrinolítica. Por todo ello, se produce un estado protrombótico⁶ que tiene como consecuencia un incremento del riesgo de tromboembolismo venoso en la mujer gestante^{7,8}.

En relación con la coagulación, durante la gestación normal se manifiestan incrementos de factores procoagulantes como factor Von Willebrand (FvW), factores VII, VIII, IX, X y fibrinógeno³⁻⁵. Estas modificaciones protrombóticas no se ven compensadas por los inhibidores de la coagulación, pues tanto la antitrombina (AT) como la proteína C (PC) no sufren variaciones significativas a lo largo de la gestación normal⁽²⁻⁶⁾. Además, los niveles de la proteína S (PS) disminuyen de forma progresiva durante la gestación, reducción que puede mantenerse los primeros días del puerperio^{2,7,9}. A todo ello se añade la existencia de una resistencia adquirida a la PC activada (APC) a lo largo de la gestación^{2,10}. Otros parámetros que indican una activación de la coagulación, como son los fragmentos 1+2 de la protrombina (F 1+2), los dímeros D, el fibrinopéptido A (FPA) y complejos trombina:AT (T:AT) y APC: α_2 antitripsina, se encuentran elevados en la gestación^{5,9,10,11}.

En la mujer gestante se manifiesta un estado de hipofunción fibrinolítica debido, fundamentalmente, a un aumento de los inhibidores fibrinolíticos¹²⁻¹⁶. Los inhibidores de los activadores del plasminógeno de tipo 1 y tipo 2 (PAI-1 y PAI-2) se incrementan a medida que progresa la gestación normal, siendo el aumento del PAI-2 muy superior al del PAI-1. Aunque

Tabla 1. Modificaciones del sistema hemostático durante la gestación normal en comparación con la mujer no gestante

Parámetros	Cambio
Factores VII, VIII, IX y X	↑
Fibrinógeno y factor Von Willebrand	↑
Proteína S	↓
Antitrombina (AT) y Proteína C	=
Resistencia a la Proteína C activada	↑
Fragmento 1+2 de la protrombina, dímeros D, fibrinopéptido A y complejo trombina: AT	↑
Actividad fibrinolítica	↓
Inhibidores fibrinolíticos (PAI-1 y PAI-2)	↑

Tabla 2. Prevalencia de los defectos trombofílicos y riesgo de enfermedad tromboembólica venosa (ETE) y gestación

Tipo de trombofilia	Prevalencia en población general (%)	Prevalencia en pacientes con ETEV (%)	ETE (RR)	ETE durante gestación (RR)
Sin defecto			1*	6-10
Deficiencia AT (tipo I)	0,01-0,02%	0,5-1%	20-50	400
Deficiencia PC	0,1-0,5%	3%	7-15	22,5
Deficiencia PS	?	2-3%	6-10	12
Factor V Leiden	3-7%	8-20%	5-8	11,2
Protrombina_{G20210A}	2-5%	6-9%	2-4	7,5
Sd. antifosfolipídico	1-2%	5-15%	9	

* Referencia.

después del parto se observa una drástica disminución de estos PAI, los niveles de PAI-2 todavía se mantienen aumentados en el puerperio inmediato¹²⁻¹⁶.

En resumen, durante la gestación normal se desarrollan diversas modificaciones en el sistema hemostático, que producen hipercoagulabilidad e hipofibrinólisis, modificaciones fisiológicas encaminadas a conseguir una correcta hemostasia durante el parto. Sin embargo, en diversas complicaciones obstétricas se puede producir un aumento muy marcado de esa hipercoagulabilidad e inducir un cuadro de coagulación intravascular diseminada (CID) que, paradójicamente, se asocia con sangrados masivos por las mucosas, secundarios al consumo de factores de la coagulación. Por otra parte, el embarazo aumenta el riesgo de tromboembolismo venoso, fundamentalmente en aquellas mujeres con trombofilia congénita o adquirida.

Trombofilia y gestación

Se denomina **trombofilia** a una tendencia a la trombosis, especialmente venosa, que presenta o puede presentar un sujeto aparentemente sano. Las anomalías de la hemostasia, que se asocian con trombofilia clínica, incluyen tanto defectos hereditarios (mutaciones en los genes que codifican anticoagulantes naturales, entre los que se encuentran la AT, la PC y la PS, o factores de la coagulación, como el factor V y la protrombina), como defectos adquiridos del tipo del síndrome antifosfolipídico. Estas anomalías en la hemostasia aumentan el riesgo de las mujeres gestantes para el desarrollo de eventos tromboembólicos asociados con el embarazo-puerperio y también de otras complicaciones, como la preeclampsia, la pérdida fetal y el retardo de crecimiento intrauterino (RCIU)^{5,17,18}.

Enfermedad tromboembólica venosa y gestación

La enfermedad tromboembólica venosa (ETE) continúa siendo la mayor causa de morbimortalidad materna en los países desarrollados. La incidencia de la ETE asociada con la gestación oscila entre 1 y 2 por cada 1000 embarazos^{18,19}. Al compararla con la de la población control de similar edad, el riesgo de ETE asociada al embarazo es aproximadamente unas 10 veces superior (Tabla 2)^{7,18}. Los factores clásicos implicados en la fisiopatología de la trombosis venosa, la llamada **triada de Virchow** (hipercoagulabilidad, estasis venosa y daño vascular), se manifiestan durante la gestación, lo cual influye en el aumento de riesgo ETE durante la misma. Existen algunas peculiaridades en relación con la localización de la trombosis venosa asociada a la gestación, ya que afecta mayoritariamente (90%) al miembro inferior izquierdo, frente al 55% en la mujer no gestante. Además, durante la gestación, la mayoría de las trombosis son ileofemorales, las cuales se asocian con una mayor frecuencia a tromboembolismo pulmonar¹⁸. Los factores que aumentan la incidencia de ETE durante la gestación son la edad superior a 35 años, el sobrepeso superior a 80 kg, la multiparidad (por encima de 4 embarazos), las infecciones, las enfermedades graves y, evidentemente, la historia familiar o personal de trombosis y trombofilia (congénita o adquirida)¹⁸.

Hoy día se sabe que la trombofilia puede ser poligénica y multifactorial, debido a la presencia de diversos defectos genéticos que a su vez son modulados por una serie de influencias ambientales, como la dieta, el estilo de vida, etc²⁰.

Se han comprobado claramente, a partir de estudios de familias con trombofilia congénita, los efectos sinérgicos entre deficiencias de PS, AT, PC, la presencia de factor V Leiden (FVL) o de protrombina

G20210A, y las situaciones de embarazo y puerperio, sugiriendo que una gran parte de la trombosis relacionada con el embarazo ocurre asociada a trombofilia congénita^{20,21}.

Síndrome antifosfolípido y gestación

El síndrome antifosfolípido (SAF) es la causa más común de trombofilia adquirida y biológicamente se caracteriza por la presencia de anticuerpos antifosfolípido (AAF) (anticoagulante lúpico y anticuerpos anticardiolipina). Estos anticuerpos pueden estar presentes en algunas enfermedades como el lupus eritematoso sistémico, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Behçet y en asociación con algunas infecciones y el consumo de ciertos fármacos, aunque en ocasiones no existe causa aparente. La persistencia de AAF se asocia con aumento de riesgo de trombosis arterial y venosa y también con aumento del riesgo de pérdida fetal^{22,23}.

Existe una serie de complicaciones de la gestación que se asocian con alteraciones de la vascularización placentaria²⁴. Dentro de estas complicaciones nos encontramos con la preeclampsia, el DPPNI, el RCIU, el aborto de repetición y el feto muerto intraútero. Alrededor de un 1-2% de las mujeres en edad reproductiva pueden presentar pérdidas fetales que pueden deberse a alteraciones de la vascularización placentaria, pero también estar asociadas a problemas cromosómicos fetales, anomalías del útero, trastornos endocrinos y enfermedades autoinmunes.

El descubrimiento de una asociación entre pérdida fetal recurrente y anticuerpos específicos, especialmente anticoagulante lúpico y anticuerpos anticardiolipina, aumentó el interés de una posible etiología adquirida autoinmune. El SAF se ha indicado como una de las causas más importantes de trombofilia adquirida. La prevalencia de AAF en mujeres con historia de pérdida fetal recurrente es de alrededor de un 15%^{22,23}. El mecanismo de la pérdida fetal en este síndrome incluye trombosis de los vasos placentarios que da lugar a una disminución de la perfusión e isquemia placentaria. Además del riesgo de ETEV y pérdida fetal existe una asociación entre SAF y otras complicaciones como preeclampsia grave y RCIU. El mecanismo por el cual este síndrome contribuye a la trombosis no está bien establecido, pero se ha sugerido que los AAF pueden interferir con varias proteínas o complejos que contienen fosfolípidos, relacionados con la coagulación, como la β_2 -glicoproteína I, la PC, la fosfolipasa A2, la protrombina, la trombomodulina y la anexina V²². Otras evidencias indican que estos anticuerpos pueden unirse a las células endoteliales o interactuar con las plaquetas, ya que ambas células son ricas en fosfolípidos. Finalmente, la pre-

sencia de anticuerpos contra el receptor endotelial de la PC (anti-EPCR) en pacientes con SAF podría justificar, al menos parcialmente, el riesgo trombótico y parece constituir un factor de riesgo de muerte fetal²⁵.

Trombofilia congénita y complicaciones de la gestación

Se ha sugerido que la trombofilia congénita se asocia con complicaciones vasculares del embarazo. Sin embargo, no existe unanimidad en los resultados y recientemente se ha indicado que la prevalencia de los defectos trombofílicos y las complicaciones en la gestación se ven influenciados por otros factores como la etnia, la gravedad de la complicación, etc.^{26,27}. Por otra parte, se está dando importancia al aumento en la expresión del factor tisular local (placentario o decidual) en complicaciones obstétricas como la preeclampsia^{28,29}.

En relación con la trombofilia y las pérdidas fetales, Pretson *et al.*³⁰ investigaron un grupo de mujeres con trombofilia familiar y observaron que existía un aumento de riesgo de pérdidas fetales en mujeres con deficiencia de AT y defectos combinados. También en las mujeres con FVL o mutación de la protrombina G20210A se ha indicado la existencia de una prevalencia alta de pérdida fetal, especialmente del segundo trimestre de gestación, aunque otros autores no encuentran una asociación significativa entre estos defectos trombofílicos y abortos de repetición³¹⁻³³. Algunos trabajos encuentran asociación entre FVL y preeclampsia u otras complicaciones vasculares placentarias, como DPPNI o RCIU²⁴.

Fertilización 'in vitro' y trombosis

Aunque se ha sugerido que la trombofilia tiene un papel en el fallo implantatorio en mujeres sometidas a métodos de fertilización in vitro (FIV)³⁴, otros autores no encuentran dicha asociación³⁵.

El proceso de FIV implica el uso de hormonas exógenas para estimular los ovarios y mejorar la implantación. Una de las complicaciones mayores de este procedimiento es el desarrollo del síndrome de hiperestimulación ovárica, que puede asociarse con fenómenos trombóticos tanto arteriales como venosos^{36,37}. Las trombosis venosas pueden presentarse con una localización inusual, por ejemplo en las extremidades superiores. Con estos procedimientos se produce una activación del sistema de coagulación, pero se desconoce si las modificaciones sobre la coagulación son suficientes para producir la trombosis o precisan estar asociadas a una trombofilia congénita.

CID de causa obstétrica

Existen diversas situaciones en la práctica obstétrica asociadas a un mayor riesgo de desarrollar una CID o coagulopatía de consumo⁵. La CID se define como un desorden trombohemorrágico sistémico asociado a situaciones clínicas bien definidas con datos biológicos de activación de la coagulación, activación fibrinolítica, consumo de inhibidores, y evidencia de daño o fallo multisistémico.

Una gran variedad de mecanismos fisiopatológicos intervienen en la instauración de una CID en el contexto de diversas complicaciones obstétricas, tales como retención de feto muerto intraútero, DPPNI, embolismo de líquido amniótico, etc. Se aceptan una serie de mecanismos comunes e iniciales en el proceso de una CID, que pueden darse conjuntamente:

1) El paso de sustancias procoagulantes al torrente circulatorio, con liberación masiva de factor tisular³⁸. Éste sería el caso del embolismo de líquido amniótico y del DPPNI, de la mola hidatídica y de la retención de feto muerto intraútero³⁹.

2) El estado de acidosis metabólica persistente, como consecuencia de una hipovolemia. Es el caso del *shock* hemorrágico posparto³⁹.

3) La liberación de citoquinas, tales como la interleuquina 1 (IL-1), el factor de crecimiento tumoral (TNF- α), como es el caso de un *shock* séptico con endotoxemia bacteriana³⁸.

4) Merece especial atención dentro de la fisiopatología de la CID, las alteraciones de la hemostasia que se manifiestan en el caso de una preeclampsia grave. En este contexto existe una producción anormal de diversos marcadores de síntesis endotelial con actividad protrombótica o vasoconstrictora, proagregante plaquetaria o antifibrinolítica, que conduce a una alteración vascular y hemostática de forma persistente a nivel sistémico^{11,13-15,40-43}.

En resumen, la trombofilia asociada a la gestación puede tener consecuencias clínicas, tanto para la madre como para el feto. Existe cada vez más evidencia de una asociación de la trombofilia, tanto congénita como adquirida, con pérdidas fetales, RCIU, preeclampsia y ETEV. Sin embargo, estudios prospectivos, longitudinales y a gran escala serían necesarios para confirmar estos hechos y considerar la trombofilia.

La CID de origen obstétrico constituye un proceso que conlleva una elevada morbimortalidad materno-fetal. La clave para poder conseguir una disminución de sus consecuencias negativas reside en el conocimiento, por parte del obstetra y del hematólogo, de las condiciones predisponentes, realizando un diagnóstico precoz e instaurando una terapia adecuada.

Anticonceptivos hormonales, coagulación y trombosis

Desde los primeros estudios epidemiológicos a finales de los años sesenta se ha demostrado que los anticonceptivos hormonales orales (AHO) aumentaban el riesgo de ETEV⁴⁴. El riesgo trombótico debido a la utilización de anticonceptivos orales estroprogestativos está relacionado, por una parte, con la concentración estrogénica del preparado y, por otra, con la dosis y potencia androgénica del gestágeno asociado⁴⁵. Desde luego, la carga trombofílica congénita individual también influye en el riesgo de manifestación clínica de eventos trombóticos^{20,46-49}.

Se ha establecido que el riesgo de ETEV es 4 veces mayor cuando la dosis de estrógeno por comprimido es igual o superior a 50 μ g de etinil-estradiol. Por ello, en las últimas décadas se ha ido reduciendo la concentración estrogénica en los preparados con el fin de minimizar estos efectos adversos, aunque todavía persiste el riesgo trombótico.

Antes de 1995 se pensaba que el componente gestágeno de los contraceptivos orales no contribuía al riesgo de trombosis. Sin embargo, desde finales de 1995 se levantó una intensa y persistente polémica acerca del grado de potencial protrombótico de los gestágenos de diferente generación. Así, el desogestrel y gestodeno (AHO con gestágeno de tercera generación) fueron señalados con un mayor riesgo de ETEV no fatal en comparación con el riesgo, ya incrementado, de los AHO que utilizan levonorgestrel como gestágeno (AHO de segunda generación)⁵⁰⁻⁵⁵.

Por otra parte, la comercialización de anticonceptivos por otras vías distintas a la oral, vía transdérmica o anillo vaginal, ha generado estudios para valorar su efecto sobre el sistema hemostático y sobre la trombosis⁵⁶⁻⁶⁰.

Efecto de los anticonceptivos hormonales sobre el sistema hemostático

Desde hace tres décadas se han venido investigando las modificaciones de diversos parámetros de la hemostasia en las mujeres con tratamiento con AHO con el fin de explicar el aumento de los eventos trombóticos. Los efectos sobre la coagulación son, en general, **procoagulantes**, por aumento de los factores de coagulación y disminución de los inhibidores de dicho sistema. Sin embargo, sobre el sistema fibrinolítico se observa un efecto **profibrinolítico**. En general, las plaquetas sufren escasas modificaciones en las mujeres usuarias de AHO.

Con relación al sistema de la coagulación, los AHO inducen un incremento de diversos factores de la coagulación. Por orden de mayor a menor varia-

ción, aumentan los niveles de FVII, FX, FXIII, protrombina, FIX, fibrinógeno, FVIII y FvW. Estos cambios son más marcados con la utilización de AHO de tercera generación que con los de segunda generación y son menores cuando disminuye la dosis estrogénica del preparado.

Acerca de la influencia de los AHO sobre los inhibidores de la coagulación, la AT y sistema de la PC, conviene destacar que interfieren con ambas vías anticoagulantes. De hecho, durante décadas se ha utilizado la determinación de la AT para la monitorización de la trombofilia en mujeres usuarias de AHO. Sin embargo, en los últimos años diversos estudios han demostrado la escasa utilidad clínica de la determinación de AT en este contexto, ya que la posible disminución no sobrepasa el límite de la normalidad. En relación con la proteína S, se ha observado una disminución de su nivel secundaria al tratamiento con AHO, especialmente de tercera generación^{40,66,67}, por lo que es importante cuantificar dicho inhibidor en mujeres con sospecha de deficiencia del mismo. Finalmente, diversos estudios han indicado que el tratamiento con AHO incrementa la incidencia de la resistencia a la proteína C activada^{62,67}.

Al estudiar la influencia de los AHO sobre el sistema fibrinolítico se ha observado que fundamentalmente existe una disminución de la actividad del PAI-1⁶⁴ y un incremento de inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI)^{64,68}. En relación con las modificaciones en los niveles del activador tisular del plasminógeno los resultados son contradictorios. Globalmente se ha detectado una actividad fibrinolítica aumentada, reflejada también por un incremento de los complejos plasmina-antiplasmina, de los productos de degradación de la fibrina, como son los dímeros D, que podría ser posiblemente compensatoria de la hiperactividad trombínica, inducida por los AHO.

Existen diversas evidencias biológicas que sostienen la presencia de un aumento de la activación de la coagulación tras la ingesta de AHO, manifestado por el aumento de los niveles de FPA, de F1+2 o los complejos T:AT.

Los anticonceptivos hormonales por vía transdérmica o anillo vaginal producen efectos similares a la anticoncepción oral en relación con la hipercoagulabilidad⁵⁸⁻⁶⁰. Sin embargo, algunos estudios indican que la disminución en los niveles de proteína S parece ser mayor si se utiliza la vía de administración transdérmica⁵⁸.

En conclusión, los AHO tienen efecto sobre diversas variables del sistema hemostático, aunque la mayoría de los cambios se encuentran dentro del coeficiente de variación interindividual. En general, existe un incremento de diversos factores de coagulación, disminución de algunos inhibidores y una hiperfibri-

Tabla 3. Uso de anticonceptivos hormonales orales (AHO), defectos trombofílicos y riesgo de enfermedad tromboembólica venosa (EDEV)

Defecto trombofílico	Uso de AHO	RR de EDEV
Factor V Leiden		
-	-	1 (referencia)
-	+	4
+	-	5-8
+	+	16-30
Protrombina G20210A		
-	-	1 (referencia)
-	+	4
+	-	2-4
+	+	7-16

Modificado de Martinelli²⁰.

nolisis. Estos efectos disminuyen con la reducción de la dosis estrogénica. Comparando los AHO de tercera generación con los que poseen progestágenos de segunda generación se observa una mayor resistencia a la proteína C activada, un mayor aumento de los factores VII y II y una mayor disminución de los niveles de proteína S. Los anticonceptivos por vía transdérmica producen efectos similares a los administrados por vía oral⁽⁶¹⁻⁶⁸⁾.

Anticonceptivos hormonales y riesgo de trombosis

Como hemos indicado, diversos estudios han sugerido que los AHO de más de 50 µg de etinil-estradiol incrementan el riesgo de EDEV en comparación con los de menos de 50 µg. Esto ha hecho que se intente reducir al máximo la concentración estrogénica de los preparados. Sin embargo, el papel del gestágeno se había minimizado.

El riesgo de EDEV en una mujer sana no gestante y no usuaria de contraceptivos orales es de 4/100.000 mujeres/año y se incrementa a 10-30/100.000 mujeres/año cuando la mujer es usuaria de AHO. Este riesgo aumenta en las mujeres portadoras de una trombofilia congénita (factor V Leiden, protrombina G20210A) (Tabla 3). Por otra parte, el riesgo de EDEV es mayor durante el primer año de uso de los anticonceptivos, y recientemente se ha publicado que la obesidad incrementa el riesgo de EDEV, especialmente en las mujeres usuarias de anticonceptivos⁷⁵.

Desde finales de 1995, y tras la polémica que indica que los AHO podían presentar una mayor incidencia de EDEV, se ha reducido su uso. En relación con ello, se ha observado que en los estudios publicados sin subvención de industria farmacéutica se encontró un riesgo relativo de EDEV de los AHO de tercera generación frente a los de segunda generación de 1,9-4,2, mientras que en estudios subvencionados el

Tabla 4. Uso de anticonceptivos hormonales orales (AHO) de 2.ª y 3.ª generación y riesgo de enfermedad tromboembólica venosa (ETEVE)

Uso de AHO	ETEVE (RR)
—	1*
2.ª Generación (levonogestrel)	1,8-3,8
3.ª Generación (desogestrel o gestodeno)	3,2-8,7

* Referencia. Modificado de Battaglioli et al.⁷².

riesgo relativo fue de 0,8-1,5^{69,71}. Parece que el riesgo de trombosis de los anticonceptivos de tercera generación (que contengan desogestrel o gestodeno) es aproximadamente el doble que los AHO que incluyen como progestágeno levonogestrel (Tabla 4).

Sin embargo, el Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos⁷⁰ indica que “aunque los AHO aumentan el riesgo de ETEVE y este incremento es mayor con los AHO de tercera generación, se debe decir a las mujeres que los AHO siguen siendo el método más eficaz dentro de los métodos anticonceptivos reversibles y que también tienen beneficios, como disminución de quistes y cáncer de ovario”.

Posteriormente, se ha introducido un nuevo anticonceptivo oral con un nuevo progestágeno (drospirenona), observándose que el riesgo tromboembólico de este anticonceptivo es similar a los observados con los anticonceptivos que contiene levonogestrel (segunda generación)⁷⁶.

Por otra parte, las mujeres usuarias de anticonceptivos con sólo progestágenos no presentan un mayor riesgo de trombosis en comparación con las no usuarias⁷⁷.

En relación con la vía de administración de los anticonceptivos, el riesgo de trombosis es similar cuando se utiliza la vía transdérmica que la oral^{56,57}. No existen datos sobre el riesgo de trombosis y la utilización del anillo vaginal como anticonceptivo.

Se ha estudiado también el efecto de los anticonceptivos sobre la trombosis arterial. Se ha indicado que los anticonceptivos orales aumentan unas dos veces el riesgo de isquemia cerebral y también el riesgo de enfermedad arterial periférica, independientemente del progestágeno utilizado⁷⁸⁻⁸⁰. Hay que tener en cuenta que el riesgo de trombosis arterial es mayor en las mujeres usuarias de anticonceptivos y que tienen también factores de riesgo vascular (tabaquismo, obesidad, hipertensión, dislipemia y diabetes).

A la luz de los conocimientos expuestos se pueden indicar diversas conclusiones:

1) Los AHO tienen un efecto procoagulante, aunque la mayoría de los cambios se encuentran dentro del coeficiente de variación interindividual. Estos efectos disminuyen con la reducción de la dosis estrogénica.

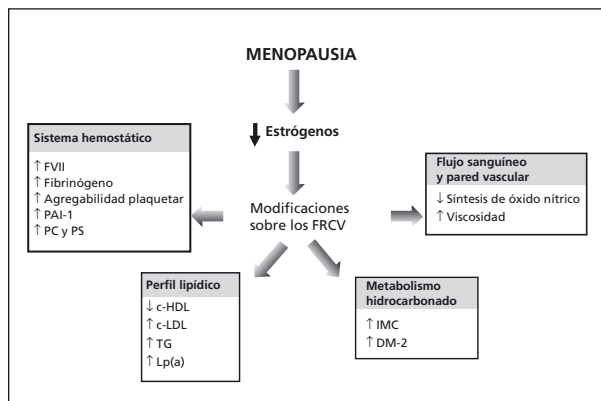


Figura 1. Modificaciones sobre los factores de riesgo cardiovascular en la menopausia.

2) Los AHO de tercera generación inducen una mayor hipercoagulabilidad.

3) Los AHO incrementan tres o cuatro veces el riesgo de ETEVE en comparación con las mujeres de similar edad y que no toman AHO.

4) Los AHO con contenido gestágeno de tercera generación aportan un mayor riesgo relativo de ETEVE que los de segunda generación.

5) El riesgo de ETEVE en usuarias de AHO se incrementa cuando se asocia a situaciones de trombofilia congénita y en el primer año de utilización.

6) Toma especial interés el historial clínico y familiar de la futura usuaria de AHO con el fin de realizar un *screening* selectivo en las mujeres con antecedentes personales o familiares de ETEVE.

7) Si la mujer es usuaria de AHO y se prevé situación de aumento del riesgo de tromboembolismo (cirugía, inmovilización) se debe suspender el anticonceptivo^{20,46-60,69-74}.

Terapia hormonal sustitutiva, balance hemostático, trombosis y enfermedad coronaria.

La deficiencia estrogénica que caracteriza la postmenopausia ocasiona una serie de cambios en la fisiología de la mujer que aumentan el riesgo de enfermedad cardiovascular. De hecho, la prevalencia de la enfermedad cardiovascular en las mujeres menores de 50 años es la mitad que en el sexo masculino pero es similar por encima de 70 años. Se ha indicado que por cada año que se retrasa la menopausia, disminuye un 2% la mortalidad ajustada para la edad, a expensas fundamentalmente de disminuir la mortalidad por enfermedad cardiovascular⁸¹. Estos datos han llevado a subrayar el papel protector de los estrógenos frente a la enfermedad cardiovascular.

Las modificaciones que se producen en la fase de la postmenopausia (Figura 1) afectan al metabolismo hidrocarbonado, al perfil lipídico, al flujo sanguíneo y a la pared vascular. En relación con el sistema hemostático, se observa un aumento de los factores de coagulación (factor VII y fibrinógeno), así como una hipofibrinólisis debida a un aumento de los niveles de PAI-1.

Terapia hormonal sustitutiva y riesgo cardiovascular

Diversos estudios consideraron que los estrógenos tenían un impacto positivo sobre varios factores de riesgo de la enfermedad cardiovascular, ya que mejoraban la función endotelial, tenían un efecto favorable sobre el metabolismo lipoproteico y parecían favorecer la fibrinólisis⁸²⁻⁸⁸. Además, estos efectos beneficiosos de los estrógenos se confirmaron en estudios clínicos observacionales con la utilización de la terapia hormonal sustitutiva (THS), de los cuales el *Nurses' Health Study* fue el más representativo⁸⁹. En dicho estudio se encontró una reducción del 50% de los eventos cardiovasculares en las 70.533 mujeres sin enfermedad cardiovascular tratadas con THS entre los años 1976 y 1996.

Sin embargo, estos resultados prometedores no se corroboraron posteriormente en estudios aleatorizados doble ciego controlados con placebo. Uno de ellos fue el estudio *HERS (Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study)*⁹⁰, diseñado para analizar el posible beneficio del tratamiento oral con THS (con estrógenos equinos conjugados-EEC y progestágenos) como prevención secundaria en 2.763 mujeres con enfermedad coronaria establecida. Los investigadores concluyeron que la THS no sólo no reducía los eventos cardiovasculares en prevención secundaria, sino que además aumentaba el riesgo de eventos adversos (cáncer de mama, ictus y ETEV). La conclusión que se extrajo fue que no se debe usar THS como prevención secundaria de eventos cardiovasculares en base al exceso de riesgo de eventos cardiovasculares en el primer año, la ausencia de beneficio cardiovascular a largo plazo y el incremento persistente de ETEV, ictus y cáncer de mama.

Otro de los estudios fue el *WHI (Women's Health Initiative)*⁹¹, diseñado para analizar el posible beneficio del tratamiento con THS como prevención primaria en 16.608 mujeres sin enfermedad coronaria establecida. De acuerdo con los resultados anteriores, no sólo no se demostró una reducción significativa de los eventos cardiovasculares, sino que además se incrementaron los eventos adversos. La conclusión de este estudio es que no se debe iniciar la THS como prevención primaria de la enfermedad cardiovascular.

Las críticas más consistentes argumentadas por la comunidad científica para ambos estudios fueron las siguientes:

En el estudio *HERS*:

- Las mujeres incluidas tenían edades avanzadas (edad media de 67 años).
- Por otra parte, en ambos estudios sólo se valoró una combinación fija y de alta concentración de EEC, sin ensayar otras dosis, otras moléculas, ni otras vías de administración, que quizás podrían haber modificado los resultados.
- Por último, no se analizó la existencia de trombofilia previa al inicio del THS.

En el estudio *WHI*:

- El tamaño muestral necesitó ser muy amplio para conseguir mostrar diferencias estadísticamente significativas.
- No se excluyeron 612 mujeres con antecedentes clínicos de enfermedad aterotrombótica. También se incluyeron mujeres demasiado mayores (edad media: 63 años), con más de 10 años de cambios posmenopáusicos, probablemente ya con aterosclerosis establecida en el momento de iniciar la THS (*timing hypothesis*)^{92,93}. Por ello se indicó que los resultados del estudio serían poco extrapolables a la mujer en la perimenopausia y en la que realmente sí puede tener un sentido mantener los estrógenos en niveles protectores.

Sin embargo, a pesar de todas estas críticas y de que en España se utilizaba la THS más por vía transdérmica que por vía oral, la alarma ha trascendido los límites de las publicaciones científicas y, al llegar a la usuaria por la prensa no especializada, ha generado cierta psicosis y disminuido la demanda de la THS.

Aunque hoy día no existe evidencia que apoye la utilización de la THS como prevención primaria o secundaria de la enfermedad cardiovascular, se han iniciado dos estudios especialmente diseñados para valorar su posible beneficio con dosis bajas de estrógenos, vía de administración transdérmica y administración temprana:

- Estudio *KEEPS (Kronos Early Estrogen Prevention Study)*⁹⁴ (0,45 mg/día de EEC o estradiol transdérmico 50 µg/día + progesterona micronizada 200 mg/día vs. placebo). Fecha de inicio: septiembre 2005. Finalización prevista: diciembre 2010. El objetivo es valorar el efecto de estrógenos y progestágenos en el desarrollo de la aterosclerosis de la mujer menopáusica (menos de 3 años desde el inicio de la sintomatología climatérica).
- Estudio *ELITE (Early versus Late Intervention Trial with Estradiol)*. Fecha de inicio: julio 2004. Finalización prevista: junio 2009. El objetivo es valorar el efecto del 17β-estradiol en la progresión de la aterosclerosis temprana en mujeres posmenopáusicas histerectomizadas.

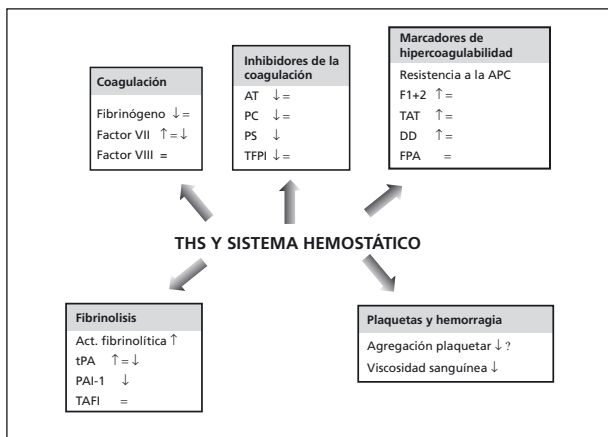


Figura 2. Modificaciones del sistema hemostático y terapia hormonal sustitutiva (THS).

Modificaciones del sistema hemostático con la terapia hormonal sustitutiva

Una de las principales dificultades en la evaluación conjunta de los resultados de los estudios sobre THS y el sistema hemostático es que los ensayos publicados suelen contener un tamaño muestral pequeño y, además, analizan distintas modalidades de THS (tipo de preparados hormonales, dosis, vía de administración...). Por una parte, a las mujeres histerectomizadas sólo se les administra estrógenos, pero la vía de administración puede ser oral o transdérmica. Sin embargo, en las mujeres con útero intacto, a la terapia estrogénica de sustitución debe añadirse obligatoriamente un gestágeno, por el efecto protector sobre el endometrio. Por ello se deben tener en cuenta todas estas variables cuando se interpretan los resultados obtenidos.

En general, el estrógeno disminuye los niveles de colesterol total y de colesterol LDL, aumenta los niveles de colesterol HDL y reduce los niveles de Lp(a), fundamentalmente en las mujeres con niveles previos más elevados⁹⁵. Algunos polimorfismos del receptor de estrógenos están asociados a un aumento del efecto de la THS sobre el colesterol HDL⁹⁶. Se ha sugerido que los estrógenos protegen a las lipoproteínas de los procesos de oxidación. Aunque algunos estrógenos administrados por vía oral pueden aumentar los niveles de triglicéridos, los administrados por vía transdérmica los disminuyen. El efecto de los estrógenos sobre el lecho vascular es beneficioso desde el punto de vista cardiovascular⁹⁷, al producir una vasodilatación mediada por un aumento en la síntesis de óxido nítrico y de prostaciclina en la pared vascular. Por otra parte, también producen una disminución del índice de pulsatilidad arterial, lo que puede reducir el riesgo de aparición de vasoespasmos arteriales. La adición de un gestágeno puede modificar ligeramente los efectos hasta aquí referidos.

Existen divergencias en la literatura sobre los efectos de la THS sobre la hemostasia. En general, se suele aceptar que producen cambios hemorreológicos, una ligera hipercoagulabilidad y un aumento de la actividad fibrinolítica. Así, se ha descrito una disminución en los niveles de fibrinógeno y de la viscosidad plasmática. La hipercoagulabilidad sanguínea se produce fundamentalmente cuando la vía de administración del estrógeno es la oral^{98,99}. Aunque algunos autores no encuentran modificaciones de los parámetros de la coagulación, como son el factor VII, el complejo T:AT y del F1+2, otros investigadores encuentran un aumento de los niveles del factor VII, del F1+2 y de la resistencia a la proteína C activada, por una parte, y una disminución de la concentración de la AT, por otra^{87,88,98-102}. En relación con el sistema fibrinolítico, los resultados descritos en la literatura no son concluyentes, aunque se ha observado que la THS podría tener un efecto beneficioso sobre la actividad fibrinolítica, debido a una disminución de la actividad del PAI-1^{83,87,95,101, 103-105} (Figura 2).

Otro de los campos emergentes en relación con el periodo menopáusico es el empleo de otras terapias, como los SERM (moduladores selectivos de los receptores de estrógenos), la tibolona, etc. La información recabada de distintos estudios sugiere el desarrollo de cierta hipercoagulabilidad asociada al empleo de estos fármacos^{106,107}.

Terapia hormonal sustitutiva y riesgo de enfermedad tromboembólica venosa

Se ha descrito un aumento de ETEV en las usuarias de THS por vía oral^{109,110}. Además, el aumento del riesgo es constatable fundamentalmente durante el primer año.

El estudio *ESTHER* (*Estrogen and Thromboembolism Risk*), publicado recientemente¹¹¹⁻¹¹⁵, es un estudio francés multicéntrico de casos y controles. En él se incluyeron 271 casos consecutivos de ETEV en mujeres (de 45 a 70 años), apareadas con controles. Los autores concluyeron que el uso de THS por vía oral (OR: 4,3; IC 95%: 2,6-7,2), y no la transdérmica (OR: 1,2 [0,8-1,7]), incrementa el riesgo de trombosis venosa¹¹⁵. De acuerdo con estudios aleatorizados previos, el estudio *ESTHER* confirmó que la vía de administración de la THS parece influir en el riesgo de trombosis.

Además de lo que se publicó en relación con el riesgo de ETEV, el estudio *KEEPS*, citado anteriormente⁹⁴, nos indicará en un futuro próximo si existe o no incremento de riesgo de enfermedad cardiovascular en las pacientes sometidas a THS por vía transdérmica. Actualmente, hay suficientes evidencias para considerar la vía transdérmica como la elección para administrar la THS.

Como se ha indicado anteriormente, el sistema hemostático, en general, y el sistema fibrinolítico, en particular, no sólo tienen importancia en la trombosis; también intervienen en otros procesos relacionados con la remodelación tisular, la angiogénesis, invasión tumoral y la reproducción, dentro de los cuales nos encontramos con dos patologías muy prevalentes en la mujer como son el cáncer de mama y la endometriosis¹¹⁶.

Fibrinolisis y cáncer de mama

Cada día existen más evidencias en relación con la importancia del sistema de activación del plasminógeno en la invasión tumoral y la metástasis. Tanto la uroquinasa (uPA) como el PAI-1 se han considerado factores de mal pronóstico en diversos tipos de carcinomas, entre los que se incluye el cáncer de mama^{117,118}.

En un principio se indicó que la uPA promocionaba la diseminación tumoral, simplemente por degradación de la matriz extracelular¹¹⁹. Sin embargo, otras funciones de la uPA, como pueden ser la promoción de la angiogénesis, de la mitogénesis, de la migración celular y la inhibición de la apoptosis, explicarían su papel en la diseminación tumoral¹¹⁹⁻¹²².

Ya que el PAI-1 es un inhibidor de la uPA, cabría esperar que dificultara la invasión tumoral y la formación de metástasis. Sin embargo, diversos estudios muestran que el aumento de los niveles de PAI-1 se correlaciona con la invasión tumoral¹¹⁸. Los mecanismos que pueden estar implicados en que el PAI-1 contribuya a la diseminación tumoral serían la prevención de una excesiva degradación de la matriz extracelular, modulación de la adhesión celular¹²³⁻¹²⁵, efecto sobre la angiogénesis^{126,127} y, también, estimulación de la proliferación celular¹²⁸. Un correcto equilibrio entre los niveles de las proteasas y los niveles del PAI-1, los cuales estarían modulados por el polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1, podría ser necesario para controlar la capacidad invasiva del tejido¹²⁹.

Fibrinolisis y endometriosis

La endometriosis es una enfermedad de la mujer que se define por la presencia de tejido endometrial en localizaciones extrauterinas. La importancia del estudio de esta enfermedad radica en la alta prevalencia de la misma, ya que afecta hasta al 30% de mujeres con esterilidad. Sin embargo, las incógnitas acerca de los mecanismos íntimos que explican la implantación del endometrio en regiones ectópicas siguen sin resolverse.

Aunque la endometriosis es una enfermedad benigna, el tejido endometrial, después de adherirse al peritoneo, tiene la propiedad de proliferar de forma

similar al tejido tumoral. Al igual que ocurre en la invasión tumoral, tiene lugar una proteólisis local extracelular que produce una degradación de la matriz extracelular del peritoneo o del ovario, lo que determina la implantación del tejido en localizaciones ectópicas. El sistema de activación del plasminógeno parece jugar un papel en dicha proteólisis local.

Se ha observado una expresión alterada de diversos componentes del sistema fibrinolítico en el endometrio, líquido peritoneal y endometrioma ovárico de la paciente con endometriosis¹³⁰⁻¹³⁷. Existe un aumento de los niveles de diversos factores proteolíticos como la uPA y angiogénicos en el endometrio y líquido peritoneal de la paciente con endometriosis¹³⁰⁻¹³⁴, lo que conllevaría a que las células endometriales tuvieran la capacidad de degradar la matriz extracelular e implantarse en localizaciones ectópicas y desencadenar la formación de la lesión endometriósica inicial¹³⁸. Una vez formado el quiste endometriósico ovárico, se produce un aumento de los niveles de inhibidores (PAI-1), sin que se detecte aumento en la actividad proteolítica. La razón por la cual esta actividad proteolítica se limita a los estadios iniciales de la enfermedad todavía se desconoce, pero este comportamiento podría explicar la formación del quiste endometriósico sin invasión del tejido ovárico circundante¹³¹.

Agradecimientos

Este trabajo se ha subvencionado parcialmente por las Ayudas de Investigación PI050799, PI050844, PI070831, CP0700326 y RECAVA (RD06/0014/0004) (Instituto de Salud Carlos III).

Bibliografía

- Jordan WM. Pulmonary embolism. *Lancet* 1961; 2: 1146-7.
- Clark P, Brennand J, Conkie JA, McCall F, Greer IA, Walker ID. Activated protein C sensitivity, protein C, protein S and coagulation in normal pregnancy. *Thromb Haemost* 1998; 79: 1166-70.
- Brenner B. Haemostatic changes in pregnancy *Thromb Res* 2004; 114: 409-14.
- Franchini M. Haemostasis and pregnancy. *Thromb Haemost* 2006; 95: 401-13
- Gilbert-Estellés J, Estellés A. Trombofilia y gestación. *Trombosis y Hemostasia* 2007; 195-223.
- Gilbert J, Aznar J, Parrilla JJ, Regañón E, Vila V, Estelles A. Alterations in the coagulation and fibrinolysis system in pregnancy, labour and puerperium with special reference to a possible transitory state of intravascular coagulation during labour. *Thromb Haemost* 1978; 40: 387-96.
- Bonnar J, Green R, Norris L. Inherited thrombophilia and pregnancy: the obstetric perspective. *Semin Thromb Hemost* 1998; 24 (Suppl. 1): 49-53.
- De Stefano V, Martinelli I, Rossi E, Battaglioli T, Za T, Mannuccio Mannucci P et al. The risk of recurrent venous throm-

- boembolism in pregnancy and puerperium without anti-thrombotic prophylaxis. *Br J Haematol* 2006; 135: 386-91.
9. Fernández JA, Estellés A, Gilabert J, España F, Aznar J. Functional and immunologic protein S in normal pregnant women and in full term newborns. *Thromb Haemost* 1989; 61: 474-8.
 10. Lindqvist PG, Svensson P, Dahlbäck B. Activated protein C resistance- in the absence of factor V Leiden and pregnancy. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 361-6.
 11. España F, Gilabert J, Aznar J, Estellés A, Kobayashi T, Griffin JH. Complexes of activated protein C with α 1-antitrypsin in normal pregnancy and in severe preeclampsia. *Amer J Obstet Gynecol* 1991; 164: 1310-6.
 12. Estellés A, Gilabert J, España F, Aznar J, Gómez-Lechón MJ. Fibrinolysis in preeclampsia. *Fibrinolysis* 1987; 1: 209-14.
 13. Estellés A, Gilabert J, Aznar J, Loskutoff DJ, Schleef RR. Changes in the plasma levels of type 1 and type 2 plasminogen activator inhibitors in normal pregnancy and in patients with severe preeclampsia. *Blood* 1989; 74: 1332-8.
 14. Estellés A, Gilabert J, Andrés C, España F, Aznar J. Plasminogen activator inhibitors type 1 and type 2 and plasminogen activators in amniotic fluid during normal pregnancy. *Thromb Haemost* 1990; 64: 281-5.
 15. Estellés A, Gilabert J, Keeton M, Equchi Y, Aznar J, Grancha S, et al. Altered expression of plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) and type 2 (PAI-2) in placentas from pregnant women with preeclampsia [(PE)] and/or intrauterine fetal growth retardation [(IUGR)]. *Blood* 1994; 84: 143-50.
 16. Bellart J, Gilabert R, Fontcuberta J, Borrell M, Miralles RM, Cabero L. Fibrinolysis changes in normal pregnancy. *J Perinat Med* 1997; 25: 363-72.
 17. Robertson L, Wu O, Langhorne P, Twaddle S, Clarck P, Lowe GD et al. Thrombophilia in pregnancy: a systematic review. *Br J Haematol* 2006; 132: 171-96.
 18. Greer IA. Thrombosis in pregnancy: maternal and fetal issues. *Lancet* 1999; 353: 1258-65.
 19. Lecumberri R, Feliu J, Rocha E. Alteraciones hematológicas en la mujer embarazada: trombosis y embarazo. *Haematologica* 2006; 91 (Suppl. 1) 200-7.
 20. Martinelli I. Thromboembolism in women. *Semin Thromb Hemost* 2006; 32: 709-15.
 21. Pomp ER, Lenselink AM, Rosendaal FR, Doggen CJ. Pregnancy, the postpartum period and prothrombotic defects: risk of venous thrombosis in the MEGA study. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 632-7.
 22. Di Simone N, Luigi MP, Marco D, Fiorella DN, Silvia D, Clara DM, Alessandro C. Pregnancies complicated with antiphospholipid syndrome: the pathogenic mechanism of antiphospholipid antibodies: a review of the literature. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1108: 505-14.
 23. Bick RL. Antiphospholipid syndrome in pregnancy. *Hematol Oncol Clin North Am* 2008; 22: 107-20
 24. Brenner B, Aharon A. Thrombophilia and adverse pregnancy outcome. *Clin Perinatol* 2007; 34: 527-41
 25. Hurtado V, Montes R, Gris JC, Berytolaccini ML, Alonso A, Martínez-González MA et al. Autoantibodies against EPCR are found in antiphospholipid syndrome and are a risk factor for fetal death. *Blood* 2004; 104: 1369-74.
 26. Kist WJ, Janssen NG, Kalk JJ, Hague WM, Dekker GA, de Vries JI. Thrombophilias and adverse pregnancy outcome - A confounded problem! *Thromb Haemost* 2008; 99: 77-85.
 27. Middeldorp S. Thrombophilia and pregnancy complications: cause or association? *J Thromb Haemost* 2007; 5 (Suppl. 1): 276-82.
 28. Estellés A, Gilabert J, Grancha S, Yamamoto K, Thinnis T, España F et al. Abnormal expression of type 1 plasminogen activator inhibitor and tissue factor in severe preeclampsia. *Thromb Haemost* 1998; 79: 500-8.
 29. Lockwood CJ, Krikun G, Caze R, Rahman M, Buchwalder LF, Schatz F. Decidual Cell-expressed Tissue Factor in Human Pregnancy and Its Involvement in Hemostasis and Preeclampsia-related Angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1127: 67-72.
 30. Preston FE, Rosendaal FR, Walker ID, Briet E, Berntorp E, Conard J et al. Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia. *Lancet* 1996; 348: 913-6.
 31. Grandone E, Margaglione M, Colaizzo, d'Addeda M, Capucci G, Vecchione G et al. Factor V Leiden is associated with repeated and recurrent unexplained fetal losses. *Thromb Haemost* 1997; 822-4.
 32. Balasch J, Reverter JC, Fabregues F, Tàssies D, Rafel M, Creus M et al. First-trimester repeated abortion is not associated with activated protein C resistance. *Hum Reprod* 1997; 12: 1094-7.
 33. Lissalde-Lavigne G, Fabbro-Peray P, Cochery-Nouvellon E, Mercier E, Ripart-Neveu S, Balducci JP et al. Factor V Leiden and prothrombin G20210A polymorphisms as risk factors for miscarriage during a first intended pregnancy: the matched case-control 'NOHA first' study. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 2178-84.
 34. Qublan HS, Eid SS, Ababneh HA, Amarin ZO, Smadi AZ, Al-Khafaji FF et al. Acquired and inherited thrombophilia: implication in recurrent IVF and embryo transfer failure. *Hum Reprod* 2006; 21: 2694-8.
 35. Martinelli I, Taioli E, Ragni G, Levi-Setti P, Passamonti SM, Battaglioli T et al. Embryo implantation after assisted reproductive procedures and maternal thrombophilia. *Haematologica* 2003; 88: 789-93.
 36. Rogolino A, Coccia ME, Fedi S, Gori AM, Cellai AP, Scarselli GF et al. Hypercoagulability, high tissue factor and low tissue factor pathway inhibitor levels in severe ovarian hyperstimulation syndrome: possible association with clinical outcome. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003; 14: 277-82.
 37. Chan WS, Dixon ME. The "ART" of thromboembolism: A review of assisted reproductive technology and thromboembolic complications. *Thromb Res* 2008; 121: 713-26.
 38. Bick RL. Disseminated intravascular coagulation. Pathophysiological mechanisms and manifestations. *Semin Thromb Hemost* 1998; 24: 3-18.
 39. Bonnar L. Massive obstetric hemorrhage. *Obstet Gynecol Surv* 1997; 52: 243-7.
 40. Gilabert J, Fernández JA, España F, Aznar J, Estellés A. Physiological coagulation inhibitors (protein S, protein C and antithrombin III) in severe preeclamptic states and in users of oral contraceptives. *Thromb Res* 1988; 49: 319-29.
 41. Estellés A, Gilabert J, España F, Aznar J, Galbis M. Fibrinolytic parameters in normotensive pregnancy with intrauterine fetal growth retardation and in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165: 138-42.
 42. Gilabert J, Estellés A, Aznar J, España F, Andrés C, Santos T et al. Contribution of platelets to increased plasminogen activator inhibitor type 1 in severe preeclampsia. *Thromb Haemost* 1990; 63: 361-6.
 43. Bellart J, Gilabert R, Cabero L, Fontcuberta J, Monasterio J, Miralles RM. Heparin cofactor II: a new marker for preeclampsia. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998; 9: 205-8.
 44. Vessey MP, Doll R. Investigation of relation between use of oral contraceptives and thromboembolic disease. *Br Med J* 1968; 2: 199-205.
 45. Estellés A, Gilabert-Estellés J. Anticonceptivos hormonales, coagulación y trombosis. *Rev Clin Española* 2001; 201: 681-4.
 46. Aznar J, Vayá A, Estellés A, Mira Y, Seguí R, Villa P et al. Risk of venous thrombosis in carriers of the prothrombin G20210A variant and factor V Leiden and their interaction with oral contraceptives. *Haematologica* 2000; 85: 1271-6.
 47. Seguí R, Estellés A, Mira Y, España F, Villa P, Falcó C et al. PAI-1 promoter 4G/5G genotype as an additional risk factor

- for venous thrombosis in subjects with genetic thrombophilic defects. *Brit J Haematol* 2000; 110: 122-8.
48. Bloemenkamp KW, Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Vandembroucke JP. Higher risk of venous thrombosis during early use of oral contraceptives in women with inherited clotting defects. *Arch Intern Med* 2000; 160: 49-52.
 49. Blickstein D, Blickstein I. Oral contraception and thrombophilia. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2007; 19: 370-6.
 50. Jick H, Jick SS, Gurewich V, Myers MW, Vasilakis C. Risk of idiopathic cardiovascular death and nonfatal venous thromboembolism in women using oral contraceptives with differing progestagen components. *Lancet* 1995; 346: 1589-93.
 51. World Health Organization Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception. Venous thromboembolic disease and combined oral contraceptives: results of international multicentre case-control study. *Lancet* 1995; 346: 1575-82.
 52. Lewis MA, Spizer WO, Heinemann LA, MacRae KD, Bruppacher R, Thorogood M. Third generation oral contraceptives and risk of myocardial infarction: an international case-control study. *Transnational Research Group on Oral Contraceptives and the Health of Young Women. Br Med J* 1996; 312: 88-90.
 53. Spitzer WO, Lewis MA, Heinemann LAJ, Thorogood M, MacRae KD on behalf of Transnational Research Group on Oral Contraceptives and the Health of Young Women. Third generation oral contraceptives and risk of venous thromboembolic disorders: an international case-control study. *Transnational Research Group on Oral Contraceptives and the Health of Young Women. Br Med J* 1996; 312: 83-8.
 54. Bloemenkamp KW, Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Büller HR, Vandembroucke JP. Enhancement by factor V Leiden mutation of risk of deep vein thrombosis associated with oral contraceptives containing a third-generation progestagen. *Lancet* 1995; 346: 1593-6.
 55. Lewis MA, Heinemann LAJ, MacRae KD, Bruppacher R, Spitzer WO. The increased risk of venous thromboembolism and the use of third generation progestagens: role of bias in observational research. *The Transnational Research Group on Oral Contraceptives and the Health of Young Women. Contraception* 1995; 54: 5-13.
 56. Jick S, Kaye JA, Li L, Jick H. Further results on the risk of nonfatal venous thromboembolism in users of the contraceptive transdermal patch compared to users of oral contraceptives containing norgestimate and 35 microg of ethinyl estradiol. *Contraception* 2007; 76: 4-7.
 57. Cole JA, Norman H, Doherty M, Walker AM. Venous thromboembolism, myocardial infarction, and stroke among transdermal contraceptive system users. *Obstet Gynecol* 2007; 109: 339-46.
 58. Johnson JV, Lowell J, Badger GJ, Rosing J, Tchaikovski S, Cushman M. Effects of oral and transdermal hormonal contraception on vascular risk markers: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 2008; 111: 278-84.
 59. Rad M, Klufft C, Ménard J, Burggraaf J, de Kam ML, Meijer P et al. Comparative effects of a contraceptive vaginal ring delivering a nonandrogenic progestin and continuous ethinyl estradiol and a combined oral contraceptive containing levonorgestrel on hemostasis variables. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 195: 72-7.
 60. Klufft C, Meijer P, LaGuardia KD, Fisher AC. Comparison of a transdermal contraceptive patch vs. oral contraceptives on hemostasis variables. *Contraception* 2008; 77: 77-83.
 61. Bloemenkamp KW, Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Koster T, Bertina RM, Vandembroucke JP. Hemostatic effects of oral contraceptives in women who developed deep-vein thrombosis while using oral contraceptives. *Thromb Haemost* 1998; 80: 382-7.
 62. Rosing J, Middeldorp S, Curvers J, Christella M, Thomassens LG, Nicolaes GA et al. Low-dose oral contraceptives and acquired resistance to activated protein C: a randomised crossover study. *Lancet* 1999; 354: 2036-40.
 63. Klufft C. Effects on haemostasis variables by second and third generation combined oral contraceptives: a review of directly comparative studies. *Curr Med Chem* 2000; 7: 585-91.
 64. Meijers JC, Middeldorp S, Tekelenburg W, van den Edne AE, Tans G, Prins MH et al. Increased fibrinolytic activity during use of oral contraceptives is counteracted by an enhanced factor XI-independent down regulation of fibrinolysis: a randomized crossover study of two low-dose oral contraceptives. *Thromb Haemost* 2000; 84: 1-3.
 65. Middeldorp S, Meijers JC, Van den Ende AE, van Enk A, Bouma BN, Tans G et al. Effects on coagulation of levonorgestrel and desogestrel-containing low dose oral contraceptives: a cross-over study. *Thromb Haemost* 2000; 84: 4-8.
 66. Tans G, Curvers J, Middeldorp S, Thomassens MC, Meijers JC, Prins MH et al. A randomized cross-over study on the effects of levonorgestrel and desogestrel-containing oral contraceptives on the anticoagulant pathways. *Thromb Haemost* 2000; 84: 15-21.
 67. Kemmeren JM, Algra A, Meijers JC, Tans G, Bouma BN, Curvers J et al. Effect of second- and third-generation oral contraceptives on the protein C system in the absence or presence of the factor V Leiden mutation: a randomized trial. *Blood* 2004; 103: 927-33.
 68. Kemmeren JM, Algra A, Meijers JC, Bouma BN, Grobbee DE. Effect of second- and third-generation oral contraceptives on fibrinolysis in the absence or presence of the factor V Leiden mutation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002; 13: 373-81.
 69. Skegg DC. Third generation of oral contraceptives. Cautions are still justified. *Br Med J* 2000; 321: 190-1.
 70. Weiss G. Risk of venous thromboembolism with third-generation oral contraceptives: a review. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180: 295-301.
 71. Kemmeren JM, Algra A, Grobbee DE. Third generation oral contraceptives and risk of venous thrombosis: meta-analysis. *BMJ* 2001; 323: 131-4.
 72. Battaglioli T, Martinelli I. Hormone therapy and thromboembolic disease. *Curr Opin Hematol* 2007; 14: 488-93.
 73. Santamaría A, Mateo J, Oliver A, Menéndez B, Souto JC, Borrell M et al. Risk of thrombosis associated with oral contraceptives of women from 97 families with inherited thrombophilia: high risk of thrombosis in carriers of the G20210A mutation of the prothrombin gene. *Haematologica* 2001; 86: 965-71.
 74. Vayá A, Mira Y, Mateo J, Falco C, Villa P, Estelles A et al. Prothrombin G20210A mutation and oral contraceptive use increase upper-extremity deep vein thrombotic risk. *Thromb Haemost* 2003; 89: 452-7.
 75. Pomp ER, le Cessie S, Rosendaal FR, Doggen CJ. Risk of venous thrombosis: obesity and its joint effect with oral contraceptive use and prothrombotic mutations. *Br J Haematol* 2007; 139: 289-96.
 76. Dinger Dinger JC, Heinemann LA, Kühl-Habich D. The safety of a drospirenone-containing oral contraceptive: final results from the European Active Surveillance Study on oral contraceptives based on 142,475 women-years of observation. *Contraception* 2007; 75: 344-54.
 77. Conard J, Plu-Bureau G, Bahi N, Horellou MH, Pelissier C, Thalabard JC. Progestogen-only contraception in women at high risk of venous thromboembolism. *Contraception* 2004; 70: 437-41.
 78. Van Den Bosch MA, Kemmeren JM, Tanis BC, Mali WP, Helmerhorst FM, Rosendaal FR et al. The RATIO study: oral contraceptives and the risk of peripheral arterial disease in young women. *J Thromb Haemost* 2003; 1 (3): 439-44.
 79. Aznar J, Mira Y, Vayá A, Corella D, Ferrando F, Villa P et al. Factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations in young adults with cryptogenic ischemic stroke. *Thromb Haemost* 2004; 91: 1031-4.

80. Slooter AJ, Rosendaal FR, Tanis BC, Kemmeren JM, van der Graaf Y, Algra A. Prothrombotic conditions, oral contraceptives, and the risk of ischemic stroke. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1213-7.
81. Ossewaarde ME, Bots ML, Verbeek AL, Peeters PH, van der Graaf Y, Grobbee DE et al. Age at menopause, cause-specific mortality and total life expectancy. *Epidemiology* 2005; 16: 556-62.
82. Chae CV, Ridker PM, Manson JE. Postmenopausal hormone replacement therapy and cardiovascular disease. *Thromb Haemost* 1997; 78: 770-80.
83. Scarabin PY, Alhencgas M, Plubureau G, et al. Effects of oral and transdermal estrogen/progesterone regimens on blood coagulation and fibrinolysis in postmenopausal women. A randomized controlled trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 3071-8.
84. Espeland MA, Marcovina SM, Miller V, Wood PD, Wasilaukas C, Sherwin R et al. Effects of postmenopausal hormone therapy on lipoprotein(a) concentration. *Circulation* 1998; 98: 979-86.
85. Meade TW. Hormone replacement therapy and haemostatic function. *Thromb Haemostas* 1997; 78: 765-9.
86. Kim CJ, Min YK, Ryu WS, et al. Effect of hormone replacement therapy on lipoprotein(a) and lipid levels in postmenopausal women. Influence of various progestogen and duration of therapy. *Arch Intern Med* 1996; 156: 1693-700.
87. Gilabert J, Estellés A, Cano A, España F, Barrachina R, Grancha S et al. The effect of estrogen replacement therapy with or without progestogen on the fibrinolytic system and coagulation inhibitors in postmenopausal status. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 1849-54.
88. Nabulsi AA, Folsom AR, White A. Association of hormone-replacement therapy with various cardiovascular risk factors in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1993; 328: 1069-75.
89. Grodstein F, Manson JE, Colditz GA. Postmenopausal hormone reduces risk of heart disease in healthy women. *Ann Intern Med* 2000; 133: 933-41.
90. Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B et al. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. *JAMA* 1998; 280: 605-13.
91. Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, Bassford T, Beresford SA, Black H et al. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2004; 291: 1701-12.
92. Mendelsohn ME, Karas RH. Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. *Science* 2005; 308: 1583-7.
93. Dubey RK, Imthurn B, Barton M, Jackson EK. Vascular consequences of menopause and hormone therapy: importance of timing of treatment and type of estrogen. *Cardiovasc Res* 2005; 66: 295-306.
94. Harman SM, Brinton EA, Cedars M, Lobo R, Manson JE, Merriam GR et al. KEEPS: The Kronos Early Estrogen Prevention Study. *Climacteric* 2005; 8: 3-12.
95. Estellés A, Cano A, Falcó C, España F, Gilabert J, Aznar J. Lipoprotein(a) levels and isoforms and fibrinolytic activity in postmenopause. Influence of hormone replacement therapy. *Thromb Haemost* 1999; 81: 104-10.
96. Herrington DM, Howard TD, Hawkins GA, Reboussin DM, Xu J, Zheng SL et al. Estrogen-receptor polymorphisms and effects of estrogen replacement on high-density lipoprotein cholesterol in women with coronary disease. *N Engl J Med* 2002; 346: 967-74.
97. Lip GY, Blann AD, Jones AF, Beevers DG. Effects of hormone-replacement therapy on hemostatic factors, lipids factors, and endothelial function in women undergoing surgical menopause: Implications for prevention of atherosclerosis. *Am Heart J* 1997; 134: 764-71.
98. Brosnan JE, Sheppard BL, Norris LA. Haemostatic activation in post-menopausal women taking low-dose hormone therapy: less effect with transdermal administration? *Thromb Haemost* 2007; 97: 558-65.
99. Hemelaar M, van der Mooren MJ, Rad M, Klufft C, Kenemans P. Effects of non-oral postmenopausal hormone therapy on markers of cardiovascular risk: a systematic review. *Fertil Steril* 2007 Oct 6. [Epub ahead of print]
100. Cushman M, Legault C, Barrett-Connor E, Stefanick ML, Kessler C, Judd HL et al. Effect of postmenopausal hormones on inflammation-sensitive proteins: the Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Study. *Circulation* 1999; 100: 717-22.
101. Venkavaara S, Silveira A, Hakala-Ala-Pietilä T. Effects of oral and transdermal estrogen replacement therapy on markers of coagulation, fibrinolysis, inflammation and serum lipids and lipoproteins in postmenopausal women. *Thromb Haemost* 2001; 85: 619-25.
102. Hoibraaten E, Mowinckel MC, de Ronde H, Bertina RM, Sandset PM. Hormone replacement therapy and acquired resistance to activated protein C: results of a randomized, double blind, placebo-controlled trial. *Br J Haematol* 2001; 115: 415-20.
103. Brown NJ, Abbas A, Byrne D, Schoenhard JA, Vaughan DE. Comparative effects of estrogen and angiotensin-converting enzyme inhibition on plasminogen activator inhibitor-1 in healthy postmenopausal women. *Circulation* 2002; 105: 304-9.
104. Falcó C, Tormo G, Estellés A, España F, Tormo E, Gilabert J et al. Fibrinolysis and lipoprotein(a) in women with coronary artery disease. Influence of hormone replacement therapy. *Haematologica* 2001; 86: 92-8.
105. Grancha S, Estellés A, Tormo G, Falcó C, Gilabert J, España F et al. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) promoter 4G/5G genotype and increased PAI-1 circulating levels in postmenopausal women with coronary artery disease. Influence of hormone replacement therapy. *Thromb Haemost* 1999; 81: 516-21.
106. Cosman F, Baz-Hecht M, Cushman M, Vardy MD, Cruz JD, Nieves JW et al. Short-term effects of estrogen, tamoxifen and raloxifene on hemostasis: a randomized-controlled study and review of the literature. *Thromb Res* 2005; 116: 1-13.
107. Eilertsen AL, Liestøl S, Mowinckel MC, Hemker HC, Sandset PM. Differential impact of conventional and low-dose oral hormone therapy (HT), tibolone and raloxifene on functionality of the activated protein C system. *Thromb Haemost* 2007; 97: 938-43.
108. Daly E, Vessey MP, Hawkins MM, Carson JL, Gough P, Marsh S. Risk of venous thromboembolism in users of hormone replacement therapy. *Lancet* 1996; 348: 977-80.
109. Lowe G, Woodward M, Vessey M, Rumley A, Gough P, Daly E. Thrombotic variables and risk of idiopathic venous thromboembolism in women aged 45-64 years. Relationship to hormone replacement therapy. *Thromb Haemost* 2000; 83: 530-5.
110. Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Vandenbroucke JP. Female hormones and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 201-10.
111. Canonico M, Oger E, Conard J, Meyer G, Lévesque H, Trillot N et al. EStrogen and THromboEmbolism Risk (ESTHER) Study Group. Obesity and risk of venous thromboembolism among postmenopausal women: differential impact of hormone therapy by route of estrogen administration. *The ESTHER Study. J Thromb Haemost* 2006; 4: 1259-65.
112. Canonico M, Oger E, Plu-Bureau G, Conard J, Meyer G, Lévesque H et al. Hormone therapy and venous thromboembolism among postmenopausal women: impact of the route of estrogen administration and progestogens: the ESTHER study. *Circulation* 2007; 115: 840-5.
113. Rexrode KM, Manson JE. Are some types of hormone therapy safer than others? Lessons from the Estrogen and Thromboembolism Risk study. *Circulation* 2007; 115: 820-2.

114. Canonico M, Olié V, Carcaillon L, Tubert-Bitter P, Scarabin PY; EStrogen and THromboEmbolism Risk (ESTHER) Study Group. Synergism between non-O blood group and oral estrogen in the risk of venous thromboembolism among postmenopausal women: The ESTHER study. *Thromb Haemost* 2008; 99: 246-8.
115. Straczek C, Oger E, Yon de Jonage-Canonico MB, Plu-Bureau G, Conard J, Meyer G et al. Study Group. Prothrombotic mutations, hormone therapy, and venous thromboembolism among postmenopausal women: impact of the route of estrogen administration. *Circulation* 2005; 112: 3495-500.
116. Zorio E, Juan Gilabert-Estelles J, España F, Luis A. Ramon LA, Raul Cosin R et al. Fibrinolysis: the key to new pathogenetic mechanisms. *Curr Med Chem* 2008; 15: 923-9.
117. Stephens R.W, Brunner N, Janicke F, Schmitt M. The urokinase plasminogen activator system as a target for prognostic studies in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 52: 99-111.
118. Foekens JA, Peters HA, Look MP, Portengen H, Schmitt M, Kramer MD et al. The urokinase system of plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients. *Cancer Res* 2000; 60: 636-43.
119. Alfano D, Franco P, Vocca I, Gambi N, Pisa V, Mancini A et al. The urokinase plasminogen activator and its receptor: role in cell growth and apoptosis. *Thromb Haemost* 2005; 93: 205-11.
120. Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer* 1997; 72: 1-22.
121. Binder BR, Mihaly J, Prager GW. uPAR-uPA-PAI-1 interactions and signaling: a vascular biologist's view. *Thromb Haemost* 2007; 97: 336-42.
122. Ma Z, Webb DJ, Jo M, Gonias SL. Endogenously produced urokinase-type plasminogen activator is a major determinant of the basal level of activated ERK/MAP kinase and prevents apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. *J Cell Sci* 2001; 114: 3387-96.
123. Loskutoff DJ, Curriden SA, Hu G, Deng G. Regulation of cell adhesion by PAI-1. *APMIS* 1999; 107: 54-61.
124. Czekay RP, Aertgeerts K, Curriden SA, Loskutoff DJ. Plasminogen activator inhibitor-1 detaches cells from extracellular matrices by inactivating integrins. *J Cell Biol* 2003; 160: 781-91.
125. Blasi, F. Proteolysis, cell adhesion, chemotaxis, and invasiveness are regulated by the u-PA-u-PAR-PAI-1 system. *Thromb Haemost* 1999; 82: 298-304.
126. Bajou K, Masson V, Gerard RD, Schmitt PM, Albert V, Praus M. The plasminogen activator inhibitor PAI-1 controls in vivo tumor vascularization by interaction with proteases, not vitronectin. Implications for antiangiogenic strategies. *J Cell Biol* 2001; 152: 777-84.
127. Roca C, Primo L, Valdembri D, Cividalli A, Declerck P, Carmeliet, P. Hyperthermia inhibits angiogenesis by a plasminogen activator inhibitor 1-dependent mechanism. *Cancer Res* 2003; 63: 1500-7.
128. Webb DJ, Thomas KS, Gonias SL. Plasminogen activator inhibitor 1 functions as a urokinase response modifier at the level of cell signaling and thereby promotes MCF-7 cell growth. *J Cell Biol* 2001; 152: 741-52.
129. Castelló R, España F, Vázquez C, Fuster C, Almenar SM, Aznar J et al. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism in breast cancer patients and its association with tissue PAI-1 levels and tumor severity. *Thromb Res* 2006; 117: 487-92.
130. Bruse C, Bergqvist A, Carlstrom K, Fianu-Jonasson A, Lescander I, Astedt B. Fibrinolytic factors in endometriotic tissue, endometrium, peritoneal fluid, and plasma from women with endometriosis and in endometrium and peritoneal fluid from healthy women. *Fertil Steril* 1998; 70: 821-6.
131. Gilabert-Estellés J, Estellés A, Gilabert J, Castelló R, España F, Falcó C et al. Expression of several components of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in endometriosis. *Hum Reprod* 2003; 18: 1516-22.
132. Bruse C, Radu D, Bergqvist A. In situ localization of mRNA for the fibrinolytic factors uPA, PAI-1 and uPAR in endometriotic and endometrial tissue. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 159-66.
133. Gilabert-Estellés J, Estellés A, Gilabert J, Castelló R, España F, Falcó C et al. Expresión tisular de los componentes del sistema fibrinolítico y de las metaloproteasas en la endometriosis. *Rev Iberoamer Fert* 2004; 18: 202-16.
134. Ramón L, Gilabert-Estellés J, Castelló R, Gilabert J, España F, Romeu A et al. mRNA analysis of several components of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in endometriosis using a real-time quantitative RT-PCR assay. *Hum Reprod* 2005; 20: 272-8.
135. Gilabert-Estellés J, Castelló R, Gilabert J, Ramón LA, España F, Romeu A et al. Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors in endometriosis. *Front Biosci* 2005; 10: 1162-76.
136. Gilabert-Estellés J, Ramón LA, España F, Gilabert J, Castelló R, Estellés, A. Expression of the fibrinolytic components in endometriosis. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2006; 35: 136-40.
137. Gilabert-Estellés J, Ramón LA, España F, Gilabert J, Vila V, Réganon E et al. Expression of angiogenic factors in endometriosis: relationship to fibrinolytic and metalloproteinase systems. *Hum Reprod* 2007; 22: 2120-7.
138. Kobayashi H. Invasive Capacity of Heterotopic Endometrium. *Gynecol Obstet Invest* 2000; 50: 26-32.

SIMPOSIOS

Avances en el manejo de los síndromes linfoproliferativos con expresión leucémica no LLC

COORDINADOR: E. GONZÁLEZ-BARCA. *Barcelona*

Resumen del simposio

Los síndromes linfoproliferativos crónicos (SLPC) son un conjunto heterogéneo de neoplasias de linfocito B o linfocito T maduro que se caracterizan por la presencia de células tumorales en la sangre. Generalmente tienen una morfología y un inmunofenotipo que permiten clasificarlos y diferenciarlos unos de otros, aunque a veces el diagnóstico diferencial es complicado. La leucemia linfática crónica B (LLC) es el SLPC más frecuente, con una incidencia de unos 3 casos /100.000/año. El resto de SLPC son poco prevalentes. Según la clasificación de la OMS podemos considerar SLPC no LLC las siguientes entidades:

1. Neoplasias de linfocito B:

- Leucemia prolinfocítica B
- Linfoma linfoplasmacítico/Macroglobulinemia de Waldenström
- Linfoma esplénico de la zona marginal
- Tricoleucemia

2. Neoplasias de linfocito T:

- Leucemia prolinfocítica T
- Leucemia de linfocitos grandes granulados
- Leucemia de células NK agresiva
- Leucemia/Linfoma T del adulto

Algunos linfomas nodales, como el linfoma folicular o el linfoma del manto, pueden tener también expresión en sangre periférica, y algunos linfomas cutáneos T tienen también células tumorales sanguíneas (síndrome de Sezary).

Por otra parte, podemos encontrar poblaciones linfoides B clonales en la sangre de individuos sanos. Son las denominadas “proliferaciones linfoides precoces”. En algunos casos, estas proliferaciones clonales evolucionan a un SLPC, pero en otros pueden revertir y desaparecer.

En este simposio se presentarán las últimas novedades de dos SLPC no LLC: el linfoma esplénico de la zona marginal (LEZM) y la leucemia prolinfocítica T (LPL-T), de los que en los últimos años se han conocido nuevos mecanismos etiopatogénicos y se han introducido nuevos tratamientos.

El LEZM suele presentarse con esplenomegalia y linfocitosis. Para su desarrollo parece importante la presencia de un estímulo antigénico continuado, ya que se asocia con la hepatitis C y con la esplenomegalia malarica. Un 45% de los casos tienen una pérdida de la región 7q22-36, zona donde se ha encontrado una alta proporción de micro-ARN. El tratamiento más adecuado aún está discutido. La esplenectomía ha sido el tratamiento estándar en estos pacientes, pero el rituximab ha demostrado una alta eficacia con escasa toxicidad. Todavía se están definiendo los factores pronósticos y los criterios de respuesta para esta entidad.

La LPL-T es una entidad poco frecuente, pero muy agresiva clínicamente. Suele presentarse con una linfocitosis por encima de $100 \times 10^9/L$, esplenomegalia y afectación cutánea. No se conoce su etiología. Las alteraciones en el cromosoma 14, que dan lugar a la activación de la familia del oncogén *TCL1*, el reordenamiento del oncogén *MTCP1* y la inactivación del gen *ATM* juegan un papel en su desarrollo. Hoy en día, el mejor tratamiento para la LPL-T es el Campath-1H, con el que se consigue una alta tasa de remisiones, pero de corta duración, por lo que ha de considerarse la consolidación con trasplante de precursores hematopoyéticos.

Finalmente, se presentarán dos comunicaciones orales sobre SLPC no LLC, una sobre la incidencia y las características de las proliferaciones linfoides clonales precoces en individuos sanos, y otra sobre las alteraciones citogenéticas y su valor pronóstico en una serie de 145 casos de linfoma del manto.

ASPECTOS BIOLÓGICOS DEL LINFOMA ESPLÉNICO DE LA ZONA MARGINAL

M. MOLLEJO¹, P. ALGARA¹,
E. RUIZ-BALLESTEROS¹,
A. ARRIBAS¹, M.Á. PIRIS²

¹Hospital Virgen de la Salud. Toledo. ²Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO). Madrid

Introducción

El linfoma esplénico de la zona marginal (LEZM) es una neoplasia de células B pequeñas, reconocida como entidad clínico-patológica en la clasificación de la OMS, que comprende menos del 2% de las neoplasias linfoides. Es una enfermedad que suele afectar a individuos mayores de 50 años, y presentarse clínicamente con esplenomegalia, infiltración de médula ósea y de sangre periférica. Se caracteriza por presentar un curso clínico bastante indolente o poco agresivo¹.

El término “linfoma esplénico de la zona marginal” fue introducido por Schmid *et al.* en 1992 en una descripción de cuatro casos.

Zona marginal

La zona marginal normal fue descrita inicialmente en el bazo, como una zona periférica al manto folicular y formada por células de tamaño medio con citoplasma claro. Las células de la zona marginal esplénica son CD20+, CD79a+, IgM+, CD21+, fosfatasa alcalina+, CD23-, Bcl6-, y IgD- o débilmente positivo. IRTA1 se ha descrito asociado a estas células. Células de la zona marginal también han sido descritas en ganglios linfáticos, especialmente en los que drenan mucosas, con un fenotipo y topografía similar a la esplénica. Por el análisis de mutaciones somáticas de genes IgVH, las células de la zona marginal son mayoritariamente células B de memoria, con un pequeño porcentaje de células *naïve*, probablemente relacionadas con respuesta timoindependiente de tipo 2, como a los polisacáridos de la cápsula bacteriana.

Recientemente se ha descrito el perfil de expresión génica de los diferentes compartimentos de células B en los órganos linfoides (zona marginal, manto y centro germinal), identificando grupos de genes implicados en la proliferación, supervivencia y maduración de las células B. Así, el perfil de expresión génica de la zona marginal incluye: a) genes que promueven la quiescencia celular; b) genes implicados en la apoptosis, como Bcl2, SODD, CARD11, NMH2, NMH3;

c) genes que codifican citoquinas, como CXCL12, CCL3, CCL14, CCL3, CXCL13, CCL5; d) genes asociados a INF, como AIM2, IFNGR1, IFNAR-1, IFNAR-2, IL-7 compatibles con su rápida respuesta a infecciones; e) matriz extracelular estroma: COL3A1, COL14A1, COL16A1, COL6A3, MMP12; y f) otros como BCL11A².

Diagnóstico

El diagnóstico se basa en la combinación de rasgos morfológicos, fenotípicos y citogenéticos del tumor en sangre periférica, en la médula ósea o en el bazo cuando se realiza esplenectomía³.

La morfología del tumor en el **bazo** se caracteriza por un infiltrado linfoide micronodular centrado en la pulpa blanca, con infiltración variable de la pulpa roja, diferenciación marginal y reemplazamiento folicular por células neoplásicas. Los nódulos están formados por un componente interno de linfocitos pequeños situado en la zona de las células del manto que rodea y reemplaza el centro germinal reactivo y un componente externo de células de mediano tamaño con citoplasmas claros, incluyendo alguna célula grande con nucléolo prominente. En la pulpa roja la infiltración se observa a nivel de los cordones y los senos.

No es raro encontrar histiocitos epiteloideos acompañando al tumor y numerosos linfocitos T acompañantes.

Algunos casos de LEZM muestran diferenciación plasmacítica, con paraproteína sérica. En estos casos, las células linfoplasmacíticas o plasmáticas se localizan en la zona marginal, pulpa roja o característicamente en los centros germinales.

El fenotipo de este tumor es CD20+, CD3-, CD23-, CD43-, IgD+, CD5-, CD10-, Bcl6-, Bcl2+, ciclina D1-, p27+. DBA44 es positivo en un pequeño porcentaje de los casos. La tinción con Bcl2 pone en evidencia el reemplazamiento folicular de las células del centro germinal Bcl2- por células Bcl2+ tumorales.

El índice proliferativo es bajo, y la tinción con MIB1 muestra un patrón en diana, destacando el crecimiento tumoral en la zona marginal, y una alta fracción de crecimiento en el centro germinal reactivo residual.

El tumor en la **médula ósea** muestra un patrón de infiltración en nódulos intertrabeculares e intrasinusoidal demostrada con inmunotinción para CD20. Este patrón morfológico, bastante característico, sugiere el diagnóstico de este tipo de linfoma.

La mayoría de la infiltración neoplásica en la **sangre periférica** está formada por linfocitos vellosos, pero además suelen observarse linfocitos B pequeños y linfocitos de tamaño intermedio semejantes a las denominadas células B “monocitoides”. Aunque la pre-

sencia de células vellosas es frecuente en los LEZM, lo que justifica su clásica denominación de “linfoma esplénico con linfocitos vellosos”, se ha comprobado que no son diagnósticas de esta entidad puesto que se pueden ver en otras enfermedades. El fenotipo por citometría del tumor es CD20+, CD22+, CD24+, CD27+, FMC7+, IgD+, IgM+, DBA44 (75%), CD11c (50%). Expresión de CD23, CD5, CD103 y CD25 es poco frecuente.

El patrón histológico en los **ganglios linfáticos** también es bastante característico. Presentan un patrón de infiltración vagamente nodular, por centrarse el tumor en los folículos preexistentes, como sucede en el bazo. La citología tumoral está formada fundamentalmente por el componente de linfocitos pequeños y por blastos salpicados. La zona periférica de diferenciación marginal no suele verse en los ganglios.

Diagnóstico diferencial

El diagnóstico diferencial de LEZM de otros linfomas B de células pequeñas requiere la integración de datos clínicos, morfológicos y moleculares. Rasgos morfológicos presentes en los LEZM como patrón micronodular y diferenciación marginal en el bazo se pueden observar en otras condiciones, como linfoma folicular y linfoma del manto. En tales circunstancias la expresión de Bcl6 y CD10 permite el diagnóstico diferencial con linfoma folicular y la expresión de ciclina D1 con el manto. Además, el estudio de la t(14;18) y la t(11;14) ayuda al diagnóstico correcto de estas entidades.

Aunque la infiltración esplénica por la leucemia linfocítica crónica (LLC-B) suele mostrar un patrón de infiltración difuso, localizado predominantemente en la pulpa roja con borramiento de los folículos linfoides, ocasionalmente muestran un patrón micronodular con diferenciación marginal. En estos casos, la coexpresión de CD23, CD5, CD43 y de IgD con un bajo índice proliferativo, sin patrón anular, favorece el diagnóstico de LLC-B.

Más difícil es el diagnóstico diferencial con el linfoma linfoplasmacítico, puesto que los LEZM pueden mostrar diferenciación plasmacítica, con paraproteína sérica. Un patrón de infiltración mixto, en pulpa blanca y roja, con agregados periarteriolares de linfocitos pequeños, células plasmocitoides e inmunoblastos, junto con ausencia de diferenciación marginal apuntan hacia el diagnóstico de linfoma linfoplasmacítico.

Aunque poco frecuente, a veces se plantea diagnóstico diferencial entre linfoma marginal de tipo MALT infiltrado en el bazo y LEZM. Rasgos útiles son la ausencia de la t(11;18) y la expresión de IgD en el LEZM.

Alteraciones citogenéticas y moleculares

Mediante estudios citogenéticos y moleculares de pérdida de heterocigosidad (LOH: *low of heterozygosity*) se ha mostrado que el 45% de los LEZM tienen una pérdida de la región 7q22-36^{4,5}. Este porcentaje es significativamente superior en los LEZM respecto a otros linfomas B de células pequeñas.

Otras alteraciones cromosómicas encontradas han sido las siguientes: +3, +5, +9q, +12q, +18, +20q, t(6;14)(p12;q32), t(10;14)(q24;q32) y t(2;7)(p12;q22). Se ha observado delección de 17p13 (P53) en el 3-17% de los casos.

Los datos obtenidos mediante hibridación genómica comparativa muestran ganancias que afectan a 3q, 5q, 12q, 20q, 9q y 4q. Las pérdidas más frecuentes son en 7q y 17p⁶. Las amplificaciones son poco frecuentes, destacando las regiones 3q26-q29, 5p11-p15 y 17q22-q25⁶. Las pérdidas génicas por CGH se asocian a peor pronóstico.

Estudios mediante *arrays*-CGH han confirmado la delección de 7q y se han descrito delecciones en 13q14.2 y 16p12⁷.

Con respecto a la frecuencia de mutaciones de p53, en general es baja (4,5%), y la implicación de genes supresores como p16, muy rara. A diferencia de los linfomas MALT, no se ha demostrado inestabilidad de microsátélites.

Análisis de mutaciones somáticas han mostrado un 51% de casos mutados en el gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgVH), y un 13% de casos con mutaciones en Bcl-6. Un alto porcentaje de tumores utilizan la subfamilia VH1-2, sugiriendo que este tumor deriva de una seleccionada subpoblación de linfocitos B⁸.

Estudios de expresión génica han mostrado que la firma molecular de este tumor incluye genes implicados en la regulación de la apoptosis, BCR, TNF, y activación de NF-κB como SYK, BTK, BIRC3, TRAF3, TRAF5, CD40 y LTB; y genes asociados con el microambiente esplénico como SELL y LPXN. Otros genes implicados en este tumor son los oncogenes ARHH y TCL1⁹. La sobreexpresión de TCL1 está asociada con la vía de señalización AKT1 descrita por Thieblemont *et al.*¹⁰. Otros genes sobreexpresados son AP-1 y Notch 2¹¹.

Además, se ha comprobado disminución de expresión de genes localizados en la región 7q32 frecuentemente perdida, como CAV1, CAV2 y GNG11⁹.

En la región donde se localiza la alteración molecular más frecuente de estos tumores, la delección de 7q32, se ha encontrado una alta proporción de miRNA. En un estudio se ha demostrado una disminución de la expresión de los miRNA 29a y miRNA 29b en linfomas esplénicos de la zona marginal en

relación con bazo normal. Estos miRNA son candidatos reguladores de la expresión de TCL1, oncogén descrito en la firma molecular de este tumor¹².

Patogénesis. Origen celular

El origen celular del LEZM es objeto de controversia. Aunque el nombre sugiere una relación con zona marginal normal, la ausencia en la mitad de los casos de mutaciones del gen de las inmunoglobulinas, la ausencia de diferenciación marginal fuera del bazo y la expresión de IgD plantean la posibilidad que este tumor derive de una subpoblación celular de la zona marginal aún no caracterizada. La sobreexpresión de Notch 2 que induce diferenciación marginal apoya esta idea.

El uso preferencial de la subfamilia VH1-2 en los estudios de mutaciones somáticas del gen de la IgVH sugiere la existencia de algún antígeno que desempeñe un papel en el desarrollo y proliferación de las células tumorales⁸. En este sentido, se ha demostrado una relación entre el virus de la hepatitis C y LEZM, lo cual sugiere que antígenos virales pueden estar implicados en la patogenia de este tumor¹³. La relación entre LEZM y la esplenomegalia hiperreactiva por malaria es otro dato a favor del papel de agentes infecciosos en la patogenia del LEZM^{14,15}.

Factores pronósticos

El LEZM es un tumor de bajo grado con una probabilidad de supervivencia a los 5 años del 65% (para pacientes diagnosticados después de esplenectomía) y 78% (para los pacientes diagnosticados como portadores de linfomas esplénicos con linfocitos vellosos). Estas diferencias dependen probablemente del incompleto solapamiento entre estas dos entidades y al peor estatus de los pacientes que requieren esplenectomía¹⁶.

Los estudios realizados con series grandes de pacientes establecen que los factores pronósticos clínicos adversos derivan de gran masa tumoral y pobre estado general. Entre los factores biológicos asociados con curso clínico adverso, destacan alteraciones de p53, delección de 7q, alto índice proliferativo y sobreexpresión de genes de la ruta NF- κ B.

Conclusiones

La falta de un marcador molecular específico del linfoma esplénico de la zona marginal dificulta el diagnóstico diferencial de otros linfomas B de células pequeñas, especialmente linfoma folicular y linfoma

linfoplasmacítico. Por otro lado, como sucede con otros linfomas de bajo grado, existen casos con una clínica indolente y otros pacientes con un curso clínico agresivo. Los estudios moleculares están aportando importante información sobre genes y vías implicadas en este tumor, información cuyo desarrollo facilitará marcadores diagnósticos y pronósticos de aplicación en la práctica clínica.

Agradecimientos

Estos estudios han sido financiados en parte por proyectos del Ministerio de Sanidad y Consumo (FIS PI052742, INT07/028) y del Servicio de Salud de Castilla-La Mancha (SESCAM 06047-00, FISCAM GCS-2006-C/06).

Bibliografía

- Jaffe ES-HN, Stein H, Vardiman JW. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. World health organization classification of tumours. Lyon: IARC Press; 2001.
- Shen Y, Iqbal J, Xiao L, et al. Distinct gene expression profiles in different B-cell compartments in human peripheral lymphoid organs. *BMC Immunol* 2004; 5:20.
- Matutes E, Oscier D, Montalbán C, et al. Splenic marginal zone lymphoma proposals for a revision of diagnostic, staging and therapeutic criteria. *Leukemia* 2007.
- Sole F, Woessner S, Florensa L, et al. Frequent involvement of chromosomes 1, 3, 7 and 8 in splenic marginal zone B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 1997; 98: 446-9.
- Sole F, Salido M, Espinet B, et al. Splenic marginal zone B-cell lymphomas: two cytogenetic subtypes, one with gain of 3q and the other with loss of 7q. *Haematologica*. 2001; 86: 71-7.
- Hernández JM, García JL, Gutiérrez NC, et al. Novel genomic imbalances in B-cell splenic marginal zone lymphomas revealed by comparative genomic hybridization and cytogenetics. *Am J Pathol* 2001; 158: 1843-50.
- Ferreira BI, García JF, Suela J, et al. Comparative genome profiling across subtypes of low-grade B-cell lymphoma identifies type-specific and common aberrations that target genes with a role in B-cell neoplasia. *Haematologica* 2008; 93: 670-9.
- Algara P, Mateo MS, Sánchez-Beato M, et al. Analysis of the IgV(H) somatic mutations in splenic marginal zone lymphoma defines a group of unmutated cases with frequent 7q deletion and adverse clinical course. *Blood* 2002; 99: 1299-304.
- Ruiz-Ballesteros E, Mollejo M, Rodríguez A, et al. Splenic marginal zone lymphoma: proposal of new diagnostic and prognostic markers identified after tissue and cDNA microarray analysis. *Blood* 2005; 106: 1831-8.
- Thieblemont C, Nasser V, Felman P, et al. Small lymphocytic lymphoma, marginal zone B-cell lymphoma, and mantle cell lymphoma exhibit distinct gene-expression profiles allowing molecular diagnosis. *Blood* 2004; 103: 2727-37.
- Troen G, Nygaard V, Jenssen TK, et al. Constitutive expression of the AP-1 transcription factors c-jun, junD, junB, and c-fos and the marginal zone B-cell transcription factor Notch2 in splenic marginal zone lymphoma. *J Mol Diagn* 2004; 6: 297-307.
- Ruiz-Ballesteros E, Mollejo M, Mateo M, Algara P, Martínez P, Piris MA. MicroRNA losses in the frequently deleted

- region of 7q in SMZL. *Leukemia* 2007; 21: 2547-49.
13. Saadoun D, Suárez F, Lefrere F, et al. Splenic lymphoma with villous lymphocytes, associated with type II cryoglobulinemia and HCV infection: a new entity? *Blood* 2005; 105: 74-6.
 14. Wallace S, Bedu-Addo G, Rutherford TR, Bates I. Serological similarities between hyperreactive malarial splenomegaly and splenic lymphoma in west Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998; 92: 463-7.
 15. Bates I, Bedu-Addo G, Rutherford TR, Bevan DH. Circulating villous lymphocytes: a link between hyperreactive malarial splenomegaly and splenic lymphoma. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997; 91: 171-4.
 16. Chacón JI, Mollejo M, Muñoz E, et al. Splenic marginal zone lymphoma: clinical characteristics and prognostic factors in a series of 60 patients. *Blood* 2002; 100: 1648-54.

LINFOMA DE LA ZONA MARGINAL ESPLÉNICA. MANEJO CLÍNICO Y TRATAMIENTO

C. MONTALBÁN

Servicio de Medicina Interna.

Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid

El linfoma de la zona marginal esplénica (LZME) es una entidad reconocida recientemente: en 1987 se describió el linfoma esplénico con linfocitos vellosos (LSLV)¹; en 1991 se publicó la primera serie larga²; Schmid utilizó el término *linfoma de la zona marginal esplénica* en 1992³ y en 1994 Isaacson describió sus características patológicas⁴. En la clasificación REAL de 1994 el LZME se incluyó como una entidad provisional en la categoría de linfomas de la zona marginal, junto con los de la zona marginal nodal y extranodal (MALT). En la clasificación de la Organización Mundial de la Salud de 2001 ya se acepta como una entidad separada, que puede presentarse con o sin linfocitos vellosos (LZME/LSLV). Sus rasgos clínicos se superponen con los de otros linfomas indolentes con afectación esplénica y leucemización y su escasa frecuencia y la ausencia de patrones inmunofenotípico y citogenético específicos han condicionado gran confusión acerca de su incidencia, historia natural, características clínicas y tratamiento. Para clarificar esta situación el Splenic Marginal Zone Lymphoma Group ha presentado en 2008 una propuesta para establecer criterios diagnósticos morfológicos y clínicos, estadiaje y posibilidades de tratamiento⁵.

Etiología y mecanismos patogénicos

Al menos algunos casos de LZME están relacionados con agentes infecciosos que, a través de estimulación

antigénica mantenida, podrían inducir su aparición. La asociación mejor conocida es con el virus de la hepatitis C (VHC) y aunque no se haya estimado adecuadamente por las diferencias geográficas en la prevalencia del virus, la respuesta del LZME al tratamiento de VHC es una prueba imbatible de su importancia patogénica⁶. Esta asociación se produce, naturalmente, en las zonas geográficas con mayor prevalencia de VHC como en Italia, donde se estima en el 4%, con un marcado gradiente norte-sur y se encuentra en linfomas B difusos de células grandes (LBDCG), linfoplasmocitarios (LLP), MALT extragástricos y especialmente en LZME. La prevalencia de VHC es también muy alta en Japón y en el sur de Estados Unidos, mientras que en Francia, Inglaterra y el norte de Estados Unidos es muy baja (menos del 1%) y también lo es la asociación con LZME.

En España, la prevalencia de VHC en donantes de sangre sanos es de 3,7/100.000 personas/año⁷ y en un estudio caso-control en población hospitalaria (utilizando VHC-ARN) fue del 3,8% en la población control no VIH, del 5,9% en los pacientes con linfoma (aumento de riesgo de 2 veces para la aparición de linfoma en personas con VHC) y del 4% en los casos con LZME⁸. En Italia, en un estudio similar, la prevalencia fue del 5,6% en la población control, del 17,5% en los pacientes con linfoma y del 26% en pacientes con linfomas de la zona marginal⁹. También se ha demostrado un aumento de la prevalencia de VHC en pacientes con linfomas en el estudio europeo multicéntrico *EPI-LYMPH*¹⁰ y en un metaanálisis sistemático¹¹, aunque sin poder determinar específicamente la influencia en el LZME. Con la aproximación contraria, en Italia varios estudios han demostrado VHC en el 19-35% de los pacientes con LZME¹²⁻¹³.

También se encuentra asociación entre malaria y LZME. En 1992 se describieron en Ghana (que es un área hiperendémica para malaria) pacientes con un cuadro idéntico al LSLV¹⁴. Esta situación es muy próxima a la de la esplenomegalia tropical o esplenomegalia malarica hiperreactiva (EMHR). En ambas el tratamiento antimalárico conduce a la mejoría de los síntomas. Aunque en África tropical la EMHR y otros linfomas B son la causa de los dos tercios de la esplenomegalia masiva, la dificultad para hacer estudios adecuados y la presencia de múltiples infecciones coexistentes (malaria, VHC, hepatitis B crónica [HBC], parásitos) hacen muy difícil la valoración clínica y epidemiológica. La exposición crónica a los diferentes tipos de *Plasmodium* condiciona un intenso estímulo antigénico con proliferación policlonal y eventual transformación clonal que daría lugar a EMHR y progresión a LSLV. La malaria (especialmente la causada por *P. malariae*) puede mantener infección latente y esplenomegalia asintomáticas durante años, pero puede reactivarse y dar lugar a fiebre y citopenias. En algunos de estos casos puede aparecer LZME/LSLV y si se

hace esplenectomía para diagnóstico o tratamiento puede causar un cuadro de malaria aguda grave, si no se realiza tratamiento previo con antimaláricos. Hay que tener en cuenta esta posibilidad en los países desarrollados, donde se encuentra con frecuencia creciente esplenomegalia masiva en emigrantes o viajeros provenientes de África tropical.

En España, en un estudio en población hospitalaria, se encontró asociación de serología positiva para *Helicobacter pylori* con LZME, con un incremento de riesgo de 3 veces para los positivos¹⁵.

Características clínicas

Aunque su frecuencia se ha estimado en el 1% de las neoplasias linfoides, esta cifra está por debajo de la real porque la ausencia de criterios específicos ha hecho que muchos casos de LZME se diagnostiquen como LLC o linfoma leucemizado. La mejor sistemática de estudio ha hecho aumentar su frecuencia, que en Francia representan el 2,7% de los linfomas¹⁶ y en España del 3,4% (R. Arranz, Fundación Leucemia Linfoma, 2005) al 4,8%⁸.

Aparece en personas de edad avanzada (media de 65 años), con esplenomegalia, linfocitosis y citopenias^{5,17}. Una parte de los pacientes están asintomáticos en el momento del diagnóstico. En la fase inicial la esplenomegalia puede estar ausente, ser mínima o detectarse sólo con los métodos de imagen, pero suele ser más o menos progresiva. Se encuentra linfocitosis clonal, generalmente por encima de 5.000/mm³, pero que habitualmente no es masiva. En el 15% de los casos hay linfocitos vellosos, que aparecen en proporción variable del 5 al 90%⁵. En la fase inicial puede no haber linfocitosis (aunque sí población clonal) o ser la linfocitosis la única alteración y, aunque en algunos pacientes puede mantenerse estable, en la mayoría suele ser progresiva. La anemia y la trombopenia son las citopenias más frecuentes y se deben a hipersplenismo más que a ocupación medular. Puede haber también trombopenia autoinmune y anemia hemolítica autoinmune (AHAI) que responden a esteroides y no condicionan el curso de la enfermedad. En el 20% de los casos hay otros fenómenos autoinmunes¹⁶: anticuerpos anti-factores de coagulación, antinucleares, antitiroideos, antimitocondrias y otros, que pueden asociarse o no con enfermedad activa (cirrosis biliar, tiroiditis). En un tercio de los casos aparece un pico monoclonal¹⁶, más frecuentemente IgM. Suele haber elevación de β_2 mg, pero no de lactatodeshidrogenasa (LDH). No suele haber síntomas B sistémicos.

El LZME no se comporta "como un linfoma" y, aunque se pueden encontrar adenopatías pequeñas en el hilio esplénico, no hay adenopatías sistémicas, al me-

nos en las fases iniciales. La médula ósea y el bazo están afectados en la mayoría de los casos¹⁶⁻¹⁸ y probablemente también el hígado, aunque la frecuencia de este dato no se conoce. En situaciones avanzadas pueden aparecer adenopatías y afectación extranodal y seguir un curso agresivo con mala respuesta a quimioterapia y evolución rápida^{7,18}. En un 10-13% de los casos puede haber transformación a LBDCG¹⁹, con elevación de LDH, afectación sistémica, síntomas B, aparición de lesiones ocupantes de espacio en el bazo y comportamiento agresivo. La situación de enfermedad extensa y la transformación pueden aparecer en el momento del diagnóstico o durante la evolución de la enfermedad. Los casos asociados a VHC pueden presentar alteraciones y síntomas debidos a hepatopatía, que se superponen a los del propio LZME. En el 10-28% de los casos la causa de muerte es la aparición de una segunda neoplasia²⁰ y un tercio de los pacientes fallece por enfermedades cardiovasculares u otras patologías concomitantes.

Diagnóstico

En la sangre hay linfocitos con núcleo redondo, cromatina condensada y citoplasma basófilo, pero siempre hay heterogeneidad morfológica, con linfocitos hendidos o plasmocitoides y en el 15% de los casos linfocitos vellosos⁵. Los linfocitos vellosos no son exclusivos de LZME/LSLV y se pueden encontrar en el linfoma del manto (LM), en el linfoma folicular (LF), en la macroglobulinemia de Waldenström (MW), en el linfoma de la pulpa roja esplénica y en la variante de la tricoleucosis. El inmunofenotipo puede habitualmente diferenciar el LZME de estas entidades y en la mayoría de los casos es CD20+, CD22+, CD24+, CD27+, FMC7+, CD79b+ intenso y hay expresión intensa de IgM o IgM más IgD⁵. La gran mayoría es CD10- (lo que lo diferencia del LF) y CD5- (lo que lo diferencia del LM y LLC). Algunos casos pueden expresar CD5 u otros antígenos, pero prácticamente ningún caso tiene *score* de LLC por encima de 2. El aspecto del aspirado medular es variable y no es suficiente para el diagnóstico. Más característicos son los hallazgos de la biopsia medular, donde se encuentra infiltración intrasinusoidal con o sin infiltración intersticial o nodular. La intensidad de la infiltración varía durante la evolución de la enfermedad, mínima en las fases iniciales y progresiva y masiva en las avanzadas²¹. Presenta un inmunofenotipo B maduro, con negatividad para ciclina D1, CD10 y Bcl6, excepto excepciones ya comentadas. Hay restricción de cadenas ligeras y frecuente diferenciación linfoplasmocitaria y plasmocitosis⁵. En el bazo la afectación de la pulpa blanca con patrón micronodular de aspecto "miliar" con infiltración de la

zona marginal folicular es característica. Algunas alteraciones cromosómicas son frecuentes (trisomía del 3) y características (deleción de 7q). El diagnóstico, obviamente, se puede hacer en el bazo, pero los hallazgos morfológicos e inmunofenotípicos de la sangre y de la biopsia medular suelen ser suficientes y en la mayoría de los casos no es necesaria la esplenectomía diagnóstica⁵.

Tratamiento y evolución

El LZME es un linfoma poco frecuente y su historia natural no es bien conocida. La evolución suele ser indolente, pero la mitad de los pacientes van a necesitar tratamiento entre los 12 y los 60 meses después del diagnóstico^{16,17}. El 80% de los pacientes que no necesitó tratamiento en el momento del diagnóstico estaban vivos a los 10 años, frente al 70% de los que sí lo requirieron^{16,13} y el 72% de todos los pacientes lo están a los 13 años²². La indicación de tratamiento es la presentación de citopenias con repercusión clínica (trombopenia, anemia sintomática, infecciones), los síntomas locales derivados de la esplenomegalia o la progresión nodal o extranodal. No se ha demostrado ninguna ventaja de la esplenectomía precoz en la evolución de la enfermedad. La AHAI suele responder a tratamiento con esteroides, independientemente de la situación general de la enfermedad.

Esplenectomía

La esplenectomía ha sido históricamente la primera línea de tratamiento en los pacientes que lo necesitan. La esplenectomía controla las citopenias, pero no hace desaparecer la población clonal, que persiste en la sangre y en la médula ósea. Como en otros linfomas indolentes, la finalidad del tratamiento no es alcanzar una remisión completa (RC) estricta, que sólo se consigue en el 30% de los casos, sino mantener una buena situación hematológica y clínica. En general, tras la esplenectomía cabe esperar el control de la enfermedad, aunque un tercio de los pacientes progresan a los 4-5 años y necesitarán otros tratamientos^{2,16,17}. En una serie de 60 pacientes tratados con esplenectomía (más quimioterapia en 29 de ellos), el 38% alcanzó RC, y el 55% RP; la supervivencia libre de enfermedad fue de 40 meses y la supervivencia media de 103 meses. El 22% de los que tuvieron RC recayó, y el 45% de los que no alcanzaron RC progresó¹⁸. La respuesta a la esplenectomía no depende de que se realice como tratamiento inicial o durante la evolución de la enfermedad² y no parece influir en el pronóstico¹³, aunque en alguna serie los pacientes esplenectomizados tuvieron mejor super-

vivencia²² y hay la experiencia práctica que pacientes en fases avanzadas de la enfermedad que responden mal a la quimioterapia mejoran la respuesta después de la esplenectomía.

La radioterapia puede ser una alternativa a la esplenectomía en los pacientes en que no se puede realizar. Es un procedimiento seguro y efectivo en el control de la esplenomegalia y de las citopenias²³.

Quimioterapia y rituximab

No hay datos precisos en el tratamiento con quimioterapia, ya que toda la información está basada en un número escaso de pacientes. El tratamiento sólo con alquilantes (clorambucil, ciclofosfamida) es poco eficaz y probablemente es mayor la toxicidad que el beneficio. Hay consenso en que no deben utilizarse como droga única⁵. Se han empleado con éxito los análogos de las purinas, especialmente fludarabina, y en una serie de 10 pacientes tratados en primera o segunda línea la respuesta a largo plazo ha sido buena, con enfermedad libre de evento de 4,7 años²⁴. Se ha utilizado deoxicoformicina en primera y segunda línea, con respuesta en 11 de 16 pacientes (3 con RC), enfermedad libre de progresión de 18 meses y supervivencia global de 40 meses²⁵. Aunque hay respuestas aisladas, el tratamiento con 2CdA, al revés de lo que sucede en la tricoleucosis y en los linfomas MALT, sólo ha conseguido respuestas parciales y de corta duración.

En un estudio retrospectivo se valoró la respuesta de 70 pacientes a tres tipos de tratamiento: rituximab, rituximab más quimioterapia (fludarabina con ciclofosfamida o con mitoxantrona) y quimioterapia sola. Se obtuvieron respuestas en el 88%, el 83% y el 55% de los casos, respectivamente, y supervivencia libre de enfermedad a los 3 años en el 86%, 100% y 45%²⁰. En otro estudio, con 4 dosis semanales de rituximab se consiguieron respuestas en 10 de 11 pacientes previamente tratados, con una duración media de 21 meses. A más largo plazo las repuestas se mantuvieron en 5 pacientes entre 46 y 86 meses²⁶. En otra serie, utilizando 6 dosis semanales de rituximab como primera línea de tratamiento en 16 pacientes²⁷ se alcanzó respuesta rápida en el 100%, con 15 RC (88%). En 12 pacientes se hizo tratamiento de mantenimiento con una dosis cada 2 meses durante 1 año, permaneciendo 11 estables después de una media de 28 meses, mientras que 2 que no recibieron mantenimiento recayeron a los 7 y 24 meses. Estos datos indican que el tratamiento con rituximab puede sustituir la esplenectomía como primer paso de tratamiento y muestran la eficacia del tratamiento de mantenimiento, que parece mantener las respuestas²⁷. El rituximab es útil en la AHAI que no respon-

de a los esteroides y en los casos con ambos, AHAI y LZME sintomático²⁷. El tratamiento inicial de la transformación debe ser CHOP-rituximab.

Tratamiento de VHC

En los pacientes con LZME asociados a VHC el tratamiento antiviral puede conseguir la desaparición del linfoma. En una serie de 9 pacientes con LSLV (algunos previamente tratados con esplenectomía o quimioterapia) el tratamiento con interferón α -2b (y ocasionalmente ribavirina) durante 6-12 meses consiguió la desaparición de la viremia y RC⁶. La ampliación de la serie confirmó los resultados: 14 de los 18 (78%) alcanzaron RC hematológica. La respuesta hematológica fue paralela a la disminución de la carga viral y los pacientes con negativización del VHC-ARN mantuvieron RC una media de 62 meses.

Valoración de la respuesta al tratamiento

Los criterios de respuesta varían según las diferentes publicaciones^{2,18,26,27}. En las propuestas de 2008⁵ se considera como RC la desaparición de la esplenomegalia, la mejoría de la hemoglobina (> 12 g/dL), más de 100.000/mm³ plaquetas y más de 1.500 neutrófilos/mm³, la ausencia de población clonal circulante y la ausencia o mínima infiltración medular. Una mejoría del 50% de la esplenomegalia y de las citopenias se acepta como RP. Sin embargo, a pesar de la normalización de las citopenias, en muchos casos se detecta población clonal circulante residual. En la mayoría de los estudios la disminución de la infiltración medular sigue de forma paralela la mejoría de las citopenias y de la linfocitosis, pero después de la esplenectomía la infiltración medular puede progresar^{20,21}. Por el contrario, el tratamiento con rituximab consigue la desaparición de la población residual clonal en sangre^{2,27} y la disminución de la infiltración medular²⁰. Esto último también lo consigue la quimioterapia²¹. También lo consigue el tratamiento antiviral para VHC cuando hay respuesta viral y RC hematológica, aunque suele persistir población clonal residual en sangre periférica.

Factores pronósticos

Los tratamientos han sido heterogéneos y en diferentes situaciones de la enfermedad y es muy difícil valorar factores pronósticos. Han sido factores adversos leucocitosis mayor de 20.000-30.000/mm³, linfocitosis por encima de 4.000/mm³^(16,17), elevación de β_2 mg, la presencia de pico monoclonal y manifestaciones autoinmunes^{16,17} y la infiltración difusa medular²².

Factores clínicos adversos han sido la necesidad de tratamiento en el momento del diagnóstico¹⁶, la utilización inicial de quimioterapia¹⁷, el fracaso de alcanzar RC¹⁸ y la afectación extranodal¹⁸. El IPI no ha tenido valor pronóstico^{13,16}. En el estudio retrospectivo de 309 pacientes del Intergrupo Italiano de Linfomas¹³ sólo tuvieron valor independiente la hemoglobina baja (< 12 g/dL), la albúmina baja ($< 3,5$ g/dL) y la elevación de LDH. La presencia de uno o más de estos factores separa tres grupos de riesgo con supervivencia a los 5 años del 88%, 73% y 50%. El 54% de las muertes debidas a linfoma se produjeron en el grupo de riesgo alto. Factores moleculares de mal pronóstico han sido la presencia de delección 7q, la ausencia de mutaciones somáticas de la IgV_H, la expresión de genes implicados en la vía NF- κ B y la presencia de mutaciones de p53¹⁸.

Cuestiones pendientes

1. Relación del LZME con otros linfomas: MW, linfomas nodales de la zona marginal, linfomas MALT, linfoma de la pulpa roja esplénica y variante de tricoleucocitosis.
2. Sistema adecuado y específico para valorar la extensión y la actividad de la enfermedad. Valoración de las fases de la enfermedad como estadios pronósticos.
3. Utilización de rituximab en primera línea de tratamiento como alternativa a la esplenectomía.
4. Protocolos prospectivos de tratamiento con quimio-inmunoterapia.
5. Factores pronósticos clínicos, citogenéticos y moleculares en pacientes con tratamiento homogéneo.

Bibliografía

1. Melo JV, Robinso DS, Gregory C, Catovsky D. Splenic B cell lymphoma with "villous" lymphocytes in the peripheral blood: a disorder distinct from hairy cell leukemia. *Leukemia* 1987; 1: 294-8.
2. Mulligan SP, Matutes E, Dearden C, Catovsky D. Splenic lymphoma with villous lymphocytes. Natural history and response to therapy in 50 cases. *Br J Haematol* 1991; 78: 206-9.
3. Schmid C, Kirkham N, Diss T, Isaacson PG. Splenic marginal zone cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 1992; 16: 455-66.
4. Isaacson PG, Matutes E, Burke M, Catovsky D. The histopathology of splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Blood* 1994; 84: 3828-34.
5. Matutes E, Oscier D, Montalbán C, Berger F, Callet-Bauchu E, Dogan A, et al. Splenic marginal zone lymphoma proposals for a revision of diagnostic, staging and therapeutic criteria. *Leukemia* 2008; 22: 487-95.
6. Hermine O, Lefrère F, Bronowicki JP, Mariette X, Jondeau K, Eclache-Saudreau V, et al. Regression of splenic lymphoma with villous lymphocytes after treatment of hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002; 347: 89-94.

7. Álvarez M, Oyonarte S, Rodríguez PM, Hernández JM. Estimated risk of transfusion transmitted viral infections in Spain. *Transfusion* 2002; 42: 994-8.
8. De Sanjosé S, Nieters A, Goedert JJ, Domingo-Domenech E, Fernández de Sevilla A, Bosch R, et al. Role of hepatitis C virus infection in malignant lymphoma in Spain. *Int J Cancer* 2004; 111: 81-5.
9. Mele A, Pulsoni A, Bianco E, Musto P, Szklo A, Sanpaolo MG, et al. Hepatitis C virus and B-cell non-Hodgkin lymphomas: an Italian multicenter case-control study. *Blood* 2003; 102: 996-9.
10. Nieters A, Kallinowski B, Brennan P, Ott M, Maynadié M, Benavente Y, et al. Hepatitis C and risk of lymphoma: results of the European multicenter case-control study EPILYMPH. *Gastroenterology* 2006; 131: 1879-86.
11. Gisbert JP, García-Buey L, Pajares JM, Moreno R. Prevalence of hepatitis C virus infection in B-cell non-Hodgkin's lymphoma: systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology* 2003; 125: 1723-32.
12. Arcaini L, Paulli M, Boveri E, Vallisa D, Bernuzzi P, Orlandi E, et al. Splenic and nodal marginal zone lymphomas are indolent disorders at high hepatitis C virus seroprevalence with distinct presenting features but similar morphologic and phenotypic profiles. *Cancer* 2004; 100: 107-15.
13. Arcaini L, Lazzarino M, Colombo N, Burcheri S, Boveri E, Paulli M, et al.; Interguppo Italiano Linfomi. Splenic marginal zone lymphoma: a prognostic model for clinical use. *Blood* 2006; 107: 4643-49.
14. Bates I, Bedu-Addo G, Rutherford T, Bevan D. Splenic lymphoma with villous lymphocytes in tropical West Africa. *Lancet* 1992; 340: 575-7.
15. De Sanjosé S, Dickie A, Álvaro T, Romagosa V, García Villanueva M, Domingo-Domenech E, et al. Helicobacter pylori and malignant lymphoma in Spain. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 944-8.
16. Thieblemont C, Felman P, Berger F, Dumontet C, Arnaud P, Hequet O, et al. Treatment of splenic marginal zone B-cell lymphoma: an analysis of 81 patients. *Clin Lymphoma* 2002; 3: 41-7.
17. Troussard X, Valensi F, Duchayne E, Garand R, Felman P, Tulliez M, et al. Splenic lymphoma with villous lymphocytes: clinical presentation, biology and prognostic factors in a series of 100 patients. *Groupe Francais d'Hematologie Cellulaire (GFHC). Br J Haematol* 1996; 93: 731-6.
18. Chacón JI, Mollejo M, Muñoz E, Algara P, Mateo M, López L, et al. Splenic marginal zone lymphoma: clinical characteristics and prognostic factors in a series of 60 patients. *Blood* 2002; 100: 1648-54.
19. Camacho FI, Mollejo M, Mateo MS, Algara P, Navas C, Hernández JM, et al. Progression to large B-cell lymphoma in splenic marginal zone lymphoma: a description of a series of 12 cases. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 1268-76.
20. Tsimberidou AM, Catovsky D, Schlette E, O'Brien S, Wierda WG, Kantarjian H, et al. Outcomes in patients with splenic marginal zone lymphoma and marginal zone lymphoma treated with rituximab with or without chemotherapy or chemotherapy alone. *Cancer* 2006; 107: 125-35.
21. Audouin J, Le Tourneau A, Molina T, Camilleri-Broët S, Adida C, Comperat E, et al. Patterns of bone marrow involvement in 58 patients presenting primary splenic marginal zone lymphoma with or without circulating villous lymphocytes. *Br J Haematol* 2003; 122: 404-12.
22. Parry-Jones N, Matutes E, Gruszka-Westwood AM, Swansbury GJ, Wotherspoon AC, Catovsky D. Prognostic features of splenic lymphoma with villous lymphocytes: a report on 129 patients. *Br J Haematol* 2003; 120: 659-764.
23. El Weshi A, Ribrag V, Girinski T, El Hajj M, Dhermain F, Bayle C. Low and medium dose spleen radiation therapy are able to induce long-term responses in splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Br J Haematol* 1998; 103: 1212-3.
24. Lefrère F, Lévy V, François S, Delarue R, Ifrah N, Tilly H, et al. Fludarabine therapy in patients with splenic lymphoma with villous lymphocytes: an update. *Leukemia* 2004; 18: 1924-25.
25. Iannitto E, Minardi V, Calvaruso G, Ammatuna E, Florena AM, Mulè A, et al. Deoxycoformycin (pentostatin) in the treatment of splenic marginal zone lymphoma (SMZL) with or without villous lymphocytes. *Eur J Haematol* 2005; 75: 130-5.
26. Bennet M, Yegena S, Dave HP, Schechter GP. Rituximab monotherapy is highly effective in splenic marginal zone lymphoma. *Hematol Oncol* 2008; e-pub on line.
27. Kalpadakis C, Pangalis GA, Dimopoulou MN, Vassilakopoulos TP, Kyrtsolis MC, Korkolopoulou P, et al. Rituximab monotherapy is highly effective in splenic marginal zone lymphoma. *Hematol Oncol* 2007; 25: 127-31.

T-CELL PROLYMPHOCYTIC LEUKAEMIA. CLINICAL AND BIOLOGICAL FEATURES, TREATMENT AND OUTCOME

E. MATUTES

Haemato-Oncology Unit

Royal Marsden Hospital/Institute of Cancer Research, Londres (Reino Unido)

Summary

T-cell prolymphocytic leukaemia (T-PLL) is a rare and aggressive mature T-cell neoplasm with distinct clinical and laboratory features. Although there is certain heterogeneity on the cell morphology and immunophenotype, T-PLL is characterized by distinct chromosomal abnormalities, namely involving chromosomes 14 and 8. Several oncogenes, *TCL1*, *MTCP1* and *ATM* have been shown to be involved in disease initiation or progression. The prognosis and outcome of T-PLL remains dismal with a median survival on the historical series of 7 months. The use of Campath-1H has significantly improved survival but the responses, even being complete to this antibody, are not maintained. Consolidation with stem cell transplant needs to be considered in order to consolidate response.

Introduction

T-cell prolymphocytic leukaemia (T-PLL) is a rare and aggressive T-cell disorder characterised by the proliferation of mature T-lymphocytes. This disease was first described in 1973 in a single patient. The clinical

cal features, the morphologic heterogeneity with the description of variants and the cytogenetics were reported in the 1980s and early 1990s enabling to establish T-PLL as a distinct entity^{1,2}. It is recognised as an entity in the WHO classification³. Other designations used in the past to describe T-PLL are “knobby-type” T-cell leukaemia and T-cell chronic lymphocytic leukaemia.

T-PLL is a rare disease slightly more frequent than B-PLL. There is no evidence that environmental factors or infection by retroviruses play a role in its development. Although there is no familial clustering or predisposition, there is a higher prevalence of T-PLL in ataxia telangiectasia (AT) patients in whom the disease develops at a lower age⁴. Abnormalities of the ataxia telangiectasia mutated (*ATM*) gene localized at 11q23 have been documented by molecular analysis in the sporadic form of T-PLL⁵. This suggests that the *ATM* gene might be an early event in disease initiation; however, an increased risk for developing T-PLL in those heterozygous for the *ATM* gene has not been demonstrated⁵.

We will describe here the clinical, laboratory, diagnostic and biological features, the treatment options and outcome of T-PLL.

Clinical and Laboratory Features

T-PLL affects adults in the 60s and is more frequent in males. Most patients are symptomatic and manifest with abdominal distension resulting from splenomegaly, lymphadenopathy and/or skin lesions (maculo-papular rash, nodules and, rarely, erythroderma); less often, initial manifestations are anaemia or bleeding. Other signs not uncommonly seen during disease progression are effusions and central nervous system involvement manifested by meningeal disease or brain deposits. In a small number (5-10%) of asymptomatic patients, the diagnosis is made on a routine check-up that shows a mild lymphocytosis. This group can be regarded as a smoldering form of T-PLL⁶, but the disease progresses to the more aggressive form in terms of months or, rarely, years.

The blood cell counts show a leukocytosis with lymphocytosis with counts above $100 \times 10^9/L$ in half of the patients. Anemia and/or thrombocytopenia are present in less than a half of the patients and, often, result from both, bone marrow infiltration and hypersplenism. Renal and liver biochemistry may be normal or show a mild impairment; the serum urate and lactate dehydrogenase levels are often elevated. Serology for the HTLV-I and II is consistently negative and DNA analysis fails to demonstrate retroviral sequences in the leukaemic cells including patients of Japanese or Afro-Caribbean descent^{2,7}.

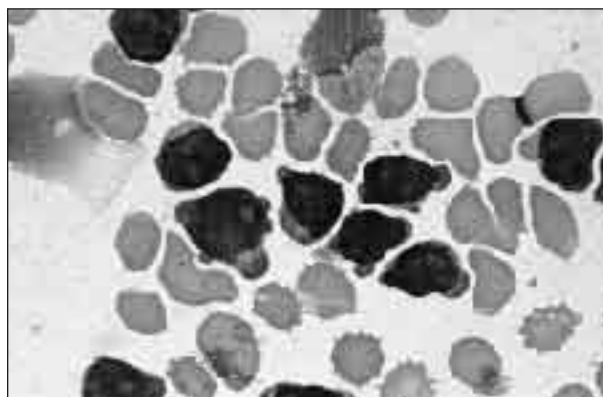


Figure 1. Circulating lymphoid cells with condensed chromatin, small nucleolus and deeply basophilic cytoplasm with blebs in a case of small cell variant of T-PLL.

Diagnosis

The diagnosis of T-PLL is best achieved by compounding morphology, immunophenotype, and genetic features. The two key initial diagnostic investigations are morphology and immunophenotype which unable to establish the diagnosis in the vast majority of cases. Cytogenetics may be required particularly in cases of “smouldering” T-PLL. Although a spectrum of morphologic features has been described, most cases are characterized by small to medium-sized lymphocytes exhibiting regular or irregular nuclear outline, condensed chromatin, single nucleolus and scanty agranular basophilic cytoplasm with protrusions or blebs^{2,3}. Two variants have been recognised: the small cell variant in which the cells are small and have a small nucleolus or this is not visible by light microscopy¹ (Figure 1) and the cerebriform variant in which cells resemble Sezary cells. Both these variants have identical cytogenetics to the typical form³.

Flow cytometry immunophenotyping provides essential diagnostic information by establishing the mature T-cell nature of T-PLL. T polyclonal lymphocytes express various pan T-cell antigens such as CD2, CD3, CD5, anti-TCR and CD7, the latter with strong intensity, and are negative with TdT and CD1a. Membrane expression of CD3 and TCR may be weak or rarely negative^{2,3,6}. Markers linked to T-cell activation (CD25, CD38 and HLA-DR) are either negative or weakly expressed in the membrane. Our experience shows that in two thirds of cases, T-cells exhibit a CD4+/CD8–T-cell phenotype, 23% have coexpression of CD4 and CD8, and in a significant minority of patients the cells are CD4–, CD8+^{2,6}. Natural killer cell associated markers are, as a rule, negative. Expression of TCL-1 has been recently reported in a subset of cases and has been linked to a more aggres-

sive disease⁹. Overall, considering the whole composite phenotype, this is not unique to T-PLL and it emphasizes the need to integrate the immunophenotype with cell morphology for a diagnosis.

The histology of the tissues affected does not allow by itself to establish the diagnosis of T-PLL. The pattern of bone marrow infiltration is variable and the lymph node histology shows paracortical expansion by T-lymphocytes as in other T-cell neoplasms. The spleen histology shows infiltration of the red pulp but, different from large granular lymphocyte (LGL) leukaemia, the picture in T-PLL is invasive infiltrating the spleen capsule and the white pulp¹⁰. Histology of the skin may be helpful in cases which raise problems of differential diagnosis with Sezary syndrome. In T-PLL, there is dermal lymphoid infiltration, preferentially around the appendages without epidermotropism¹¹.

Molecular genetics and pathogenesis

T-PLL has distinct recurrent chromosomal abnormalities. These comprise: 1-*inv(14)(q11q32)* or tandem translocations such as *t(14;14)(q11;q32)* which are seen in 80% of the patients and 2- chromosome 8 abnormalities which often involve the two arms (60% of cases) such as *idic(8)p11*, *iso(8)q*, and *t(8;8)(p11-12;q12)*^{2,3,12}. Other abnormalities reported include: *del(12)p13* detected by fluorescent in situ hybridization studies¹⁴, rearrangements of Xq28 where the *MTCP1* oncogene is mapped and *del(13)*¹⁴. Rearrangements affecting 11q22-23, the site for the *ATM* are rarely detected by cytogenetics but rearrangements and/or missense mutations of this gene have been reported in a substantial number of cases⁵.

The abnormalities of chromosome 14q32.1 result in the activation of the *TCL1* oncogene family due to their rearrangement with the regulatory elements of T-cell receptor genes. A similar picture is seen with rearrangement of *MTCP1* (Xq28), an oncogene that encodes for a protein that has a 60% homology to *TCL1*. The pathogenic role of these two oncogenes is substantiated by experimental animal models^{15,16}. Transgenic mice with *TCL1* and *MTCP1* develop a T-cell leukaemia similar to T-PLL but with a CD8+ CD4- phenotype.

Inactivation of the tumor suppressor gene *ATM* at 11q22-23 has shown too to play a key role in the development of T-PLL. This is substantiated by: 1) AT patients have circulating T-cell clones with similar genetic abnormalities than those seen in T-PLL and are at risk to develop T-PLL; 2) knockout mice with an AT phenotype develop T-cell malignancies and 3) rearrangements and missense mutations of *ATM* gene have been shown present in sporadic T-PLL⁵.

Recent data on gene expression profile in 5 T-PLL with 14q32 abnormalities has shown deregulation of genes involved in lymphomagenesis, cell cycle, apoptosis and DNA repair. These showed a clustering in chromosomes regions: 6p and 8q (up-regulated genes) and 6q, 8p, 10p, 11q and 18p (down-regulated genes). It is likely that these chromosome regions harbour genes involved in the pathogenesis of T-PLL¹⁷.

Prognostic factors

There is little information on factors that may have an influence on the outcome of T-PLL. Immunophenotype and cytogenetics do not have an impact. Hepatomegaly seemed to be a strong predictor for survival² and for response to Campath-1H¹⁸. Response to therapy (2'-deoxycoformycin or Campath-1H) has been shown to be a predictor for disease-free and overall survival^{2,18}. Thus, the median survival of the complete remitters (CR) with Campath-1H is close to 2 years, whereas in the partial responders it is 9 months. A recent study from the MD Anderson has shown that a high WBC, short lymphocyte doubling time, older age, high expression of *TCL1* are associated with an unfavorable outcome⁹.

Treatment

T-PLL has a poor prognosis with resistance to conventional chemotherapy. In the historical series of 78 cases reported in 1991², the majority of patients were treated with alkylating agents, CHOP, and/or with 2'-deoxycoformycin, but results were disappointing. The median survival for this group was just 7 months. Most patients did not respond and one-third experienced transient responses to CHOP. 2'-deoxycoformycin resulted in a higher response rate (45%), with a 9% CR rate². The efficacy of 2'-deoxycoformycin was substantiated later in a study that included 55 patients. Information is scanty on the efficacy of cladribine and fludarabine.

At present, the best treatment for T-PLL is Campath-1H against the CD52 antigen. An update of our early results¹⁸ in 44 patients, the majority of whom had been previously treated shows a CR rate of 63%. The higher response rate with Campath-1H has resulted in a survival benefit with a median survival of 2 years for patients achieving a CR and only 4 months for the non-responders. A retrospective multicentre analysis of 76 patients with T-PLL (which included 18 of our patients) reported a 51% overall response rate with a 39% CR. A recent pilot study in our unit evaluating subcutaneous Campath-1H sug-

gests that this form of delivery is not as effective as IV in T-PLL. Other schedules have been explored in T-PLL. Data from the German CLL Study Group using fludarabine, mitoxantrone and cyclophosphamide (FMC) followed by Campath consolidation in 18 T-PLL has shown a response of 86%¹⁹.

Despite the high CR rate to Campath-1H, patients relapse and there is no plateau. Therefore there is a need for new strategies to consolidate responses with stem cell transplantation (SCT). In a study of 16 patients who were in first/second CR or had a PR following Campath, 11 were consolidated with an autologous SCT and 5 with an allogeneic SCT²⁰. Of the 11 patients who received an autograft 55% remain alive with median disease free survival of 20 months. Of the 5 patients who had an allograft (2 full intensity and 3 reduced intensity conditioning), two patients died from transplant related mortality and both had full intensity conditioning. Therefore, autologous SCT increases disease free survival but over a third of patients still relapse. Although allogeneic SCT seems superior, the transplant related mortality with full intensity conditioning is high, and reduced intensity conditioning should be explored.

Conclusions

Major advances have been made that have allowed a better understanding of the biology and pathogenesis of T-PLL. A number of onco-genes (*TCL1*, *MTCP1*, *ATM*) are involved in the disease initiation and/or progression. The outcome of T-PLL patients is very poor and management of these patients remains a challenge to the clinicians. Treatment with Campath-1H has significantly improved the outlook of T-PLL but despite of the high CR rate to this antibody, most patients relapse. Consolidation with SCT offers new avenues to consolidate responses aiming for a cure of the disease.

References

1. Matutes E, García-Talavera J, O'Brien M, Catovsky D. The morphological spectrum of T-prolymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1986; 64: 111-24.
2. Matutes E, Brito-Babapulle V, Swansbury J, Ellis J, Morilla R, Dearden C, et al. Clinical and laboratory features of 78 cases of T-prolymphocytic leukemia. *Blood* 1991; 78: 3269-74.
3. Catovsky D, Ralfkiaer E, Müller-Hermelink HK. T-cell prolymphocytic leukaemia. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al. (eds.). WHO classification of tumours: tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: IARC Press, 2001: 195-6.
4. Taylor AMR, Metcalfe JA, Thick J, Mak YF. Leukemia and lymphoma in ataxia telangiectasia. *Blood* 1996; 87: 423-38.
5. Yullie MAR, Coignet LJA, Abraham SM, Yaqub F, Luo L, Matutes E, et al. ATM is usually rearranged in T-cell prolymphocytic leukemia. *Oncogene* 1998; 789-96.
6. Matutes E, Brito-Babapulle V, Dearden C, Yullie MR, Catovsky D. Prolymphocytic leukemia of B and T cell types. Biology and therapy. In: Cheson BD (ed.). Chronic lymphoid leukemias, 2nd ed. New York: Marcel Dekker; 2001. p. 525-41.
7. Pawson R, Schulz TF, Matutes E, Catovsky D. The human T-cell lymphotropic viruses types I/II are not involved in T prolymphocytic leukemia and large granular lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1997; 11: 1305-11.
8. Brito-Babapulle V, Maljaie SH, Matutes E, Hedges M, Yullie M, Catovsky D. Relationship of T leukaemias with cerebriform nuclei to T-prolymphocytic leukaemia: a cytogenetic analysis with in situ hybridization. *Br J Haematol* 1997; 96: 724-32.
9. Herling M, Patek KA, Teitell MA, Konopleva M, Ravan-di F, Kobayashi R. et al. High TCL1 expression and intact T-cell receptor signalling define a hyperproliferative subset of T-cell prolymphocytic leukaemia. *Blood* 2008; 111: 328-37.
10. Osuji N, Matutes E, Catovsky D, Lampert I, Wotherspoon A. Histopathology of the spleen in T-cell large granular leukemia and T-cell prolymphocytic leukaemia: a comparative review. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 935-41.
11. Mallett RB, Matutes E, Catovsky D, MacLennan K, Mortimer PS, Holden CA. Cutaneous infiltration in T-cell prolymphocytic leukaemia. *Br J Dermatol* 1995; 132: 263-6.
12. Maljaie SH, Brito-Babapulle V, Hiorns LR, Catovsky D. Abnormalities of chromosomes 8, 11, 14 and X in T-prolymphocytic leukemia studied by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 1998; 103: 110-6.
13. Salomon-Nguyen F, Brizard F, Le Coniat M, Radford I, Berger R, Brizard A. Abnormalities of the short arm of chromosome 12 in T cell prolymphocytic leukemia. *Leukemia* 1998; 12: 972-5.
14. Brito-Babapulle V, Baou M, Matutes E, Morilla R, Atkinson S, Catovsky D. Deletions of D13S25, D13S319 and RB-1 mapping to 13q14.3 in T-cell prolymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2001; 114: 327-32.
15. Pekarsky Y, Hallas C, Isobe M, Russo G, Croce CM. Abnormalities at 14q32.1 in T cell malignancies involve two oncogenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 2949-51.
16. Gritti C, Dastot H, Soulier J, Janin A, Daniel M-T, Madani A, et al. Transgenic mice for MTCP1 develop T-cell prolymphocytic leukemia. *Blood* 1998; 92: 368-73.
17. Durig J, Bug S, Kelin-Hitpass L, Boes T, Jons T, Martin-Su-bero JJ, et al. Combined single nucleotide polymorphism-based genomic mapping and global gene expression profiling identifies novel chromosomal imbalances, mechanisms and candidate genes important in the pathogenesis of T-cell prolymphocytic leukemia with inv(14)(q11q32). *Leukemia* 2007; 21: 2153-63.
18. Dearden CE, Matutes E, Cazin B, Tjonnfjord GE, Parreira A., Nomdedeu B, et al. High remission rate in T-cell prolymphocytic leukemia with CAMPATH-1H. *Blood* 2001; 98: 1721-6.
19. Hopfinger G, Raymonde B, Eichhorst B, Cramer P, Kandler G, Fingerle-Rowson G, et al. T-PLL 1 protocol of the German CLL Study Group (GCLLSG) a prospective phase 2 trial of fludarabine phosphate, mitoxantrone and cyclophosphamide (FCM) followed by alemtuzumab consolidation as first line treatment in T-PLL. *Blood* 2007; 106 (abstract 2039).
20. Dunganwalla M, Matutes E, Dearden CE. Prolymphocytic leukaemia of B and T-cell subtype: a state of the art paper. *Eur Journal Haematolog* 2008 (in press).

La leucemia aguda en el anciano: cómo y cuándo tratar

COORDINADOR: M. BARRIOS. *Málaga*

Resumen del simposio

Más de la mitad de las leucemias agudas (LA) se diagnostican en sujetos mayores de 65 años. Además, la incidencia de esta enfermedad en ancianos aumenta a un ritmo superior al que se observa en sujetos más jóvenes. Sin embargo, el progreso alcanzado en el tratamiento de la LA en los últimos años no parece haber alcanzado a los pacientes de mayor edad, cuyos resultados en cuanto a supervivencia son los más pobres (de apenas unos meses) y permanecen estables desde hace décadas.

Los protocolos utilizados con éxito en otros grupos de edad se enfrentan a pacientes más vulnerables y con mayor riesgo de complicaciones (infecciosas, tóxicas, etc.), así como a una enfermedad de características biológicas menos favorables (menos marcadores de buen pronóstico, menos sensibilidad al tratamiento, más alteraciones citogenéticas desfavorables, etc.). La utilidad indiscutible del trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) para mejorar el pronóstico del paciente con LA se convierte también en una opción limitada para los pacientes ancianos.

Al tratarse de una enfermedad con una expectativa de vida de pocos meses tras el diagnóstico, la renuncia al tratamiento condena al paciente a una supervivencia corta, por lo que la mejora en la calidad de vida se convierte en el objetivo principal para un gran número de pacientes. El tratamiento agresivo (incluso adaptado a la edad) pone en riesgo este objetivo, al aumentar el período de hospitalización y las complicaciones, sin producir modificaciones significativas en la supervivencia. Sin embargo, el valor de la remisión completa en los pacientes en que ésta se alcanza es similar al de los restantes grupos de edad y permite predecir supervivencias más prolongadas. Por esta razón, la selección correcta del paciente con capacidad para recibir tratamiento constituye el primero de los retos en el paciente anciano. En este sentido, la superioridad de la citarabina a bajas dosis frente a la terapia de soporte proporciona una opción poco tóxica y un punto de referencia con el que comparar nuevos tratamientos en este grupo de edad. En los últimos años se han comenzado también a investigar alternativas terapéuticas menos agresivas y mejor toleradas, incluyendo el papel emergente de las terapias dirigidas, lo que ha generado un gran número de estudios prometedores, pero hasta el momento poco concluyentes en su mayoría.

Por tanto, la necesidad de abordar el problema de cómo y cuándo tratar al paciente anciano con LA resulta incuestionable, y se manifiesta en una mayor atención a este tema en diferentes reuniones científicas. El propósito de este simposio ha sido actualizar y ordenar la gran cantidad de información aparecida recientemente sobre las LA en ancianos, así como intentar establecer unas pautas comunes de actuación para ellos, ayudando a seleccionar mejor aquellos susceptibles de tratamiento agresivo. La Dra. Martín Calvo, que desarrolla su trabajo en uno de los grupos más activos a nivel nacional, en el Hospital Reina Sofía de Córdoba, ha realizado una revisión exhaustiva de los resultados de diferentes opciones terapéuticas en la leucemia aguda mielóide en ancianos, con especial énfasis en los datos referidos a los nuevos tratamientos. El Dr. Ribera, una de las personas con más experiencia y con aportaciones más valiosas al tratamiento actual de las LA, procedente del Hospital Germans Trias i Pujol, aporta una visión clarificadora sobre una variedad menos frecuente de LA en los ancianos, pero que presenta importantes novedades en los últimos años: la leucemia aguda linfóide. Finalmente el Dr. Olavarría, que dirige la Unidad de TPH del prestigioso Hammersmith Hospital de Londres, revisará sus resultados y los de otros grupos en este terreno, desarrollando especialmente las nuevas opciones de TPH disponibles para este grupo de pacientes.

Como novedad, en este Congreso Nacional se presentan por primera vez comunicaciones relacionadas con los simposios dentro del programa de los mismos. En este caso, se han seleccionado dos comunicaciones de grupos muy implicados en este tema, que complementan con estudios cercanos las revisiones más

generales de las ponencias. El grupo del Hospital Vall d'Hebron, en Barcelona, que ha venido realizando estudios y propuestas en este campo desde hace años, revisa su experiencia y aporta datos sobre qué pacientes se pueden beneficiar más de un tratamiento agresivo. Por su parte, el Hospital Juan Ramón Jiménez de Huelva ha trabajado también en este campo desde hace tiempo y ha presentado sus resultados en distintos foros especializados; en este caso, resulta interesante su comparación de diversas estrategias de tratamiento para los pacientes más ancianos (mayores de 70 años).

Queda aún mucho trabajo que queda aún por hacer: el diseño de ensayos específicos destinados a estos grupos de edad, el establecimiento de criterios comunes de selección y de respuesta para predecir los mejores candidatos a tratamiento, el desarrollo de las nuevas terapias dirigidas o el papel del mantenimiento para prolongar la respuesta constituyen algunos de los retos inmediatos a considerar en un terreno donde existe un amplio camino por recorrer (al que este simposio espera contribuir), pero también un extraordinario espacio para la mejora.

LA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA EN EL ANCIANO: ALTERNATIVAS DE TRATAMIENTO Y NOVEDADES TERAPÉUTICAS

C. MARTÍN CALVO, J. ROMÁN GÓMEZ,
A. TORRES GÓMEZ

Servicio de Hematología. Hospital Reina Sofía. Córdoba

El criterio generalmente aceptado como definición de leucemia aguda mieloblástica (LAM) del anciano es aquella que ocurre en pacientes ≥ 60 años. La prevalencia de esta hemopatía aumenta con la edad, de forma que su incidencia aumenta más de diez veces entre los 20 y los 65 años de edad, siendo ancianos la gran mayoría de los pacientes con LAM (la edad mediana de presentación es de 70 años)¹. Aunque se han hecho progresos significativos en el tratamiento de los pacientes jóvenes, el pronóstico en el paciente anciano sigue siendo malo, con medianas de supervivencia de sólo meses. En los pacientes jóvenes el tratamiento quimioterápico citotóxico consigue curaciones en el 20-75% de los casos. Sin embargo, en el paciente anciano, con dichos protocolos sólo se consiguen supervivencias en menos del 10% de los casos debido, en primer lugar, a su incapacidad para resistir el tratamiento por el mal estado físico o por la presencia de comorbilidades y, en segundo lugar, a la mayor probabilidad de resistencia terapéutica. En este sentido, múltiples estudios han demostrado que en el paciente anciano la LAM está precedida habitualmente por un síndrome mielodisplásico (SMD), más frecuentemente presenta alteraciones citogenéticas de mal pronóstico (fundamentalmente de los cromosomas 5 y 7) y expresa resistencia a multidroga^{2,3}; la presencia de la glicoproteína-P (también llamada MDR1), que promueve la extrusión de los antraciclínicos usados comúnmente para tratar la LAM, está asociada con una menor tasa de remisión completa (RC)³. No se ha demostrado mayor incidencia de anomalías del gen *FLT-3* ni correlación entre su presencia en el anciano y las tasas de RC ni supervivencia global⁴. El efecto deletéreo de la edad permanece aun después de tener en cuenta esos factores pronósticos². Es más, es importante considerar otras variables, además de la edad, a la hora de decidir el tratamiento en el anciano: quimioterapia estándar, tratamiento investigacional o no tratamiento (sólo cuidados de soporte). Esta decisión es la base del tratamiento de la LAM en el anciano.

Con el régimen conocido como 3+7 (3 días de antraciclínico, daunorrubicina o idarrubicina más 7 días de citarabina), en este grupo de pacientes se obtiene una tasa de RC de no más del 50%, con una probabilidad de supervivencia a los 2 años de alrededor del 20% y del 10% a los 5 años, y una mediana de superviven-

cia de 7-12 meses⁵. El tratamiento con dosis baja de citarabina obtiene una supervivencia media de 9 meses, reduciéndose la estancia hospitalaria y las necesidades transfusionales⁶. Está demostrado que el tratamiento de inducción con dosis baja de citarabina aumenta la supervivencia (RR: 0,61) respecto al tratamiento de soporte, incluyendo hidroxiurea⁷. Los intentos de mejorar los resultados del tratamiento de inducción en los pacientes ancianos mediante el uso de combinaciones que no incluyesen antraciclínicos como fludarabina más citarabina con o sin G-CSF o topotecán más citarabina no han demostrado ventajas sobre el clásico 3+7⁸.

En realidad, los estudios publicados sobre la efectividad de la quimioterapia estándar en el anciano con LAM sobreestiman los datos de supervivencia, dado que existe la tendencia de tratar sólo a los pacientes con mejor estado físico y sin comorbilidades⁹. Por el contrario, es frecuente ver pacientes ancianos con LAM con un curso indolente durante meses. Sin embargo, es probable que en la mayoría de los pacientes ancianos con LAM los resultados de los tratamientos experimentales no sean mucho peores que los obtenidos con el tratamiento estándar o con tratamiento de soporte.

Son hipotéticamente buenos candidatos para tratamiento estándar 3+7 o bajas dosis de citarabina aquellos pacientes de 60-69 años con ECOG menor de 2, cifras de bilirrubina y creatinina normales, no antecedentes de mielodisplasia ni de leucemia secundaria a quimioterapia y sin infecciones pretratamiento: este grupo tiene una supervivencia actuarial a los 2 años del 38%, con un 5% de mortalidad relacionada con el tratamiento, un 70% de tasa de RC y una mediana de supervivencia de 1,1 años. Pero estos pacientes representan una minoría de los pacientes de nuevo diagnóstico, por lo que la mayoría de los pacientes ancianos, particularmente aquellos con mal estado físico o comorbilidades, son candidatos a terapias investigacionales.

En cuanto al tratamiento posremisión, no hay estudios aleatorizados que demuestren cuál es el mejor esquema: mantenimiento frente a consolidaciones. No se ha demostrado ningún beneficio en la supervivencia con regímenes posremisión intensivos¹⁰. Los pacientes ancianos con citogenética favorable tienen una supervivencia a largo plazo del 20-30%, por lo que serían candidatos a terapia intensiva posremisión. Sin embargo, los pacientes con citogenética desfavorable tienen una supervivencia a 5 años de sólo el 2,5%, por lo que son candidatos a terapia experimental o tratamiento paliativo.

Nuevos agentes terapéuticos en la LAM

La mayor esperanza en el tratamiento de la LAM son las llamadas terapias dirigidas (*targeted therapy*), que se basan en aprovechar eventos patofisiológicos de la

leucemogénesis tales como la proliferación incontrolada, el fallo en la diferenciación, los factores de supervivencia mediados por las células estromales y el fallo en la muerte celular programada. Los tratamientos desarrollados en este sentido son: los inhibidores de la vía Ras y de las tirosina quinasas tales como la *fms-like tyrosine kinase 3* (FLT-3); inhibidores de la histona deacetilasa; agentes hipometilantes del ADN, inhibidores de la angiogénesis y los agentes anti-Bcl-2.

Inhibidores de la farnesil-transferasa (FT)

Las mutaciones del *Ras* se detectan en el 10-40% de los casos de LAM. La farnesil-transferasa es la enzima que cataliza la transferencia de una molécula farnesil a los residuos cisteína terminales de las proteínas sustrato, entre las que se incluyen Ras, Rho-b, Rac, etc., involucradas en varias vías intracelulares implicadas en la supervivencia celular, angiogénesis, adhesión celular y mitosis.

El **tipifarnib** (R115777) es un inhibidor oral de la FT. En un estudio multicéntrico de fase II de uso de tipifarnib en 158 pacientes con LAM de mal pronóstico, con una mediana de edad de 74 años, se consiguió un 14% de RC, con una mediana de duración de ésta de 7,3 meses¹¹. Hubo un 47% de efectos adversos no hematológicos. La respuesta es independiente de que *Ras* esté o no mutado. Un estudio de fase I-II que combina tipifarnib con idarrubicina y citarabina en LAM no tratadas mostró una eficacia del 77% de respuestas (65% de RC) con moderada toxicidad¹². Están pendientes los resultados de dos estudios cooperativos norteamericanos: uno compara cuatro dosis y esquemas de tipifarnib en pacientes mayores de 70 años y el segundo explora la eficacia del tipifarnib en pacientes en segunda RC, pero su bajo perfil de toxicidad parece hacer al tipifarnib un fármaco útil para realizar un tratamiento prolongado de control de la enfermedad, aun sin conseguir una respuesta completa.

Inhibidores de tirosina quinasa

La fosforilación enzimática de los residuos tirosina de las proteínas diana de las vías implicadas en la proliferación celular, la apoptosis y la angiogénesis está mediada por las quinasas, fenómeno que subyace a múltiples mecanismos oncogénicos. FLT-3 induce la proliferación celular mediante su unión a un ligando o como consecuencia de la presencia de mutaciones activadoras (presentes en los blastos del 30-35% de los pacientes con LAM). La mutación más común (25-30%) es una duplicación interna en tándem (ITD), y en el resto de los pacientes con LAM (5-10%) tiene lugar una mutación puntual en la región

carboxiterminal (región denominada *loop* de activación). Los estudios *in vitro* demuestran que es importante la secuencia de administración del inhibidor de FLT-3 y de la quimioterapia: el tratamiento primero con el inhibidor seguido por la quimioterapia es antagónico; sin embargo, la administración simultánea o en primer lugar de la quimioterapia tiene efecto antitumoral sinérgico. Existen varios inhibidores de FLT-3: **lestaurtinib** (CEP-701) ya está disponible por vía oral. En un estudio de este fármaco combinado con quimioterapia realizado por Levis *et al.*¹³, mostró actividad inhibitoria frente a FLT-3 en el 76% de los pacientes, hecho correlacionado con la respuesta (58% de los pacientes). Actualmente está en proceso un ensayo aleatorizado de tratamiento con CEP-701 en pacientes con mutaciones de FLT-3 (NCRI AML15). **PKC412** es otro potente inhibidor de FLT-3. Se ha administrado a pacientes con LAM junto o tras la quimioterapia de inducción convencional, habiéndose demostrado seguridad y factibilidad, con una tasa de respuesta significativamente mayor (92% de RC) en pacientes con la mutación de FLT-3 frente al 69% de RC en pacientes sin mutación¹⁴. El CALGB va a liderar un estudio doble ciego con PKC412 en pacientes con leucemia mieloide aguda (AML) no tratados previamente con mutación de FLT-3.

Terapias antiangiogénicas

Los factores angiogénicos y la densidad microvascular de la médula ósea están asociados con la progresión de la leucemia y el fallo del tratamiento en la LAM. La interacción entre factores solubles como VEGF, angiopoyetina 1 y 2, interleuquina 8 y RTK, como receptores VEGF y Tie1 y Tie2, subyace a la compleja biología de la angiogénesis asociada a los tumores. La contribución del VEGF y sus receptores a la patogénesis de la LAM es bien conocida. Entre la primera generación de agentes antiangiogénicos está la **talidomida**, que como agente único tiene escasa actividad en la LAM. La **lenalidomida** es un análogo de la talidomida más potente, si bien su eficacia como monoterapia o en combinación con quimioterapia en la LAM asociada a la del(5q) está por determinar. El anticuerpo monoclonal anti-VEGF **bevacizumab**, combinado con mitoxantrone y altas dosis de citarabina, ha sido utilizado en un estudio de fase II de LAM refractarias con aceptable tasa de RC¹⁵. El **trióxido de arsénico** también posee efecto antiangiogénico en la LAM no promielocítica: existen datos recientes de un estudio que combina esta sustancia con citarabina a dosis bajas en pacientes ancianos con AML (39% de RC con una mediana de duración de la respuesta ≥ 7 meses) o SMD de alto riesgo, sugiriendo suficiente eficacia y tolerabilidad¹⁶.

Inhibidores de proteosomas: bortezomib

Existen estudios de fase I que muestran evidencia de seguridad y eficacia de este inhibidor de proteosomas en combinación con quimioterapia de inducción tipo 3+7 en pacientes ancianos¹⁷.

Terapia antiapoptótica

Oblimersen es un oligonucleótido anti-sentido que inhibe al ARNm que codifica la proteína antiapoptótica Bcl-2. Se ha usado en combinación con la quimioterapia de inducción de AML en ancianos, con un 48% de RC¹⁸. El CALGB está llevando a cabo un ensayo de fase III en pacientes con AML no tratada > 60 años, comparando la inducción 3+7 con o sin oblimersen.

Terapia epigenética

La hipermetilación aberrante del ADN es relevante en la leucemogénesis. La hipermetilación de las islas CpG de los genes promotores induce el silencio epigenético e inactivación de genes supresores de tumores, favoreciendo la génesis tumoral. Ésta puede ser revertida por los llamados agentes desmetilantes. Estos mecanismos epigenéticos que afectan a la expresión de los genes son bastante complejos y están interrelacionados, de forma que la metilación del promotor tiene impacto en el grado de acetilación y metilación de las histonas de la cromatina, fenómeno que también conduce a la pérdida de función de genes importantes en la diferenciación o en la supresión tumoral. En este sentido, la investigación está intentando desarrollar fármacos que reviertan la metilación de las islas CpG y/o que inhiban la deacetilación de las histonas.

Inhibidores de la metilación del ADN, agentes desmetilantes. El uso de inhibidores irreversibles de la ADN-metiltransferasa, como 5-azacitidina y decitabina (5-aza-2'-deoxycytidine), parece una opción prometedora en el tratamiento de SMD y LAM. Estos agentes inactivan a la enzima que metila al ADN, produciendo la hipometilación de los promotores de los genes supresores de tumores y su consiguiente activación. En ensayos clínicos, el uso de 5-azacitidina resulta en una significativa tasa de respuesta, mejora de la calidad de vida y disminución del riesgo de transformación leucémica en caso de los SMD, con mejoría de la supervivencia respecto al tratamiento paliativo. La tasa de respuestas es del 48% y la mediana de supervivencia de 19,3 meses¹⁹. La decitabina también ha demostrado actividad en SMD

y LAM, siendo bien tolerada en pacientes mayores con LAM no candidatos a tratamiento más agresivo, con un 25% de remisiones completas más parciales y efecto antileucémico (reducción de > 25% blastos en médula) en un 29% más, resultando un 54% de respuestas globales²⁰.

Ácido valproico. Inhibe directamente la deacetilasa de histonas. Se ha usado en ensayos clínicos solo o en combinación con el ATRA o con desmetilantes en pacientes con LAM no candidatos a quimioterapia convencional, aunque con escasos resultados²¹.

Inmunoterapia

El mylotarg (gemtuzumab ozogamicina) consta de la calicheamicina, un potente antibiótico antitumoral que se une a la doble cadena de ADN, conjugado a un anticuerpo monoclonal humanizado anti-CD33 que se une específicamente al antígeno CD33 de la superficie de los blastos y células inmaduras de estirpe mielomonocítica, pero no a las células madre normales. Tras ser internalizado, el complejo se une mediante la calicheamicina al ADN, rompiéndolo y provocando la muerte celular. Se ha usado en tres ensayos de fase II que incluyen a 277 pacientes con LAM previamente tratados, alcanzando un 26% de RC+RP²². Los resultados mejoran añadiendo quimioterapia, con hasta un 75% de RC en pacientes mayores con LAM no tratada²³.

Nuevos agentes citotóxicos

La clofarabina es un análogo de nueva generación del nucleósido adenosina, sintetizado con el fin de mantener las mejores propiedades farmacocinéticas de la fludarabina y la cladribina, evitando a la vez la neurotoxicidad dosis-limitante mediante una serie de modificaciones químicas. De esta forma, es un potente inhibidor de la síntesis de ADN y de la enzima ribonucleótido-reductasa, encargada de mantener el *pool* intracelular de nucleósidos. Ha sido demostrada su efectividad en leucemias agudas en recaída y refractarias en niños y adultos. En un estudio de fase II, Faderl *et al.* consiguen un 60% de respuestas en pacientes con LAM mayores de 50 años combinando este fármaco con citarabina²⁴, aunque la supervivencia no aumenta respecto a otros regímenes.

La cloretazina es un agente alquilante con actividad antileucémica. En un ensayo de fase II en pacientes mayores de 60 años con LAM no tratada se obtiene una tasa de respuesta del 50% en LAM *de novo* y del 11% en LAM secundaria. La supervivencia a un año es del 14 y 28% para los que alcanzaron la RC²⁵.

Conclusiones

Dentro del grupo heterogéneo de la LAM se definen subgrupos moleculares que posiblemente se beneficien de las terapias dirigidas. Las vías de investigación darán lugar a una nueva generación de agentes terapéuticos frente a la LAM menos tóxicos y más específicos. Muchas de estas nuevas drogas pueden ser usadas en combinación con otros agentes. Algunos de estos agentes podrían jugar un papel como terapia de mantenimiento para controlar la enfermedad mínima residual, mejorando la supervivencia.

Hay tres opciones de tratamiento en el anciano con LAM: tratamiento estándar (3+7 seguido por 3-6 ciclos de las mismas drogas a menores dosis que en pacientes jóvenes para mantener la remisión), terapia investigacional o tratamiento paliativo. Dado los resultados insatisfactorios con el tratamiento quimioterápico convencional, la mayoría de los pacientes ancianos son candidatos a terapias investigacionales, sobre todo aquellos con factores pronósticos desfavorables, como son edad > 69 años, citogenética adversa, LAM secundaria, mal estado físico, infección o comorbilidades. El tratamiento paliativo debe ser la elección en aquellos pacientes con muy mal estado físico, con anomalías orgánicas graves o edad > 80 años.

Bibliografía

1. Taylor PRA, Reid MM, Star AN, Bown N, Hamilton PJ, Proctor SJ. De novo acute myeloid leukemia in patients over 55-years-old: a population-based study on incidence, treatment and outcome. *Leukemia* 1995; 9: 231-7.
2. Appelbaum FR, Gundacker H, Head DR, Slovak ML, Willman CI, Godwin JE, et al. Age and acute myeloid leukemia. *Blood* 2006; 107: 3481-5.
3. Leith CP, Kopecky KJ, Godwin J, McConnell T, Slovak ML, Chen IM, et al. Acute myeloid leukaemia in the elderly: Assessment of multidrug resistance (MDR1) and cytogenetics distinguishes biologic subgroups with remarkably distinct responses to standard chemotherapy. A Southwest Oncology Group study. *Blood* 1997; 89: 3323-9.
4. Anderson A, Johansson B, Lassen C, Mitelman F, Billström R, Fioretos T. Clinical impact of internal tandem duplications and activating point mutations in FLT3 in acute myeloid leukemia in elderly patients. *Eur J Haematol* 2004; 72: 307-13.
5. Goldstone AH, Burnett AK, Wheatley K, Smith AG, Hutchinson RM, Clark RE. Attempts to improve treatment outcomes in AML in older patients: The results of the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood* 2001; 98: 1302-11.
6. Tilly H, Castaigne S, Bordessoule D, Casassus P, Le Prise PY, Tertian G, et al. Low dose cytarabine versus intensive chemotherapy in the treatment of acute nonlymphocytic leukemia in the elderly. *J Clin Oncol* 1990; 8: 272-9.
7. Burnett AK, Milligan D, Prentice AG, Goldstone AH, McMullin ME, Wheatley K. Low-dose ara-C versus hydroxyurea with or without retinoid in older patients not considered fit for intensive chemotherapy: the UK NCRI AML14 trial. *Blood* 2004; 104: 872a.
8. Estey EH, Thall PF, Cortés JE, Giles FJ, O'Brien S, Pierce SA et al. Comparison of idarubicin+ara-C-, fludarabine+ara-C-, and topotecan + ara-C-based regimens in treatment of newly diagnosed acute myeloid leukemia, refractory anemia with excess blast in transformation, or refractory anemia with excess blast. *Blood* 2001; 98: 3575-83.
9. Mengis C, Aebi S, Tobler A, Dahler W, Martin FF. Assessment of differences in patient populations selected for or excluded from participation in clinical phase III acute myelogenous leukemia trials. *J Clin Oncol* 2003; 21: 2933-9.
10. Rowe JM. Is there a role for post-remission therapy in older adults with acute myelogenous leukemia (AML)? *Leukemia* 2005; 19: 1324-7.
11. Lancet JE, Gojo I, Gotlib J, Feldman EJ, Greer J, Liesveld JL, et al. A phase II study of farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in poor-risk and elderly patients with previously untreated acute myelogenous leukemia. *Blood* 2007; 109: 1387-94.
12. Álvarez RH, Kantarjian H, García-Manero G, Estrov Z, Ravandi-Kashani F, Verstovsek S, et al. Farnesyl transferase inhibitor (Tipifarnib, Zarnestra; Z) in combination with standard chemotherapy with idarubicin (Ida) and cytarabine (ara-C) for patients with newly diagnosed acute myeloid leukaemia (AML) or high risk myelodysplastic syndrome (MDS). *Blood* 2006; 108: 1999a.
13. Levis M, Smith BD, Beran M, Baer MR, Erba HP, Cripe L, et al. A randomized open-label study of lestaurtinib (CEP-701), an oral FLT3 inhibitor, administered in sequence with chemotherapy in patients with relapsed AML harbouring FLT3 activating mutations: clinical response correlates with successful FLT3 inhibition. *Blood* 2005; 106: 403a.
14. Stone RM, Fisher T, Paquette R, Schiller G, Schiffer CA, Enghinger G, et al. Phase IB study of PKC412, an oral FLT3 kinase inhibitor, in sequential and simultaneous combinations with daunorubicin and cytarabine (DA) induction and high-dose cytarabine consolidation in newly diagnosed patients with AML. *Blood* 2005; 106: 404a.
15. Karp JE, Gojo I, Pili R, Gocke CD, Greer J, Guo C, et al. Targeting vascular endothelial growth factor for relapsed and refractory adult acute myelogenous leukaemias: therapy with sequential 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine, mitoxantrone and bevacizumab. *Clinical Cancer Research* 2004; 10: 3577-85.
16. Roboz GJ, Ritchie EK, Allen-Bard S, Curcio TJ, Provenzano JL, Samuel MS, et al. Arsenic trioxide (ATO) is safe and effective in combination with low-dose Ara-C (LDAC) for the treatment of IPSS-2 myelodysplastic syndrome and poor prognosis AML in elderly patients. *Blood* 2005; 106: 2805a.
17. Cortés J, Thomas D, Koller C, Giles F, Estey E, Faderl S, et al. Phase I study of bortezomib in refractory or relapsed acute leukemias. *Clinical Cancer Research* 2004; 10: 3371-6.
18. Marcucci G, Stock W, Dai G, Klisovic RB, Liu S, Klisovic MI, et al. Phase I study of oblimersen sodium, an antisense to Bcl-2, in untreated older patients with acute myeloid leukemia: pharmacokinetics, pharmacodynamics and clinical activity. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3404-41.
19. Silverman LR, McKenzie DR, Peterson BL, Holland JF, Backstrom CL, Beach CL, et al. Further analysis of trials with azacitidine in patient with myelodysplastic syndrome: studies 8421, 8921 and 9221 by the Cancer and leukemia Group B. *J Clin Oncol* 2006; 24: 3895-903.
20. Lübbert M, Rüter B, Claus R, Schmid M, Germing U, Eimermacher H, et al. Continued low-dose Decitabine (DAC) is an active first-line treatment in all cytogenetic subgroups of older AML patients: results of the FR00331 Multicenter Phase II Study. *Blood* 2007; 110: 300a.
21. Kuendgen A, Schimid M, Schlenk R, Knipp S, Hildebrandt B, et al. The histone deacetylase (HDAC) inhibitor valproic acid as monotherapy or in combination with all-trans ret-

- inoic acid in patients with acute myeloid leukemia. *Cancer* 2006; 106: 112-9.
22. Larson RA, Sievers EL, Stadtmauer EA, Lowenberg B, Estey EH, Dombret H, et al. Final report of the efficacy and safety of gentuzumab ozogamicin (Mylotarg) in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first recurrence. *Cancer* 2005; 104: 1442-52.
 23. Eom KS, Kim HJ, Min WS, Lee S, Min CK, Cho BS, et al. Gentuzumab ozogamicin in combination with attenuated doses of standard induction chemotherapy can successfully induce complete remission without increasing toxicity in patients with acute myeloid leukemia aged 55 or older. *Eur J Haematol* 2007; 79: 398-404.
 24. Faderl S, Verstovsek S, Cortés J, Ravandi F, Beran M, García-Manero G, et al. Clofarabine and cytarabine combination as induction therapy for acute myeloid leukemia (AML) in patients > 50 years. *Blood* 2006; 108: 45-51.
 25. Giles F, Rizzieri D, Karp J, Vey N, Ravandi F, Faderl S, et al. Cloretazine (VNP40101M), a novel sulfonylhydrazine alkylating agent, in patients age 60 years or older with previously untreated acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2007; 25: 25-31.

LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA EN PACIENTES DE EDAD AVANZADA: REALIDAD ACTUAL Y EXPECTATIVAS DE FUTURO

J.M. RIBERA, A. ORIOL, J.M. SANCHO, M. MORGADÉS, B. XICOY, M. BATLLE, C. FERRÁ, A. FLORES, S. VIVES, J. JUNCÀ, F. MILLÀ, E. FELIU

Servicio de Hematología Clínica. Institut Català d'Oncologia-Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Badalona. Universitat Autònoma de Barcelona.

Introducción

La leucemia aguda linfoblástica (LAL) es la neoplasia más frecuente en los niños. Su frecuencia es baja en adultos y también es muy poco habitual en los pacientes de edad avanzada. En las últimas décadas se ha logrado una mejoría notable en los resultados del tratamiento de los niños y adolescentes, gracias al tratamiento adaptado al riesgo y a la optimización de las pautas de quimioterapia¹. En cambio, los progresos en los adultos han sido más modestos. A su vez, en la mayor parte de los protocolos y ensayos clínicos en adultos con LAL se excluye a los pacientes de edad avanzada, debido a la presencia de otras enfermedades concomitantes, al mal estado general o a otros criterios de fragilidad y a la peor tolerancia a la quimioterapia. Ello hace que este grupo de pacientes suelen tratarse de forma conservadora e individualizada. Por otra parte, hasta hace bien poco la mayor parte de los

estudios incluían indistintamente pacientes con LAL con cromosoma Filadelfia (LAL Ph+) o sin él. En conjunto, los datos disponibles sobre LAL en pacientes de edad avanzada indican que el pronóstico es malo, con una alta mortalidad durante la fase de inducción, tasas bajas de respuesta a quimioterapia y una elevada frecuencia de recaídas^{2,3}.

Características clínicas y biológicas

El 15-30% de las LAL del adulto se diagnostican en pacientes de más de 60 años. Diferentes estudios han puesto de manifiesto que los pacientes de edad avanzada con LAL presentan características clínicas y biológicas algo diferentes a las observadas en niños y adultos jóvenes^{3,4}. Entre ellas cabe citar menor predominio en varones (la relación varón:mujer disminuye desde 1,75 en los adultos jóvenes a 0,97 en el grupo de edad avanzada), estado general más afectado, menor frecuencia de adenopatías, esplenomegalia o masa mediastínica⁵⁻¹⁰ y menor frecuencia de pacientes con hiperleucocitosis.

Las principales diferencias biológicas de la LAL en los pacientes de edad avanzada son las relacionadas con el inmunofenotipo y, sobre todo, con la citogenética. Así, se ha descrito una menor frecuencia de LAL de línea T (especialmente de los subtipos T maduro y tímico) y mayor frecuencia de LAL común y pre-B^{5,7,8,11-14}. Respecto a la citogenética, el hallazgo más notable es el aumento de frecuencia de LAL con cromosoma Filadelfia (LAL Ph+), que se observa en más de una tercera parte de pacientes de este grupo de edad (35% en el estudio francés, 33% en estudio del CALGB y hasta 53% en el estudio del Southwest Oncology Group)³, claramente superior a la descrita en el grupo de adultos jóvenes (20-25%)^{5,6,10,15-17}. Esta elevada frecuencia de LAL Ph+ es responsable, entre otras razones, de los malos resultados descritos en todas las series publicadas. Otras características citogenéticas diferenciales de los pacientes de edad avanzada son la mayor frecuencia de LAL con cariotipo complejo (un factor pronóstico desfavorable reconocido recientemente en algunos estudios en pacientes jóvenes) y una menor proporción de reordenamientos 11q23⁵.

Tratamiento

El mal estado general y la comorbilidad que presentan muchos pacientes de edad avanzada diagnosticados de LAL son, junto a la mala tolerancia a ciertos citostáticos, las principales limitaciones del tratamiento. La actitud terapéutica a tomar puede variar desde una estrategia conservadora o paliativa, basada en el tratamiento con soporte transfusional o monoquimio-

terapia por vía oral, a estrategias de poliquimioterapia. Los pacientes de edad avanzada incluidos en protocolos terapéuticos reciben por lo general pautas similares a las de los adultos jóvenes, pero a dosis más bajas, lo cual repercute en una disminución sustancial en la frecuencia, calidad y duración de la respuesta. Algunos estudios en los que se han comparado ambas estrategias (quimioterapia intensiva frente a pautas de quimioterapia menos intensiva¹⁸ o frente a estrategias conservadoras¹²) no han encontrado diferencias en términos de tasas de RC alcanzadas o en la supervivencia, lo que pone de manifiesto la necesidad de desarrollar nuevas orientaciones terapéuticas, a ser posible con nuevos fármacos. Estas nuevas pautas y la mejora en el tratamiento de soporte (por ejemplo, mediante el empleo sistemático de factores de crecimiento hematopoyético)¹⁹ podrían cambiar en el futuro el mal pronóstico de estos enfermos. La escasa frecuencia de LAL en pacientes de edad avanzada hace necesaria la investigación de estos tratamientos en el seno de grupos cooperativos.

Resultados de los tratamientos con fármacos convencionales

La mayoría de los estudios publicados son retrospectivos e incluyen un número escaso de pacientes^{5,9,11,18,20}. Por otra parte, en muchos se incluye también a los pacientes con LAL Ph+, cuyo mal pronóstico con pautas basadas únicamente en poliquimioterapia es sobradamente conocido, y que actualmente deben tratarse con protocolos que incluyan inhibidores de las tirosininasas.

Globalmente, la tasa de RC oscila entre un 12 y un 85%, con medianas de supervivencia que oscilan entre 3 y 14 meses en la mayor parte de los estudios publicados^{5-7,9,12-14,21-24} (Tabla 1). Las principales razones que explican estos malos resultados son una elevada resistencia primaria a la quimioterapia y, sobre todo, una alta mortalidad durante la fase de inducción (que oscila entre el 7 y el 42% en los diferentes estudios). El grupo español PETHEMA analizó los resultados de los pacientes tratados con el protocolo LAL-96⁷. La tasa de RC fue del 58%, porcentaje que aumentó a casi un 70% en el grupo de pacientes tratados a partir de 1999, cuando se decidió eliminar del tratamiento de inducción la ciclofosfamida y la asparaginasa debido a un exceso de toxicidad (especialmente hepatobiliar y pancreática). De hecho, la retirada de estos fármacos se asoció a un descenso significativo de la mortalidad precoz (de un 70% a un 22%), a una mayor frecuencia RC y a una mayor probabilidad de supervivencia global (Figura 1). Otros estudios^{5,13} han demostrado que la administración de pautas de quimioterapia adaptadas a la edad (*age-adapted treatment*) pueden mejorar

los resultados del tratamiento en los pacientes de edad avanzada con LAL. Entre los factores que influyen negativamente en la obtención de la RC, cabe citar la respuesta lenta al tratamiento de inducción⁷, la presencia de una cifra de leucocitos superior a $30 \times 10^9/L$ ^{9,22}, el mal estado general²³, la hemorragia en el diagnóstico⁵, los fenotipos pro-B y T²², el género masculino⁹ o la presencia de hipoalbuminemia, hepatomegalia o hiperbilirrubinemia²³.

Un problema frecuente de los tratamientos en la LAL en pacientes de edad avanzada es su poca comparabilidad. Ello, unido al número escaso de pacientes incluidos, hace difícil evaluar la eficacia de los componentes de los mismos. Con el fin de uniformizar en lo posible dichos tratamientos, el grupo de trabajo de la LAL de la European LeukemiaNet ha desarrollado una propuesta de protocolo común para tratar los pacientes de edad avanzada sin criterios de fragilidad (Figura 1), que han adoptado diversos grupos cooperativos, entre ellos el grupo PETHEMA (se puede consultar en www.pethema.org). Además, esta propuesta podría constituir el esqueleto sobre el que podrían evaluarse nuevos fármacos para el tratamiento de la LAL en este subgrupo de pacientes. Por su parte, los pacientes con criterios de fragilidad deben recibir tratamientos destinados a mejorar más la calidad que la cantidad de vida.

Tratamiento de las LAL con cromosoma Filadelfia

Un subgrupo importante de pacientes que merece especial mención es el de los enfermos con LAL Ph+²⁵, ya que representan hasta el 40-50% de pacientes de edad avanzada con LAL. El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos con acondicionamiento mieloablativo es el tratamiento de elección en pacientes jóvenes, mediante el cual es posible alcanzar probabilidades de supervivencia a largo plazo de un 30-65% para pacientes trasplantados en primera remisión completa²⁶. Sin embargo, este procedimiento no es aplicable a los pacientes de edad avanzada debido a la alta mortalidad relacionada con el trasplante. La introducción del primer inhibidor de la tirosininasas de *ABL* – el imatinib – para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica con cromosoma Filadelfia llevó al desarrollo de estudios para evaluar la actividad de dicho fármaco, tanto en pacientes adultos jóvenes²⁷⁻²⁹ como en pacientes de edad avanzada con LAL Ph³⁰⁻³³. En los adultos jóvenes, la administración de imatinib asociado a quimioterapia ha proporcionado mejores resultados que los controles históricos (tratados con quimioterapia estándar), lo que ha llevado a que en la actualidad la combinación de imatinib y quimioterapia sea el tratamiento estándar de este subtipo de LAL.

En la Tabla 2 se reflejan los resultados del tratamien-

Tabla 1. Resultados de los principales estudios del tratamiento de los pacientes de edad avanzada con leucemia aguda linfoblástica

Estudio (referencia)	Número de pacientes	Edad de inclusión (años)	RC (%)	Fracaso del tratamiento (%)	Mortalidad durante la inducción (%)	Mediana de SLE (meses)	Mediana de SG (meses)
Taylor <i>et al.</i> ¹²	19	≥ 60	37	–	16	–	3
Splith-Schwalbe <i>et al.</i> ⁶	24	≥ 60	43	–	37	–	9 (respondedores), 2 (no respondedores)
Bassan <i>et al.</i> ²¹	22	≥ 60	59	14	18	–	12 (respondedores), 1,2 (no respondedores)
Delannoy <i>et al.</i> ¹³	40	≥ 55	85	–	7,5	14	14,3
Gökuşbuğ <i>et al.</i> ²²	63	> 65	48	–	–	–	11
Kantarjian <i>et al.</i> ²³	44	≥ 60	79	–	16	–	–
Pagano <i>et al.</i> ¹⁴	25	> 65	80	–	16	–	–
Thomas <i>et al.</i> ⁵	64	≥ 60	87 ^a -58 ^b	20	11	8,3	7
Robak <i>et al.</i> ⁹	87	≥ 60	45	40	15	6 en respondedores	5
Offidani <i>et al.</i> ²⁴	17	≥ 60	76,5	6	17,5	20	21
Sancho <i>et al.</i> ⁷	33	≥ 55	58	6	36	20	7

^a Para pacientes con tratamiento adaptado a la edad (de 1992 a 1998).

^b Para pacientes tratados con terapia similar a la del adulto joven (de 1987 a 1992).

SLE: supervivencia libre de enfermedad; SG: supervivencia global.

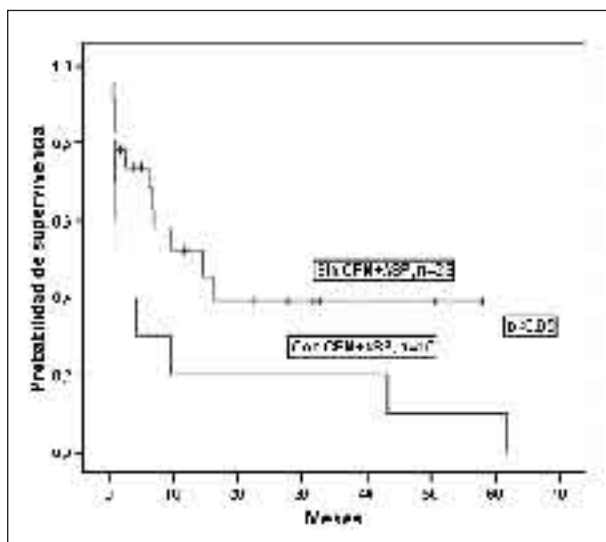


Figura 1. Supervivencia global en pacientes de edad avanzada tratados según el protocolo PETHEMA LAL-96 antes y después de la retirada de la ciclofosfamida (CPM) y asparaginasa (ASP). Con permiso de Sancho *et al.*⁷.

to con imatinib en pacientes de edad avanzada. Delannoy *et al.*³⁰ observaron una mayor tasa de RC y supervivencia en pacientes tratados con una pauta de imatinib y metilprednisolona alternada con quimioterapia respecto a los controles históricos que no recibieron imatinib. Otros dos estudios^{31,32} demostraron que el tratamiento de inducción único con imatinib o en

combinación con glucocorticoides^{31,32} fue capaz de inducir respuestas hematológicas completas en porcentajes cercanos al 100% de los pacientes (incluso con respuesta molecular completa en algún paciente), todo ello con toxicidad aceptable. Sin embargo, la tasa de recaídas en los pacientes tratados con imatinib en monoterapia es muy elevada, de modo que en el único estudio aleatorizado publicado hasta la fecha no se observaron diferencias en la supervivencia libre de enfermedad con respecto a los tratados con quimioterapia adaptada a la edad, sin imatinib³². En el estudio de Vignetti *et al.*³¹, la tasa de RC fue igualmente muy elevada, pero también se siguió de frecuentes recaídas durante el mantenimiento.

Los mecanismos que pueden llevar a las recaídas son diversos, y entre ellos destacan las mutaciones del gen *ABL*, la amplificación de *ABL* o la activación de otras vías alternativas a las derivadas del gen de fusión *BCR-ABL*. Recientemente se ha observado que las mutaciones del gen *ABL* están presentes ya en el momento del diagnóstico hasta en un 40% de pacientes de edad avanzada con LAL Ph+³³, proporción que llega al 80% en el momento de la recaída, lo que indica que durante la administración de imatinib hay una selección de clones con mutaciones que confieren resistencia al citod fármaco. Ello ha motivado que se estén ensayando ya desde el momento del diagnóstico tratamientos con nuevos y más potentes inhibidores de tirosincinasas (nilotinib y dasatinib), cuya eficacia en casos de LAL Ph+ resistente o con intolerancia a imatinib ha sido demostrada en algunos estudios³⁴⁻³⁶. Recientemente se han comunicado los resultados preliminares del estu-

Tabla 2. Resultados de los principales estudios del tratamiento de los pacientes de edad avanzada con leucemia aguda linfoblástica con cromosoma Filadelfia en la era del imatinib

Estudio (referencia)	N	Edad (años)	RC (%)	Fracaso del tratamiento (%)	Mortalidad durante la inducción (%)	Mediana de SLE (meses)	Probabilidad de SLE (%)	Mediana de SG (meses)	Probabilidad de SG (%)
Ottmann <i>et al.</i> ³²	55	≥ 60	96 ^a 50 ^b	0 35	0 8	–	–	–	42 ± 8 (a 2 años)
Delannoy <i>et al.</i> ^{c,30}	30 (29 evaluables)	≥ 55	72	20	6	20,1 (SLR)	58 (SLR)	23	66 (a un año)
Vignetti <i>et al.</i> ³¹	30 (29 evaluables)	> 60	100 ^d	0	0	8 ^e	48 (a un año)	20	74 (a un año)

^a En pacientes tratados con imatinib frente a ^b pacientes tratados con quimioterapia sin imatinib ($p = 0,0001$).

^c En controles históricos tratados sin imatinib la RC fue del 29% ($p = 0,003$) y la SG del 43% ($p = 0,004$).

^d Un paciente de 27 evaluables alcanzó remisión molecular completa.

^e Duración de la respuesta hematológica.

SLE: supervivencia libre de enfermedad; SG: supervivencia global; SLR: supervivencia libre de recaída.

dio del grupo GIMEMA, en el que se administró dasatinib junto a dexametasona a 23 pacientes de edad avanzada con LAL Ph+, en los que se demuestra una tasa de respuesta hematológica del 100%, con una sola recaída y una probabilidad de supervivencia del 90%, aunque con una mediana de seguimiento de 5 meses. La tolerancia fue buena y la tasa de respuesta molecular al final de la inducción fue elevada. Dentro de la European LeukemiaNet está activo un ensayo clínico en el que se combina dasatinib con citostáticos no genotóxicos en pacientes con LAL Ph+ de edad superior a 55 años, con resultados prometedores en cuanto a eficacia (100% de RC) y tolerabilidad en los primeros 18 casos incluidos (P. Rousselot, comunicación personal). Aunque la elevada tasa de RC con los nuevos inhibidores de tirosincinasas era esperable, lo más importante es conocer su capacidad para mantener la RC. Si ello fuera así, se abriría un interesante abanico de posibilidades terapéuticas, entre las que figura el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos con acondicionamiento de intensidad reducida como estrategia de consolidación, que podría seguirse de tratamiento de mantenimiento con inhibidores de tirosincinasas, ya sean aislados o en combinación con otros agentes.

Tratamiento de la leucemia/linfoma de Burkitt

La LAL B madura se observa con muy poca frecuencia en pacientes de edad avanzada. Dado que se trata de una enfermedad altamente curable en niños y adultos jóvenes con pautas específicas de tratamiento, es lógico que se haya tratado de explorar su eficacia y toxicidad en pacientes de edad avanzada. Sin embargo, los primeros estudios demostraron que la edad avanzada confería un pronóstico desfavorable, debido a un exceso de toxicidad³⁷. Ello ha llevado a disminuir la dosis (al menos a la mitad) de ciertos citostáticos, en particular citarabina y metotrexato, en este subgrupo de pacientes. Con tales modificaciones, el pronóstico de estos enfermos ha mejorado ostensiblemente, con

una alta tasa de respuesta (80-90%) y una probabilidad de supervivencia superior al 60%. La adición de rituximab a los tratamientos específicos de la leucemia y linfoma de Burkitt ha comportado una mejoría en la supervivencia libre de enfermedad de estos enfermos, que también se ha observado en los pacientes de edad avanzada^{38,39}. Así, la inmunoquimioterapia específica podría considerarse el tratamiento estándar de los pacientes con leucemia y linfoma de Burkitt, cualquiera que sea su edad.

Trasplante de progenitores hematopoyéticos con acondicionamiento no mieloablativo

La eficacia de esta modalidad de tratamiento en la LAL es controvertida, ya que se trata de una enfermedad en la que el efecto del injerto contra la leucemia, aunque evidente, no parece ser tan potente como en otras neoplasias hematológicas. Por otra parte, los escasos estudios publicados son de tipo retrospectivo e incluyen enfermos que han recibido previamente distintas modalidades de tratamiento, lo que hace difícil extraer conclusiones válidas. Martino *et al.* publicaron la experiencia preliminar del grupo español, con una mortalidad asociada al procedimiento del 23%, inferior a la esperada en este grupo de enfermos; y, de manera interesante, observaron una clara asociación entre el desarrollo de enfermedad injerto contra huésped (EICH) y un menor riesgo de recidiva, confirmando la existencia de efecto GVL (injerto frente a leucemia) en este contexto⁴⁰. Esta asociación se ha comprobado en otros estudios⁴¹. Si bien la aplicabilidad del procedimiento está bastante bien demostrada, queda por aclarar su eficacia. Parece claro por el momento que, si se efectúa en fases avanzadas de la enfermedad, los resultados son claramente insatisfactorios. En el reciente estudio del registro del European Group for Blood and Marrow Transplantation⁴², que incluyó 97 pacientes, los factores que se asociaron a una mayor probabilidad de supervivencia libre de en-

fermedad fueron el trasplante de precursores hematopoyéticos (TPH) realizado en fases iniciales de la enfermedad y la EICH crónica. Ello sugiere que un reducido número de pacientes de edad avanzada trasplantados en primera remisión completa presentan supervivencias prolongadas tras el trasplante de progenitores hematopoyéticos con acondicionamiento no mieloablativo. Idealmente, el impacto del mismo debería evaluarse en estudios prospectivos y cooperativos que incluyan pacientes con un tratamiento inicial homogéneo. La propuesta de la European LeukemiaNet antes mencionada puede constituir un excelente punto de partida.

Nuevos fármacos para el tratamiento de la LAL en pacientes de edad avanzada

No parece probable que la atenuación de dosis o las modificaciones en la secuencia de administración de los fármacos convencionales pueda mejorar el resultado del tratamiento de la LAL en pacientes de edad avanzada. Por ello, los esfuerzos actuales se dirigen a la incorporación de nuevos fármacos a estas pautas de tratamiento (Tabla 3)³, o bien a la incorporación de nuevas formulaciones de fármacos ya conocidos. Un ejemplo de estos últimos lo constituyen las preparaciones liposómicas de fármacos con reconocida actividad en la LAL, que permiten la infusión de dosis mayores del fármaco nativo sin que aumente la toxicidad cardíaca o neurológica (es el caso de la daunorubicina y la vincristina liposómicas, respectivamente), o un aumento de la vida media cuando se administra con formulaciones de liberación sostenida (es el caso de la citarabina liposómica *depot* para administración intratecal -i.t.- como profilaxis o tratamiento de la infiltración neuromeningea, o de la asparaginasa conjugada con polietilenglicol -PEG-ASP-). Así, un estudio de Offidani *et al.*²⁴ demostró mejores resultados en términos de mayores tasas de RC y menor mortalidad durante la inducción con el uso de daunorubicina liposómica. Por otra parte, varios estudios preliminares sugieren la eficacia de la administración i.t. de citarabina liposómica *depot* en el tratamiento de la infiltración meníngea por la LAL⁴³⁻⁴⁵. Recientemente se ha demostrado un impacto favorable en la supervivencia de los pacientes adultos con LAL tratados con PEG-ASP que presentaron depleción de asparagina (n = 63) en comparación con los que no la tuvieron (n = 22)⁴⁶. Otras estrategias, como la sustitución de vincristina por vindesina o la administración de interferón alfa como único agente durante el mantenimiento no han mostrado resultados favorables¹⁷.

Otro grupo de fármacos actualmente en fase de evaluación en el tratamiento de la LAL es el de los anticuerpos monoclonales⁴⁷. Los resultados de algunos

estudios muestran un efecto favorable sobre la supervivencia cuando el rituximab se combina con quimioterapia tipo hiper-CVAD u otras^{48,49} en la LAL de precursores B CD20+. Sin embargo, es posible que la frecuencia de infecciones en los pacientes añosos tratados con quimioterapia y rituximab sea elevada, lo que limitaría su empleo, a diferencia de lo que ocurre en pacientes jóvenes, donde se han comunicado resultados prometedores. Otro de los fármacos de este grupo son el anti-CD19 conjugado con ricina, el anti-CD22 conjugado con la inmunotoxina CAT-3888 y el alemtuzumab, anticuerpo monoclonal capaz de unirse al antígeno CD52, que se expresa en casi un 70% de LAL tanto de línea B como T. Actualmente están en marcha estudios que están evaluando el papel del alemtuzumab en la erradicación de la enfermedad residual en pacientes adultos jóvenes con LAL CD52+⁵⁰, pero su utilidad en pacientes de edad avanzada vendría limitada de nuevo por su toxicidad.

Entre los análogos de las purinas, la clofarabina (análogo de la desoxiadenosina) ha demostrado tener actividad clínica significativa en niños y adultos con leucemia mieloblástica aguda y LAL en segunda o ulteriores recaídas, con una tasa de respuestas del 15-30%⁵¹⁻⁵³. Su indicación está aprobada para niños con LLA más allá de la primera recaída. En el momento actual se están llevando a cabo estudios en los que se combina con otros fármacos (citarabina, ciclofosfamida) en niños y adultos con LLA refractaria o en recaída⁵⁴.

La nelarabina (506U78) es un profármaco soluble de la 9-beta-D-arabinofuranosilguanina (ara-G), un derivado de la desoxiguanosina. Su uso está aprobado para tratamiento de pacientes con LAL de precursores T y linfoma linfoblástico T (LL-T) refractarios o en recaída después de dos regímenes como mínimo⁵⁵. En un estudio reciente en adultos con LAL o LL-T refractarios o en primera recaída, la tasa de respuesta global fue del 41% y la de RC del 31%. Su principal toxicidad es hematológica y neurológica⁵⁶. Están en desarrollo ensayos clínicos que evalúan su posible utilidad en primera línea, en combinación con quimioterapia. Recientemente se ha aprobado su uso en pacientes con LAL-T refractaria o en segunda o ulteriores recaídas.

La forodesina es un inhibidor de la purina nucleósido fosforilasa (PNP), con lo que se bloquea la conversión de desoxiguanosina a guanina y desoxirribosa-1-fosfato. La acumulación intracelular de desoxiguanosina conduce a un aumento de desoxiguanosina trifosfato, que es tóxico para las células y provoca su apoptosis. Dado que las células linfoides, especialmente las de línea T, son muy ricas en PNP, se ha investigado activamente la actividad de forodesina en neoplasias linfoides, tanto agudas como crónicas. Aunque su uso todavía no está aprobado por las agencias reguladoras, en ensayos clínicos en LAL de precursores T resis-

Tabla 3. Nuevos fármacos en el tratamiento de la leucemia aguda linfoblástica^a

	Grupo de fármacos	Mecanismo	Comentario
Fármacos encapsulados en liposomas	Vincristina liposómica Daunorubicina liposómica Ara-C <i>depot</i> liposómica Asparaginasa pegilada		Menor neurotoxicidad. Mayor concentración tisular Menor cardiotoxicidad. Posibilidad de vencer resistencia Mayor vida media en LCR Mayor vida media (6 días). Menos inmunogenicidad
Anticuerpos monoclonales	Rituximab Epratuzumab Alemtuzumab Gemtuzumab	Anti-CD20 Anti-CD22 Anti-CD52 Anti-CD33	LAL-B madura, LAL-precursores B CD20+ LAL línea B LAL B, LAL T (ensayos clínicos) LAL CD33+
Antimetabolitos	Clofarabina Nelarabina Forodesina Trimetrexato Pralatrexato Talotrexina Aminopterina	Análogo de nucleósidos Inhibe PNP Inhibe PNP Inhibe DHF reductasa Inhibe DHF reductasa Inhibe DHF reductasa Antifólico	Aprobado en LAL infantil en recaída (EE UU) Aprobada en LAL-T refractaria o en segunda o ulteriores recaídas En evaluación en LAL-T y en LAL de precursores B
Inhibidores de las tirosina quinasas	Imatinib Nilotinib (AMN107) Dasatinib (BMS 354825) PKC412	Inhibe TK ABL Inhibe TK ABL Inhibe TK ABL y SRC Inhibe TK FLT3	LAL Ph+ LAL Ph+ recaída/resistente LAL Ph+ recaída/resistente. LAL Ph+ primera línea (ensayos clínicos) LAL con FLT3 (especialmente con reordenamientos MLL)
Inhibidores de la gamma-secretasa	MK0752	Interferencia con NOTCH1	LAL-T
Otros	Inhibidores FT (tipifarnib) Agentes hipometilantes (decitabina) Inhibidores histona desacetilasa Inhibidores proteasoma (bortezomib) Inhibidores de m-TOR (rapamicina)		Posible utilidad junto con inhibidores de BCR-ABL en LAL Ph+ resistente En evaluación en casos resistentes, en combinación con quimioterapia En estudios preclínicos En estudios preclínicos En estudios preclínicos

^a Modificado de Larson RA³.

Ara-C: citarabina; DHF reductasa: dihidrofolato reductasa; FT: farnesiltransferasa; LAL: leucemia aguda linfoblástica;

LAL Ph: leucemia aguda linfoblástica con cromosoma Filadelfia; LCR: líquido cefalorraquídeo; PNP: purina nucleósido fosforilasa; TK: tirosina quinasas.

tentes o en recaída, la tasa de respuesta global fue del 33%, con RC del 17%^{57,58}. La toxicidad del fármaco es moderada, lo que, junto a su buena biodisponibilidad por vía oral, hace atractivo su uso en combinación con otros agentes. También se hallan en curso ensayos clínicos que evalúan la eficacia de este fármaco en LLA de precursores B refractaria o en recaída.

Conclusiones

La LAL en pacientes de edad avanzada es una enfermedad que condiciona un mal pronóstico, debido tanto a las peculiares características de la leucemia en este grupo de pacientes como, especialmente, a la mala tolerancia a la quimioterapia convencional y al mal estado general que presentan estos pacientes en el momento del diagnóstico, con frecuente comorbilidad asociada⁵⁹. Los resultados de los estudios publicados sobre el tratamiento de la LAL en este grupo de pacientes son malos, con una alta mortalidad durante la fase de inducción, tasas bajas de respuesta a quimio-

terapia y recaídas frecuentes. La quimioterapia adaptada a la edad, junto a la incorporación del TPH con acondicionamiento no mieloablatoivo y de nuevos fármacos dirigidos al subtipo de LAL (forodesina y nelarabina en la LAL T, rituximab en LAL de línea B con expresión del antígeno CD20 e inhibidores de las tirosincinasas de ABL como imatinib, dasatinib y nilotinib en la LAL Ph, entre otros), en el contexto de ensayos clínicos mejorarán probablemente el pronóstico de la LAL en este grupo de pacientes⁶⁰.

Agradecimientos

Financiado en parte con las becas 051490 del FIS, P-EF/07 de la FIJC y RD06/0020/1056 de RETICS.

Bibliografía

1. Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* 2008; 3671: 1030-43.

2. Hoelzer D, Gökbuget N. Treatment of elderly patients with acute lymphoblastic leukaemia. In: Perry MC, ed. American Society of Clinical Oncology Educational Book; 2005. p. 533-9.
3. Larson RA. Acute lymphoblastic leukemia: Older patients and newer drugs. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*; 2005. p. 131-6.
4. Appelbaum FR. Impact of age on the biology of acute leukemia. In: Perry MC, ed. American Society of Clinical Oncology Educational Book; 2005. p. 528-32.
5. Thomas X, Olteanu N, Charrin C, Lheritier V, Magaud JP, Fiere D. Acute lymphoblastic leukemia in the elderly: The Edouard Herriot Hospital experience. *Am J Hematol* 2001; 67: 73-83.
6. Splith-Schwalbe E, Heil G, Heimpel H. Acute lymphoblastic leukemia in patients over 59 years of age. Experience in a single center over a 10-year period. *Ann Hematol* 1994; 69: 291-6.
7. Sancho JM, Ribera JM, Xicoy B, Morgades M, Oriol A, Tormo M, et al. Results of the PETHEMA ALL-96 trial in elderly patients with Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Haematol* 2007; 78: 102-10.
8. Gökbuget N, Hoelzer D, Arnold R. Subtypes and treatment outcome in adult acute lymphoblastic leukemia less than or greater than 55 years. *Hematol J* 2001; 1 (Suppl 1): 186.
9. Robak T, Szmigielska-Kaplon A, Wrzesien-Kus A, Wierzbowska A, Skotnicki AB, Piatkowska-Jakubas B, et al. Acute lymphoblastic leukemia in elderly: The Polish Adult Leukemia Group (PALG) experience. *Ann Hematol* 2004; 83: 225-31.
10. Kantarjian HM, O'Brien S, Smith T, Estey EH, Beran M, Preti A, et al. Acute lymphocytic leukaemia in the elderly: Characteristics and outcome with the vincristine-adriamycin-dexamethasone (VAD) regimen. *Br J Haematol* 1994; 88: 94-100.
11. Taylor PR, Reid MM, Proctor SJ. Acute lymphoblastic leukaemia in the elderly. *Leuk Lymphoma* 1994; 13: 373-80.
12. Taylor PRA, Reid MM, Bown N, Hamilton PJ, Proctor SJ. Acute lymphoblastic leukemia in patients aged 60 years and over: A population-based study of incidence and outcome. *Blood* 1992; 80: 1813-7.
13. Delannoy A, Sebban C, Cony-Makhoul P, Cazin B, Cordonnier C, Bouabdallah R, et al. Age-adapted induction treatment of acute lymphoblastic leukaemia in the elderly and assessment of maintenance with interferon combined with chemotherapy. A multicentric prospective study in forty patients. French Group for Treatment of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Leukemia* 1997; 11: 1429-34.
14. Pagano L, Mele L, Casorelli I, Fianchi L, Di Febo A, Leone G. Acute lymphoblastic leukemia in the elderly. A twelve-year retrospective, single center study. *Haematologica* 2000; 85: 1327-8.
15. Wetzler M, Dodge RK, Mrozek, Carroll AJ, Tantravahi R, Block AW, et al. Prospective karyotype analysis in adult lymphoblastic leukemia. The Cancer and Leukemia Group B experience. *Blood* 1999; 93: 3983-93.
16. Groupe Français de Cytogenétique Hematologique. Cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia: Correlations with hematologic findings and outcome. A collaborative study of the Groupe Français de Cytogenétique Hematologique. *Blood* 1996; 87: 3135-42.
17. Delannoy A, Cazin B, Thomas X, Bouabdallah R, Boiron JM, Huguet F, et al. Treatment of acute lymphoblastic leukemia in the elderly: an evaluation of interferon alpha given as a single agent after complete remission. *Leuk Lymphoma* 2002; 43: 75-81.
18. Ferrari A, Annino L, Crescenzi S, Romani C, Mandelli F. Acute lymphoblastic leukaemia in the elderly: results of two different treatment approaches in 49 patients during a 25-year period. *Leukemia* 1995; 9: 1643-7.
19. Larson RA, Dodge RK, Linker CA, Stone RM, Powell BL, Lee EJ, et al. A randomized controlled trial of filgrastim during remission induction and consolidation chemotherapy for adults with acute lymphoblastic leukemia: CALGB Study 9111. *Blood* 1998; 92: 1556-64.
20. Legrand O, Marie JP, Marjanovic Z, Cadiou M, Blanc C, Ramond S, et al. Prognostic factors in elderly acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 1997; 97: 596-602.
21. Bassan R, Di Bona E, Lerede T, Pogliani E, Rossi G, D'Emilio A, et al. Age-adapted moderate-dose induction and flexible outpatient postremission therapy for elderly patients with acute lymphoblastic leukaemia. *Leuk Lymphoma* 1996; 22: 295-301.
22. Gökbuget N, de Wit M, Gerhardt A, Lipp Th, Rieder H, Schwartz S, et al. Results of a shortened, dose reduced treatment protocol in elderly patients with acute lymphoblastic leukaemia [abstract]. *Blood* 2000; 96 (Suppl 1): 718a (abstr 3104).
23. Kantarjian HM, O'Brien S, Smith TL, Cortes J, Giles FJ, Beran M, et al. Results of treatment with Hyper-CVAD, a dose-intensified regimen, in adult acute lymphocytic leukaemia. *J Clin Oncol* 2000; 18: 547-61.
24. Offidani M, Corvatta L, Malerba L, Marconi M, Catarini M, Centurioni R, et al. Comparison of two regimens for the treatment of elderly patients with acute lymphoblastic leukaemia (ALL). *Leuk Lymphoma* 2005; 46: 233-8.
25. Houot R, Tavernier E, Le QH, Lheritier V, Thiebaut A, Thomas X. Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia in the elderly: prognostic factors and treatment outcome. *Hematology* 2004; 9: 369-76.
26. Martin TG, Linker CA. Allogeneic stem cell transplantation for acute lymphocytic leukemia in adults. *Hematol Oncol Clin North Am* 2001; 15: 97-120.
27. Yanada M, Takeuchi J, Sugiura I, Akiyama H, Usui N, Yagasaki F, et al. High complete remission rate and promising outcome by combination of imatinib and chemotherapy for newly diagnosed BCR-ABL-positive acute lymphoblastic leukemia: a phase II study by the Japan Adult Leukemia Study Group. *J Clin Oncol* 2006; 24: 460-6.
28. Thomas DA, Faderl S, Cortes J, O'Brien S, Giles FJ, Kornblau SM, et al. Treatment of Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia with hyper-CVAD and imatinib mesylate. *Blood* 2004; 103: 4396-407.
29. Ribera JM, Oriol A, González M, Vidriales MB, Xicoy B, Grau J, et al. Treatment of Philadelphia chromosome (Ph)-positive acute lymphoblastic leukemia (ALL) with concurrent chemotherapy and imatinib mesylate. *Blood* 2004; 104 [abstract 4483].
30. Delannoy A, Delabesse E, Lheritier V, Castaigne S, Rigal-Huguet F, Raffoux E, et al. Imatinib and methylprednisolone alternated with chemotherapy improve the outcome of elderly patients with Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia: results of the GRAALL AFR09 study. *Leukemia* 2006; 20: 1526-32.
31. Vignetti M, Fazi P, Cimino G, Martinelli G, Di Raimondo F, Ferrara F, et al. Imatinib plus steroids induces complete remissions and prolonged survival in elderly Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia patients without additional chemotherapy: Results of the GIMEMA LAL0201-B Protocol. *Blood* 2007; 109: 3676-8.
32. Ottmann OG, Wassmann B, Pfeifer H, Giagounidis A, Steljes M, Dührsen U, et al. Imatinib compared with chemotherapy as front-line treatment of elderly patients with Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ ALL). *Cancer* 2007; 109: 2068-76.
33. Pfeifer H, Wassmann B, Pavlova A, Wunderle L, Oldenburg J, Binckebanck A, et al. Kinase domain mutations of BCR-ABL frequently precede imatinib-based therapy and give rise to relapse in patients with de novo Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ ALL). *Blood* 2007; 110: 727-34.

34. Kantarjian H, Giles F, Wunderle L, Bhalla K, O'Brien S, Wasmann B, et al. Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL. *N Engl J Med* 2006; 354: 2542-51.
35. Talpaz M, Shah NP, Kantarjian H, Donato N, Nicoll J, Paquette R, et al. Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* 2006; 354: 2531-41.
36. Ottmann O, Dombret H, Martinelli G, Simonsson B, Guilhot F, Larson RA, et al. Dasatinib induces rapid hematologic and cytogenetic responses in adult patients with Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia with resistance or intolerance to imatinib: interim results of a phase 2 study. *Blood* 2007; 110: 2309-15.
37. Oriol A, Ribera JM, Esteve J, Sanz MA, Brunet S, García-Boyeró R, et al. Lack of influence of human immunodeficiency virus infection status in the response to therapy and survival of adult patients with mature B-cell lymphoma or leukemia. Results of the PETHEMA-LAL3/97 study. *Haematologica* 2003; 88: 445-53.
38. Oriol A, Ribera JM, Bergua J, Giménez-Mesa E, Grande C, Esteve J, et al. High-dose chemotherapy and immunotherapy in adult Burkitt's lymphoma: comparison of results in human immunodeficiency virus-infected and non-infected patients. *Cancer* 2008; 113: 117-25.
39. Thomas DA, Faderl S, O'Brien S, Bueso-Ramos C, Cortés J, García-Manero G, et al. Chemoimmunotherapy with hyper-CVAD and rituximab for the treatment of adult Burkitt and Burkitt-type lymphoma or acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 2006; 106: 1569-80.
40. Martino R, Giralt S, Caballero MD, Mackinnon S, Corradini P, Fernández-Avilés F, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning in acute lymphoblastic leukemia: a feasibility study. *Haematologica* 2003; 88: 555-60.
41. Hamaki T, Kami M, Kanda Y, Yuhi K, Inamoto Y, Kishi Y, et al. Reduced-intensity stem cell transplantation for adult acute lymphoblastic leukemia: a retrospective study of 33 patients. *Bone Marrow Transplant* 2005; 35: 549-56.
42. Mohty M, Labopin M, Tabrizi R, Theorin N, Fauser AA, Rambaldi A, et al. Reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation for adult patients with acute lymphoblastic leukemia: a retrospective study from the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Haematologica* 2008; 93: 303-6.
43. Bomgaars L, Geyer JR, Franklin J, Dahl G, Park J, Winick NJ, et al. Phase I trial of intrathecal liposomal cytarabine in children with neoplastic meningitis. *J Clin Oncol* 2004; 22: 3916-21.
44. Goekbuget N, Bassan R, Hug S, Jentsch-Ullrich K, Rutjes J, Matthias S, et al. First promising results from an European trial with liposomal cytarabine (DepoCyt[®]) for intrathecal (i.th.) application in CNS relapse of acute lymphoblastic leukemia (ALL) or very aggressive lymphoma (vaNHL). *Gemeinsame Jahrestagung der. Detschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie*, 2005. Abstract 789.
45. Sancho JM, Ribera JM, Romero MJ, Martín-Reina V, Giraldo P, Ruiz E. Compassionate use of intrathecal depot liposomal cytarabine as treatment of central nervous system involvement in acute leukaemia: report of 6 cases. *Haematologica* 2006; 91:(ECR) 02. (<http://www.haematologica.org/online/2006/ECR02/index.html>).
46. Wetzler M, Sanford BL, Kurtzberg J, DeOliveira D, Frankel SR, Powell BL, et al. Effective asparagine depletion with pegylated asparaginase results in improved outcomes in adult acute lymphoblastic leukemia: Cancer and Leukemia Group B Study 9511. *Blood* 2007; 109: 4164-7.
47. Gökbuget N, Hoelzer D. Novel antibody-based therapy for acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2006; 19: 701-13.
48. Thomas DA, Cortés J, O'Brien S, Faderl S, Ravandi F, García-Manero G, et al. Update of the modified Hyper-CVAD regimen with or without rituximab in newly diagnosed adult acute lymphocytic leukemia [abstract]. *Blood* 2005; 106: 521a (abstr 1831).
49. Hoelzer D, Goekbuget N, Beck J, Burmeister T, Giagounidis A, Glasmacher A, et al. Subtype adjusted therapy improves outcome of elderly patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood* 2004; 104 (Suppl 1): abstr 2732.
50. Stock W, Yu D, Sanford B, Lozanski G, Cataland S, Vij R, et al. Incorporation of alemtuzumab into front-line therapy of adult acute lymphoblastic leukemia (ALL) is feasible: A phase I/II study from the Cancer and Leukemia Group B (CALGB 10102). *Blood* 2005; 106 (Suppl 1): 46a (abstract 145).
51. Jeha S, Kantarjian H. Clofarabine for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther* 2007; 7: 113-8.
52. Beesley AH, Palmer ML, Ford J, Weller RE, Cummings AJ, Freitas JR, et al. In vitro cytotoxicity of nelarabine, clofarabine and flavopiridol in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2007; 137: 109-16.
53. Jeha S, Gaynon PS, Razzouk BI, Franklin J, Kadota R, Shen V, et al. Phase II study of clofarabine in pediatric patients with refractory or relapsed acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2006; 24: 1917-23.
54. Karp JE, Ricklis RM, Balakrishnan K, Briel J, Greer J, Gore SD, et al. A phase I clinical-laboratory study of clofarabine followed by cyclophosphamide for adults with refractory acute leukemias. *Blood* 2007; [Epub ahead of print].
55. Cohen MH, Johnson JR, Massie T, Sridhara R, McGuinn WD, Abraham S, et al. Approval summary: nelarabine for the treatment of T-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 5329-35.
56. DeAngelo DJ, Yu D, Johnson JL, Coutre SE, Stone RM, Stopeck AT, et al. Nelarabine induces complete remissions in adults with relapsed or refractory T-lineage acute lymphoblastic leukemia or lymphoblastic lymphoma: Cancer and Leukemia Group B study 19801. *Blood* 2007; 109: 5136-42.
57. Bantia S, Ananth SL, Parker CD, Horn LL, Upshaw R. Mechanism of inhibition of T-acute lymphoblastic leukemia cells by PNP inhibitor – BCX-1777. *Int Immunopharmacol* 2003; 3: 879-87.
58. Ravandi F, Gandhi V. Novel purine nucleoside analogues for T-cell-lineage acute lymphoblastic leukaemia and lymphoma. *Expert Opin Investig Drugs* 2006; 15: 1601-13.
59. Sancho JM, Ribera JM. Leucemia linfoblástica aguda en pacientes de edad avanzada. *Med Clí (Barc)* 2007 (extraordinario 1): 56-61.
60. Ribera JM, Feliu E. Nuevos fármacos en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda. *Med Clí (Barc)* 2007 (extraordinario 1): 68-74.

THE ROLE OF ALLOGENEIC STEM CELL TRANSPLANTATION IN THE MANAGEMENT OF ACUTE LEUKAEMIA IN THE ELDERLY PATIENT

E. OLAVARRÍA

Medical Director. BMT Unit. Consultant Haematologist. Haematology Department. Hammersmith Hospital. London (United Kingdom)

Introduction

Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) offers a curative potential for many patients with haematological malignancies. However, older patients are often denied this option because of concerns regarding the toxicities of myeloablative regimens. Increasing age has been implicated as a risk factor for transplantation-related mortality (TRM) and other transplant complications, such as graft-versus-host disease (GVHD). This has classically limited this therapy to patients less than 50 years of age. However, such an approach would exclude many patients with acute leukaemia from this potentially curative therapy because the median age at diagnosis for these diseases is greater than 60 years. This age restriction is likely to become even more relevant as the proportion of population older than 65 years grows in the following years¹⁻³.

The incidence of acute myeloid leukaemia (AML) increases with advancing age. At age 40 years, there is only 1 case per 100,000, but the annual incidence increases to 15 per 100,000 at 75 years¹⁻³. The prognosis of patients with AML is inversely correlated with age. A number of patient-specific and leukaemia-associated factors explain the poor outcome of elderly patients with AML. Older patients are less able to tolerate intensive cytotoxic induction and post remission chemotherapy. They often have comorbidities which result in limited cardiac, renal, pulmonary and/or hepatic functional reserve. The elderly also have poor tolerance of serious bacterial and fungal infections. Poor performance status of patients with AML is associated with worse outcome, predominantly due to early mortality during initial induction chemotherapy. In addition, AML in older patients is more likely to have evolved from an antecedent haematological disorder, such as myelodysplastic syndrome, or to have been induced by prior chemotherapy or radiotherapy. There is also a higher incidence of poor-risk cytogenetic changes and expression of the multidrug resistance gene (MDR1), which have been associated with poor outcome. Poor-risk karyotypes include complex structural and numeric cytogenetic changes, del(5q) or -5, del(7q) or -7, rear-

rangements of 11q23, inv(3q), t(6;9), t(9;22) and others. The prognostic significance of trisomy 8 as an isolated finding in the elderly is more controversial³.

The place of allogeneic HSCT in the management of acute leukaemia

Due to all of the above, the likelihood of an elderly patient diagnosed with acute leukaemia being treated with allogeneic HSCT is very limited. Data from published retrospective series and prospective clinical trials have to be considered with scepticism given the obvious selection biases. In reality the vast majority of elderly patients are more likely to receive palliation and supportive care than proceed to aggressive chemotherapy followed by allogeneic HSCT. A recent analysis in the USA of 2,657 Medicare beneficiaries older than 65 years with AML may more accurately reflect the true outcome of this population⁴. The overall mortality was 86% and 94% at 1 and 2 years following the diagnosis, respectively. Only 30% of these patients received any form of intravenous chemotherapy in the 2 years following diagnosis (44% in patients aged 65 to 74 years, 24% in patients aged 75 to 84, and 6% in patients aged 85 and above). Furthermore, the study could not distinguish between the outcomes after intensive induction chemotherapy and palliative therapy. Nevertheless, 89% of all patients required hospitalization, and they spent 31% of their remaining days in hospital. The high rate of hospitalization is likely due to the consequences of bone marrow failure caused by AML, even in the absence of cytotoxic chemotherapy. The median survival was longer among treated patients (7 months versus 1 month). Patients surviving more than 2 months were more likely to have received chemotherapy. These data would suggest that the superior outcome of treated elderly patients with AML is due as much to the efficacy of chemotherapy as the ability of the treating physician to choose patients carefully for therapy⁴.

On the other hand, with the advent of reduced intensity conditioning (RIC) allogeneic HSCT an increasing number of reports have emerged been released showing the outcome of RIC HSCT in elderly patients⁵. It is possible that a less intense preparative regimen produces considerably less organ toxicity and, therefore, would be better tolerated by older patients. If regimen-related toxicity could be substantially reduced, it might then be possible to extend access to allogeneic HSCT to patients who, because of their age or other comorbidities, would not have previously been considered reasonable candidates for allogeneic HSCT. It is uncertain, however, whether the growing trend to use reduced intensity conditioning in older patients is justified. Assuming that the graft-versus-malignancy effect

is similar, the success of reduced intensity conditioning HSCT depends on its ability to decrease treatment-related mortality sufficiently to compensate for the degree of antitumour activity lost as a consequence of less intensive chemotherapy or radiotherapy.

Indications for allogeneic HSCT

As discussed before, AML and ALL in the elderly exhibit biological differences when compared with the younger patient counterpart. In AML, older patients have often evidence of trilineage dysplasia or a prior diagnosis of myelodysplasia. These findings support the hypothesis that AML in the elderly arises from a more pluripotent stem cell. In ALL, the presence of the t(9:22) or other high risk chromosomal abnormalities is also increased⁵.

When faced with the decision of indicating an HSCT in the elderly, the same prognostic factors utilised in younger patients apply. In AML, the karyotype and the response to the induction chemotherapy are the most determinant factors. In ALL by contrast, the patient's age is in itself a prognostic factor and most clinicians would agree that the cure rate with conventional chemotherapy in patients older than 50 years is unacceptably low and therefore the indications for allogeneic HSCT may be wider.

Conventional myeloablative HSCT

Elderly patients tolerate poorly the early toxicity and complications of myeloablative regimens. However, as a result of improvement in supportive care and GVHD management and prevention, the age restriction that applied in many transplant centres has been raised in recent years. The Seattle group investigated myeloablative conditioning in 52 patients older than 60 years of age (median age 62.8 years) with acute leukaemia or MDS⁶. The myeloablative conditioning consisted of BuCy or Cyclo-TBI in the majority of cases and all patients received stem cells from an HLA identical sibling. The TRM at 100 days was 27% and increased to 43% at 3 years indicating the continuous risk of post transplant complications (namely GVHD) in this patient population. With a follow up of 4 years, 18 (35%) patients were alive and leukaemia free. However a significant proportion of survivors had CML in chronic phase or early stage MDS and there were no survivors amongst patients with advanced phase disease. The authors concluded that this approach of myeloablative HSCT in elderly patients should be reserved for those who do not have advanced disease.

Similar results have been obtained in Essen with a larger group of patients older than 50 years⁷. A total of

215 patients (median age 57 years) received myeloablative HSCT from either an HLA identical sibling (123 patients) or matched unrelated donors (92 patients). The TRM at one year was 30% in the early stage cohort and 49% in the rest. Once again the early stage group included patients with CML-CP, low risk MDS and MPD. The conditioning was TBI based in 155 patients. With a median follow up of 3 years, the 10-year overall survival for the advanced phase group was 31% with a relapse rate of 34%. The Dana-Farber group reported 81 patients older than 50 years (median age 54 years) treated with Cyclo-TBI and sibling (52 patients) or unrelated (29) donors. The TRM at 100 days was 30%, the cumulative incidence of relapse was 30% and the overall survival at 2 years was 29%⁸. At the MD Anderson Cancer Center in Houston, they treated 52 patients older than 55 years (median age 58 years) with a variety of haematological conditions including 33 AML patients with Busulfan-based myeloablative conditioning⁹. The major finding of this study was that the incidence of GVHD increased with age: 64% acute and 54% chronic GVHD was seen in the over 60 group. The intravenous Busulfan regimen was well tolerated and the 100 day TRM was low at 11%. TRM at 12 months increased to 29% with an overall 2-year survival of 46%.

The largest study comes from the EBMT that analysed retrospectively 722 AML patients older than 50 years and compared the results of myeloablative (407 patients) with RIC (315 patients) HLA identical sibling HSCT¹⁰. The TRM for the myeloablative cohort was 32% at 2 years and this compared unfavourably with a TRM of 19% in the RIC group. However, the relapse rate analysed at 2 years post transplant was significantly higher in the RIC group (41%) compared with the myeloablative conditioning cohort (24%). This two counteracting results combined to produce a similar overall survival and disease free survival of around 45% in the 2 groups. Of note, patients in CR1 transplanted after myeloablative conditioning had a disease free survival of 54% at 2 years.

Reduced intensity conditioning allogeneic HSCT

Data on RIC HSCT in elderly patients with acute leukaemia is limited and most of them refer to AML. The majority of studies lack sufficient number to extrapolate firm conclusions but a clearer picture is emerging in recent years: durable remissions can be achieved in patients in CR at transplantation, suggesting a significant graft versus leukaemia effect in this treatment modality. The Spanish group reported a retrospective study of sibling RIC HSCT in 62 AML and MDS patients with a median age of 56 years¹¹. They showed a TRM of 12% at 2 years with a relapse rate of 28%

and an encouraging progression free survival of 61%. Similarly, the group in Freiburg, reported 19 patients with a median age of 64 years treated with a combination of Fludarabine, Melphalan and Carmustine that had an overall survival of 68% at one year¹². These and other initial studies confirmed the feasibility of a RIC HSCT approach in elderly patients and highlighted the need to focus on preventing early relapse after transplant.

Studies with longer follow up also show encouraging results. A multicenter collaboration using Fludarabine and low dose TBI treated 122 AML patients with a median age of nearly 58 years¹⁵. Half of the donors were unrelated. An impressive 3% TRM at 100 days paved the way for a 2 year mortality of 16%. Unfortunately, relapse rates were high (50% for patients in CR1 after HLA sibling RIC HSCT) translating into an overall survival at 2 years of 48% for the entire cohort. Interestingly, relapse rate was reduced to 16% in AML patients in CR1 transplanted from an unrelated donor. Along these lines, the MD Anderson group reported their experience with 29 AML patients older than 55 years who were treated with Fludarabine in combination with Melphalan or Busulfan prior to unrelated donor RIC HSCT¹⁴. They had a relapse rate of 11% which was hampered by a TRM of 38% and high a GVHD incidence resulting in a similar overall survival of 44% at one year.

In ALL, the general consensus has been that high dose chemo and radiotherapy was required for the adequate control of the disease¹⁵. This, combined with the weaker graft versus leukaemia effect observed in ALL, has curtailed the enthusiasm for RIC HSCT in patients diagnosed with ALL. However, results with conventional myeloablative conditioning have been disappointing and a very recent update of the UKALL-XII prospective randomised clinical trial has shown a surprisingly high mortality of 39% at 2 years associated with myeloablative conditioning (Etoposide and TBI) in patients older than 35 years¹⁶. Recently a few small studies have shown promising results including a 34% long term remission in a retrospective study by the EBMT¹⁷ and an even more encouragingly 70% early survival (at one year) in patients with high risk ALL utilising a variety of donors, including cord blood stem cells¹⁸.

Optimising transplant strategies

The most common myeloablative conditioning regimen in ALL includes Cyclophosphamide and TBI. There is now sufficient evidence that substituting Etoposide for Cyclophosphamide improves outcome^{15,16}. However, this may not apply to elderly patients. We have seen before that RIC HSCT has the potential to

benefit more elderly patients who otherwise may not be candidates to allogeneic HSCT. In between increasing or decreasing the intensity of the conditioning, a “third way” may include the use of tumour reactive monoclonal antibodies with or without the addition of radioconjugates such as Iodine-131 or Yttrium-90. With the latter approach it is feasible to target the bone marrow and deliver localised intensive radiotherapy avoiding many of the collateral side effects of increased dose TBI. A recent study reported 46 patients treated with Iodine-131 conjugated with anti-CD45 in addition to conventional Cyclophosphamide and Busulfan conditioning¹⁹. The 3-year TRM was 21% and the leukaemia free survival was 61%. This study showed the feasibility of such an approach and resulted in long term survival in patients with refractory ALL.

In patients with refractory AML, the outcome after allogeneic HSCT remains unsatisfactory. A German group has presented the results of 103 refractory AML patients with primary induction failure using a sequential approach²⁰. Conventional chemotherapy (FLAMSA) is followed by a RIC HSCT two weeks later and prophylactic infusion of donor lymphocyte infusions (DLI) soon after immunosuppression is withdrawn. The median age was 52 years and the 4 year overall survival was 32%.

The use of monoclonal antibodies in order to enhance engraftment and more importantly reduce the incidence of both acute and chronic GVHD opens the possibility of reducing even further the TRM of allogeneic HSCT in the elderly. The UK experience with Campath (Alemtuzumab) in 77 high risk AML and MDS patients with a median age of 52 years has been recently reported²¹. The TRM at 100 days was reduced to 9% and the incidences of acute and chronic GVHD were 28% and 10% respectively, with no patient developing grade 3-4 acute GVHD. However, such an approach will invariably result in an increased relapse rate, which was 35% at 2 years. Two smaller studies in elderly patients (median age of 58 and 61 respectively) with AML and MDS receiving ATG as in vivo T-cell depletion showed very similar results^{22,23}.

Post-transplant management

The use of tyrosine kinase inhibitors, such as Imatinib, has now been extensively studied in the first line therapy of CML and Ph+ ALL. However, experience remains limited regarding the role of Imatinib in controlling or treating minimal residual disease after allogeneic HSCT. The EBMT conducted a retrospective study in patients with all phases of CML and Ph+ ALL in relapse after allogeneic HSCT demonstrating a CR rate of between 95% in chronic phase CML and 55% in Ph+ ALL²⁴. Unfortunately, the duration of the

CR in Ph+ ALL was short. Phase II clinical trials of Dasatinib have included 30 patients with blastic phase CML and 17 patients with Ph+ ALL. Results were similar to Imatinib, although long term remissions have been reported in a significant proportion of patients. Dasatinib has also been piloted as the sole induction in Ph+ ALL with a CR rate close to 100%, thus allowing for elderly patients to reach the transplant without previous exposure to chemotherapy agents and therefore potentially reducing the TRM.

Imatinib has been used to manipulate the kinetics of relapse in CML and postpone the use of DLI until such a time when it becomes safer (>12 months after HSCT). A similar strategy for Ph+ ALL is currently under investigation in several prospective studies²⁵.

The classical data showing a correlation between the presence of GVHD and a reduced incidence of leukaemia relapse is evidence of the strong anti leukaemia effect harnessed by the GVL. It is clear now that the degree and duration of immunosuppression after allogeneic HSCT has a major impact on relapse risk. Simply by reducing the dose and plasma levels of cyclosporine in the first few weeks after HSCT is sufficient to reduce the relapse rate by 30% in some studies²⁶. Preliminary results using no immunosuppression after HSCT (instead giving additional doses of Cyclophosphamide after the infusion of the graft) confirm the ample room for improvement in this field.

Donor lymphocyte infusions exert a very powerful effect in diseases such as CML and chronic lymphoproliferative disorders. However, the role of DLI in the treatment of relapse acute leukaemia is somewhat limited. Despite the fact that the very first patient treated with DLI had ALL and remains in CR more than 14 years later, there is a general consensus that the GVL effect is weak in relapsed ALL. Consequently, there is interest in the administration of DLI in a prophylactic fashion to patients at a high risk of relapse or patients with detectable MRD after HSCT. The presence of mixed chimerism should serve as guidance in cases where no molecular marker of the persisting leukaemia is present, with the aim to achieve full donor T-cells and haemopoiesis.

However the use of DLI early after HSCT carries a higher risk of GVHD, particularly after RIC HSCT and unrelated donors. It is not clear why this is, but a possible alternative strategy would be to maintain a status of controlled and stable MRD with the adjunctive use of agents such as Azacitidine or Bortezomib in order to postpone the use of DLI²⁶.

Final considerations

Elderly patients with acute leukaemia have a distinct biology leading to a poorer outcome when compared

to younger patients. The likelihood that an elderly patient with acute leukaemia receives treatment with allogeneic HSCT is very low, despite recent progress in transplant techniques. A prospective study from the MD Anderson Cancer Center in Houston, started with 295 patients older than 50 years diagnosed with AML and unfavourable karyotypes²⁷. Only 99 patients entered CR with conventional induction chemotherapy. Only 53 were eventually referred to the transplant unit, with the remaining failing to do so because of comorbidities, refusal by the patient or lack of available donor (although the reasons were not clear in 21 patients). Finally, a suitable donor was identified in 26 cases and eventually just 14 (of the original 295) patients underwent allogeneic HSCT (13 sibling, one unrelated donor). This example illustrates the enormity of the task ahead if we are to transplant the majority of elderly patients with acute leukaemia that could benefit from this approach.

Reduced intensity conditioning coupled with low GVHD strategies and followed by post transplant prophylaxis of relapse seems a possible combination that could provide optimal results in elderly patients with acute leukaemia.

References

1. Wingo PA, Tong T, Bolden S. Cancer statistics, 1995. *CA Cancer J Clin* 1995; 45: 8-3030. Erratum in: *CA Cancer J Clin* 1995; 45: 127-8.
2. Taylor PR, Reid MM, Bown N, Hamilton PJ, Proctor SJ. Acute lymphoblastic leukemia in patients aged 60 years and over: a population-based study of incidence and outcome. *Blood* 1992; 80: 1813-7.
3. Erba H P. Prognostic factors in elderly patients with AML and the implications for treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007; 2007: 420-8.
4. Menzin J, Lang K, Earle CC, Kerney D, Mallick R. The outcomes and costs of acute myeloid leukemia among the elderly. *Arch Intern Med* 2002; 162: 1597-603.
5. Kiss TL, Sabry W, Lazarus HM, Lipton JH. Blood and marrow transplantation in elderly acute myeloid leukaemia patients – older certainly is not better. *Bone Marrow Transplant* 2007; 40 (5): 405-16.
6. Wallen H, Gooley TA, Deeg HJ, Pagel JM, Press OW, Appelbaum FR, et al. Ablative allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults 60 years of age and older. *J Clin Oncol* 2005; 23 (15): 3439-46.
7. Ditschkowski M, Elmaagacli AH, Trensche R, Steckel NK, Koldehoff M, Beelen DW. Myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in elderly patients. *Clin Transplant* 2006; 20 (1): 127-31.
8. Alyea EP, Kim HT, Ho V, Cutler C, Gribben J, DeAngelo DJ, et al. Comparative outcome of nonmyeloablative and myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation for patients older than 50 years of age. *Blood* 2005; 105 (4): 1810-4.
9. de Lima M, Giral S. Allogeneic transplantation for the elderly patient with acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome. *Semin Hematol* 2006; 43 (2): 107-17.
10. Aoudjane M, Labopin M, Gorin NC, Shimoni A, Ruutu T, Kolb HJ, et al; Acute Leukemia Working Party (ALWP) of the European group for Blood and Marrow Transplantation (EB-

- MT). Comparative outcome of reduced intensity and myeloablative conditioning regimen in HLA identical sibling allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for patients older than 50 years of age with acute myeloblastic leukaemia: a retrospective survey from the Acute Leukemia Working Party (ALWP) of the European group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Leukemia* 2005; 19 (12): 2304-12.
11. Martino R, Pérez-Simón JA, Moreno E, Queralto JM, Caballero D, Mateos M, et al. Reduced-intensity conditioning allogeneic blood stem cell transplantation with fludarabine and oral busulfan with or without pharmacokinetically targeted busulfan dosing in patients with myeloid leukemia ineligible for conventional conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11 (6): 437-47.
 12. Bertz H, Potthoff K, Finke J. Allogeneic stem-cell transplantation from related and unrelated donors in older patients with myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2003; 21 (8): 1480-4.
 13. Hegenbart U, Niederwieser D, Sandmaier BM, Maris MB, Shizuru JA, Greinix H, et al. Treatment for acute myelogenous leukemia by low-dose, total-body, irradiation-based conditioning and hematopoietic cell transplantation from related and unrelated donors. *J Clin Oncol* 2006; 24 (3): 444-53.
 14. Wong R, Giralt SA, Martin T, Couriel DR, Anagnostopoulos A, Hosing C, et al. Reduced-intensity conditioning for unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation as treatment for myeloid malignancies in patients older than 55 years. *Blood* 2003; 102 (8): 3052-9.
 15. Stein A, Forman SJ. Allogeneic transplantation for ALL in adults. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41 (5): 439-46.
 16. Goldstone AH, Richards SM, Lazarus HM, Tallman MS, Buck G, Fielding AK, et al. In adults with standard-risk acute lymphoblastic leukemia, the greatest benefit is achieved from a matched sibling allogeneic transplantation in first complete remission, and an autologous transplantation is less effective than conventional consolidation/ maintenance chemotherapy in all patients: final results of the International ALL Trial (MRC UKALL XII/ECOG E2993). *Blood* 2008; 111 (4): 1827-33.
 17. Valcárcel D, Martino R, Sureda A, Canals C, Altés A, Briones J, et al. Conventional versus reduced-intensity conditioning regimen for allogeneic stem cell transplantation in patients with hematological malignancies. *Eur J Haematol* 2005; 74 (2): 144-51.
 18. Stein A, O'Donnell M, Snyder D, Parker P, Nademanee A, Falk P, et al. Reduced intensity stem cell transplantation for high-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007; 13: 134-8.
 19. Pagel JM, Appelbaum FR, Eary JF, Rajendran J, Fisher DR, Gooley T, et al. 131I-anti-CD45 antibody plus busulfan and cyclophosphamide before allogeneic hematopoietic cell transplantation for treatment of acute myeloid leukemia in first remission. *Blood* 2006; 107 (5): 2184-91.
 20. Schmid C, Schleuning M, Hentrich M, Markl GE, Gerbitz A, Tischer J, Ledderose G, Oruzio D, Hiddemann W, Kolb HJ. High antileukemic efficacy of an intermediate intensity conditioning regimen for allogeneic stem cell transplantation in patients with high-risk acute myeloid leukemia in first complete remission. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41 (8): 721-7.
 21. Tauro S, Craddock C, Peggs K, Begum G, Mahendra P, Cook G, et al. Allogeneic stem-cell transplantation using a reduced-intensity conditioning regimen has the capacity to produce durable remissions and long-term disease-free survival in patients with high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplasia. *J Clin Oncol* 2005; 23(36): 9387-93.
 22. Popat U, Heslop HE, Duret A, May R, Krance RA, Brenner MK, Carrum G. Outcome of reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (RISCT) using anti-lymphocyte antibodies in patients with high-risk acute myeloid leukemia (AML). *Bone Marrow Transplant* 2006; 37 (6): 547-52.
 23. Kröger N, Shimoni A, Zabelina T, Schieder H, Panse J, Ayuk F, et al. Reduced-toxicity conditioning with treosulfan, fludarabine and ATG as preparative regimen for allogeneic stem cell transplantation (alloSCT) in elderly patients with secondary acute myeloid leukemia (sAML) or myelodysplastic syndrome (MDS). *Bone Marrow Transplant* 2006; 37 (4): 339-44.
 24. Olavarria E, Ottmann OG, Deininger M, Clark RE, Bandini G, Byrne J, et al.; Chronic Leukaemia Working Party of the European Group of Bone and Marrow Transplantation (EBMT). Response to imatinib in patients who relapse after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2003; 17 (9): 1707-12.
 25. Olavarria E, Siddique S, Griffiths MJ, Avery S, Byrne JL, Piper KP, et al. Posttransplantation imatinib as a strategy to postpone the requirement for immunotherapy in patients undergoing reduced-intensity allografts for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2007; 110 (13): 4614-7.
 26. Craddock CF. Full-intensity and reduced-intensity allogeneic stem cell transplantation in AML. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41 (5): 415-23.
 27. Estey E, de Lima M, Tibes R, Pierce S, Kantarjian H, Champlin R, Giralt S. Prospective feasibility analysis of reduced-intensity conditioning (RIC) regimens for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in elderly patients with acute myeloid leukemia (AML) and high-risk myelodysplastic syndrome (MDS). *Blood* 2007; 109 (4): 1395-400.

Monitorización y tratamiento de la sobrecarga de hierro

COORDINADOR: F.A. GONZÁLEZ FERNÁNDEZ. *Madrid*

Resumen del simposio

La transfusión constituye la base del tratamiento de la mayoría de las anemias congénitas, como la talasemia, y de algunas patologías adquiridas, como los síndromes mielodisplásicos, siendo esencial en la supervivencia a largo plazo de estos trastornos. Sin embargo, pese a los claros beneficios, no está exenta de riesgos; entre ellos destaca, sobre todo, la sobrecarga férrica, que es una consecuencia inevitable de la terapia transfusional crónica.

El impacto de la sobrecarga de hierro sobre la supervivencia en pacientes con transfusión crónica ha quedado bien establecido en varios estudios en pacientes con talasemia *major*, de forma que los que tienen una mayor sobrecarga porque no reciben una adecuada quelación presentan menor supervivencia. En este sentido, en los últimos años se ha producido una mejora en la supervivencia de estos pacientes, de manera que los pacientes nacidos en las últimas décadas presentan una mayor supervivencia, claramente relacionada con el establecimiento y la difusión generalizada de las pautas de tratamiento con deferoxamina (DFO) subcutánea en bombas de infusión continua. Sin embargo, pese a ello, todavía existe una mortalidad significativa, de forma que en los registros de talasemia del Reino Unido y de Italia entre un tercio y la mitad de los pacientes no superan la edad de 35 años, siendo la afectación cardiaca la principal causa de muerte. Entre los factores que contribuyen a esta mortalidad habría que destacar como los más importantes la poca adhesión al tratamiento quelante con DFO; la sobrecarga cardiaca de hierro a pesar del tratamiento con DFO; y el difícil diagnóstico de afectación cardiaca preclínica.

En los últimos años dos hechos han determinado que estemos asistiendo a una revolución que puede modificar profundamente la quelación de hierro que hemos seguido hasta la actualidad: en primer lugar, el desarrollo y la comercialización de fármacos quelantes orales, como la deferiprona y el deferasirox, que pueden aportar un mejor cumplimiento del tratamiento y un mayor efecto quelante a nivel cardiaco; y en segundo lugar, la utilización de la resonancia magnética (RM) para valorar los depósitos de hierro en el hígado y sobre todo en el corazón, que puede aportar una mejor optimización del tratamiento quelante.

En primer lugar, el Dr. Alústiza (Osatek, San Sebastián) va a tratar precisamente sobre la valoración de la sobrecarga de hierro mediante la RM a nivel hepático y cardiaco, para profundizar en los fundamentos y los aspectos técnicos necesarios para su estandarización, implantación y utilización generalizada en la práctica clínica diaria.

En segundo lugar, la Dra. Benavente (Hospital Clínico San Carlos, Madrid) va a comentar algunos aspectos de la quelación en síndromes mielodisplásicos, como qué pacientes pueden ser candidatos a un tratamiento quelante, cuándo se debe iniciar éste, con qué métodos y qué frecuencia se debe monitorizar la sobrecarga de hierro, y qué experiencia hay con las diferentes opciones de quelación en la actualidad.

En tercer lugar, la Dra. de la Iglesia (Hospital Universitario Doctor Negrín, Gran Canaria) va a realizar una revisión del pasado, presente y futuro de la sobrecarga de hierro en las anemias hereditarias, y se va a centrar en la talasemia *major*, que constituye el modelo con el cual se han desarrollado todas las pautas con los diferentes quelantes disponibles en la actualidad y con el que se ha establecido la optimización del tratamiento quelante.

Finalmente, de forma más breve, la Dra. Cascales (Centro Regional de Hemodonación, Murcia) nos va a presentar un interesante estudio que relaciona la cardiotoxicidad por antraciclinas con la acumulación cardiaca de hierro, y el Dr. Remacha (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona) nos mostrará su experiencia con la RM como alternativa a la biopsia hepática en las enfermedades que cursan con atesoramiento de hierro en el hígado.

VALORACIÓN DE LA SOBRECARGA FÉRRICA MEDIANTE RESONANCIA MAGNÉTICA

J.M. ALÚSTIZA¹, J.I. EMPARANZA²,
A. CASTIELLA³, A. CASADO⁴, A. GARRIDO²,
P. ALDAZÁBAL², M. SAN VICENTE¹,
N. GARCÍA², A.B. ASENSIO², M. URANGA²;
GRUPO BURNIA

¹Osatek-Donostia. ²Hospital Donostia. ³Hospital Mendaró. ⁴Universidad del País Vasco

Introducción

Los aspectos más importantes de las alteraciones del metabolismo del hierro son el diagnóstico precoz de la hemocromatosis hereditaria (HH) y la evaluación de la sobrecarga férrica en los pacientes con hemocromatosis secundarias a anemia crónica susceptibles de tratamiento médico con quelantes del hierro.

El *gold standard* para el diagnóstico de la HH es la cuantificación de la concentración de hierro hepático (CHH), que clásicamente requiere una biopsia hepática. En los últimos años se han producido hallazgos relevantes en la genética y en la valoración no invasiva de la CHH mediante resonancia magnética (RM), que han facilitado el diagnóstico de HH sin necesidad de recurrir a la biopsia hepática. Si un paciente con elevación del índice de saturación de transferrina (IST) y de la ferritina es homocigoto para la mutación C282Y o doble heterocigoto C282Y/H63D, se considera ya como diagnóstico definitivo de HH y puede iniciar el tratamiento mediante sangrías^{1,2}. En ausencia de estas mutaciones deberá valorarse la CHH^{2,3}.

El porcentaje de enfermos de HH con homocigosis C282Y varía, según las áreas geográficas, entre un 40 y un 100%^{4,6}. La asociación con la doble heterocigosis C282Y/H63D es aún menor (0-11%)⁷. Si tenemos en cuenta que la especificidad de la elevación de IST y de la ferritina es menor del 50%, podemos deducir que un número importante de pacientes requieren esta cuantificación de la CHH².

La CHH se mide en micromoles de hierro por gramo de hígado ($\mu\text{mol Fe/g}$)^{2,3}. El valor normal de la CHH es $< 36 \mu\text{mol Fe/g}$. Valores por encima de $71 \mu\text{mol Fe/g}$ son altamente sugestivos de HH. El índice de hierro hepático (IHH) se obtiene al dividir la CHH por la edad del paciente. Un valor de IHH $\geq 1,9$ se considera indicativo de HH^{2,3,8,9}. En las sobrecargas férricas secundarias a hepatopatía, abuso de alcohol, etc., los niveles de CHH son siempre inferiores^{2,3}.

Además de ser invasiva, la biopsia hepática tiene importantes limitaciones diagnósticas¹¹. El coeficiente de variación de la CHH medida mediante biopsia hepática llega hasta el 19% en hígado sano y hasta el 40% en hígado cirrótico^{11,12}. Además al ser un método cruento, no sería razonable tener que utilizarlo en grandes estudios poblacionales para el diagnóstico precoz de la HH⁸. Por estas razones es interesante poder disponer de un método no invasivo para la cuantificación de la CHH.

Cuantificación por resonancia magnética

La fiabilidad de la RM para la valoración de la CHH ha sido evaluada por múltiples grupos de trabajo (Figura 1). La sobrecarga férrica genera un acortamiento del T2 del hígado que se traduce en la imagen en una disminución de la señal proporcional a la importancia de la sobrecarga férrica^{9,11,13-15} (Figura 2). Muchos trabajos



Figura 1. Paciente de 48 años con hemocromatosis hereditaria diagnosticada por biopsia (concentración de hierro en hígado de $195 \mu\text{mol Fe/g}$). A: RM en el momento del diagnóstico: importante reducción de la intensidad de señal del hígado en relación con la alta sobrecarga férrica. B: Tres años después, tras un tratamiento prolongado con sangrías, normalización de la señal del hígado. C: Sobrecarga férrica secundaria postransfusional en una mujer de 33 años tratada de un linfoma no Hodgkin con trasplante de médula ósea: reducción de la intensidad de señal en el hígado y en el bazo.

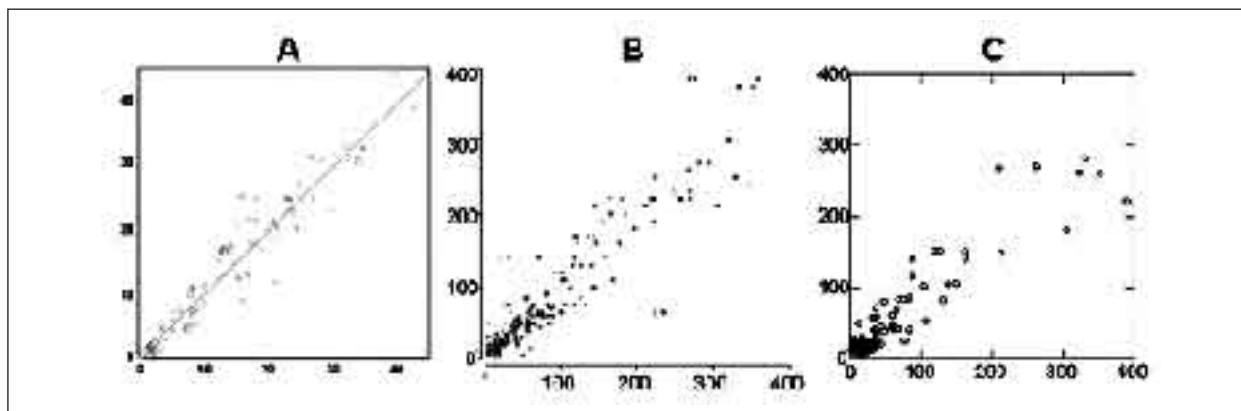


Figura 2. Gráficas con concentración de hierro en hígado calculada por RM vs. la determinada mediante por biopsia hepática en tres diferentes trabajos. A: St. Pierre *et al.*, 2005 ($r = 0,98$)¹². Y Gandon *et al.*, 2004¹³. C: J.M. Alústiza *et al.*, 2004 ($r = 0,937$)¹⁹.

han demostrado la existencia de una alta correlación entre los valores de CHH medidos sobre biopsia hepática y las medidas de RM de forma que pueden hacer estudios fiables de cuantificación^{9,11,13}. Sin embargo, el proceso para llegar a cuantificar realmente la CHH en $\mu\text{mol Fe/g}$ a partir de las medidas realizadas sobre RM es complejo y delicado.

Para cuantificar la CHH se utilizan dos métodos diferentes: 1) mediante el cálculo de tiempos de relajación; y 2) mediante la medida de ratios de intensidad de señal.

1) El cálculo de constantes de tiempos de relajación (T2, T1, R2, T2*...) requiere secuencias con múltiples tiempos de eco (TE) y cálculos de posproceso complejos. Los resultados con estos modos de cálculo han demostrado una alta correlación en todos los niveles de sobrecarga férrica, incluso en los niveles más altos típicos de las hemocromatosis secundarias. Se ha observado también una alta reproducibilidad de estos cálculos en diferentes aparatos de RM^{7,9,12,15-18}. Sin embargo, en la práctica clínica no existen métodos de adquisición estandarizados, ni modelos de cálculo validados que permitan una cuantificación de la CHH en $\mu\text{mol Fe/g}$ más que en sitios muy especializados.

2) El cálculo de la CHH a partir de de ratios de intensidad de señal (IS) entre el hígado y una estructura de referencia situada en la misma imagen a la que no afecte la sobrecarga férrica, generalmente la musculatura paravertebral, es más sencillo de realizar¹³. Se utilizan varias secuencias diferentes en eco de gradiente (EG) para poder evaluar distintos niveles de sobrecarga férrica^{9,13,14,19}. Estos cálculos han demostrado una buena correlación para niveles de CHH típicos de HH, inferiores a aproximadamente 400 $\mu\text{mol Fe/g}$. Sin embargo, saturan con niveles de sobrecarga superiores^{13,14}. El protocolo más utilizado es el diseñado por Gandon *et al.*, de la Universidad de Rennes (Francia).

Consta de un abanico de 5 secuencias con diferente susceptibilidad al hierro, rápidas y fácilmente realizables en la gran mayoría de los aparatos de RM^{13,20} (Figura 3).

La RM puede identificar también la presencia de hierro en el miocardio calculando el T2* de éste. Como no hay correlación con los valores de los depósitos de hierro en el hígado¹⁵⁻¹⁷, la posibilidad de valorar directamente la concentración de hierro en el corazón es muy interesante sobre todo para el manejo de los pacientes con hemocromatosis secundaria, en los que la afectación cardiaca es más importante que la hepatopatía. El T2 es el mejor indicador de la sobrecarga de hierro en miocardio y permite monitorizar el tratamiento de la misma mediante quelantes¹⁵. El valor normal del T2* es de $33,3 \pm 7,8$ ms; con la sobrecarga férrica, es de < 20 ms.

La cuantificación por RM en España

En nuestro conocimiento no hay ningún centro en España que cuantifique la CHH calculando la T2. Sin embargo, en estos momentos hay una gran actividad en España y Europa en diferentes grupos de trabajo y casas comerciales, y puede predecirse que en un corto plazo la técnica estará disponible en bastantes centros.

Aunque desconocemos que nadie lo utilice en España, St. Pierre *et al.*¹² ofrecen los medios necesarios para calcular la R2 (<http://www.FerriScan.com>). Requiere configurar la máquina con un fantoma que ellos mismos suministran y enviar electrónicamente los datos brutos obtenidos a una oficina central. Esta operación conlleva un coste económico y necesita dos días laborables. Su modelo de cálculo fue validado en 105 pacientes con niveles de CHH comprendidos entre 5 y 765 $\mu\text{mol Fe/g}$, habiéndose obtenido

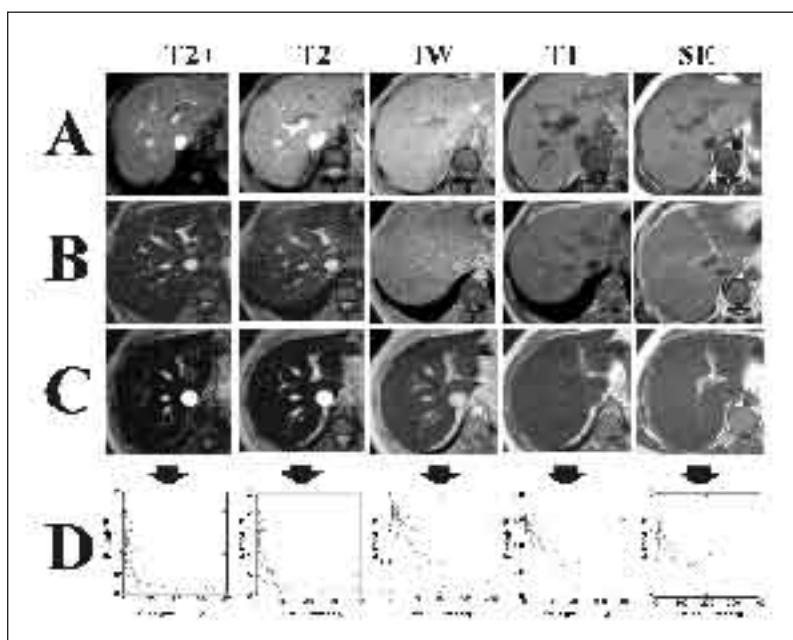


Figura 3 (A-D). Estudio hepático por RM de tres pacientes con grados diferentes de sobrecarga férrica en las secuencias del protocolo de la Universidad de Rennes [T2+ = 120/21/20° TR/TE/Flip); T2 = 120/14/20°; IW = 120/4/20°; T1 = 120/14/90°; SE (Spin Echo) = 300/12]. A: Paciente sin sobrecarga férrica (15 $\mu\text{mol Fe/g}$ en la biopsia hepática). B: Paciente con sobrecarga férrica de grado medio (60 $\mu\text{mol Fe/g}$). C: Paciente con hemocromatosis hereditaria (219 $\mu\text{mol Fe/g}$). D: Gráficos ilustrativos de la correlación entre la ratio hígado/músculo (*Ratio H/M*) y la concentración de hierro en hígado (CHH) medida sobre biopsia hepática, para cada secuencia de RM, en 112 pacientes con diferentes niveles de sobrecarga férrica. Los gráficos muestran una mayor disminución de la señal en las secuencias más ponderadas en T2.

una correlación $r = 0,98$ con la CHH calculada sobre biopsia hepática.

En cuanto a los modelos de cálculo a partir de medidas de ratios de IS, la técnica propuesta por la Universidad de Rennes, además de ser sencilla de realizar en la práctica totalidad de las máquinas de RM de 1,5 y 1 teslas, en su página web (<http://www.radio.univ-rennes1.fr>) se ofrece también la posibilidad de obtener automáticamente la cuantificación de la CHH usando su algoritmo sin coste económico alguno. Para ello simplemente hay que introducir los valores de IS del hígado y el músculo obtenidos en todas y cada una de las secuencias en la hoja de cálculo de la web. Son muchos los centros en España que utilizan este método de cálculo.

Son, sin embargo, muy pocos los trabajos que han evaluado la cuantificación de la CHH obtenida por dicho método con respecto a la calculada mediante biopsia hepática. Nuestro centro ha podido evaluar este modelo de cálculo a 1,5 y 1 teslas. A 1,5 teslas se comparó la CHH calculada por dicho modelo con la medida sobre biopsia hepática en 112 pacientes en-

contrando una tendencia a la sobrevaloración: 16 falsos positivos (24,5%) de sobrecarga media (36-80 $\mu\text{mol Fe/g}$) y 7 falsos positivos (30%) de sobrecarga férrica alta (> 80 $\mu\text{mol Fe/g}$)¹⁹. La correlación fue $r = 0,887$. A 1 tesla se compararon también en 31 pacientes la CHH calculada mediante este modelo, encontrándose también una tendencia significativa a la sobrevaloración con respecto a la medida sobre biopsia hepática: 5 falsos positivos (45%) de sobrecarga férrica media y 10 falsos positivos (75%) de sobrecarga alta (aceptado para publicación en radiología).

Nuestro grupo de trabajo ha diseñado un algoritmo de cuantificación de la CHH. Este modelo fue calculado con 112 pacientes con CHH < 391 $\mu\text{mol Fe/g}$, obteniéndose una correlación $r = 0,937$ con la CHH medida sobre biopsia hepática (3 falsos positivos (4,5%) para sobrecarga férrica media y 3 falsos positivos (13%) para alta sobrecarga férrica)¹⁹.

Nuestro equipo ha diseñado también un fantoma con diferentes soluciones de hierro que permite calibrar máquinas de 1,5 teslas para la utilización de este modelo de cálculo con márgenes de error asumibles en la práctica clínica. Por el momento se han evaluado en España

40 centros (Tabla 1): 36 no han necesitado modificar sus secuencias de adquisición y pueden reproducir de manera automática nuestro modelo de cálculo; dos han debido modificar sus parámetros de adquisición; y otros dos han debido aplicar un factor de corrección a la fórmula de cálculo de la CHH para corregir una tendencia a la sobrevaloración en las sobrecargas férricas medias (resultados todavía no publicados). Este fantoma está disponible gratuitamente (jmalustiza@osatek.es).

Nuestro hospital atiende una población de unas 500.000 personas. Desde enero del 2002 disponemos de este modelo de cuantificación y hemos realizado más de 800 estudios; hemos encontrado más de 100 pacientes con más de 80 $\mu\text{mol Fe/g}$ (resultados todavía no publicados). La justificación más frecuente de la prueba es la presencia de alteraciones del metabolismo del hierro con estudios genéticos no concluyentes. Tenemos menos experiencia en el estudio de sobrecargas férricas secundarias.

Técnicamente, calcular el T2 del miocardio es todavía más complejo que el del hígado, y en realidad

todavía pocos aparatos lo pueden hacer en nuestro medio. También en esta área, actualmente hay grandes avances en las casas comerciales y esta técnica de

cálculo será realidad de manera más generalizada en un corto-medio plazo.

Tabla 1. Centros de RM calibrados en España para utilizar el modelo de cálculo de Osatek-Donostia

CENTRO	CIUDAD	MÁQUINA RM
Osatek I	Galdácano	SIEMENS
Osatek II	Vitoria	SIEMENS
Osatek III	San Sebastián	PHILIPS
Osatek IV	San Sebastián	PHILIPS
Policlínica Guipúzcoa	San Sebastián	G. ELECTRIC
Clínica Quirón	San Sebastián	SIEMENS
Instituto Oncológico	San Sebastián	G. ELECTRIC
Clínica Virgen Blanca	Bilbao	G. ELECTRIC
Hospital Cruces	Bilbao	PHILIPS
Osatek Amb. Las Arenas	Bilbao	SIEMENS
Clínica San Francisco Javier	Bilbao	G. ELECTRIC
Clínica Guimón-Preteimagen	Bilbao	SIEMENS
Clínica Dr. San Sebastián	Bilbao	SIEMENS
Clínica U. de Navarra	Pamplona	SIEMENS
Hospital U. de Vigo	Vigo	G. ELECTRIC
Hospital U. Juan Canalejo	A Coruña	PHILIPS
Hospital U. Virgen del Rocío	Sevilla	PHILIPS
Hospital Miguel Servet I y II	Zaragoza	G. ELECTRIC
IDI Girona (H. Dr. Josep Trueta)	Girona	G. ELECTRIC
Clínica Girona	Girona	G. ELECTRIC
Hospital Clínic	Barcelona	SIEMENS
CRC - Sagrat Cor	Barcelona	PHILIPS
Hospital Son Dureta	Palma de Mallorca	SIEMENS
Hospital U. Dr. Peset	Valencia	PHILIPS
Hospital Quirón Valencia	Valencia	PHILIPS
Hospital de la Ribera	Alcira	PHILIPS
Hospital U. Gregorio Marañón	Madrid	PHILIPS
Hospital de León	León	SIEMENS
Clínica La Milagrosa	Madrid	PHILIPS
Hospital 12 de Octubre	Madrid	PHILIPS
Sanatorio San Francisco de Asís	Madrid	PHILIPS
H. U. Gran Canaria Dr. Negrín	Las Palmas	SIEMENS
Hospital Santa María Del Rosell	Cartagena	G. ELECTRIC
UDIAT	Sabadell	SIEMENS
Hosp. de Madrid-Montepíncipe	Boadilla del Monte	PHILIPS
CIDT Francisco Díaz	Alcalá de Henares	G. ELECTRIC
Hospital U. Príncipe de Asturias	Alcalá de Henares	PHILIPS
Hospital U. Reina Sofía	Córdoba	G. ELECTRIC
Hospital Mesa del Castillo	Murcia	G. ELECTRIC
Hospital U. Morales Meseguer	Murcia	G. ELECTRIC

Conclusión

Podemos decir que en nuestro medio hay disponibles ya herramientas validadas para cuantificar la CHH de manera fiable en el diagnóstico de la HH.

El método de la Universidad de Rennes, por su tendencia a la sobrevaloración de la CHH, es útil para descartar HH e identificar los pacientes con ausencia de sobrecarga férrica; sin embargo, su fiabilidad en el diagnóstico de sobrecarga férrica es limitada.

Nuestro modelo de cálculo, además de ser más fiable para todos los valores de CHH tiene la ventaja de disponer de un fantoma que permite una calibración específica para cada máquina. Cuarenta centros diferentes de España ya están calibrados con este modelo.

En este momento aquellos centros que quieran comenzar a realizar estos estudios de cuantificación, deberían también “calibrarse” con algunos pacientes, comparando los cálculos realizados en la RM con los obtenidos sobre biopsia hepática. Estos estudios comparativos no son difíciles de realizar si tenemos en cuenta que todavía sigue indicada la biopsia hepática con fines pronósticos, en todos los mayores de 40 años, con ferritina > 1.000 y alteraciones de las enzimas hepáticas para descartar cirrosis hepática^{2,3}.

Ninguno de ambos modelos es fiable para la cuantificación de las sobrecargas férricas muy altas típicas de las hemocromatosis secundarias. La técnica adecuada con cálculo de T2 del hígado o del corazón no está todavía disponible en nuestro medio de manera generalizada aunque se están dando actualmente prometedores avances técnicos. La colaboración interdisciplinar entre hematólogos y radiólogos será imprescindible para hacer realidad estos nuevos modelos de cálculo en un medio plazo.

Bibliografía

- Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis – A new look at an old disease. *N Engl J Med* 2004; 350: 2383-97.
- Tavill AS. Diagnosis and management of hemochromatosis. *Hepatology* 2001; 33 (5): 1321-8.
- O’Neil J, Powell L. Clinical aspects of hemochromatosis. *Semin Liver Dis* 2005; 25 (4): 381-91. Review.
- Brittenham GM, Badman DG. Noninvasive measurement of iron: report of an NIDDK workshop. *Blood* 2003; 101 (1): 15-19.
- Beutler E. The HFE Cys282Tyr mutation as a necessary but not sufficient cause of clinical hereditary hemochromatosis. *Blood* 2003; 101 (9): 3347-50.
- De Juan D, Reta A, Castiella A, et al. HFE gene mutations analysis in Basque hereditary haemochromatosis patients and controls. *Eur J Hum Genet* 2001; 9 (12): 961-4.

7. Lazarescu A, Snively BM, Adams PC. Phenotype variation in C282Y homozygotes for the hemochromatosis gene. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3 (10): 1043-6.
8. EASL International Consensus Conference on Haemochromatosis. *J Hepatol* 2000; 33 (3): 485-504.
9. Bonkovsky HL, Rubin RB, Cable EE et al. Hepatic iron concentration: noninvasive estimation by means of MR imaging techniques. *Radiology* 1999; 212 (1): 227-34.
10. Sherlock S, Dooley J. *Diseases of the Liver and Biliary System*, 11th ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 2002. p. 399-411.
11. Jensen PD. Evaluation of iron overload. *Br J Haematol* 2004; 124 (6): 697-711.
12. St Pierre TG, Clark PR, Chua-anusorn W, et al. Noninvasive measurement and imaging of liver iron concentrations using proton magnetic resonance. *Blood* 2005; 105 (2): 855-61.
13. Gandon Y, Olivieri D, Guyader D, Aubé C, Oberti F, Sebille V, Deugnier Y. Non-invasive assessment of hepatic iron stores by MRI. *The Lancet* 2004; 363: 357-62.
14. Rose C, Vandevenne P, et al. Liver iron content assessment by routine and simple magnetic resonance imaging procedure in highly transfused patients. *Eur J Haematol* 2006; 77: 145-9.
15. Anderson LJ, Holden S, et al. Cardiovascular T2-star (T2*) magnetic resonance for the early diagnosis of myocardial iron overload. *European Heart Journal* 2001; 22: 2171-9.
16. Westwood MA, Anderson LJ, et al. Interscanner reproducibility of cardiovascular magnetic resonance T2* measurements of tissue iron in thalassemia. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 2003; 18: 616-20.
17. Wood J C, Enriquez C, et al. MRI R2 and R2* mapping accurately estimates hepatic iron concentration in transfusion-dependent thalassemia and sickle cell disease patients. *Blood* 2005; 106: 1460-5.
18. Westwood MA, Anderson LJ, et al. A single breath-hold multiecho T2* cardiovascular magnetic resonance technique for diagnosis of myocardial iron overload. *J Magn Reson Imaging*, 2003; 18: 33-9.
19. Alústiza JM, Artetxe J, Castiella A, et al. MR Quantification of Hepatic Iron Concentration. *Radiology* 2004; 230: 479-84.
20. Gandon Y. Iron and liver. Available at: www.radio.univ-lyon1.fr.

UTILIZACIÓN DE LOS QUELANTES DE HIERRO EN LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS

C. BENAVENTE CUESTA,
F.A. GONZÁLEZ FERNÁNDEZ
*Servicio de Hematología y Hemoterapia.
Hospital Clínico San Carlos. Madrid*

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) son un conjunto heterogéneo de hemopatías clonales caracterizadas por una diferenciación y proliferación celular anormal. Cursan con una mielopoyesis ineficaz, generalmente con mono-, bi- o pancitopenia en sangre periférica y médula ósea normo o hiper celular con signos de displasia. La mayoría de los SMD evolucionan a un fallo

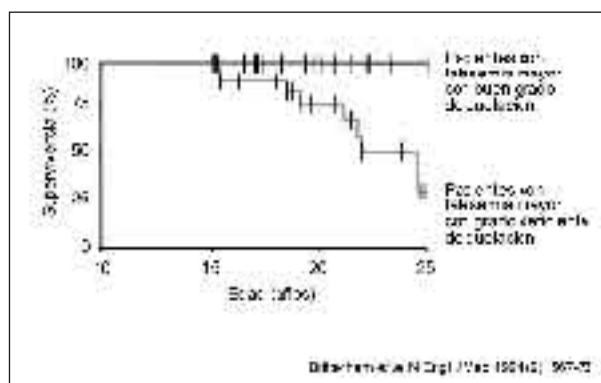


Figura 1. Impacto de la sobrecarga de hierro en la supervivencia de los pacientes con talasemia mayor.

medular progresivo y presentan un mayor riesgo de evolucionar a leucemia aguda, aunque en algunos pacientes el curso clínico puede ser relativamente indolente. Generalmente la edad media al diagnóstico está entre los 60 y los 75 años.

Pese al desarrollo de nuevos fármacos, como factores de crecimiento, inmunosupresores, inductores de la diferenciación, agentes antiangiogénicos, agentes demetilantes entre otros y a la mejora en las estrategias terapéuticas potencialmente curables como el trasplante alogénico de médula ósea, el tratamiento de soporte sigue siendo en la actualidad el pilar principal del tratamiento de los SMD. De hecho, la anemia es el hallazgo más común en estos pacientes, de forma que aproximadamente el 80% de los casos la presentan al diagnóstico, y prácticamente la totalidad la desarrollan en algún momento en el curso de su enfermedad, por lo que la transfusión es el tratamiento más frecuentemente administrado.

A pesar de los claros beneficios de la transfusión en cuanto a disminución de la morbilidad, no está exenta de problemas o riesgos, entre los que destaca la sobrecarga férrica. El hecho de que no exista un mecanismo fisiológico de excreción de hierro ocasiona de manera inevitable la sobrecarga de hierro en la terapia transfusional crónica. Así, si cada unidad de concentrado de hematíes contiene unos 200-250 mg de hierro y las pérdidas fisiológicas son sólo de 1 mg al día, en un paciente que recibe dos concentrados de hematíes al mes, a los 4 años habrá acumulado aproximadamente de 20-25 g, cifra que se considera el límite a partir del cual aparecen las manifestaciones y complicaciones clínicas por el efecto tóxico del hierro.

Además del hierro aportado en las transfusiones en los síndromes mielodisplásicos, al igual que en otros tipos de anemia con un importante componente de eritropoyesis ineficaz, existe un aumento de la absorción

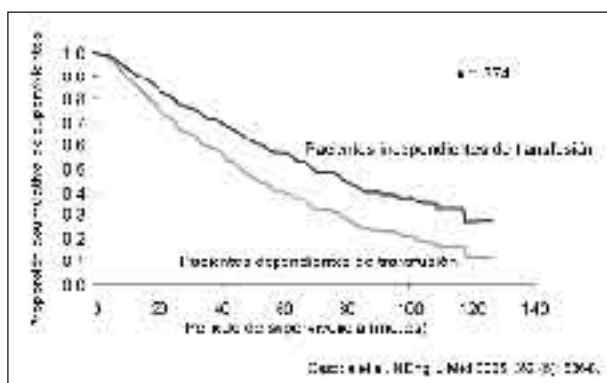


Figura 2. Impacto de las transfusiones en la supervivencia de los SMD.

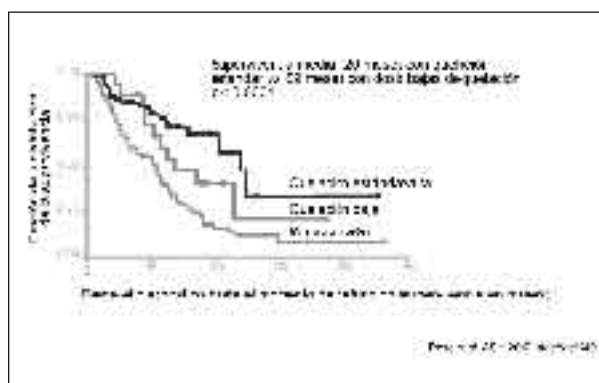


Figura 3. Impacto de la quelación de hierro en la supervivencia de los SMD.

de hierro a nivel intestinal que contribuye en mayor o menor grado al desarrollo de la sobrecarga de hierro.

El impacto de la sobrecarga de hierro sobre la supervivencia en pacientes con transfusión crónica ha sido bien establecido en varios estudios en pacientes con talasemia, de forma que los pacientes que presentan una mayor sobrecarga porque no reciben una adecuada quelación presentan una menor supervivencia¹. (Figura 1) Sin embargo, esta diferencia se pone de manifiesto a los 10 años de tratamiento, por lo que dado el pronóstico de los SMD y que la mayoría de los pacientes son de edad avanzada, cabe la duda de si los pacientes con SMD tienen una supervivencia lo suficientemente larga como para que se beneficien de alguna intervención terapéutica sobre la sobrecarga de hierro. No obstante, hay que considerar que, por la comorbilidad que con frecuencia presentan, los pacientes con edad avanzada pueden ser especialmente sensibles o vulnerables al efecto tóxico del hierro.

Por tanto, la cuestión principal es si las complicaciones de la sobrecarga de hierro a nivel cardiaco, hepático y endocrino son más frecuentes en los pacientes con SMD transfusión-dependientes que en la población general de su edad y si pueden condicionar su supervivencia. Desafortunadamente no hay ningún estudio en la literatura que valore específicamente y de forma prospectiva la mortalidad atribuible a la sobrecarga de hierro postransfusional en los SMD, aunque sí disponemos de estudios importantes.

El grupo de Pavia² ha demostrado que los pacientes con SMD transfusión-dependientes presentan una supervivencia significativamente menor. Aunque esto podría ser explicado porque estos pacientes presentan una enfermedad más agresiva, con mayor incidencia de transformación a leucemia, complicaciones hemorrágicas e infecciosas, las complicaciones derivadas de la sobrecarga de hierro podrían contribuir a esta menor supervivencia (Figura 2).

De hecho, en el mismo grupo de pacientes el desarrollo de sobrecarga férrica definida como ferritina > 1.000 ng/mL se asociaba a una menor supervivencia con un aumento del riesgo relativo de muerte del 30% por cada incremento en la ferritina de 500 ng/mL³. Esta diferencia en la supervivencia se observó en los pacientes con anemia refractaria simple y sideroblástica, que son los que presentan globalmente mejor supervivencia, y se perdía en los grupos de citopenias refractarias con mielodisplasia multilineal y en los grupos con excesos de blastos. Otro dato interesante de este estudio es que, excluyendo las muertes por evolución a leucemia, la mitad de los pacientes habían muerto por ICC y la muerte por ICC fue estadísticamente significativa mayor en el grupo de pacientes transfusión-dependientes. Por tanto, sí parece razonable pensar que al menos un grupo de pacientes con mejor pronóstico y más supervivencia podrían beneficiarse de un tratamiento quelante.

En el último ASH se han comunicado dos estudios, uno del grupo canadiense y otro del grupo francés, que sustentan el posible beneficio del tratamiento quelante en los SMD.

En del grupo canadiense⁴ se analizaron de forma retrospectiva 178 pacientes de manera que los pacientes que recibieron tratamiento quelante presentaron una mediana de supervivencia y una supervivencia global a los 4 años significativamente mayor.

En el del grupo francés⁵ se realizó una encuesta en 18 centros que incluyeron a 170 pacientes. Se consideró que habían recibido un tratamiento quelante estándar o adecuado 57 pacientes, una quelación baja o inadecuada 19 pacientes y 101 no habían recibido tratamiento quelante. La supervivencia global fue significativamente mejor para los pacientes que recibieron terapia de quelación del hierro, 115 meses frente a 51. La quelación estándar produjo beneficios en la supervivencia significativamente mejores que la quelación a dosis bajas. El tratamiento quelante mejoró la supervi-

vencia en pacientes con SMD transfusión-dependientes con un IPSS bajo o intermedio (Figura 3).

A la luz de estos datos es difícil plantear un estudio prospectivo aleatorizado en SMD transfusión-dependientes de tratamiento con quelación de hierro frente a grupo control sin quelación.

De esta forma la utilización de quelantes del hierro en los pacientes transfusión-dependientes con SMD se ha recogido en las diferentes guías consenso sobre el diagnóstico y tratamiento de los SMD, como la del grupo italiano⁶, el grupo británico⁷ o el NCCN de Estados Unidos⁸, y se han elaborado unas guías específicas sobre quelación en SMD como son la Guía de la Reunión Consenso del VIII Simposium sobre SMD de Nagasaki del 2005⁹ y, más recientemente, las guías españolas¹⁰ elaboradas por un grupo de expertos de la AEHH que se acaban de editar.

En estas guías se recogen una serie de cuestiones que debemos tener en cuenta en el momento que nos planteamos la utilización de quelantes del hierro en pacientes transfusión-dependientes con SMD.

Pacientes candidatos a tratamiento quelante

Si estratificamos los pacientes según la clasificación de la OMS, los pacientes con síndrome 5q- y anemia refractaria con y sin sideroblastos en anillo presentan una supervivencia de alrededor de 5 años, por lo que se podrían beneficiar de forma clara de un tratamiento quelante si son transfusión-dependientes; mientras que los pacientes AREB I y II presentan una mediana de supervivencia inferior a los 2 años, por lo que no serían candidatos a la quelación ya que no van a vivir lo suficiente para desarrollar las complicaciones de la sobrecarga férrica⁹.

Las citopenias refractarias con displasia multilineal presentan una supervivencia aproximada de 3 años, pero con un considerable riesgo de transformación a leucemia y un pronóstico muy variable. Aplicando el índice pronóstico IPSS en estos pacientes, se diferencian: el grupo de bajo riesgo, con una supervivencia superponible a las anemias refractarias; el del grupo de riesgo intermedio 1, con una supervivencia algo menor en torno a los 3 años; y los del intermedio 2 y alto grado, con supervivencias de 12 y 7 meses, respectivamente.

Por lo tanto, en resumen, los síndromes mielodisplásicos subsidiarios de tratamiento quelante comprenderían la anemia refractaria con o sin sideroblastos en anillo, el síndrome 5q- y las citopenias refractarias con displasia multilineal con IPSS de bajo riesgo o intermedio de riesgo 1 que en su conjunto constituyen algo más de la mitad de los pacientes con SMD.

Recientemente se ha publicado un estudio del grupo del Dana-Farber (Boston)¹¹ en el que los pacientes con SMD y LAM que recibieron un trasplante alogé-

co de MO que presentaban niveles más altos de ferritina tenían una supervivencia global menor, una mayor mortalidad relacionada con el procedimiento y una supervivencia libre de enfermedad inferior (Figura 4). Por lo tanto, además se debería considerar la posibilidad de tratamiento quelante en pacientes con SMD de alto riesgo y sobrecarga férrica si son candidatos a trasplante alogénico de médula ósea.

Cuándo se debe iniciar el tratamiento quelante

No existe un claro acuerdo en las diferentes guías de consenso. Así, el grupo italiano considera que se debe iniciar el tratamiento cuando los pacientes han recibido más de 50 U de CH y su esperanza de vida es mayor de 6 meses. En la guía británica se recomienda iniciar el tratamiento tras 25 U de CH con el objetivo de obtener una ferritina < 1.000 ng/mL. En la guía americana del NCCN el tratamiento quelante se recomienda en pacientes que previamente han recibido 20-30 U de CH y ferritinas > 2.500 ng/mL. En la Reunión Consenso del VIII Simposium sobre SMD en Nagasaki en mayo del 2005 se recomienda iniciar el tratamiento cuando la ferritina alcance niveles de 1.000 a 2.000 ng/mL dependiendo del grado y frecuencia de las transfusiones. La guía española recomienda el tratamiento quelante en SMD transfusión-dependientes cuando los niveles de ferritina son > 1.000 ng/mL.

Cuándo se debe iniciar la valoración de la posible sobrecarga de hierro

Aunque el mayor grado de sobrecarga férrica viene determinado por el soporte transfusional, en los SMD existe un aumento de absorción de hierro a nivel intestinal que justificaría que algunos pacientes comenzasen a acumular hierro antes de que se iniciaran las transfusiones.

De esta forma en el registro de SMD de Düsseldorf en 650 pacientes se observó que el 5% presentaban una ferritina superior a 1.000 ng/mL en el momento del diagnóstico, por lo que parece conveniente iniciar la valoración del hierro al diagnóstico.

Métodos que se deben utilizar para la valoración de la sobrecarga de hierro

La ferritina constituye el método de valoración de la sobrecarga de hierro más frecuentemente utilizado en la práctica clínica por su bajo coste y su sencillez. Sin embargo, es un reactante de fase aguda y sus niveles pueden fluctuar a corto plazo en respuesta a factores como la infección o la inflamación, de modo que para

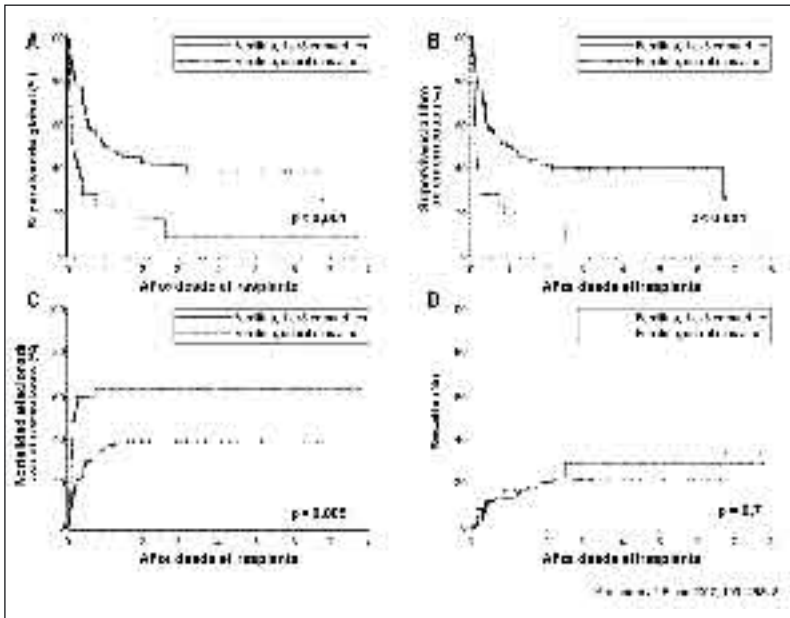


Figura 4. Impacto de la sobrecarga de hierro en TPH alógeno. Supervivencia según sobrecarga de hierro.

el diagnóstico definitivo de la sobrecarga de hierro es necesario valorar otros parámetros como el índice de saturación de transferrina.

Existe una buena correlación de los niveles de ferritina con la concentración hepática de hierro (LIC), por lo que los cambios a largo plazo de ferritina reflejan los cambios de los depósitos corporales y constituyen una herramienta útil en la monitorización de la sobrecarga de hierro.¹²

En el hígado se encuentra el 70% del hierro de los depósitos, por lo que la determinación del LIC por biopsia hepática ha sido considerada como el mejor método de valoración de los depósitos de hierro del organismo. De hecho, su relevancia o importancia clínica ha sido bien establecida en pacientes con talasemia, de forma que los pacientes con un LIC mayor de 15 mg/g de tejido seco presentan un riesgo muy aumentado de enfermedad cardíaca y muerte precoz¹³.

Sin embargo, la heterogeneidad de los depósitos de hierro en el hígado, junto con el pequeño tamaño de la muestra que se suele obtener en la biopsia, hace que la determinación de la concentración hepática de hierro presente un alto coeficiente de variación en la mayoría de los estudios publicados. Si además tenemos en cuenta que es una prueba invasiva, no exenta de riesgos, sobre todo en pacientes de edad avanzada y que con frecuencia presentan trombopenia, su utilización no es recomendable en los SMD.

En la actualidad la determinación de la concentración hepática de hierro por métodos no invasivos como la RMN están sustituyendo a la biopsia hepática. Se ha demostrado una buena correlación entre la determinación de la concentración hepática de hierro por RMN y por biopsia¹⁴. En este sentido la determina-

ción del LIC con RMN presenta una alta especificidad y sensibilidad para los valores considerados umbrales en el manejo de los pacientes con sobrecarga férrica secundaria a transfusión.

Además la RMN nos puede permitir obtener información del acúmulo de hierro cardíaco que constituye la principal causa de muerte en estos pacientes. De hecho, existe una buena correlación entre el hierro cardíaco y el tiempo de relajación transversal T2*, así como entre este último parámetro y la fracción de eyección, de forma que cuando la T2* disminuye por debajo de 20 ms se produce una disminución en la fracción de eyección.¹⁵

Frecuencia con que se debe monitorizar la sobrecarga de hierro

Los intervalos entre los que se debe monitorizar la sobrecarga férrica van a depender fundamentalmente del grado de aporte de hierro con las transfusiones y del método de la valoración. Así, parece razonable que en pacientes no transfusión-dependientes probablemente sea necesario sólo evaluar el grado de hierro en el organismo una vez al año o cada 6 meses, mientras que en pacientes transfusión-dependientes sea necesario realizar esta valoración una vez al mes o cada 3 meses.

Fármacos quelantes que podemos usar

En la actualidad disponemos de tres quelantes de hierro. La deferoxamina, la deferiprona y el deferasirox (Tabla 1).

Tabla 1. Agentes quelantes

	Deferoxamina	Deferiprona	Deferasirox
Dosis habitual (mg/kg/día)	25-60	75	20-30
Vida media	20-30 minutos	3-4 horas	12-16 horas
Vía administración	s.c.-i.v. (8-12 horas 5 días/semana)	oral 3 veces/día	oral 1 vez /día
Eliminación	orina, heces	orina	heces
Efectos adversos	reacciones locales, retraso crecimiento, oculares, auditivos, alérgicos	gastrointestinales, agranulocitosis, leucopenia, altralgia	gastrointestinales, rash, creatinina, oculares, auditivos

A la hora de elegir un tratamiento quelante hay que tener en cuenta una serie de consideraciones básicas:

- La toxicidad de todo fármaco quelante es inversamente proporcional al nivel de sobrecarga férrica.
- El objetivo no es eliminar la sobrecarga, sino mantener unos niveles que no determinen daño a nivel visceral. En pacientes con talasemia *major* el objetivo es mantener ferritinas inferiores a 1.500 ng/mL y un LIC inferior a 7 mg/g.
- La dosis del fármaco debe estar en relación con la severidad de la sobrecarga y de los requerimientos transfusionales del paciente.
- El objetivo teórico de un buen quelante es la eliminación continua del LIP (*labil plasma iron*), que es la fracción tóxica a nivel celular.
- Dado que el tratamiento se debe mantener de por vida, se ha de confirmar su eficacia y falta de toxicidad a muy largo plazo.

La deferoxamina (DFO) es el quelante del que se cuenta con más experiencia, más de 30 años, y el único aprobado para cualquier indicación o etiología. De origen natural, ya que se obtiene a partir de *Streptomyces pilosus*, tiene estructura hexadentada que forma complejos 1/1 con el hierro.

Su utilidad en la sobrecarga férrica ha sido bien establecida en talasemia *major*, de forma que el cumplimiento del tratamiento es crítico en la supervivencia de los pacientes¹⁶.

Pese a que brinda un perfil de toxicidad leve, presenta una vida media muy corta, menos de una hora, y no se absorbe por vía oral, por lo que es necesaria su administración con bombas de infusión continua por vía parenteral, lo que dificulta el cumplimiento del tratamiento, sobre todo en pacientes de edad avanzada.

De hecho, existen muy pocos estudios sobre su utilización en SMD. Así en la guía de la Sociedad Italiana se recogen sólo 29 pacientes en 7 estudios no controlados de quelación en SMD. De estos estudios desta-

can el del grupo de Verona¹⁷, en el que se observó una reducción de los niveles de ferritina en el 71% (10 de 14), y el de Jehnsen¹⁸, de Dinamarca, con una reducción del 100% (11 de 11) en la concentración de hierro hepático medida por RMN. Además, en estos últimos pacientes se observó una mejoría en la hemopoyesis, con un incremento en la cifra de plaquetas y en la cifra de neutrófilos y una disminución significativa en los requerimientos transfusionales.

El Grupo Español de Eritropatología realizó un estudio observacional, abierto, multicéntrico y no aleatorizado, en 28 pacientes diagnosticados de SMD de bajo riesgo (anemias refractarias simples o sideroblásticas)¹⁹. Hubo un alto número de abandonos del tratamiento de forma que al año un 40% de los pacientes lo habían abandonado, la mayoría por intolerancia; a los 2 años sólo un 20% seguían con él; y a los 3, solamente 2 lo seguían. Pese al mal cumplimiento y a pesar del régimen transfusional, se encontró una disminución de la concentración de ferritina, aunque ésta no fue estadísticamente significativa, probablemente por la pérdida de pacientes durante el seguimiento. Pero al contrario de la experiencia recogida por Jensen *et al.*, en la que observó una disminución en los requerimientos transfusionales, en este estudio aumentaron. No obstante, la edad media de estos pacientes era sensiblemente mayor, al igual que el tiempo de evolución de su enfermedad antes de iniciar la quelación.

La deferiprona (DFP) es el segundo fármaco disponible en la actualidad. Está aprobado para sobrecarga férrica en pacientes mayores de 10 años con talasemia *major* en los que el tratamiento con deferoxamina está contraindicado o es inadecuado. No está aprobada su indicación como tratamiento quelante en la sobrecarga férrica postransfusional de los SMD. Es un ligando bidentado, forma complejos 3/1, se absorbe por vía oral, con una vida media corta, por lo que se deben administrar en tres tomas diarias. La mayor parte del hierro se elimina por orina y el nivel de excreción depende de la dosis de DFP y del nivel de sobrecarga. Presenta una toxicidad no despreciable que consiste en agranulocitosis en un 0,5 a 1% de pacientes que obliga a suspender definitivamente el tratamiento, leucopenia en un 8%, artropatía en un 10-15%, síntomas gastrointestinales (15-20%) y, con menor frecuencia, elevación de las transaminasas y déficit de zinc, lo que también dificulta su utilización en pacientes de edad avanzada.

Su utilidad como quelante ha sido demostrada en pacientes con talasemia y, aunque en estudios iniciales se sugirió que era menos eficaz que la DFO, en algunos estudios más recientes hay datos que indican que es más eficaz en la eliminación de hierro cardiaco y, por tanto, es más cardioprotector que la DFO.²⁰

Prácticamente no ha sido utilizada en los SMD por su toxicidad. De modo que sólo existe un estudio publicado en el que se utilizó deferiprona en 18 pacientes

con SMD con unas respuestas del 61% y una pérdida de seguimiento al año de un tercio de los pacientes con una toxicidad de leucopenia (8%), náuseas (8%), artralgia (5%), agranulocitosis (3%) y exantema (3%)²¹.

El deferasirox es el tercer fármaco que podemos calificar como nuevo quelante. Está indicado en la sobrecarga férrica postransfusional en pacientes mayores de 6 años con talasemia *major*. También está indicado cuando la DFO está contraindicada o su tratamiento es inadecuado en talasemia *major* con sobrecarga férrica en pacientes mayores de dos años y sobrecarga férrica postransfusional asociada a otros tipos de anemia incluyendo SMD. Es un quelante trivalente con buena absorción oral, con un pico en plasma a las 2 horas de la ingesta. Tiene una vida media larga (12-16 h), por lo que se puede utilizar una única dosis diaria, con una alta selectividad por el hierro. La excreción del hierro es fundamentalmente por las heces; sólo un 6% se elimina por orina. Presenta una toxicidad leve con molestias gastrointestinales, exantema y aumento de creatinina que exige control renal. No produce agranulocitosis ni afectación articular o hepática.

Desde el año 2003 se han llevado a cabo varios estudios en fase II y III en más de 200 centros de 30 países que comprenden más de 3.500 pacientes, fundamentalmente con talasemia, en los que se ha visto que la eliminación de hierro depende de la dosis del fármaco y del grado y frecuencia de las transfusiones; también se ha comprobado que las dosis de 20 mg/kg y 30 mg/kg son comparables, o al menos igual de eficaces, en la disminución de hierro corporal que dosis de 40 y 60 mg/kg de DFO.

Además de la dosis utilizada, el grado y frecuencia de los requerimientos transfusionales influyen de forma importante en la eliminación de Fe. Así, los pacientes con requerimientos transfusionales altos de más de dos concentrados de hematíes/mes necesitan dosis mayores para conseguir un balance negativo; y, al contrario, pacientes con pocos requerimientos transfusionales necesitan menos dosis.

La vida media larga hace que, al contrario que con la DFO y la DFP, se obtengan niveles más constantes del fármaco de forma que se consigue una reducción mantenida sin picos de rebote en los niveles del LPI que corresponde a una fracción del hierro no unido a transferrina y que probablemente es la más tóxica al estar involucrada en la generación de radicales libres.

Además hay estudios preclínicos que sugieren la capacidad del fármaco de entrar en las células miocárdicas, unirse al hierro y eliminarlo de los tejidos. Así, en un estudio donde se valoró la cantidad de hierro por RMN mediante el parámetro T2* se observó una mejoría significativa de dicho parámetro al año de tratamiento.

En cuanto a su experiencia en pacientes con SMD, hay 3 estudios 2 en fase II y otro en fase IV que in-

cluyen pacientes con SMD. En el primero, los datos preliminares se comunicaron en el ASH del 2004 por Porter y posteriormente los resultados se han ido comunicando en la reunión sobre SMD de Nagasaki del 2005, en el ESMO del 2006 y finalmente se han publicado recientemente en febrero del 2008²². En este estudio se incluye una cohorte de 47 pacientes con SMD dentro de un grupo de pacientes con talasemia, anemia de Blackfan-Diamond y otras anemias de diversa etiología. La dosis inicial del deferasirox se ajustaron al grado de sobrecarga medido por la concentración hepática de hierro de forma que los pacientes con un LIC entre 2 y 3 recibieron 5 mg/kg, los pacientes con LIC de 3 a 7 recibieron 10 mg/kg, los que presentaban un LIC de 7 a 14 recibieron 20 mg/kg y, finalmente, los que tenían un LIC mayor de 14 recibieron 30 mg/kg. Se obtuvo un balance negativo de hierro en algo más de la mitad de los pacientes, teniendo en cuenta que los pacientes en los que no se evaluó el LIC al año de tratamiento se consideraron como sin respuesta. Considerando sólo los pacientes con LIC al año, el porcentaje de respuesta se elevó al 78% de los pacientes. Además se observó una respuesta global significativa en la reducción hepática del hierro que fue mayor en los pacientes con dosis de 20 y 30 mg/kg. De forma paralela, se obtuvo una disminución de la ferritina en los grupos tratados con 20 y 30 mg/kg, lo que demuestra que el efecto del deferasirox es dosis-dependiente y que los cambios de la ferritina se correlacionan con los cambios en la concentración hepática de hierro. En cuanto a la tolerancia, el 90% presentaron efectos adversos, fundamentalmente trastornos gastrointestinales leves o moderados que en la mayoría de los casos fueron transitorios y dosis-dependientes. Hubo 6 abandonos del tratamiento por efectos adversos, aunque sólo uno se relacionó de forma clara con el fármaco, y 4 muertes que no se relacionaron con el fármaco.

Los resultados preliminares del segundo estudio han sido comunicados en el ASH del año pasado. En este último se han incluido 165 pacientes con SMD de riesgo bajo o intermedio de grado 1 y sobrecarga férrica, que se trataron con dosis iniciales de 20 mg/kg y se podía incrementar a 40 según respuesta. Se observó una disminución significativa en la ferritina y en el LPI, con 10% de abandonos y 11 muertes por progresión de la enfermedad que no se relacionaron con el fármaco.

El tercer estudio es un ensayo en fase IV, abierto y observacional en el que se incluye una cohorte de 240 pacientes con SMD de un total de 1.500 pacientes en el que se engloban diferentes tipos de anemia como talasemias, degranocitosis y aplasias medulares, entre otras. Los datos preliminares de las características de los pacientes de la cohorte con síndromes mielodisplásicos han sido presentados por Gatterman en el IX Simposio sobre SMD de Florencia de 2007. Los resultados definitivos, en este

momento en evaluación, es muy posible que aclaren la utilidad del fármaco en esta patología.

En conclusión, hasta que no se encuentren otras alternativas a la transfusión podemos decir que:

- La quelación de hierro es esencial en la supervivencia de los pacientes con patologías que necesiten un soporte transfusional crónico y que, por tanto, la quelación debe incorporarse al tratamiento de soporte de un grupo seleccionado de pacientes con SMD transfusión-dependientes.

- El desarrollo de nuevos quelantes puede aportar un mejor cumplimiento del tratamiento quelante, que constituye el principal problema de la DFO.

- Algunas características farmacológicas y farmacodinámicas, como son una mayor eliminación de hierro del tejido cardíaco y una vida media más larga, pueden determinar una mayor eficacia en el tratamiento quelante y que ésta se traduzca en una mayor supervivencia de los pacientes con sobrecarga de hierro secundaria a transfusión.

Bibliografía

- Brittenham GM, Griffith PM, Nienhuis AW, McLaren CE, Young NS, Tucker EE, et al. Efficacy of deferoxamine in preventing complications of iron overload in patients with thalassemia major. *N Engl J Med* 1994; 9: 567-73.
- Cazzola M, Malcovati L. Myelodysplastic syndromes-coping with ineffective hematopoiesis. *N Engl J Med* 2005; 352 (6): 536-8.
- Malcovati L, Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, Boni M, Travaglino E, et al. Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: a basis for clinical decision making. *J Clin Oncol* 2005; 23 (30): 7594-603.
- Leitch HA, Wong D, Leger CS, Ramadan KM, Rollins MD, Barnett MJ, et al. Improved leukemia-free and overall survival in patients with myelodysplastic syndrome receiving iron chelation therapy: a subgroup analysis. *Blood* 2007; 110 (11): n 1469.
- Rose C, Brechignac S, Vassilief D, Beyne-Rauzy O, Stamatoullas A, Larbaa D, et al. Positive impact of iron chelation therapy (CT) on survival in regularly transfused MDS patients. A prospective analysis by the GFM. *Blood* 2007; 110 (11): n 249.
- Alesandrino EP, Amdori S, Barosi G, Cazzola M, Grossi A, Liberato LN, et al. Evidence and consensus based practice guidelines for the therapy of primary myelodysplastic syndromes. A statement from the Italian Society of Hematology. *Haematologica* 2002; 87 (12): 1286-306.
- Bowen D, Culligan D, Jowitt S, Kelsey S, Muti G, Oscier D, et al. Guidelines for the diagnosis and therapy of adult myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 2003; 120 (2): 187-200.
- Greenberg PL, Baer MR, Bennet JM, Bloomfield CD, De Castro CM, Deeg HJ, et al. Myelodysplastic syndromes clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 2006; 4 (1): 58-77.
- Gatterman N. Consensus statement on iron overload in myelodysplastic syndromes. *Hematol Oncol Clin* 2005; 19 (Suppl. 1): 18-25.
- Arrizabalaga B, Del Cañizo C, Remacha A, Sanz G, Villegas A. Guía clínica de quelación del paciente con síndrome mielodisplásico. *Haematologica* 2008; 93 (Suppl. 1): 3-10.
- Armand P, Kim HT, Cutler CS, Koreth J, Alyea EP, Soiffer RJ, et al. Prognostic impact of elevated pretransplantation serum ferritin in patients undergoing myeloablative stem cell transplantation. *Blood* 2007; 109 (10): 4586-8.
- Olivieri NF, Brittenham GM, Matsui D, Berkovitch M, Blendis LM, Cameron RG, et al. Iron-chelation therapy with oral deferiprone in patients with thalassemia major. *N Engl J Med* 1995; 332 (14): 918-22.
- Olivieri NF, Brittenham GM. Iron-chelation therapy and the treatment of thalassemia. *Blood* 1997; 89 (3): 739-61.
- St Pierre TG, Clark PR, Chua-anusorn W, Fleming AJ, Jeffrey GP, Olynyk JK, et al. Noninvasive measurement and imaging of liver iron concentrations proton magnetic resonance. *Blood* 2005; 105 (2): 855-61.
- Anderson LJ, Holden S, Davis B, Prescott E, Charrier CC, Bunce NH et al. Cardiovascular T2-star (T2*) magnetic resonance for the early diagnosis of myocardial iron overload. *Eur Heart J* 2001; 22 (23): 2171-9.
- Gabutti V, Piga A. Results of long-term iron-chelating therapy. *Acta Haematol* 1996; 95 (1): 26-36.
- Borgna-Pignatti C, Franchini M, Gandini G, Vassanelli A, De Gironcoli M, Aprili G. Subcutaneous bolus injection of deferoxamine in adult patients affected by onco-hematologic diseases and iron overload. *Haematologica* 1998; 83 (9): 788-90.
- Jensen PD, Heickendorff L, Pedersen B, Bendix-Hansen K, Jensen FT, Christensen T, et al. The effect of iron chelation on haematopoiesis in MDS patients with transfusional iron overload. *Br J Haematol* 1996; 94 (2): 288-99.
- González AF, Arrizabalaga B, Villegas A, Alonso D, Castro M, Remacha A, et al. Estudio del tratamiento con deferoxamina en perfusión subcutánea para la sobrecarga de hierro en pacientes con síndrome mielodisplásico. *Med Clin* 2005; 124 (17): 645-7.
- Anderson LJ, Wonke B, Prescott E, Holden S, Walker JM, Pennell DJ. Comparison of effects of oral deferiprone and subcutaneous desferrosamine on myocardial iron concentrations and ventricular function in beta-thalassemia. *Lancet* 2002; 360 (9232): 516-20.
- Kersten MJ, Lange R, Smeets ME, Vreugdenhil G, Roozendaal KJ, Lameijer W, et al. Long-term treatment of transfusional iron overload with the oral iron chelator deferiprone (L1): a Dutch multicenter trial. *Ann Hematol* 1996; 73 (5): 247-52.
- Porter J, Galanello R, Saglio G, Neufeld EJ, Vichinsky E, Cappellini MD, et al. Relative response of patients with myelodysplastic syndromes and other transfusion-dependent anaemias to deferaxirox (ILC670): a 1-yr prospective study. *Eur J Haematol* 2008; 80 (2): 168-76.

TRATAMIENTO DE LA SOBRECARGA DE HIERRO EN LAS ANEMIAS HEREDITARIAS

S. DE LA IGLESIA, A. LEMES, T. MOLERO
Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín. Las Palmas de Gran Canaria

Metabolismo del hierro y sobrecarga férrica

El hierro es uno de los elementos más comunes en la naturaleza, siendo esencial para el organismo. En un estado de equilibrio normal, cada día entran y sa-

len del organismo entre 1 y 2 mg de este metal. Existen varios mecanismos reguladores de la absorción del hierro, entre los que cabe destacar la hepcidina^{1,2}, pero ninguno que intervenga en su excreción. La sobrecarga férrica es el resultado de un balance positivo en la homeostasis de este elemento y puede ser de causa primaria –como en el caso de la hemocromatosis hereditaria– o secundaria a anemias crónicas o su tratamiento³.

En las anemias hereditarias, como es el caso de las hemoglobinopatías y talasemias, la eritropoyesis ineficaz que conllevan va a provocar *per se* un aumento de la absorción intestinal. Por otro lado, la mayoría de estos pacientes están sometidos a un régimen hipertransfusional con la intención de minimizar la eritropoyesis ineficaz y la eritropoyesis extramedular, con las alteraciones patológicas secundarias que produce (retraso del crecimiento, cambios óseos y esplenomegalia progresiva). Dado que cada concentrado de hematíes aporta entre 200 y 250 mg de hierro al organismo, la transfusión de dos unidades al mes supone un aporte extra de 5-6 g al año. A esta cantidad hay que sumar la absorción intestinal aumentada (4 mg/día) que se observa en estos pacientes, y que puede llegar a alcanzar el 1,5 g de hierro/año. La hiperabsorción intestinal, junto con la distribución anormal del hierro, es debida a los bajos niveles de hepcidina que se observan en estos pacientes. La síntesis de hepcidina, péptido inhibidor de la absorción intestinal, está disminuida en estas patologías por el incremento de la actividad eritropoyética y por la hipoxia tisular existente asociada a la anemia². Por todos estos datos se puede concluir que la sobrecarga férrica es una consecuencia inevitable y potencialmente mortal en los pacientes politransfundidos⁴.

El daño tisular se produce por el hierro plasmático lábil, un componente del hierro no unido a la transferrina (NTBI) con actividad redox que se deposita en los tejidos y provoca toxicidad de los órganos diana (hipófisis, tiroides, paratiroides, páncreas, gónadas, hígado y corazón), siendo esta última la afectación más peligrosa. Aún en nuestros días, las complicaciones cardíacas siguen siendo la principal causa de muerte en pacientes con talasemia^{5,6}, considerándose que niveles mayores a 2.500 ng/mL de ferritina sérica son indicadores de sobrecarga grave y de un aumento del riesgo de cardiopatía⁷. Sin embargo, para evitar la aparición de complicaciones cardíacas, actualmente se recomienda mantener niveles de ferritina menores de 1.000 ng/mL, siendo éste el objetivo ideal a conseguir en estos pacientes⁸.

El tratamiento quelante del hierro implica el uso de un fármaco que sea capaz de unirse y formar un complejo con dicho metal, evitando así su toxicidad y facilitando su excreción. Una vez que se deposita en los tejidos, el exceso de hierro es de difícil eli-

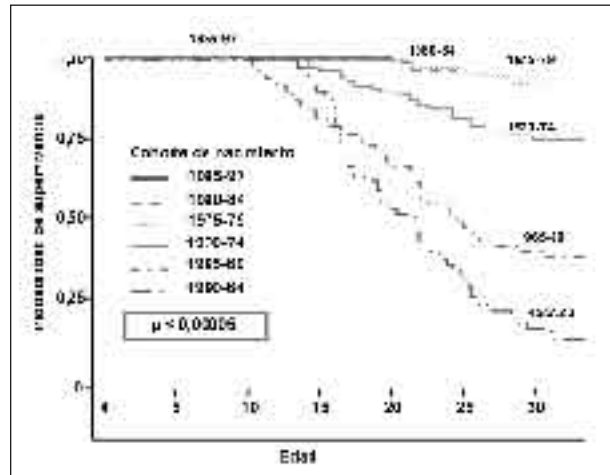


Figura 1. Curvas de supervivencia según cohorte de nacimiento. Tomado de Borgna-Pignatti et al.⁽¹⁰⁾.

minación. De esta manera, la eficiencia de la quelación es limitada, dado que la mayor parte del hierro depositado no es fácilmente movilizable, existiendo solamente una pequeña cantidad de hierro quelable en cada momento⁹.

Tratamiento de la sobrecarga férrica. Indicaciones de inicio de la quelación

La introducción de la quelación en la talasemia *major* en la década de los setenta supuso un punto de inflexión dado que, desde su uso rutinario, se ha aumentado considerablemente la esperanza de vida en los pacientes afectados de esta patología¹⁰ (Figura 1). Actualmente se acepta que se debe iniciar el tratamiento quelante cuando el paciente ha recibido más de 10 concentrados de hematíes o tiene una ferritina superior a 1.000 ng/mL¹¹. La experiencia clínica, obtenida tras muchos años de tratamiento de los pacientes talasémicos, ha sido llevada posteriormente a otras anemias hereditarias como la anemia falciforme, dado que en esta patología las consecuencias de la sobrecarga férrica son similares a las producidas en otros pacientes sometidos a transfusiones periódicas. Así, las guías de consenso para el manejo de la anemia falciforme recomiendan iniciar el tratamiento quelante cuando la concentración hepática de hierro sea superior a 7 mg por gramo de peso seco, se hayan recibido más de 120 mL de hematíes/kg de peso corporal o la ferritina sérica supere los 1.000 ng/mL^{11,12}. La terapia quelante también está indicada en el resto de anemias hereditarias con sobrecarga férrica secundaria a transfusión, utilizándose estos mismos parámetros como indicadores de la necesidad de inicio del tratamiento.

El tratamiento quelante clásico consistía en la administración de desferrioxamina (Desferin[®], Desferal[®]), inicialmente por vía intramuscular y posteriormente como infusión subcutánea. Éste fue el único quelante disponible en nuestro país durante muchos años y, según algunos autores, continúa siendo el tratamiento de elección de la sobrecarga férrica^{11,13}. La deferiprona (Ferriprox[®]), utilizada desde 1987 en la India, no fue aprobada hasta 1999 por la Agencia Europea del Medicamento (EMA). Este fármaco ofrecía la ventaja de su forma de administración, pero su uso se limita al tratamiento de segunda línea en pacientes con talasemia *major* cuando el tratamiento con desferrioxamina está contraindicado o es inadecuado^{11,13}.

La aprobación del deferasirox (Exjade[®]) en noviembre de 2005 por la FDA y en el año 2006 por la EMA, como primera línea en el tratamiento de la sobrecarga férrica transfusional en pacientes afectados de talasemia *major* con edad superior a seis años, y como segunda línea cuando el tratamiento con desferrioxamina esté contraindicado o no sea adecuado en la sobrecarga férrica transfusional independientemente del diagnóstico de base, ha supuesto una alternativa cómoda de tratamiento para los pacientes afectados de cualquier tipo de anemia hereditaria sometidos a transfusiones. Antes de su introducción en el mercado español en noviembre de 2007 pasó por una serie de estudios clínicos que se habían iniciado en 1999¹⁴. En España se realizó un estudio abierto y multicéntrico (protocolo C1670A2203) con la intención de ofrecer un acceso expandido de Exjade[®] a los pacientes afectados de eritropatologías congénitas y sobrecarga férrica secundaria a transfusiones, que no podían ser tratados con otros quelantes aprobados localmente. Los objetivos de este ensayo clínico consistían en documentar la no adherencia, contraindicaciones, toxicidades inaceptables o una respuesta escasa al tratamiento, así como evaluar el perfil de seguridad y el efecto sobre los niveles de ferritina del fármaco. Estos datos se están analizando actualmente, por lo que todavía no han sido publicados.

Comparativa de los tratamientos quelantes disponibles actualmente

El objetivo de la terapia quelante es prevenir que la acumulación de hierro alcance niveles dañinos a nivel tisular. Esta protección frente a los efectos perjudiciales del hierro tóxico debe ser continua, durante las 24 horas del día⁹. En los pacientes que ya presentan sobrecarga se debe intentar disminuir el hierro depositado en los tejidos con la intención de revertir el daño orgánico. Asimismo, se debe minimizar la toxicidad del fármaco, ajustando la dosis a la severidad de la sobrecarga y a los requerimientos transfusionales del pa-

Tabla 1. Resumen de las principales características de los fármacos quelantes del hierro actualmente disponibles

	<i>Desferrioxamina</i>	<i>Deferiprona</i>	<i>Deferasirox</i>
Dosis (mg/kg/día)	25-60	75	20-30
Vía administración	Subcutánea, i.v. 8-12 h. 5 días/semana	Oral 3 veces/día	Oral 1 vez/día
Vida media	20-30 minutos	3-4 horas	8-16 horas
Excreción	Urinaria, fecal	Urinaria	Fecal
Efectos adversos fundamentales	Reacciones locales, oftalmológicos, auditivos, retraso del crecimiento, alérgicos	Trastornos gastrointestinales, agranulocitosis/neutropenia, artralgia, aumento de enzimas hepáticas	Trastornos gastrointestinales, exantema, aumento leve no progresivo de creatinina, aumento de enzimas hepáticas

ciente, vigilando los efectos secundarios^{11,13}. En la Tabla 1 se resumen las principales características de los quelantes actualmente disponibles.

La desferrioxamina es un quelante de alta afinidad por el hierro que se une a los seis sitios de unión del hierro libre. Su elevado peso molecular condiciona su mala biodisponibilidad vía oral y su rápida aclaramiento del organismo. Debe administrarse como infusión subcutánea o intravenosa lenta en seis u ocho horas, cinco días por semana, dado que los niveles de hierro tóxico (hierro no unido a ferritina) se elevan rápidamente una vez que se interrumpe su infusión^{9,13}. Este hecho, junto con la aparición de reacciones locales en el lugar de administración, hace que sea frecuente un inadecuado cumplimiento del tratamiento por los pacientes, sobre todo al llegar a la adolescencia. Tenemos que tener en cuenta que la supervivencia de los pacientes se correlaciona con el cumplimiento del tratamiento, y que esto se garantiza con un tratamiento por vía oral^{15,16}. De esta manera, la aparición de la deferiprona y deferasirox ha supuesto una nueva era en la quelación.

La deferiprona es un quelante bidentado, por lo que forma complejos 3:1 con el hierro, condicionándole una menor afinidad. Su menor peso molecular permite una adecuada absorción oral, mejorando la adhesión al tratamiento¹¹, pero su rápido aclaramiento hace que haya que administrarlo tres veces al día. Este compuesto ha demostrado ser un buen quelante consiguiendo un balance negativo del hierro¹³, que se usa en más de 48 países, pero que no ha sido aprobado en Estados Unidos ni en Canadá, debido a la –aunque poco frecuente– temida aparición de neutropenia y agranulocitosis como efectos secundarios. Actualmen-

te se considera que la incidencia de neutropenia (2,1 a 5,4/100 pacientes-año) y agranulocitosis (0,4 a 0,6/100 pacientes-año) es menor que la previamente descrita^{11,13}. Otros efectos secundarios descritos son artralgias, alteraciones gastrointestinales (náuseas, vómitos, dolor abdominal) y aumento de las transaminasas.

El efecto cardioprotector de la deferiprona ha sido ampliamente estudiado, siendo igual o mayor que el de la desferrioxamina^{13,15}. Por otro lado, la administración intravenosa o subcutánea continua de desferrioxamina, sola o en combinación con deferiprona, sigue siendo el tratamiento de elección, junto con el tratamiento cardiológico, de la miocardiopatía dilatada secundaria a la sobrecarga férrica^{11,13}. La combinación de estos dos quelantes consigue un control durante las veinticuatro horas de los niveles de hierro tóxico, por lo cual, según algunos autores, sería el tratamiento más apropiado para la mayoría de los pacientes afectados de talasemia *major*¹⁵.

El quelante de más reciente aparición, el deferasirox, es tridentado, por lo que tiene una afinidad similar a la desferrioxamina, pero presenta un peso molecular menor, lo que le confiere una buena biodisponibilidad oral^{13,14}. Su principal ventaja es una vida media larga que permite su dosificación una vez al día, manteniendo su efecto quelante durante las veinticuatro horas⁹, lo cual facilita el grado de satisfacción y el cumplimiento del tratamiento^{11,16}. Al igual que la deferiprona, atraviesa las membranas celulares con facilidad, lo que favorece la quelación del hierro intracelular¹⁴. Aunque existen algunos datos sobre el probable efecto cardioprotector de este fármaco, es demasiado pronto para saber su efecto real sobre este órgano¹³. Generalmente es bien tolerado por los pacientes¹⁴, aunque se ha descrito con su uso un aumento leve de la creatinina sérica, no progresivo y dependiente de dosis^{11,13,14,17}, por lo que la ficha técnica del fármaco aconseja controles de creatinina y determinación de proteinuria mensuales. También se han descrito otros efectos secundarios, generalmente leves, como trastornos gastrointestinales y cutáneos. Asimismo, se ha observado un aumento de las transaminasas en un 0,3% de los pacientes.

Respecto a la eficacia de los tratamientos quelantes disponibles, hay que decir que todos consiguen un mantenimiento/reducción de los niveles de ferritina sérica, pero teniendo en cuenta dos cuestiones fundamentales: la adherencia al tratamiento y la protección continuada frente al hierro tóxico. Ambos quelantes orales cumplen el primer objetivo, ya que su vía de administración asegura un mejor cumplimiento del tratamiento^{15,16}. Respecto al hierro lábil o tóxico, no todos ofrecen una protección continuada la veinticuatro horas del día, consiguiéndose únicamente con deferasirox en monoterapia o con la combinación de desferrioxamina más deferiprona^{14,18}.

Controles a seguir durante el tratamiento quelante

La monitorización de la sobrecarga férrica durante el tratamiento quelante tiene el objetivo de evitar el exceso de depósito, con el consiguiente daño tisular, al igual que la sobrequelación. Asimismo, tenemos que vigilar la aparición de efectos secundarios de los quelantes utilizados¹³.

El seguimiento de la ferritina sérica es el método más aceptado para el seguimiento de la sobrecarga férrica. Cuando los valores de ferritina aumenten o disminuyan por encima o debajo de 1.000 ng/mL, se aconseja realizar otras pruebas que nos informen del depósito tisular para valorar un defecto o exceso de quelación. En estos casos estará indicada la realización de biopsia hepática o la medida del depósito hepático de hierro por RMN mediante la T2*¹¹. En los pacientes en los que dispongamos una determinación basal del contenido hepático de hierro, es conveniente repetirlo anualmente¹¹. Asimismo, en los pacientes con evidencias de una quelación inadecuada o aumento de la concentración hepática de hierro, es aconsejable la realización de la cuantificación del hierro cardiaco por RMN¹¹. Esta técnica también es recomendable cuando observamos una disminución de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo respecto a estudios anteriores, ya que existe una buena relación entre estas dos medidas¹⁹.

Conclusiones

La generalización del uso de la desferrioxamina en los pacientes afectados de talasemia *major* hace más de treinta años supuso un punto de inflexión en la supervivencia de estos pacientes¹⁰. Este hecho, junto a la amplia experiencia de quelación en las talasemias, ha hecho que exista unanimidad sobre la necesidad de tratar a los pacientes afectados de esta y otras anemias hereditarias que precisen transfusiones periódicas con la consiguiente sobrecarga férrica secundaria. Existe consenso en que se debe iniciar la quelación de forma precoz, antes de que el depósito de hierro alcance niveles tóxicos para los tejidos, estableciéndose en 1.000 ng/mL la cifra de ferritina a partir de la cual se debe comenzar el tratamiento quelante^{11,12,13}.

Asimismo, la introducción de los quelantes orales ha marcado una nueva era, con una evidente mejora de la calidad de vida. Las nuevas fórmulas orales garantizan un mejor cumplimiento y adhesión al tratamiento, lo cual se relaciona con una disminución de la morbimortalidad y un aumento de la supervivencia^{15,16}. Tanto es así que –aunque las guías clínicas recientemente publicadas^{11,13} sigan aconsejando la infusión subcutánea de desferrioxamina como el tratamiento de primera línea de la sobrecarga férrica en la talasemia y otras eri-

tropatologías congénitas— es evidente que la tendencia actual es el uso de los nuevos fármacos que permiten su administración oral. La comercialización reciente del deferasiroxi, con el que se consigue una protección continua frente al hierro tóxico con una sola dosis, ha propiciado este hecho. El aumento de su uso no nos debe hacer olvidar la posible aparición de efectos secundarios^{11,13,17}, para lo cual deberemos realizar un seguimiento adecuado de los pacientes que incluya la realización de pruebas de función renal y hepática mensuales.

En determinadas circunstancias, como la aparición de afectación cardiaca, existe consenso en que el tratamiento más adecuado es la combinación de desferrioxamina continua junto con deferiprona^{11,13,15}, que consigue ejercer una protección sostenida sobre el hierro tóxico¹⁸. Esta disminución continuada de los niveles de hierro tóxico también se logra con la monoterapia con deferasiroxi¹⁴. Este hecho, junto con la existencia de estudios preliminares que sugieren un acceso adecuado al hierro miocárdico¹⁴, nos hace pensar que este fármaco pudiera tener una futura indicación en la insuficiencia cardiaca secundaria a la sobrecarga férrica.

Por otro lado, se deberán estudiar mediante ensayos clínicos rigurosos otras combinaciones que nos permitan el tratamiento seguro y eficaz de los pacientes que presenten intolerancia o una quelación inadecuada con los esquemas actuales. De esta manera se podrían establecer nuevos protocolos terapéuticos con doble quelación oral, combinación de desferrioxamina con deferasiroxi²⁰ o, incluso, que combinen los tres quelantes disponibles en casos excepcionales en los que no se consigue mantener una adecuada quelación. Asimismo, existen otros quelantes en estudio que podrán ampliar el espectro terapéutico actual y ofrecer nuevas ventajas al paciente.

Bibliografía

- Ganz T. Hepcidin in iron metabolism. *Curr Opin Hematol* 2004; 11 (4): 251-4.
- Nemeth E. Iron regulation and erythropoiesis. *Curr Opin Hematol* 2008; 15 (3): 169-75.
- Anderson GJ. Mechanisms of iron loading and toxicity. *Am J Hematol* 2007; 82 (12): 1128-31.
- Porter JB. Practical management of iron overload. *Br J Haematol* 2001; 115 (2): 239-52.
- Cogliandro T, Derchi G, Mancuso L, Mayer MC, Pannone B, Pepe A, et al. under the auspices of the Society for the Study of Thalassemia and Hemoglobinopathies (SoSTE). Guideline recommendations for heart complications in thalassemia major. *J Cardiovasc Med* 2008; 9 (5): 515-25.
- Aessopos A, Kati M, Farmakis D. Heart disease in thalassemia intermedia: a review of the underlying pathophysiology. *Haematologica* 2007; 92 (5): 658-65.
- Olivieri NF, Nathan DG, MacMillan JH, Wayne AD, Martin M, McGee A, et al. Survival in medically treated patients with homozygous beta-thalassemia. *N Engl J Med* 1994; 331: 574-8.
- Bosi G, Crepaz R, Gamberini MR, Fortini M, Scarcia S, Bon-sante E, et al. Left ventricular remodelling, and systolic and diastolic function in young adults with beta thalassaemia major: a Doppler echocardiographic assessment and correlation with haematological data. *Heart* 2003; 89 (7): 762-6.
- Porter JB. Concepts and goals in the management of transfusional iron overload. *Am J Hematol* 2007; 82 (12 Suppl.): 1136-9.
- Borgna-Pignatti C, Rugolotto S, De Stefano P, Zhao H, Cappellini MD, Del Vecchio GC, et al. Survival and complications in patients with thalassemia major treated with transfusion and deferoxamine. *Haematologica* 2004; 89 (10): 1187-93.
- Angelucci E, Barosi G, Camaschella C, Cappellini MD, Cazzola M, Galanello R, et al. Italian Society of Hematology practice guidelines for the management of iron overload in thalassemia major and related disorders. *Haematologica* 2008; 93 (5): 741-52.
- National Heart, Lung, and Blood Institute. (2004) The Management of Sickle Cell Disease (NHLBI Publication No. 04-2117: 159-160). Accesible en: <http://www.nhlbi.nih.gov/health/prof/blood/sickle/index.htm>
- Maggio A. Light and shadows in the iron chelation treatment of haematological diseases. *Br J Haematol* 2007; 138 (4): 407-21.
- Porter JB. Deferasiroxi: an effective once-daily orally active iron chelator. *Drugs Today (Barc)* 2006; 42 (10): 623-37.
- Ceci A, Baiardi P, Catapano M, Felisi M, Cianciulli P, De Sanctis V, et al. Risk factors for death in patients with beta-thalassemia major: results of a case-control study. *Haematologica* 2006; 91 (10): 1420-1.
- Cappellini MD, Bejaoui M, Agaoglu L, Porter J, Coates T, Jeng M, et al. Prospective evaluation of patient-reported outcomes during treatment with deferasiroxi or deferoxamine for iron overload in patients with beta-thalassemia. *Clin Ther* 2007; 29 (5): 909-17.
- Yang LP, Keam SJ, Keating GM. Deferasiroxi: a review of its use in the management of transfusional chronic iron overload. *Drugs* 2007; 67 (15): 2211-30.
- Cabantchik ZI, Breuer W, Zanninelli G, Cianciulli P. LPI-labile plasma iron in iron overload. *Best Pract Res Clin Haematol* 2005; 18 (2): 277-87.
- Porter JB, Davis BA. Monitoring chelation therapy to achieve optimal outcome in the treatment of thalassaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2002; 15 (2): 329-68.
- Kontoghiorghes GJ, Kolnagou A. Effective new treatments of iron overload in thalassaemia using the ICOC combination therapy protocol of deferiprone (L1) and deferoxamine and of new chelating drugs. *Haematologica* 2006; 91 (6 Suppl.): 34-35.

Nuevas moléculas y nuevos papeles para viejas moléculas del sistema hemostático

COORDINADOR: J.C. REVERTER. *Barcelona*

Resumen del simposio

El avance de los conocimientos sobre la fisiología de la hemostasia evidencia cada vez más su gran complejidad. Como sistema fisiológico de importancia vital, cuenta con múltiples mecanismos reguladores interconectados que pueden compensarse entre ellos. A medida que nuestros conocimientos avanzan, se desvelan nuevas alteraciones en sus componentes que pueden causar o modificar las manifestaciones clínicas de trombosis o hemorragias. Además, progresivamente se van conociendo nuevas e importantes relaciones entre la hemostasia y otros sistemas biológicos. El presente simposio pretende tratar sobre las novedades en la fisiología de la hemostasia que han llevado a reconsiderar los papeles tradicionales de sus componentes, tanto en la coagulación como en otros ámbitos biológicos, y sobre nuevas moléculas que pueden tener un papel relevante en la regulación de la misma.

La primera ponencia, expuesta por el Dr. José María Hermida, nos explicará cómo ciertos componentes de la hemostasia que inicialmente se describían con una función, posteriormente han mostrado otras que pueden ser incluso contradictorias con la primera. Centrará su atención, sobre todo, en el receptor endotelial de la proteína C (EPCR). Esta molécula se describió en principio como el receptor celular que contribuía a la acción anticoagulante de la proteína C, pero posteriormente se ha demostrado que es también un receptor endotelial de alta afinidad del factor VII activado y que éste, al unirse, impide la activación de la proteína C por el EPCR. Este efecto podría contribuir a explicar la acción farmacológica del factor VII activado.

La segunda ponencia, impartida por la Dra. María Dolores Tàssies, nos introducirá en las importantes funciones que una familia de proteínas transmembrana, las selectinas, pueden desempeñar en la hemostasia fisiológica o patológica. Alteraciones en los niveles de selectinas y algunos polimorfismos genéticos de las mismas se han descrito asociados a trombosis arteriales o venosas, y al desarrollo de arteriosclerosis. También comentará el papel que puede tener el receptor de la P-selectina, el PSGL-1, en estas situaciones y la estrecha relación de las selectinas con las micropartículas procoagulantes circulantes. Por último, analizará la situación actual de estas moléculas como potenciales dianas terapéuticas.

La tercera ponencia, realizada por la Dra. Pilar Medina, nos ilustrará sobre las nuevas acciones biológicas identificadas en el sistema de la proteína C. Estas nuevas funciones no anticoagulantes incluyen como más relevantes las acciones antiinflamatorias, antiapoptóticas, neuroprotectoras y de estabilización de la barrera endotelial. Explicará también los mecanismos de señalización intracelular relacionados con estas acciones. La demostración de estas nuevas funciones biológicas puede tener trascendencia clínica identificando nuevas situaciones en las que la proteína C activada puede surtir un efecto farmacológico beneficioso como, por ejemplo, la sepsis grave, el fallo multiorgánico, el ictus isquémico o la cicatrización de heridas.

La primera de las comunicaciones orales seleccionadas para este simposio, que tiene como primera autora a la Dra. Silvia Navarro, expondrá el efecto protector frente a la trombosis venosa que han identificado relacionado con el polimorfismo C1418T del gen de la trombomodulina, proteína reguladora en múltiples procesos de la hemostasia. Este efecto clínico va acompañado de una mayor expresión o estabilidad en la membrana celular de la molécula de trombomodulina y de una mayor concentración de proteína C activada circulante.

La segunda comunicación, que tiene por primera autora a la Dra. Pilar Medina, identificará en el polimorfismo -589C->T del gen de la interleucina 4, una citocina de efectos antiinflamatorios, un efecto protector para el infarto de miocardio en las personas jóvenes. Este trabajo resalta la interrelación entre la alteración de la hemostasia y la regulación de los mecanismos pro y antiinflamatorios, lo que nos abre nuevas líneas de investigación y la posibilidad de novedosas dianas terapéuticas.

PROTEÍNAS DE ACCIÓN DUAL EN LA HEMOSTASIA

J.M. HERMIDA^{1,2}, C. PUY²,
J. LÓPEZ-SAGASETA², R. MONTES¹

¹ Servicio de Hematología. Clínica Universitaria.

Facultad de Medicina. Universidad de Navarra. Pamplona

² Área de Ciencias Cardiovasculares. Laboratorio de

Hemostasia y Trombosis. Fundación para la Investigación

Médica Aplicada. Universidad de Navarra. Pamplona

En la coagulación existen proteínas que se describieron inicialmente con una función pero que investigaciones posteriores les han atribuido otras funciones adicionales, a veces contradictorias. La proteína ejemplar de este fenómeno es la trombina, que es la enzima central de la coagulación y por lo tanto tiene actividades "procoagulantes" como la generación de fibrina a partir del fibrinógeno, activación de las plaquetas a través del PAR-1, activación del factor XIII, del factor XI y del TAFI. Además, es el iniciador de los mecanismos anticoagulantes al activar a la proteína C cuando se une a la trombomodulina en la superficie de las células endoteliales. Estos fenómenos han sido detalladamente descritos por David Lane en un simposio del congreso de nuestra Sociedad celebrado en Valencia el año 2004¹. Por este motivo no abordaremos el ejemplo de la trombina y nos centraremos en otra molécula sobre la que tenemos experiencia directa por ser el centro de una línea de trabajo que seguimos, desde hace años, en nuestro laboratorio: el receptor endotelial de la proteína C (EPCR), del cual estudios recientes han demostrado que, además de receptor de la proteína C, es el receptor endotelial del factor VII.

El receptor endotelial de la proteína C

El sistema de la proteína C es un sistema anticoagulante "latente" o de reserva que se activa según la necesidad de anticoagulación que tenga el organismo en un momento determinado y en un lugar concreto del árbol vascular. La trombina unida a la trombomodulina pierde sus propiedades anticoagulantes y adquiere la capacidad de activar la proteína C que, una vez activada, degrada los factores V y VIII activados y, de este modo, detiene la generación de más trombina y así evita que el coágulo se propague a regiones del árbol vascular donde éste no es necesario². El EPCR es una glicoproteína de transmembrana que se expresa en la superficie de las células endoteliales y que tiene gran afinidad por la proteína C³. Cuando la proteína C se une al EPCR, la activación de ésta por el complejo trombina/trombo-

modulina se facilita y aumenta entre 10 y 20 veces^{4,5} (Figura 1). La unión al EPCR se realiza a través del dominio Gla de la proteína C⁶, y los residuos, tanto de la proteína C como del EPCR, implicados directamente en la interacción se conocen gracias al análisis de la estructura cristalizada del complejo EPCR/dominio Gla de la proteína C⁷.

El factor VII se une a las células endoteliales a través del EPCR

Recientemente hemos demostrado en nuestro laboratorio, mediante citometría de flujo, que el factor VII zimógeno y el activado se unen a la superficie de las células endoteliales a través del EPCR⁸. La unión se realiza a través del dominio Gla del factor VII/VIIa, que tiene perfectamente conservados los residuos del dominio Gla implicados en la unión de la proteína C al EPCR. El factor VII y la proteína C comparten, al menos parcialmente, el mismo sitio de unión sobre el EPCR y por este motivo son uniones mutuamente excluyentes. La unión del factor VII es de alta afinidad (Kd ~ 30 nM), depende de la presencia de calcio y es mejorada en presencia de iones magnesio; es idéntica en el caso del zimógeno y del factor acti-

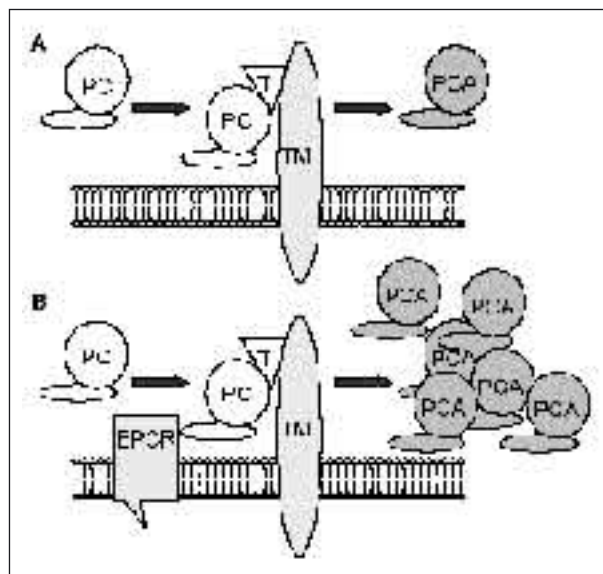


Figura 1. Activación de la proteína C por la trombina sobre la membrana de las células endoteliales. Se representa el dominio Gla de la proteína C (PC) y de la proteína C activada (PCA) con una elipse, y con un círculo el resto de la molécula. El panel A muestra la activación de la proteína C en la membrana de la célula endotelial tras su unión con el complejo formado por la trombina (T) y la trombomodulina (TM). El panel B muestra cómo la generación de PCA es mayor cuando el EPCR presenta la proteína C al complejo trombina-trombomodulina.

vado. El EPCR presente en la membrana celular y el EPCR soluble se comportan de manera idéntica en relación con su unión con el factor VII.

El factor VIIa impide la activación de la proteína C en la superficie endotelial

Como la proteína C y el factor VII/VIIa comparten el sitio de unión al EPCR, su unión será mutuamente excluyente, lo cual puede tener consecuencias funcionales en determinadas situaciones clínicas. Normalmente la concentración de proteína C es de 60 nM, un exceso importante respecto a la concentración fisiológica de factor V/VIIa, que es de 10 nM. En situaciones fisiológicas dominará la unión de la proteína C sobre la unión del factor VII. Sin embargo, cuando se administra factor VIIa recombinante para tratar un episodio de hemorragia, la concentración de factor VIIa puede llegar a ser tan alta como la de la proteína C, o incluso más: cuando se administran dosis moderadamente elevadas de factor VIIa (90-120 µg/kg), los niveles plasmáticos llegan hasta 50 nM⁹⁻¹¹ y cuando se administran dosis más altas, que pueden llegar a ser de 300 µg/kg^{12,13}, el pico de concentración plasmática será probablemente aún más alto. En estos casos, el exceso de factor VIIa impide la unión de la proteína C al EPCR sobre la superficie endotelial y

por lo tanto se reduce la generación de proteína C activada (PCA) (Figura 2), como se ha demostrado en experimentos *in vitro*^{9,14}. La reducción de PCA podría tener un efecto hemostático en estos pacientes, teniendo en cuenta que se ha descrito que la disminución de la generación de PCA o las alteraciones que dificultan su actividad reducen las hemorragias^{15,16}. Este fenómeno podría explicar, al menos parcialmente, el efecto hemostático del factor VIIa independiente del factor tisular y también por qué el uso de dosis extraordinariamente altas de factor VIIa, en principio inútiles a partir de cierto umbral ya que saturarán a las moléculas de factor tisular disponibles, es, aun con todo, más eficaz: al efecto procoagulante, dependiente del factor tisular y para el que sería suficiente con “poco” factor VIIa, se sumaría el efecto de reducción de la anticoagulación, por competencia con la proteína C, para el que se necesitaría “mucho” factor VIIa.

El EPCR tiene un efecto anticoagulante al inhibir la vía extrínseca de la coagulación

Una de las consecuencias de la unión del factor VIIa al EPCR es que el EPCR soluble (sEPCR) es capaz de prolongar el tiempo de protrombina de forma dosis-dependiente en un ensayo con plasma humano normal⁸. El mecanismo molecular a través del cual se produce este efecto anticoagulante no está claro, pero pueden existir tres vías: la inhibición de la unión del factor VIIa al factor tisular, la inhibición de la unión del factor VIIa a los fosfolípidos, y, finalmente, la inhibición del sitio catalítico del VIIa. La unión del factor VIIa al factor tisular no parece verse afectada por el sEPCR, y no existen datos experimentales que demuestren que el sEPCR inhiba la unión del factor VIIa a los fosfolípidos por lo que, actualmente, pensamos que el sEPCR inhibe la vía extrínseca de la coagulación alterando la capacidad enzimática del factor VIIa. La acción fundamental del factor VIIa, auténtico iniciador de la coagulación en presencia de factor tisular, consiste en la activación de los factores IX y X. El factor X activado es el responsable de la transformación de la protrombina en trombina. El sEPCR inhibe la acción del factor VIIa sobre el factor X, probablemente, al menos en parte, induciendo un cambio conformacional en el sitio catalítico del factor VIIa unido al factor tisular⁹. La consecuencia de esta acción del EPCR es la inhibición de la coagulación en la superficie del endotelio sano. En situaciones de lesión endotelial en las que disminuye la cantidad de EPCR presente en la superficie, como es el caso de la arteriosclerosis¹⁷, este sistema inhibitor desaparece, y se favorecerá la formación de trombosis.

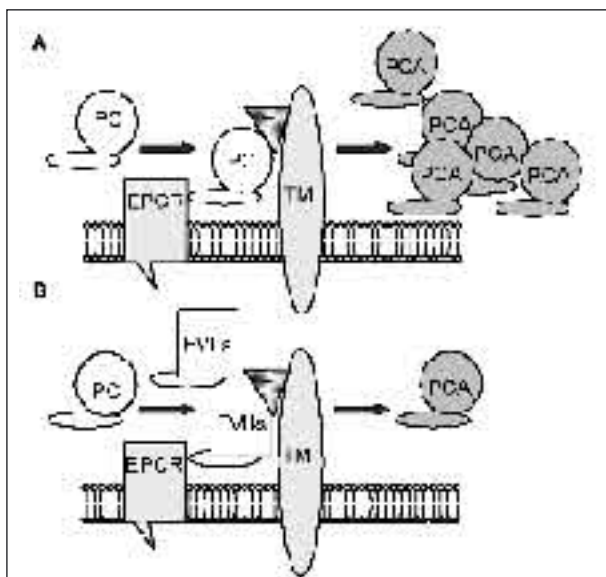


Figura 2. Inhibición de la generación de PCA por el factor VIIa sobre las células endoteliales. El panel A muestra de forma esquemática la activación de la proteína C en la membrana de la célula endotelial en ausencia de factor VIIa. En el panel B se muestra que la generación de PCA es menor en presencia de concentraciones elevadas de factor VIIa que bloquea el acceso de la PC al EPCR, que necesita concentraciones muy elevadas para manifestarse.

La modulación del efecto proinflamatorio del factor VIIa a través del EPCR

Un estudio reciente ha analizado si la presencia del EPCR en la superficie endotelial puede modular las acciones proinflamatorias del factor VIIa. No parece que el factor VIIa unido al EPCR en la superficie de las células endoteliales sea capaz de activar el PAR-2 y, por lo tanto, no parece que module los efectos inflamatorios del factor VIIa¹⁴.

Conclusiones

El factor VII/VIIa se une al EPCR por el mismo sitio por el que lo hace la proteína C. Cuando el factor VIIa se une al EPCR impide la activación de la proteína C y, de este modo, el factor VIIa puede ejercer su acción hemostática independientemente de la presencia de factor tisular. Cuando el factor VIIa se une al EPCR pierde su capacidad para activar la coagulación, lo cual puede ser un mecanismo fisiológico para mantener inhibida la coagulación sobre la superficie endotelial.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el acuerdo entre FIMA y la "UTE proyecto CIMA" y por los proyectos del Instituto de Salud Carlos III PI05/1178 y RECAVA RD/0014/0008.

Bibliografía

- Lane DA. How thrombin is regulated. *Haematologica* 2004; 89 (Suppl 1): 297-8.
- Esmon CT. Thrombomodulin as a model of molecular mechanisms that modulate protease specificity and function at the vessel surface. *FASEB J* 1995; 9: 946-55.
- Fukudome K, Esmon CT. Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor. *J Biol Chem* 1994; 269: 26486-91.
- Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica JS, Ferrell GL, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 10212-6.
- Taylor FB Jr, Peer GT, Lockhart MS, Ferrell G, Esmon CT. Endothelial cell protein C receptor plays an important role in protein C activation in vivo. *Blood* 2001; 97: 1685-8.
- Regan LM, Mollica JS, Rezaie AR, Esmon CT. The interaction between the endothelial cell protein C receptor and protein C is dictated by the gamma-carboxyglutamic acid domain of protein C. *J Biol Chem* 1997; 272: 26279-84.
- Oganesyan V, Oganesyan N, Terzyan S, Qu D, Dauter Z, Esmon NL, Esmon CT. The crystal structure of the endothelial protein C receptor and a bound phospholipid. *J Biol Chem* 2002; 277: 24851-4.
- López-Sagaseta J, Montes R, Puy C, Díez N, Fukudome K, Hermida J. Binding of factor VIIa to the endothelial cell protein C receptor reduces its coagulant activity. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 1817-24.

- Hedner U, Erhardtsen E. Potential role for rFVIIa in transfusion medicine. *Transfusion* 2002; 42: 114-24.
- Bijsterveld NR, Moons AH, Boekholdt SM, van Aken BE, Fennema H, Peters RJ, et al. Ability of recombinant factor VIIa to reverse the anticoagulant effect of the pentasaccharide fondaparinux in healthy volunteers. *Circulation* 2002; 106: 2550-4.
- Bijsterveld NR, Vink R, van Aken BE, Fennema H, Peters RJ, Meijers JC, et al. Recombinant factor VIIa reverses the anticoagulant effect of the long-acting pentasaccharide idraparinux in healthy volunteers. *Br J Haematol* 2004; 124: 653-8.
- Cooper HA, Jones CP, Campion E, Roberts HR, Hedner U. Rationale for the use of high dose rFVIIa in a high-titre inhibitor patient with haemophilia B during major orthopaedic procedures. *Haemophilia* 2001; 7: 517-22.
- Kenet G, Lubetsky A, Luboshitz J, Martinowitz U. A new approach to treatment of bleeding episodes in young hemophilia patients: a single bolus megadose of recombinant activated factor VII (NovoSeven). *J Thromb Haemost* 2003; 1: 450-5.
- Ghosh S, Pendurthi UR, Steinoe A, Esmon CT, Rao LV. Endothelial cell protein C receptor acts as a cellular receptor for factor VIIa on endothelium. *J Biol Chem* 2007; 282: 11849-57.
- Donahue BS, Gailani D, Higgins MS, Drinkwater DC, George AL, Jr. Factor V Leiden protects against blood loss and transfusion after cardiac surgery. *Circulation* 2003; 107 (7): 1003-8.
- Squires RA, Smith S, Pennington LR, Comp PC. Blockade of protein C activation reduces microvascular surgical blood loss. *J Surg Res* 1992; 52 (6): 560-4.
- Laszik ZG, Zhou XJ, Ferrell GL, Silva FG, Esmon CT. Down-regulation of endothelial expression of endothelial cell protein C receptor and thrombomodulin in coronary atherosclerosis. *Am J Pathol* 2001; 159: 797-802.

LAS SELECTINAS COMO NUEVOS DETERMINANTES EN LA COAGULACIÓN*

M.D. TÀSSIES PENELLA

*Servicio de Hemoterapia y Hemostasia.
Hospital Clínic. IDIBAPS. Barcelona*

*Trabajo financiado en parte por: FIS 05/0204, Beca de Investigación de la Fundación MAPFRE 2005/2006.

Las selectinas son una familia de proteínas transmembrana de tipo I que se expresan en la superficie de los leucocitos, y en las células endoteliales y plaquetas activadas. Se han descrito tres miembros de la familia de las selectinas, denominados de acuerdo con el lugar donde fueron identificados inicialmente. Son la E-selectina en la célula endotelial, la L-selectina en los leucocitos, y la P-selectina en las plaquetas. Posteriormente se demostró que esta última también se expresaba en las células endoteliales. Las tres selectinas poseen una estructura muy similar que consta de un dominio aminoterminal de tipo lectina, seguido por un dominio EGF (*epidermal growth factor*) y un número variable de dominios SCR (*short consensus repeat*), una región trans-

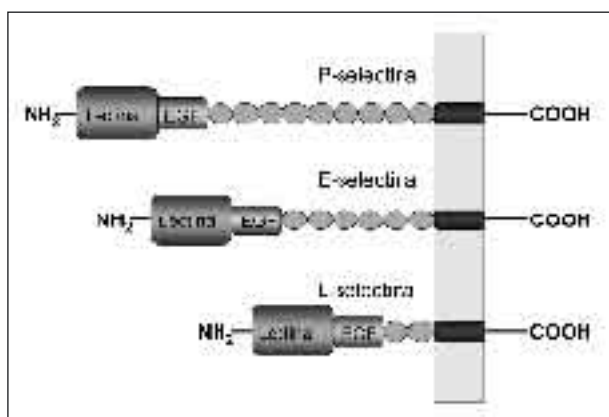


Figura 1. Representación de la estructura molecular de las selectinas (ver texto).

membrana y un pequeño dominio citoplasmático¹. La principal diferencia estructural entre las selectinas es el número de dominios SCR. En humanos, la P-selectina es la más larga, con 9 dominios SCR, mientras que la E-selectina y la L-selectina tienen 6 y 2 dominios, respectivamente (Figura 1). Cada una de las selectinas posee un patrón específico de expresión. La E-selectina se sintetiza en las células endoteliales. Se expresa únicamente tras la activación celular, y su transcripción es regulada por algunas citoquinas y factores de transcripción como el NF-κB, que parece ser crucial en la activación del gen. La inducción tarda unas horas y disminuye rápidamente tras alcanzar el máximo. La L-selectina se expresa de manera constitutiva en los leucocitos de sangre periférica y en algunos linfocitos T

y B y células NK, dependiendo de su grado de activación. Se han descrito diversos activadores de la L-selectina, tales como el GM-CSF, el interferón α, y la IL-8. La P-selectina se almacena en los gránulos α plaquetarios y en los cuerpos de Weibel-Palade en las células endoteliales, y se detecta en la superficie celular sólo tras la activación celular por fusión de los gránulos con la membrana citoplasmática, proceso que ocurre en pocos minutos¹. Tras la activación celular las selectinas son rápidamente eliminadas de la superficie celular por un mecanismo de internalización y degradación en los lisosomas (P- y E-selectina) o por proteólisis (L- y E-selectina). Existe una forma soluble de E- y L-selectina, detectable en plasma, como resultado del proceso anterior. La forma soluble de P-selectina puede originarse por proteólisis de la P-selectina de membrana o bien ser una isoforma que carece del dominio transmembrana. Las formas solubles de las selectinas no son meros productos de degradación, sino que pueden tener su propia función actuando como inhibidores o como agonistas, compitiendo con la proteína de membrana en su interacción con los receptores².

Las selectinas usualmente interactúan a través de su dominio lectina con carbohidratos fucosilados o sializados, tales como sialil Lewis X, pero también pueden unirse a glicoproteínas de tipo mucina. El principal ligando de P-selectina es PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*) una proteína transmembrana homodimérica que se expresa principalmente en leucocitos, aunque recientemente se ha hallado también en células endoteliales activadas³. PSGL-1 es capaz de unirse también a L- y E-selectina, aunque con menor afinidad que para P-selectina. El proceso de inactivación de PSGL-1, mediante proteólisis de la superficie celular,

Tabla 1. Selectinas y sus principales ligandos

Selectina/Receptor	Otros nombres	Ligandos	Localización			
			Endotelio	Leucocitos	Plaquetas	Forma soluble
P-selectina	CD62P GMP-140 LECAM-3 PADGEM	PSGL-1 sLewisX CD24	+	-	+	+
E-selectina	CD62E ELAM-1 LECAM-2	ESL-1 PSGL-1 sLewisX CD44	+	-	-	+
L-selectina	CD62L LECAM-1 LAM-1	sLewisX CD34 PSGL-1 GlyCAM-1	-	+	-	+
PSGL-1	CD162	P-selectina E-selectina L-selectina	-	+	+/-	+
ESL-1	MG160	E-selectina	-	+	-	-

da lugar a una forma soluble que todavía es capaz de unir P-selectina. Se ha descrito un ligando específico de E-selectina, el ESL-1 (*E-selectin ligand*) que se expresa en leucocitos y se une específicamente a E-selectina, pero no a P-selectina. No obstante, sus propiedades *in vivo* no son aún bien conocidas. Para la L-selectina se han descrito 4 ligandos (GlyCAM-1, CD34, Sgp200 y MadCAM-1), aunque también se ha demostrado una interacción de L-selectina con PSGL-1 en el proceso de agregación de neutrófilos⁴ (Tabla 1).

Funciones de las selectinas

La P-selectina se identificó a principios de los años ochenta del siglo pasado mediante el empleo de anticuerpos monoclonales específicos para plaquetas activadas por trombina, y su papel como molécula de adhesión celular se describió a finales de dicha década. Hasta la actualidad, numerosos estudios han documentado la importancia de la P-selectina y de su ligando PSGL-1 como moléculas clave en el reclutamiento de leucocitos en los procesos inflamatorios agudos y crónicos, en la adhesión inicial de los leucocitos al endotelio activado y en la interacción celular entre leucocitos, plaquetas y endotelio⁵. La primera publicación que demuestra la contribución de la P-selectina en la formación del trombo *in vivo* data de 1992⁶. En estos experimentos realizados en un modelo de trombosis en primates, se demostró que los anticuerpos dirigidos contra la P-selectina inhibían la deposición de fibrina en el trombo en formación. Poco después se demostró que la P-selectina era capaz de estimular la síntesis de factor tisular en los monocitos, por un mecanismo de señalización celular iniciado tras la interacción de P-selectina con PSGL-1⁷. Sin embargo, no fue hasta principios de la actual década cuando, con la introducción de estudios en ratones modificados genéticamente junto con estudios de microscopía intravital en tiempo real, se ha hecho evidente el importante papel que estas moléculas y sus interacciones con otros elementos tienen en la hemostasia y trombosis^{8,9}. Diversos experimentos en modelos animales han demostrado que la expresión de P-selectina modula la deposición de fibrina y el tamaño del trombo resultante. Así, se ha demostrado que el aumento de expresión de P-selectina induce un estado procoagulante, con acortamiento del tiempo de sangría y con un incremento en la deposición de fibrina¹⁰. De forma similar, se observó que el trombo que se formaba en ratones deficientes en P-selectina era de menor peso y contenía menos fibrina que el formado en ratones normales, mientras que el que se formaba en ratones con altos niveles de P-selectina era de mayor tamaño¹¹. La E-selectina parece contribuir en el proceso de trombogénesis amplificando

el efecto de la P-selectina¹². Si bien las tres selectinas intervienen en las interacciones celulares descritas, la P-selectina parece tener un papel más relevante en la coagulación, probablemente en relación con la rápida regulación de su expresión tras la activación celular, que sucede en pocos minutos. El mecanismo por el que la P-selectina es capaz de potenciar la formación de fibrina parece ser la inducción por parte de la P-selectina de la formación de micropartículas procoagulantes. Recientemente se ha evidenciado, mediante experimentos en animales carentes de PSGL-1 o mediante su inhibición con anticuerpos monoclonales, que la interacción P-selectina/PSGL-1 es crucial para la formación y el reclutamiento de micropartículas portadoras de factor tisular¹³. Las micropartículas, además de poder expresar factor tisular, pueden ejercer una acción procoagulante a través de los fosfolípidos aniónicos de su membrana capaces de sustentar actividad protrombinasa.

Así, en los últimos años, las selectinas, junto a las micropartículas y al factor tisular, se han establecido como una tríada determinante en la generación de las trombosis¹⁴. Dos importantes descubrimientos han permitido comprender mejor la cinética de acumulación de fibrina en el trombo mediada por P-selectina: por una parte, la demostración de la existencia de factor tisular circulante y, por otra, que este factor tisular circulante se acumula en el trombo en formación. En un modelo de lesión vascular inducida por láser y microscopía intravital, Falati *et al.*¹⁵ examinaron la formación del trombo en tiempo real en la microcirculación de ratones genéticamente modificados. Estos autores detectaron en ratones normales expresión de P-selectina, acumulación de factor tisular y generación de fibrina tras la localización de las plaquetas en el trombo en formación. Sin embargo, en ratones modificados carentes de PSGL-1 o P-selectina y en ratones normales tras la inyección de un anticuerpo anti-P-selectina se desarrollaban trombos plaquetarios que contenían una mínima cantidad de factor tisular y fibrina. La expresión de factor tisular y la formación de fibrina ocurrían muy rápidamente, a los pocos segundos de haberse producido la lesión vascular. Además, la acumulación de factor tisular en el trombo se correlacionaba con la cinética de acumulación de micropartículas en el mismo¹⁵, lo que indicaba que una vía de iniciación de la coagulación *in vivo* implica la acumulación de micropartículas portadoras de factor tisular (y PSGL-1) en el trombo plaquetario que expresa P-selectina. Así pues, la interacción de P-selectina plaquetaria con su ligando PSGL-1 en las micropartículas circulantes es necesaria para concentrar la actividad de factor tisular en el trombo. En un modelo murino de hemofilia A, se demostró que la P-selectina soluble promovía la liberación de micropartículas leucocitarias portadoras de factor tisular capaces de

Tabla 2. Genes de las selectinas y principales polimorfismos relacionados con la enfermedad tromboembólica

Selectina/ Receptor	Gen	Localización	Polimorfismos
P-selectina	<i>SELP</i>	1q23-25	T715P, S290N, N562D
E-selectina	<i>SELE</i>	1q23-25	S128R, L554F
L-selectina	<i>SELL</i>	1q23-25	–
PSGL-1	<i>SELPLG</i>	12q24	VNTR, M62I
ESL-1	<i>GLG1</i>	16q22-q23	–

corregir la hemostasia¹³. Además, en ratones modificados para expresar niveles altos de P-selectina, se halló un estado procoagulante y una elevada proporción de micropartículas leucocitarias portadoras de factor tisular^{8,10}. Se han descrito otros mecanismos dependientes de P-selectina que pueden contribuir a incrementar el riesgo trombótico, como la inducción por P-selectina/PSGL-1 de la exposición de fosfatidilserina en la superficie de los monocitos¹⁶, aunque este proceso, al igual que ocurre con la expresión de factor tisular en monocitos inducida por P-selectina⁷, ocurre en horas y es poco probable que ejerzan un papel relevante en la hemostasia fisiológica, mecanismo que requiere una respuesta rápida.

Las selectinas en la patología cardiovascular y trombótica

La P-selectina juega un papel importante en la trombosis arterial y venosa^{10,11,15,17,18}. Una de las primeras fases del proceso arteriosclerótico implica el reclutamiento de células inflamatorias desde el torrente sanguíneo y su migración a través del endotelio. Este proceso está mediado fundamentalmente por moléculas de adhesión celular. Se ha observado expresión focal de P-selectina y E-selectina junto a otras moléculas de adhesión en placas arteriosclerosas en humanos². A pesar de que cada una de las selectinas (E-, L- y P-selectina) está implicada en el reclutamiento inicial de leucocitos, su papel en el desarrollo de la arteriosclerosis es variable. De este modo, se ha demostrado que la L-selectina interviene en la adhesión de los monocitos al endotelio *in vitro*, pero no se ha podido demostrar ninguna función de esta molécula en modelos *in vivo* de arteriosclerosis⁵. Por otra parte, en ratones deficientes en E-selectina se ha observado sólo una modesta reducción del tamaño de la lesión arteriosclerótica⁵. En diversos estudios se ha evidenciado el papel de la P-selectina en la formación de la lesión arteriosclerótica. Los ratones deficientes en P-selectina muestran una disminución de las lesiones arterioscleróticas

y, por otra parte, la inhibición de la función de P-selectina plaquetaria también reduce la arteriosclerosis¹⁹. En humanos se ha constatado la relación entre la expresión de P-selectina y el desarrollo de la lesión arteriosclerótica en algunos estudios²⁰.

En la actualidad el valor de la determinación de los niveles de selectinas como marcador de riesgo cardiovascular no está bien establecido, aunque existen algunas evidencias de niveles elevados de P-selectina soluble en pacientes con enfermedad arterial periférica². Por otra parte, los niveles elevados de E-selectina soluble podrían predecir el riesgo de reestenosis tras una angiografía transluminal percutánea y podrían estar involucrados en la enfermedad cardiovascular²¹.

En referencia a los niveles de selectinas como marcadores de trombosis venosa, se han hallado niveles elevados de P-selectina soluble tanto en la fase aguda de la trombosis como varios meses después de la misma¹⁷, y también se han relacionado con un mayor riesgo de recurrencia¹⁸.

Polimorfismos genéticos de las selectinas y trombosis

Los genes de la familia de las selectinas están localizados en el brazo largo del cromosoma 1. Se han descrito diversos polimorfismos que pueden afectar a la expresión o a la funcionalidad de las selectinas y que se han relacionado en algunos casos con procesos trombóticos (Tabla 2). En el gen de la P-selectina, localizado en el cromosoma 1q24-q25, se han identificado varios polimorfismos (S290N, N562D, V599L, T715P, V168M, entre otros), pero sólo algunos de ellos se han asociado con el riesgo cardiovascular. El polimorfismo T715P ha sido el más estudiado ya que se ha relacionado con los niveles de P-selectina soluble^{22,23}. Se ha asociado al riesgo de infarto de miocardio en algunos estudios²⁴⁻²⁶, aunque no en todos²⁷. Cuando se han analizado distintos polimorfismos del gen de la P-selectina mediante el estudio de haplotipos específicos y su asociación con enfermedad cardiovascular, se ha hallado un efecto protector del alelo 715P, pero la implicación de otros polimorfismos incluidos en el análisis como el S290N y el N562D ha dado resultados contradictorios respecto a su asociación con el riesgo de infarto de miocardio²⁶. En un trabajo reciente derivado del estudio *ARIC*²⁸, el polimorfismo S290N, de forma aislada o formando parte del haplotipo que incluye T715P, se ha asociado a un incremento del riesgo de infarto de miocardio en población caucásica pero no en afroamericanos.

En el gen de la E-selectina se han investigado fundamentalmente dos polimorfismos en relación con la arteriosclerosis, el L554F y el S128R. El alelo F554 del polimorfismo L554F se ha relacionado con los niveles

Tabla 3. Algunos tratamientos basados en la inhibición de selectinas evaluados en modelos de trombosis *in vivo*

Tipo	Diana	Indicación
<i>Anticuerpos</i>		
RB40.34	P-selectina	Isquemia cerebral
4RA10	PSGL-1	Reestenosis
CLB-Throm/6	P-selectina	Lesión post-isquemia en IAM
<i>PSGL-1 recombinante</i>		
rPSGL-1-Ig	P- y E-selectina	Lesión post-isquemia en IAM Trombosis Reestenosis post-angioplastia
<i>Antagonistas de bajo peso molecular</i>		
TBC1269	P- y E-selectina	Lesión post-isquemia en IAM
PSI-697	P-selectina	Trombosis venosa
PSI-421	P-selectina	Trombosis venosa
Efomicina M	P- y E-selectina	Lesión post-isquemia en IAM

IAM: infarto agudo de miocardio

de E-selectina y con el desarrollo precoz de arteriosclerosis². Por su parte, el polimorfismo S128R altera la afinidad de E-selectina por su ligando y en estudios funcionales se ha demostrado una disminución de la adhesión relacionada con el alelo R128. Además, el polimorfismo S128R se ha asociado con un aumento de generación de trombina y fibrina²⁹ y, desde el punto de vista clínico, se ha relacionado con el desarrollo precoz de arteriosclerosis, con reestenosis tras angioplastia, con el infarto de miocardio³⁰ y con enfermedad cerebrovascular en población japonesa³¹. Por el contrario, en otros estudios no se ha hallado relación del polimorfismo S128R de la E-selectina con el infarto de miocardio²⁴. Respecto a la L-selectina, se han descrito diversos polimorfismos, aunque ninguno de ellos se ha relacionado de manera clara con la patología cardiovascular.

Dos trabajos muy recientes analizan los polimorfismos de las selectinas en relación con la trombosis venosa, con resultados contradictorios. En uno de ellos³², que incluye 474 pacientes del *Leiden Thrombophilia Study*, se han investigado 24 polimorfismos en los genes de E-, L- y P-selectina y en el de su principal ligando, PSGL-1. Ninguno de los haplotipos estudiados de E- y L-selectina se asociaron a riesgo trombótico. Dos de los haplotipos de P-selectina se relacionaron con el riesgo trombótico, uno de ellos incrementándolo (haplotipo H2) y otro disminuyéndolo (H4). Sin embargo, esta asociación desapareció cuando se tuvo en consideración el desequilibrio de ligamiento con la mutación factor V Leiden, localizada también en el cromosoma 1, a sólo 2,4 Kb del gen de la P-selectina³². Por el contrario, en el otro estudio³³, que analiza 4 polimorfismos de la P-selectina,

se halla relación de determinados haplotipos con los niveles de P-selectina soluble y con el riesgo trombótico, de forma independiente de la presencia del factor V Leiden. En relación con el gen de la E-selectina, en un estudio prospectivo que incluyó 585 pacientes con trombosis venosa, se halló que los homocigotos para el polimorfismo S128R tenían más riesgo de recurrencia de la trombosis³⁴.

El PSGL-1 tiene un gen compuesto por dos exones y un intrón. Se ha descrito un polimorfismo de tamaño en el exón 2 de este receptor (VNTR, *variable number of tandem repeats*) en el que una secuencia decamérica se repite 14, 15 o 16 veces, dando lugar a los alelos C, B y A, respectivamente, y determina la longitud del dominio extracelular de la proteína. El polimorfismo VNTR parece tener relevancia desde el punto de vista funcional puesto que los alelos de menor tamaño se han asociado a una menor capacidad de unión a plaquetas activadas en estudios experimentales³⁵. Desde el punto de vista clínico, los alelos más cortos (B y C) del polimorfismo VNTR se han asociado con un menor riesgo de enfermedad cerebrovascular, pero no con el riesgo de padecer enfermedad cardiovascular o trombosis venosa profunda^{27,35}. Asimismo, se ha descrito un polimorfismo M62I localizado cerca del sitio de unión del PSGL-1 a la P-selectina, que se ha relacionado con enfermedad cardiovascular, atribuyéndose al alelo 62I un efecto protector²⁷. En otro estudio en el que se analizan 9 polimorfismos de PSGL-1, los autores hallan una relación de los polimorfismos VNTR y M62I con los niveles plasmáticos de PSGL-1, pero no con el riesgo de enfermedad cardiovascular³⁶.

Las selectinas como dianas terapéuticas

Se han explorado diversas estrategias terapéuticas para la inhibición de la interacción de las selectinas y sus ligandos. Se han probado tres tipos de inhibidores de selectinas en modelos preclínicos y en algunos ensayos clínicos: los anticuerpos anti-selectinas, el PSGL-1 recombinante y las moléculas de bajo peso molecular (glicomiméticos) inhibitoras de la unión P-selectina/PSGL-1. Estos inhibidores han demostrado su eficacia antitrombótica en modelos experimentales animales de trombosis venosa, trombosis arterial e ictus y, también, como coadyuvantes del tratamiento fibrinolítico^{4,5,14,37} (Tabla 3). Recientemente se ha caracterizado un inhibidor de P-selectina, administrado por vía oral, que se ha mostrado eficaz en un modelo de trombosis venosa en primates³⁸.

Por otra parte, se ha sugerido que el potencial procoagulante de la P-selectina¹⁰ podría utilizarse para el tratamiento de enfermedades hemorrágicas, tales como la hemofilia. Así, se ha demostrado en algunos trabajos experimentales en ratones hemofílicos que la

P-selectina incrementa el número de micropartículas procoagulantes capaces de mejorar la hemostasia¹³.

Consideraciones finales

La interacción entre P-selectina y su ligando PSGL-1 representa un importante mecanismo potenciador de la hemostasia a través del cual se generan micropartículas procoagulantes que son incorporadas al trombo en formación. El valor de los niveles plasmáticos de las selectinas se ha intentado validar como un marcador de riesgo cardiovascular y trombótico, aunque por el momento los resultados no son totalmente concluyentes. Adicionalmente, algunas de las variaciones genéticas en las selectinas o en sus ligandos determinan los niveles de proteína circulante y, en algunos estudios, se han podido relacionar con el riesgo trombótico arterial y venoso. A pesar de los importantes avances que se han realizado en los últimos años en el conocimiento de las selectinas como moléculas determinantes en la coagulación, aún quedan por responder muchas cuestiones tales como por qué mecanismos se produce la regulación de la expresión de selectinas, cómo se induce su proteólisis, qué vías de señalización intervienen en la generación de micropartículas, o qué variantes genéticas son relevantes y qué alteración funcional producen, entre otras. Por último, el desarrollo de estrategias terapéuticas moduladoras de la hemostasia tanto en procesos trombóticos como hemorrágicos basadas en la inhibición o potenciación de las funciones de las selectinas y sus ligandos es un reto científico y un campo muy prometedor que está en la actualidad en su fase inicial de desarrollo.

Bibliografía

1. Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 1996; 88: 3259-87.
2. Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003; 170: 191-203.
3. da Costa P, García-Vallejo JJ, van Thienen J, Fernández-Borja M, van Gils JM, Beckers C, et al. P-selectin glycoprotein ligand-1 is expressed on endothelial cells and mediates monocyte adhesion to activated endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 1023-9.
4. Kneuer C, Ehrhardt C, Radomski MW, Bakowsky U. Selectins, potential pharmacological targets? *Drug Discov Today* 2006; 11: 1034-40.
5. Ley K. The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol Med* 2003; 9: 263-8.
6. Palabrica T, Lobb R, Furie BC, Aronovitz M, Benjamin C, Hsu YM, et al. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature* 1992; 359: 848-51.
7. Celi A, Pellegrini G, Lorenzet R, De Blasi A, Ready N, Furie BC, et al. P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 8786-71.
8. Cambien B, Wagner DD. A new role in hemostasis for the adhesion receptor P-selectin. *Trends Mol Med* 2004; 10: 179-86.
9. Furie B, Furie BC. Role of platelet P-selectin and microparticle PSGL-1 in thrombus formation. *Trends Mol Med* 2004; 10: 171-8.
10. Andre P, Hartwell D, Hrachovinova I, Saffaripour S, Wagner DD. Pro-coagulant state resulting from high levels of soluble P-selectin in blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 13835-40.
11. Myers DD, Hawley AE, Farris DM, Wroblewski SK, Thanaporn P, Schaub RG, et al. P-selectin and leukocyte microparticles are associated with venous thrombogenesis. *J Vasc Surg* 2003; 38: 1075-89.
12. Myers D, Farris D, Hawley A, Wroblewski S, Chapman A, Stoolman L, et al. Selectins influence thrombosis in a mouse model of experimental deep venous thrombosis. *J Surg Res* 2002; 108: 212-21.
13. Hrachovinova I, Cambien B, Hafezi-Moghadam A, Kappelmayr J, Camphausen RT, Widom A, et al. Interaction of P-selectin and PSGL-1 generates microparticles that correct hemostasis in a mouse model of hemophilia A. *Nat Med* 2003; 9: 1020-5.
14. Polgar J, Matuskova J, Wagner DD. The P-selectin, tissue factor, coagulation triad. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1590-6.
15. Falati S, Liu Q, Gross P, Merrill-Skologoff G, Chou J, Vandendries E, et al. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J Exp Med* 2003; 197: 1585-98.
16. del Conde I, Nabi F, Tonda R, Thiagarajan P, López JA, Kleiman NS. Effect of P-selectin on phosphatidylserine exposure and surface-dependent thrombin generation on monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1065-70.
17. Rectenwald JE, Myers DD Jr, Hawley AE, Longo C, Henke PK, Guire KE, et al. D-dimer, P-selectin, and microparticles: novel markers to predict deep venous thrombosis. *Thromb Haemost* 2005; 94: 1312-7.
18. Kyrle PA, Hron G, Eichinger S, Wagner O. Circulating P-selectin and the risk of recurrent venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2007; 97: 880-3.
19. Huo Y, Schober A, Forlow SB, Smith DF, Hyman MC, Jung S, et al. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med* 2003; 9: 61-7.
20. Koyama H, Maeno T, Fukumoto S, Shoji T, Yamane T, Yokoyama H, et al. Platelet P-selectin expression is associated with atherosclerotic wall thickness in carotid artery in humans. *Circulation* 2003; 108: 524-9.
21. Roldan V, Marin F, Lip GYH, Blann AD. Soluble E-selectin in cardiovascular disease and its risk factors. A review of the literature. *Thromb Haemost* 2003; 90: 1007-20.
22. Carter AM, Anagnostopoulou K, Mansfield MW, Grant PJ. Soluble P-selectin levels, P-selectin polymorphisms and cardiovascular disease. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1718-23.
23. Barbaux SC, Blankenberg S, Rupprecht HJ, Francomme C, Bickel C, Hafner G, et al. Association between P-selectin gene polymorphisms and soluble P-selectin levels and their relation to coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1668-73.
24. Herrmann SM, Ricard S, Nieuwd V, Mallet C, Evans A, Ruidavets JB, et al. The P-selectin gene is highly polymorphic: reduced frequency of the Pro715 allele carriers in patients with myocardial infarction. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 1277-84.
25. Kee F, Morrison C, Evans AE, McCrum E, McMaster D, Dallongeville J, et al. Polymorphisms of the P-selectin gene and risk of myocardial infarction in men and woman in the ECTIM extension study. Etude cas-temoin de l'infarctus myocarde. *Heart* 2000; 84: 548-52.
26. Tregouet DA, Barbaux S, Escolano S, Thari N, Goldmard JL, Tiret L, et al. Specific haplotypes of the P-selectin gene are associated with myocardial infarction. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 2015-23.

27. Burgert P, Vosberg M, Entelmann M, Jahn J, Katus HA, Kluter H. Polymorphisms in the P-selectin (CD62P) and P-selectin glycoprotein ligand (PSGL-1) genes and coronary heart disease. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 997-1004.
28. Volcik KA, Ballantyne CM, Coresh J, Folsom AR, Boerwinkle E. Specific P-selectin and P-selectin glycoprotein ligand-1 genotypes/haplotypes are associated with risk of incident CHD and ischemic stroke: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Atherosclerosis* 2007; 195: 76-82.
29. Jilma B, Marsik C, Kovar F, Wagner OF, Jilma-Stohlawetz P, Endler G. The single nucleotide polymorphism Ser128Arg in the E-selectin gene is associated with enhanced coagulation during human endotoxemia. *Blood* 2005; 105: 2380-3.
30. Yoshida M, Takano Y, Sasaoka T, Izumi T, Kimura A. E-selectin polymorphism associated with myocardial infarction causes enhanced leukocyte-endothelial interactions under flow conditions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 783-8.
31. Hattori H, Sato H, Ito D, Tanahashi N, Murata M, Saito I, et al. A561C polymorphism of E-selectin is associated with ischemic cerebrovascular disease in the Japanese population without diabetes mellitus and hypercholesterolemia. *Brain Res* 2006; 1108: 221-3.
32. Uitte de Willige S, de Visser MCH, Vos HL, Houwing-Duistermaat JJ, Rosendaal FR, Bertina RM. Selectin haplotypes and the risk of venous thrombosis: influence of linkage disequilibrium with the factor V Leiden mutation. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 478-85.
33. Ay C, Jungbauer LV, Kaider A, Koder S, Panzer S, Pabinger I, et al. P-selectin gene haplotypes modulate soluble P-selectin concentrations and contribute to the risk of venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2008; 99: 899-904.
34. Jilma B, Kovar FM, Hron G, Endler G, Marsik CL, Eichinger S, et al. Homozygosity in the single nucleotide polymorphism Ser128Arg in the E-selectin gene associated with recurrent venous thromboembolism. *Arch Intern Med* 2006; 166: 1655-9.
35. Lozano ML, González Conejero R, Corral J, Rivera J, Inhiesta JA, Martínez C, et al. Polymorphisms of P-selectin glycoprotein ligand-1 are associated with neutrophil-platelet adhesion and with ischaemic cerebrovascular disease. *Br J Haematol* 2001; 115: 969-76.
36. Tregouet DA, Barbaux S, Poirier O, Blankenberg S, Bickel C, Escolano S, et al. SELPLG gene polymorphisms in relation to plasma SELPLG levels and coronary artery disease. *Ann Hum Genet* 2003; 67: 504-11.
37. Oostingh GJ, Pozgajova M, Ludwig RJ, Krahn T, Boehncke WH, Nieswandt B, Schön MP. Diminished thrombus formation and alleviation of myocardial infarction and reperfusion injury through antibody- or small-molecule-mediated inhibition of selectin-dependent platelet functions. *Haematologica* 2007; 92: 502-12.
38. Meier TR, Myers D, Wroblewski SK, Zajkowski PJ, Hawley AE, Bedard PW, et al. Prophylactic P-selectin inhibition with PS1-421 promotes resolution of venous thrombosis without anticoagulation. *Thromb Haemost* 2008; 99: 343-51.

NUEVAS ACCIONES BIOLÓGICAS DEL SISTEMA DE LA PROTEÍNA C

P. MEDINA¹, S. NAVARRO¹, E. ZORIO^{1,2},
A. ESTELLÉS¹, F. ESPAÑA¹

¹ Departamento de Bioquímica. Centro de Investigación del Hospital Universitario La Fe. Valencia

² Servicio de Cardiología. Hospital Universitario La Fe. Valencia

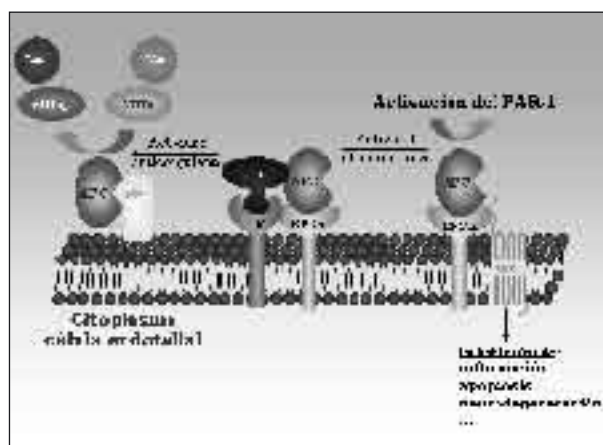


Figura 1. Funciones de la proteína C activada. La proteína C es activada por la trombina tras la formación del complejo trombina-trombomodulina y proteína C-EPCR sobre la superficie de la célula endotelial. La APC puede permanecer unida a su receptor o disociarse del complejo. Cuando la APC se disocia del EPCR con la ayuda de la proteína S (PS), la APC ejerce su función anticoagulante al inhibir los factores (F) Va y VIIIa, disminuyendo la generación de trombina, mientras que si la APC permanece unida al EPCR sobre la superficie endotelial puede ejercer sus funciones citoprotectoras al activar el receptor PAR-1 mediante un corte proteolítico.

Introducción

El sistema de la proteína C juega un papel esencial en la protección frente a la enfermedad trombótica, principalmente frente al tromboembolismo venoso (TEV). Éste se desencadena cuando la trombina se une a su receptor, la trombomodulina (TM), sobre la superficie de la célula endotelial, pasando de ser una molécula procoagulante a ejercer funciones anticoagulantes. A su vez, la proteína C (PC) circulante se une a su receptor, el receptor endotelial de la proteína C (EPCR). El complejo formado por estas cuatro proteínas permite la rápida conversión de la proteína C en proteína C activada (APC), proceso que es potenciado por el EPCR. El EPCR se une a la proteína C y a la APC con la misma afinidad (Kd ~ 30 nM)¹. Una vez activada, la APC puede disociarse del EPCR con la ayuda de la proteína S (PS), y ejercer su función anticoagulante inhibiendo los factores (F) Va y VIIIa, disminuyendo por tanto la generación de trombina. Sin embargo, la APC puede ejercer otras funciones importantes. Así, si la APC permanece unida al EPCR sobre la superficie endotelial, puede activar el receptor activado por proteasas de tipo 1 (PAR-1) mediante un corte proteolítico y expresar sus funciones citoprotectoras incluyendo la actividad antiinflamatoria, antiapoptótica y neuroprotectora² (Figura 1).

Tabla 1. Funciones citoprotectoras de la APC y su mecanismo de acción

Función de la APC	Mecanismo	Bibliografía
Antiinflamatoria	Inhibición de la liberación de mediadores de inflamación Menor expresión de moléculas de adhesión vascular Inhibición de la adhesión e infiltración leucocitaria	4,6
Antiapoptótica Neuroprotectora	Disminución de las rutas proapoptóticas p53 y Bax Aumento de las rutas antiapoptótica Bcl-2 Reducción de la señalización por caspasa-3 Contrarresta la neurotoxicidad del tPA Activación de la ruta ERK	10-12
Estabilización de la barrera endotelial	Generación de SP1	2,16
Protección frente al IM	Niveles elevados de APC en plasma Niveles elevados de sEPCR en plasma	18,19
Protección frente al stroke	Niveles elevados de APC en plasma Reducción de hemorragias inducidas por tPA Estabilización de la barrera hematoencefálica	9-11,22,23
Protección frente al TEV en la enfermedad de Behçet	Niveles elevados de APC en plasma	24
Mayor riesgo de cáncer	Mayor invasión y quimiotaxis de células tumorales Mayor angiogénesis	25-27
Protección frente a la pancreatitis severa aguda	Menor expresión y actividad de p38MAPK y JNK	28
Protección frente a la nefropatía diabética	Inhibición de la apoptosis glomerular	29
Protección frente al daño cerebral isquémico por hipoxia neonatal	Reducción de la apoptosis neuronal	30
Angiogénesis y cicatrización	Proliferación de células endoteliales Proliferación y migración de queratinocitos Degradación de la matriz extracelular Mayor expresión y fosforilación de EGFR Mayor expresión de IL-6 e IL-8 Mayor expresión de MCP-1	27,31-34

Nuevas funciones de la APC

En los últimos años se le han otorgado nuevas funciones a la APC, todas ellas eminentemente citoprotectoras. Para llevar a cabo estas funciones, la APC debe activar el PAR-1 mediante un corte proteolítico, proceso dependiente del EPCR por dos motivos. Primero, la afinidad de la PC/APC por las membranas celulares endoteliales en ausencia de EPCR es baja, de manera que sin el EPCR la APC no se localiza eficientemente en dichas superficies y no puede activar el PAR-1. Segundo, el EPCR puede ser transportado específicamente a las caveolas, proceso que localiza a la APC en estos microdominios ricos en glicoesfingolípidos que, a su vez, son ricos en PAR-1³. Esta colocalización aumenta la probabilidad de que la APC unida al EPCR encuentre y corte el PAR-1. Como hemos visto, tras la activación de la proteína C, la APC puede bien disociarse del EPCR y ejercer su actividad anticoagulante o bien permanecer unida al EPCR y expresar sus actividades citoprotectoras al activar el PAR-1. Pero ¿qué factores determinan la funcionalidad de la APC tras su activación? Bae *et al.*³ proponen

que la colocalización del EPCR y PAR-1 en las regiones lipídicas de las membranas de células endoteliales es un requerimiento clave para que se inicie la señalización celular inducida por la APC.

Las funciones citoprotectoras de la APC conllevan la alteración de patrones de expresión génica. Así, la APC regula negativamente rutas proinflamatorias y proapoptóticas como p53 y Bax, mientras que regula positivamente rutas antiinflamatorias y antiapoptóticas como Bcl-2^{4,5}.

Seguidamente detallaremos las funciones citoprotectoras de la APC y sus mecanismos de acción (Tabla 1).

Actividad antiinflamatoria de la APC

Inicialmente se suponía que la actividad anticoagulante de la APC explicaba su actividad antiinflamatoria, ya que disminuye la generación de trombina y la trombina tiene propiedades proinflamatorias, pero estudios recientes han demostrado que no es así. Los efectos antiinflamatorios de la APC sobre las células endoteliales engloban la inhibición de la libera-

ción de mediadores de inflamación y la disminución de la expresión de moléculas de adhesión vascular, con la finalidad de inhibir la adhesión e infiltración de leucocitos a los tejidos y limitar el daño al tejido subyacente. A su vez, al ayudar a mantener las barreras endoteliales, la APC reduce los procesos inflamatorios extravasculares⁶. Asimismo, la APC inhibe la liberación de citoquinas por los leucocitos atenuando el inicio de la respuesta inflamatoria sistémica como la sepsis⁴. Además, la APC inhibe la producción de la metaloproteasa proinflamatoria MMP-9 al unirse al EPCR e inhibir la activación intracelular de las moléculas de señalización NF- κ B y p38 y la producción de TNF, y también aumenta la producción y actividad de la metaloproteasa antiinflamatoria MMP-2. Estos datos sugieren que la APC podría ser beneficiosa para prevenir la inflamación y la destrucción de las articulaciones en la artritis reumatoide⁷. Se conoce que la molécula de señalización Wnt5A es crítica en la señalización inflamatoria de los macrófagos en la sepsis y actúa como diana de la APC para que ésta ejerza su actividad antiinflamatoria⁸.

Las lesiones de espina dorsal pueden ser inducidas por un daño físico que resulta en una respuesta inflamatoria que da lugar a destrucción celular e incapacidad. El tratamiento terapéutico se centra en la reducción de dicha inflamación. El tratamiento con APC en modelos de rata sujetas a lesión de espina dorsal por compresión mostraron una reducción significativa de las alteraciones motoras. Asimismo, la APC redujo significativamente las alteraciones motoras y los microinfartos en ratas sujetas a daño de la espina dorsal por isquemia-reperfusión⁹.

Actividad antiapoptótica y neuroprotectora de la APC

Existen evidencias de la actividad antiapoptótica de la APC tanto *in vitro* como *in vivo*, en reacciones que requieren tanto la actividad enzimática de la APC como la presencia de EPCR y PAR-1⁶. La APC inhibe la apoptosis en el cerebro de modelos de ratón, y bloquea la ruta apoptótica intrínseca con la disminución de p53 y Bax, con el aumento de Bcl-2 y con la reducción de la señalización por la caspasa-3¹⁰. La APC también parece capaz de bloquear la ruta apoptótica extrínseca porque contrarresta la neurotoxicidad del activador tisular del plasminógeno (tPA), que ejerce una actividad proapoptótica dependiente de la caspasa-8¹¹. Sin embargo, O'Brien *et al.*¹² han identificado un mecanismo por el cual la APC puede ejercer su actividad antiapoptótica sin la mediación del EPCR. La APC activa la ruta ERK, factor que induce la expresión del factor de transcripción ERG-1, que a su vez actúa como supresor de TRAIL, un factor que se expresa en la mayor parte de los tipos celulares y tejidos

y es capaz de inducir apoptosis. Para desarrollar esta actividad antiapoptótica la APC debe unirse al PAR-1 pero no se requiere la presencia del EPCR.

En modelos de ratón con endotoxemia, la APC redujo la apoptosis al mejorar la supervivencia por sepsis¹³. En pacientes con sepsis severa, la molécula de APC recombinante XI-GRISTM redujo la apoptosis de células sanguíneas circulantes¹⁴.

Por lo tanto, la actividad antiapoptótica de la APC se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo*, lo que respalda el uso farmacológico de la APC para reducir la mortalidad por sepsis¹⁵.

Estabilización de la barrera endotelial por la APC

Las células endoteliales forman una barrera estable y dinámica en la interfase sangre-tejido. La ruptura de esta barrera, con la infiltración de células y mediadores de la inflamación al espacio extravascular, es un factor clave en los procesos inflamatorios. Concretamente, la mayor permeabilidad endotelial promueve edema e hipotensión, lo que produce inflamación, daño pulmonar agudo y fallo orgánico. La APC, en conjunción con el EPCR y PAR-1, contribuye al efecto protector de la barrera endotelial. La activación del PAR-1 por APC estimula a la esfingosina quinasa-1 (SphK-1) a producir esfingosina-1-fosfato (S1P) a partir de esfingosina. S1P activa el receptor esfingosina-1-fosfato 1 (S1P₁), lo que promueve la protección de la barrera endotelial, antiapoptosis y reduce la expresión de moléculas de adhesión^{2,16}.

Al contrario de lo que ocurre con la APC, concentraciones elevadas de trombina actuando a través de PAR-1 causan desestabilización de la barrera endotelial, mientras que la activación de PAR-1 por APC la estabiliza². Esta regulación de la estabilidad de la barrera endotelial mediada por la APC o la trombina depende del nivel de inducción de S1P. Además, los efectos de la estabilización de la barrera parecen ser más efectivos cuando son producidos por la APC generada endógenamente que por la APC añadida de manera exógena¹⁷, lo que apoya la idea de que la generación endógena de APC promovería la integridad vascular y limitaría las hemorragias cuando la trombina es generada localmente.

S1P, además de promover la estabilización de la barrera endotelial, también media señales antiapoptóticas. Los esfingolípidos ceramida y esfingosina están en equilibrio metabólico dinámico con S1P. Además, la ratio ceramida:esfingosina parece mediar la señalización proapoptótica. La glucosilceramida, producto metabólico de la ceramida, potencia la actividad anticoagulante de la APC, lo que sugiere que las interacciones entre la ruta reguladora de los esfingolípidos y la ruta de la proteína C podrían jugar un papel relevante.

Papel de la APC en el infarto de miocardio

Los factores de riesgo cardiovascular clásicos son frecuentes en individuos que sufren un infarto de miocardio (IM). Sin embargo, su presencia no siempre desencadena un evento trombótico arterial, lo que sugiere que otros factores adicionales podrían jugar un papel importante. Especialmente, individuos jóvenes que desarrollan IM suelen presentar menos factores de riesgo. No se ha establecido una clara evidencia del papel del sistema de la proteína C en la patogenia de la trombosis arterial, aunque diversos estudios sugieren que la PC podría ejercer un papel protector, fundamentalmente debido a las funciones anticoagulante y antiinflamatoria de la APC. Por tanto, quisimos estudiar si niveles reducidos de APC están asociados con el IM a edad temprana y con el grado de afectación coronaria¹⁸. Observamos una menor concentración de APC circulante en pacientes jóvenes con IM comparados con sujetos sanos. Además, los niveles de APC reducidos se asocian con el número de arterias coronarias afectadas y con la severidad de las lesiones coronarias. Por lo tanto, nuestro estudio demostró que una disminución de APC circulante incrementa el riesgo de IM en individuos jóvenes, y se asocia con una mayor afectación coronaria.

Además, hemos estudiado 2 haplotipos (H) del gen del EPCR para analizar su posible asociación con el riesgo de IM prematuro¹⁹. El H1, cuyo SNP marcador es el G4678C, está asociado con un mayor nivel de APC en plasma y con una reducción del riesgo de TEV, mientras que el H3, cuyo SNP marcador es el A4600G, está asociado con mayores niveles de EPCR soluble (sEPCR) y parece ser neutro frente al TEV en ausencia de otros defectos trombofílicos²⁰, pero incrementa el riesgo trombótico en presencia de la mutación FV Leiden²¹. Sorprendentemente, en nuestro estudio observamos que tanto el H1 como el H3 protegen frente al IM prematuro. De hecho, el efecto protector de ambos haplotipos parece ser aditivo, puesto que los individuos H1H3 presentaban el riesgo de IM más bajo. El efecto protector del H1 se debe probablemente a su asociación con niveles de APC más elevados en plasma, mientras que los individuos portadores del H3 tienen un menor riesgo de IM prematuro, en parte debido a sus niveles de sEPCR elevados en plasma. Esto es debido a que el sEPCR posee actividad anticoagulante independiente de la APC, la cual podría ser más pronunciada en los individuos portadores del H3¹⁹.

Papel de la APC en el stroke

Niveles elevados de PC en plasma están asociados con una menor incidencia de *stroke* isquémico en hu-

manos, mientras que en pacientes con *stroke* isquémico tras una infección se han encontrado niveles de APC reducidos⁹. Estos datos sugieren que el sistema de la proteína C protege frente al *stroke*.

Así, aunque la función principal de la APC es anticoagulante, también previene las hemorragias cerebrales. Uno de los pocos tratamientos disponibles para el *stroke* isquémico es el tPA, puesto que promueve la lisis de las oclusiones trombóticas por la plasmina, pero su administración conlleva importantes efectos secundarios. El tPA es neurotóxico para las células neurovasculares puesto que induce su apoptosis y además incrementa el riesgo de hemorragias. En modelos de *stroke* isquémico en ratón y rata donde la administración de tPA induce hemorragia cerebral, la coadministración de APC reduce dicha hemorragia inducida por tPA. Estos efectos antihemorrágicos de la APC en modelos de *stroke* requieren el PAR-1 y parecen actuar mediante la estabilización directa e indirecta de la barrera endotelial. Los efectos directos de la APC tendrían que ver con su capacidad para estabilizar el citoesqueleto endotelial, mientras que sus efectos indirectos tendrían que ver con la atenuación del aumento de MMP-9 inducido por tPA, lo cual promueve la ruptura de la barrera hematoencefálica^{10,11,22,23}.

Papel de la APC en la enfermedad de Behçet

La enfermedad de Behçet es un patología inflamatoria multisistémica de causa desconocida, que en la mayor parte de los casos se asocia con daño endotelial mediado por vasculitis. En el 25% de los casos la enfermedad de Behçet cursa con trombosis pero se desconoce el mecanismo. Por ello, quisimos evaluar el estado del sistema de la proteína C en la enfermedad de Behçet y su correlación con el TEV²⁴. Observamos que, en los pacientes con Behçet, los niveles de APC y TM soluble eran significativamente menores que en los individuos sanos. Además, los niveles de APC, inhibidor de la proteína C y TM soluble eran más bajos en los pacientes con trombosis que en los pacientes sin trombosis. En los pacientes, niveles de APC por debajo de 0,75 ng/mL aumentan el riesgo trombótico 5 veces. Estos datos indican que niveles de APC reducidos están asociados con una mayor incidencia de TEV en la enfermedad de Behçet, posiblemente debido a la disminución de la actividad antiinflamatoria asociada a la APC.

Papel de la APC en el cáncer

La APC promueve la invasión de células tumorales con la ayuda del EPCR y del PAR-1²⁵. Así, la APC aumenta la migración de las células de cáncer de ovario y de

coriocarcinoma *in vitro* en presencia del inhibidor del activador del plasminógeno de tipo 1 (PAI-1), lo que sugiere que la APC estimula el activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA) formando un complejo con el PAI-1 que da lugar a la activación de proteasas de la matriz extracelular y a una mayor invasión²⁵.

A su vez, la APC aumenta la invasión y la quimiotaxis de las células de cáncer de mama *in vitro* uniéndose a la superficie celular y activando rutas de transducción de señales específicas con la ayuda del EPCR y del PAR-1²⁶.

Además, la APC incrementa la proliferación de células endoteliales *in vitro* y la angiogénesis *in vivo* con la ayuda del EPCR mediante la activación de las rutas MAPK, PI3K y eNOS²⁷.

Papel de la APC en la pancreatitis

La pancreatitis severa aguda es una condición inflamatoria grave del páncreas que suele cursar con trombosis, hemorragia y en último término con necrosis tisular. Chen *et al.*²⁸ observaron que el tratamiento de ratas con pancreatitis severa aguda con APC mejoró el pronóstico de la enfermedad. La reducción en la expresión y actividad de p38MAPK y JNK atenuó la expresión de TNF- α e IL-1 β pancreáticas, mientras que se observó un aumento en la expresión y actividad de ERK1/2. Por tanto, el tratamiento con APC parece proteger frente al daño pancreático disminuyendo la severidad de la enfermedad.

Papel de la APC en la nefropatía diabética

La nefropatía diabética es la causa más frecuente de fallo renal, la cual cursa con anormalidades glomerulares como el aumento de la tasa de filtrado glomerular y albuminuria. Los podocitos son las células que conforman la barrera del filtrado del glomérulo, y su integridad suele estar alterada en los individuos con diabetes de tipo 1 y tipo 2. Isermann *et al.*²⁹ observaron que en ratones diabéticos existe una menor generación de APC debido a una menor expresión de TM en la superficie de la célula endotelial glomerular, lo cual se asocia con nefropatía puesto que la APC inhibe la apoptosis glomerular. Esto es debido a que la APC, con la ayuda del EPCR y PAR-1, previene la apoptosis inducida por glucosa en células endoteliales y podocitos. Isermann *et al.* han establecido un nuevo mecanismo en el que la hiperglucemia reduce la expresión de TM y con ello la generación de APC, lo cual interrumpe la comunicación entre el compartimento vascular y los podocitos causando apoptosis glomerular y nefropatía diabética. Por ello podemos concluir que el mantenimiento de niveles de APC

elevados en la diabetes a largo plazo podría proteger frente a la nefropatía diabética.

Papel de la APC en el daño cerebral isquémico por hipoxia neonatal

La hipoxia isquémica perinatal es la causa más importante de daño cerebral en neonatos, y conlleva la muerte o secuelas permanentes en el desarrollo físico, visual, motor, sensorial, cognitivo y social. En la actualidad no existe terapia para la encefalopatía por hipoxia isquémica neonatal (NHIE). Puesto que la APC presenta actividades neuroprotectoras, Yesilirmak *et al.*³⁰ analizaron el uso de la APC como posible agente terapéutico para la NHIE. En un modelo de ratas observaron que el tratamiento con APC redujo significativamente el número de células apoptóticas y redujo la apoptosis celular en ambos hemisferios cerebrales a la vez que preservó el número de neuronas. Estos resultados sugieren que la APC podría ser un agente terapéutico prometedor para el tratamiento del daño cerebral isquémico por hipoxia neonatal.

Papel de la APC en la angiogénesis y cicatrización de heridas

Se sabe que la APC muestra efectos beneficiosos en procesos regenerativos como la angiogénesis y la cicatrización de heridas. La APC puede inducir la proliferación de células endoteliales y la angiogénesis tanto *in vitro* como *in vivo*, lo cual depende del EPCR y el PAR-1²⁷. La APC puede estimular la proliferación y migración de queratinocitos, así como contribuir a la degradación de la matriz extracelular por la activación de la gelatinasa MMP-2^{31,32}. En el daño epitelial se sobreexpresa el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) para regular la reepitelización de la herida puesto que regula la adhesión celular, la expresión de proteasas de degradación de la matriz y la migración celular para favorecer el potencial migratorio e invasivo de los queratinocitos⁹. La APC aumenta la expresión y fosforilación del EGFR, al mismo tiempo que estimula a los queratinocitos. Además, la APC podría inducir la cicatrización de heridas y promover la migración y proliferación celular a través del aumento de la generación de citoquinas endoteliales como IL-6 e IL-8, o de quimoquinas como el MCP-1^{33,34}. Sorprendentemente, en un modelo de rata, una única aplicación tópica de APC promovió la cicatrización de heridas⁹.

En la mayoría de los casos, la relevancia de las nuevas funciones de la APC se ha demostrado en modelos animales al administrarles dosis farmacológicas (generalmente muy elevadas) de APC^{10,11,22,23}, pero se desconoce la trascendencia de estas funciones *in vivo*.

Quizás la discrepancia entre la APC generada endógenamente y la añadida de manera exógena tiene que ver con la dosis, puesto que en los modelos estudiados la APC añadida es mucho mayor que la generada por el propio organismo. Este dato sería consistente con el hecho de que la activación de PAR-1 por el complejo APC-PAR-1 es cientos de veces más lenta que por sus activadores eficientes como la trombina³⁵.

PAR-1 parece ser un receptor promiscuo puesto que puede ser proinflamatorio o antiinflamatorio dependiendo de la proteasa que lo active, de la dosis de la proteasa y del tipo celular³⁶. La trombina es la proteasa con mayor afinidad por el PAR-1, mientras que la APC tiene mucha menor afinidad, pero los receptores necesarios para la activación de la PC (TM y EPCR) y para la señalización celular por la APC (EPCR y PAR-1) se localizan juntos en las regiones lipídicas de la membrana de células endoteliales, de manera que la trombina presente es reclutada por la TM para activar a la PC permitiendo la activación del PAR-1 por la APC³. Además, recientemente Schuepbach *et al.*³⁷ han demostrado que la APC genera una población de PAR-1 activado diferente a la generada por la trombina, lo que explicaría que las señales celulares generadas por esta población de PAR-1 dependiente de APC sean relevantes aún en presencia de la trombina.

Nuevas funciones del EPCR

El EPCR puede ejercer funciones anticoagulantes independientes de la APC, puesto que puede unirse al FVII/VIIa con similar afinidad que a la proteína C inhibiendo la activación del FX y, por tanto, su función procoagulante³⁸⁻⁴⁰. El FVII/VIIa interacciona con monocitos activados y células endoteliales tras su unión al factor tisular (FT), pero la unión del FVIIa a HUVEC no estimuladas es independiente del FT y de los fosfolípidos cargados negativamente y dependiente del EPCR⁴⁰. Además, la unión del FVIIa al EPCR facilita su endocitosis y eliminación de la circulación, puesto que el cambio conformacional en el FVIIa inducido por el EPCR es diferente al del producido por el FT³⁹, por lo que el EPCR inhibe su actividad procoagulante.

Ambas proteínas se unen al EPCR por la misma región del dominio Gla, de manera que actúan como competidores³⁸⁻⁴⁰. Sin embargo, la concentración fisiológica en plasma de la PC es de 70 nM, mientras que la del FVII es de 10 nM, por lo que la generación de APC se ve mínimamente afectada por la presencia del FVII. Sin embargo, concentraciones farmacológicas de FVIIa recombinante pueden inhibir parcialmente la activación de la proteína C dependiente del EPCR y la señalización celular mediada por la APC, aumentando el efecto procoagulante del FVIIa recombinante, como se ha demostrado eficazmente en el tratamiento de la hemofilia³⁹.

Nuevas funciones de la trombosmodulina

La TM no sólo interviene en la activación de la PC, sino que a su vez previene la coagulación del fibrinógeno por acción de la trombina⁴¹. Esto es debido a que la TM y el fibrinógeno comparten sitios de unión que compiten entre ellos. Además, la TM acelera la inhibición de la trombina unida a ella por la antitrombina o el inhibidor de la proteína C reduciendo su vida media en el plasma a ~ 2 segundos⁴².

El sistema de la proteína C puede verse comprometido por mediadores de la inflamación que pueden ejercer efectos perjudiciales sobre la vasculatura. El TNF y la IL-1 disminuyen la expresión de la TM y del EPCR sobre el endotelio, lo que conduce a una menor generación de APC y a una mayor apoptosis, a una pérdida de la función protectora de la barrera endotelial y a la expresión de moléculas de adhesión de leucocitos. Estos efectos no son debidos únicamente a la disminución en la generación de APC, sino también a la pérdida de las funciones protectoras del endotelio que ejerce la TM, puesto que su dominio lectina N-terminal actúa como represor de la activación endotelial disminuyendo la señalización por MAP quinasas y NF- κ B en respuesta a mediadores de la inflamación⁴³.

Shi *et al.*⁴⁴ generaron una molécula de TM recombinante con 6 dominios de tipo EGF y un dominio rico en serina-treonina, la cual estimula la expresión de metaloproteasas y activadores del plasminógeno que median la proteólisis extracelular favoreciendo la invasión celular y la migración durante la angiogénesis, e induce la neovascularización. Estos resultados sugieren que los fragmentos de la TM podrían jugar un papel importante en la formación de nuevos vasos.

La TM se expresa sobre la superficie de las células tumorales y parece jugar un papel en el cambio hemostático que ocurre alrededor de los tumores malignos. La TM se expresa en una amplia variedad de tumores, y existe una buena correlación entre la pérdida de expresión de TM y un estado avanzado y mala prognosis. Además, los niveles de TM soluble en plasma aumentan con la progresión del cáncer en varios tipos de tumores. En la actualidad se está estudiando este mecanismo de acción, pero parece que la TM podría emplearse como factor diagnóstico, terapéutico y pronóstico en diferentes tipos de tumores⁴⁵.

Nuevas aplicaciones de la APC

Dada la multifuncionalidad de la APC, en la actualidad se está estudiando su posible aplicabilidad terapéutica y la de otros componentes del sistema de la proteína C en diversas patologías. La aplicación terapéutica de la proteína C activada resulta beneficiosa tanto por su función anticoagulante como por sus

funciones citoprotectoras. La APC podría utilizarse en sepsis severa, *stroke* isquémico, daño pulmonar e inflamación, angiogénesis y cicatrización de heridas⁴. De hecho, en el estudio *PROWESS (Recombinant Human Activated Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis Study)*, los pacientes diagnosticados con sepsis y disfunción orgánica aguda fueron tratados con APC humana recombinante reduciendo la mortalidad un 19,4%^{46,47}, y en el estudio *ARIC (Atherosclerosis Risk in Communities)* observaron que la proteína C plasmática era protectora frente al *stroke* isquémico (OR = 0,65; IC 95%: 0,4-1,0)⁴⁸. Recientemente se ha sugerido la posible aplicabilidad terapéutica de la APC en diversas patologías como el fallo multiorgánico causado por la malaria. También en el tratamiento del Alzheimer debido a las propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, profibrinolíticas, neuroprotectoras y proangiogénicas de la APC⁹.

Se sabe que las regiones moleculares de la APC responsables de su actividad anticoagulante son parcialmente diferentes a las responsables de sus actividades citoprotectoras; de hecho, recientemente se han generado variantes de APC recombinantes mediante ingeniería genética en las que se ha reducido selectivamente la actividad citoprotectora, mientras que se preserva o se incrementa su actividad anticoagulante, y viceversa^{13,49}. Estas variantes de APC podrían tener una aplicación terapéutica relevante, puesto que aquéllas con actividad anticoagulante reducida y plena actividad citoprotectora podrían reducir el riesgo de sangrado, mientras que reducirían la mortalidad debido a su acción citoprotectora sobre las células.

Sorprendentemente, se han desarrollado nuevos medios de aplicación de la APC para el tratamiento de ciertas patologías. Se ha demostrado la utilidad de la APC aplicada tópicamente para favorecer la cicatrización de heridas, y se ha empleado la APC inhalada para el tratamiento de la inflamación que ocurre en el daño pulmonar agudo y el asma⁹.

Conclusión

En los últimos años se ha identificado un amplio abanico de nuevas funciones del sistema de la proteína C, las cuales prometen nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas. El sistema de la proteína C está regulado a la baja por mediadores de inflamación y a su vez regula la respuesta inflamatoria por una amplia variedad de mecanismos. Además de la función antiinflamatoria del sistema de la proteína C, sus funciones antiapoptótica y neuroprotectora, y la capacidad de modular la funcionalidad de la barrera celular endotelial sugieren un importante número de dianas terapéuticas para los componentes del sistema de la proteína C. Se han desarrollado variantes

de APC con actividad anticoagulante reducida pero actividad citoprotectora normal, y viceversa. Dichas variantes serán de gran utilidad para comprender los mecanismos de acción de la APC y como posibles agentes terapéuticos debido a la eliminación de sus efectos secundarios adversos como las hemorragias severas. Los datos de la experimentación *in vitro*, datos preclínicos y los datos clínicos limitados de los que se dispone actualmente indican que la APC puede convertirse en un agente terapéutico prometedor, aunque se requieren nuevos estudios que ayuden a esclarecer con detalle los mecanismos de acción de la APC para poder trasladar los resultados de los estudios preclínicos a la aplicación terapéutica.

Bibliografía

1. Fukudome K, Esmon CT. Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor. *J Biol Chem* 1994; 269: 26486-91.
2. Feistritz C, Riewald M. Endothelial barrier protection by activated protein C through PAR1-dependent sphingosine 1-phosphate receptor-1 crossactivation. *Blood* 2005; 105: 3178-84.
3. Bae JS, Yang L, Rezaie AR. Receptors of the protein C activation and activated protein C signaling pathways are colocalized in lipid rafts of endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 2867-72.
4. Mosnier LO, Zlokovic BV, Griffin JH. The cytoprotective protein C pathway. *Blood* 2007; 109: 3161-72.
5. España F, Medina P, Navarro S, Zorio E, Estellés A, Aznar J. The multifunctional protein C system. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* 2005; 3: 119-31.
6. Griffin JH, Fernández JA, Gale AJ, Mosnier LO. Activated protein C. *J Thromb Haemost* 2007; 5 (Suppl 1): 73-80.
7. Xue M, March L, Sambrook PN, Jackson CJ. Differential regulation of matrix metalloproteinase 2 and matrix metalloproteinase 9 by activated protein C: relevance to inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 2864-74.
8. Pereira C, Schaer DJ, Bachli EB, Kurrer MO, Schoedon G. Wnt5A/CaMKII signaling contributes to the inflammatory response of macrophages and is a target for the antiinflammatory action of activated protein C and interleukin-10. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 504-10.
9. Jackson C, Whitmont K, Tritton S, March L, Sambrook P, Xue M. New therapeutic applications for the anticoagulant, activated protein C. *Expert Opin Biol Ther* 2008; en prensa.
10. Cheng T, Liu D, Griffin JH, Fernández JA, Castellino F, Rosen ED, et al. Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Nat Med* 2003; 9: 338-42.
11. Liu D, Cheng T, Guo H, Fernández JA, Griffin JH, Song X, et al. Tissue plasminogen activator neurovascular toxicity is controlled by activated protein C. *Nat Med* 2004; 10: 1379-83.
12. O'Brien LA, Richardson MA, Mehrbod SF, Berg DT, Gerlitz B, Gupta A, et al. Activated protein C decreases tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand by an EPCR-independent mechanism involving Egr-1/Erk-1/2 activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 2634-41.
13. Mosnier LO, Gale AJ, Yegneswaran S, Griffin JH. Activated protein C variants with normal cytoprotective but reduced anticoagulant activity. *Blood* 2004; 104: 1740-4.
14. Bilbault P, Lavaux T, Launoy A, Gaub MP, Meyer N, Oudet P, et al. Influence of drotrecogin alpha (activated) infusion on

- the variation of Bax/Bcl-2 and Bax/Bcl-xl ratios in circulating mononuclear cells: a cohort study in septic shock patients. *Crit Care Med* 2007; 35: 69-75.
15. Hotchkiss RS, Nicholson DW. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 813-22.
 16. Finigan JH, Dudek SM, Singleton PA, Chiang ET, Jacobson JR, Camp SM, et al. Activated protein C mediates novel lung endothelial barrier enhancement: role of sphingosine 1-phosphate receptor transactivation. *J Biol Chem* 2005; 280: 17286-93.
 17. Feistritzer C, Schuepbach RA, Mosnier LO, Bush LA, Di Cera E, Griffin JH, et al. Protective signaling by activated protein C is mechanistically linked to protein C activation on endothelial cells. *J Biol Chem* 2006; 281: 20077-84.
 18. Zorio E, Navarro S, Medina P, Estellés A, Osa A, Rueda J, et al. Circulating activated protein C is reduced in young survivors of myocardial infarction and inversely correlates with the severity of coronary lesions. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1530-6.
 19. Medina P, Navarro S, Corral J, Zorio E, Roldán V, Estellés A, et al. Endothelial protein C receptor polymorphisms and risk of myocardial infarction. *Haematologica* 2008; en prensa.
 20. Medina P, Navarro S, Estellés A, Vaya A, Woodhams B, Mira Y, et al. Contribution of polymorphisms in the endothelial protein C receptor gene to soluble endothelial protein C receptor and circulating activated protein C levels, and thrombotic risk. *Thromb Haemost* 2004; 91: 905-11.
 21. Medina P, Navarro S, Estellés A, Vaya A, Bertina RM, España F. Influence of the 4600A/G and 4678G/C polymorphisms in the endothelial protein C receptor (EPCR) gene on the risk of venous thromboembolism in carriers of factor V Leiden. *Thromb Haemost* 2005; 94: 389-94.
 22. Guo H, Liu D, Gelbard H, Cheng T, Insalaco R, Fernández JA, et al. Activated protein C prevents neuronal apoptosis via protease activated receptors 1 and 3. *Neuron* 2004; 41: 563-72.
 23. Cheng T, Petraglia AL, Li Z, Thiyagarajan M, Zhong Z, Wu Z, et al. Activated protein C inhibits tissue plasminogen activator-induced brain hemorrhage. *Nat Med* 2006; 12: 1278-85.
 24. Navarro S, Ricart JM, Medina P, Vaya A, Villa P, Todoli J, et al. Activated protein C levels in Behçet's disease and risk of venous thrombosis. *Br J Haematol* 2004; 126: 550-6.
 25. Suzuki K, Hayashi T. Protein C and its inhibitor in malignancy. *Semin Thromb Hemost* 2007; 33: 667-72.
 26. Beaulieu LM, Church FC. Activated protein C promotes breast cancer cell migration through interactions with EPCR and PAR-1. *Exp Cell Res* 2007; 313: 677-87.
 27. Uchiba M, Okajima K, Oike Y, Ito Y, Fukudome K, Isobe H, et al. Activated protein C induces endothelial cell proliferation by mitogen-activated protein kinase activation in vitro and angiogenesis in vivo. *Circ Res* 2004; 95: 34-41.
 28. Chen P, Zhang Y, Qiao M, Yuan Y. Activated protein C, an anticoagulant polypeptide, ameliorates severe acute pancreatitis via regulation of mitogen-activated protein kinases. *J Gastroenterol* 2007; 42: 887-96.
 29. Isermann B, Vinnikov IA, Madhusudhan T, Herzog S, Kashif M, Blautzik J, et al. Activated protein C protects against diabetic nephropathy by inhibiting endothelial and podocyte apoptosis. *Nat Med* 2007; 13: 1349-58.
 30. Yesilirmak DC, Kumral A, Tugyan K, Cilaker S, Baskin H, Yilmaz O, et al. Effects of activated protein C on neonatal hypoxic ischemic brain injury. *Brain Res* 2008; 1210: 56-62.
 31. Xue M, Thompson P, Kelso I, Jackson C. Activated protein C stimulates proliferation, migration and wound closure, inhibits apoptosis and upregulates MMP-2 activity in cultured human keratinocytes. *Exp Cell Res* 2004; 299: 119-27.
 32. Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ. Activated protein C directly activates human endothelial gelatinase A. *J Biol Chem* 2000; 275: 9095-8.
 33. Hooper WC, Phillips DJ, Renshaw MA, Evatt BL, Benson JM. The up-regulation of IL-6 and IL-8 in human endothelial cells by activated protein C. *J Immunol* 1998; 161: 2567-73.
 34. Hooper WC, Phillips DJ, Renshaw MA. Activated protein C induction of MCP-1 in human endothelial cells: a possible role for endothelial cell nitric oxide synthase. *Thromb Res* 2001; 103: 209-19.
 35. Ludeman MJ, Kataoka H, Srinivasan Y, Esmon NL, Esmon CT, Coughlin SR. PAR1 cleavage and signaling in response to activated protein C and thrombin. *J Biol Chem* 2005; 280: 13122-8.
 36. Coughlin SR, Camerer E. PARticipation in inflammation. *J Clin Invest* 2003; 111: 25-7.
 37. Schuepbach RA, Feistritzer C, Brass LF, Riewald M. Activated protein C-cleaved protease activated receptor-1 is retained on the endothelial cell surface even in the presence of thrombin. *Blood* 2008; 111: 2667-73.
 38. Preston RJ, Ajzner E, Razzari C, Karageorgi S, Dua S, Dahlback B, et al. Multifunctional specificity of the protein C/activated protein C Gla domain. *J Biol Chem* 2006; 281: 28850-7.
 39. Ghosh S, Pendurthi UR, Steinoe A, Esmon CT, Rao LV. Endothelial cell protein C receptor acts as a cellular receptor for factor VIIa on endothelium. *J Biol Chem* 2007; 282: 11849-57.
 40. López-Sagaseta J, Montes R, Puy C, Díez N, Fukudome K, Hermida J. Binding of factor VIIa to the endothelial cell protein C receptor reduces its coagulant activity. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 1817-24.
 41. Esmon CT. The regulation of natural anticoagulant pathways. *Science* 1987; 235: 1348-52.
 42. Rezaie AR, Cooper ST, Church FC, Esmon CT. Protein C inhibitor is a potent inhibitor of the thrombin-thrombomodulin complex. *J Biol Chem* 1995; 270: 25336-9.
 43. Conway EM, Van de Wouwer M, Pollefeyt S, Jurk K, Van Aken H, De Vriese A, et al. The lectin-like domain of thrombomodulin confers protection from neutrophil-mediated tissue damage by suppressing adhesion molecule expression via nuclear factor kappaB and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Exp Med* 2002; 196: 565-77.
 44. Shi CS, Shi GY, Chang YS, Han HS, Kuo CH, Liu C, et al. Evidence of human thrombomodulin domain as a novel angiogenic factor. *Circulation* 2005; 111: 1627-36.
 45. Hanly AM, Winter DC. The role of thrombomodulin in malignancy. *Semin Thromb Hemost* 2007; 33: 673-9.
 46. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, López-Rodríguez A, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001; 344: 699-709.
 47. Esmon CT. Protein C pathway in sepsis. *Ann Med* 2002; 34: 598-605.
 48. Folsom AR, Rosamond WD, Shahar E, Cooper LS, Aleksic N, Nieto FJ, et al. Prospective study of markers of hemostatic function with risk of ischemic stroke. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators. *Circulation* 1999; 100: 736-42.
 49. Mosnier LO, Yang XV, Griffin JH. Activated protein C mutant with minimal anticoagulant activity, normal cytoprotective activity, and preservation of thrombin activable fibrinolysis inhibitor-dependent cytoprotective functions. *J Biol Chem* 2007; 282: 33022-33.

El eosinófilo (grupo CECH)

COORDINADOR: L. ESCRIBANO. *Toledo*

Resumen del simposio

El eosinófilo se origina en la médula ósea, madura bajo la influencia de factores de transcripción, especialmente GATA-1 y GATA-2, y su proliferación depende de diversos factores de crecimiento; entre éstos se encuentran la interleucina 3 (IL-3), la IL-5 y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (revisado por Rothenberg¹). La IL-5 es el factor de crecimiento más específico, y el responsable de su expansión y su salida de la médula ósea². A lo largo de su maduración, el eosinófilo adquiere características morfológicas, fenotípicas y funcionales específicas.

Los eosinófilos están implicados en la patogenia de numerosos procesos inflamatorios como las infecciones por helmintos, bacterias, parásitos, virus, reparación de tejidos, inmunidad tumoral y enfermedades alérgicas (revisado por Hogan *et al.*³).

Ante un estímulo adecuado, los eosinófilos son reclutados de la circulación hacia el foco inflamatorio, y su activación —a través de diversos receptores— da lugar a la producción y secreción de numerosos mediadores biológicamente activos (Figura 1).

En muchos casos, la hipereosinofilia, independientemente de su etiología, constituye una situación de alto riesgo sobre la base del daño tisular severo que pueden producir algunos mediadores del eosinófilo como la proteína mayor básica (MBP), la neurotoxina derivada del eosinófilo (EDN) y la proteína catiónica (ECP). La lesión tisular puede afectar, entre otros, al corazón, pulmón, sistema nervioso y tubo digestivo. La afectación cardiaca puede ser severa e irreversible; por ello, el tratamiento debe ser precoz, aun antes de que se conozca con exactitud la causa o se haya establecido de forma clara el tipo de síndrome hipereosinofílico (SHE).

Para establecer el diagnóstico de eosinofilia primaria deben descartarse infecciones parasitarias invasivas y eosinofilia secundaria a diversos fármacos, procesos alérgicos e inflamatorios, síndromes linfoproliferativos y otras neoplasias. Es indudable que la frecuencia de los SHE secundarios ha aumentado de forma significativa en nuestro país por dos razones: la inmigración procedente de zonas con alta prevalencia de parasitosis invasivas y los viajes a estas zonas. Aunque no es el objetivo de este simposio, la eosinofilia asociada a enfermedades parasitarias constituye uno de los retos de primer orden y ha obligado a la creación de unidades específicas en muchos hospitales.

Los SHE primarios se definen por la evidencia de una eosinofilia persistente ($> 1,5 \times 10^6/\text{mL}$) que se mantiene más de 6 meses, una vez que se han descarta-

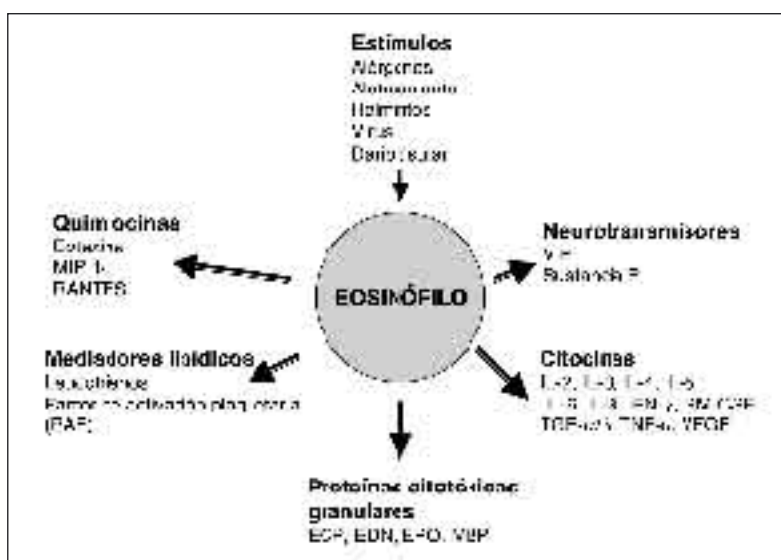


Figura 1. Principales mediadores producidos por el eosinófilo.

do otras causas. Existen dos tipos de SHE primarios: los clonales, leucemias de eosinófilos (CEL), y aquellos en los que no se demuestra clonalidad sobre la base de los métodos de estudio disponibles y que se encuadran en los llamados *SHE idiopáticos*. Esta distinción es básica no sólo desde un punto de vista académico sino, especialmente, por sus repercusiones terapéuticas; un ejemplo claro es la respuesta a imatinib de las CEL en las que se detecta el reordenamiento PDGFRA o PDGFRB^{4,5}.

En este simposio, la Dra. María Rozman presentará los aspectos morfológicos ópticos y ultraestructurales del eosinófilo normal y patológico; el Dr. Carlos Fernández se ocupará de revisar la ontogenia y las características inmunofenotípicas del eosinófilo, y, por fin, el Dr. Peter Valent tratará sobre la clasificación de los síndromes hipereosinofílicos primarios según la OMS⁶, incluyendo aspectos clínicos y moleculares así como su repercusión en el tratamiento de la enfermedad. A este respecto, es importante transmitir a los jóvenes hematólogos el papel que los tratamientos “clásicos” como los basados en la prednisona, la hidroxiurea y el interferón α , entre otros, siguen desempeñando en este grupo de enfermedades; y también la importancia que reviste el diagnóstico temprano de la enfermedad y su tratamiento: muchas veces, un tratamiento citorreductor precoz es capaz de evitar lesiones tisulares irreversibles que pueden condicionar la calidad de vida y el pronóstico de los pacientes.

Bibliografía

1. Rothenberg ME. Eosinophilic gastrointestinal disorders (EGID). *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 11-28.
2. Wardlaw AJ. Molecular basis for selective eosinophil trafficking in asthma: a multistep paradigm. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 917-26.
3. Hogan SP, Rosenberg HF, Moqbel R, Phipps S, Foster PS, Lacy P, et al. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 709-50.
4. Klion AD, Noel P, Akin C, Law MA, Gilliland DG, Cools J, et al. Elevated serum tryptase levels identify a subset of patients with a myeloproliferative variant of idiopathic hypereosinophilic syndrome associated with tissue fibrosis, poor prognosis, and imatinib responsiveness. *Blood* 2003; 101 (12): 4660-6.
5. Klion AD, Robyn J, Akin C, Noel P, Brown M, Law M, et al. Molecular remission and reversal of myelofibrosis in response to imatinib mesylate treatment in patients with the myeloproliferative variant of hypereosinophilic syndrome. *Blood* 2004; 103 (2): 473-8.
6. Bain BJ, Pierre R, Imbert M, et al. Chronic eosinophilic leukemia and hypereosinophilic syndrome. En: Jaffe ES, Harris NL, Stein W, Vardiman JW (eds.). *World Health Organization (WHO) Classification of Tumours. Pathology & Genetics. Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*; 2001. p. 29-31.

MORFOLOGÍA ÓPTICA Y ULTRAESTRUCTURAL DEL EOSINÓFILO

M. ROZMAN

Consultora. Unidad de Hematopatología.
Instituto de Hematología y Oncología. Hospital Clínic.
IDIBAPS. Universidad de Barcelona

Morfología óptica

Los granulocitos segmentados eosinófilos fueron descritos hace aproximadamente un siglo por Ehrlich. Los denominó eosinófilos, del griego *Eos* 'diosa del amanecer', pues contenían en su citoplasma gránulos muy brillantes¹. Los eosinófilos provienen de la médula ósea y antiguamente se habían considerado células terminales involucradas en la protección del huésped frente a los parásitos. Sin embargo, hoy en día se consideran leucocitos multifuncionales que poseen funciones en las respuestas alérgica, inflamatoria e inmunorreguladora^{2,3}.

Desde el punto de vista morfológico, el tamaño de los eosinófilos es de 12-14 μm . Su núcleo es bilobulado, y deben su nombre a los gránulos acidófilos o eosinófilos que contienen en su citoplasma¹. Al observarlos en extensiones de sangre o médula ósea teñidas mediante tinción panóptica, estos gránulos no se disponen por encima del núcleo.

La diferenciación y maduración de la serie eosinofílica es semejante a la neutrofílica, pero con algunas diferencias importantes: a) su granulación es completamente distinta, y b) la maduración nuclear conduce a una segmentación menor, con lo cual el eosinófilo maduro sólo presenta dos segmentos nucleares.

Por lo que respecta a la granulación, los eosinófilos poseen distintos tipos de gránulos. Los principales son los gránulos eosinófilos, redondeados y de un tamaño que oscila entre 0,5 y 1,5 μm . Ocupan todo el citoplasma de la célula, con las tinciones panópticas se tiñen de color naranja o marrón anaranjado, y son muy refringentes. Estos gránulos constituyen el 95% de la granulación de los eosinófilos maduros y son el distintivo característico de este tipo de granulocito. Además de los gránulos eosinófilos, estos leucocitos contienen granulación primaria y gránulos pequeños o microgránulos. La granulación primaria aparece en el promielocito y persiste en todos los estadios madurativos⁴.

Citoquímica

Las características citoquímicas de los eosinófilos son diferentes a las de los neutrófilos. Así, la granulación secundaria o eosinófila contiene gran cantidad

de mieloperoxidasa, que posee características diferenciales con respecto a la peroxidasa de la serie neutrófila, puesto que es resistente al cianuro⁵. También contiene fosfatasa ácida, arilsulfatasa, y gran cantidad de fosfolipasa y lisofosfolipasa, así como, en menor cantidad, β -glucuronidasa, ribonucleotidasa y catepsina. La granulación primaria es rica en peroxidasa eosinófila, fosfatasa ácida y arilsulfatasa. Los microgránulos poseen estas dos últimas sustancias y también pueden contener catalasa. Los eosinófilos, por el contrario, no poseen fosfatasa alcalina ni lactoferrina^{1,4}.

El aspecto citoquímico de los eosinófilos más útil desde el punto de vista diagnóstico reside en que los eosinófilos normales y reactivos son cloro-acetato-esterasa negativos, en tanto que la mayoría de los eosinófilos proliferativos son positivos para esta esterasa^{1,5}.

Ultraestructura

Desde el punto de vista ultraestructural, el eosinófilo posee características diferenciales. En el leucocito eosinófilo maduro el núcleo contiene predominantemente heterocromatina y se dispone en dos segmentos. En contraste con los neutrófilos maduros, los eosinófilos con frecuencia aún tienen un nucleolo, lo cual sugiere la existencia de un proceso sintético incluso fuera de la médula ósea. El complejo de Golgi suele ser algo más aparente que en el neutrófilo. Posee escasas cisternas de retículo endoplásmico rugoso y abundantes mitocondrias. También destaca la abundancia de gotas de glucógeno, que, a diferencia de los gránulos, no muestran membrana envolvente, y los dos tipos de granulación: los gránulos eosinófilos y los microgránulos (Figura 1).

Cuando se observan con el microscopio electrónico de transmisión, los gránulos eosinófilos son muy llamativos. Tienen un diámetro mayor que los neutrófilos, que oscila entre 900 y 1.200 nm, y en el promielocito su contenido es homogéneo y de densidad electrónica mediana. Sin embargo, a partir del mielocito eosinófilo, una parte de los gránulos conserva las características señaladas, mientras que otros muestran en su interior unas típicas inclusiones (Figura 2). Estas inclusiones tienen estructura cristalina y formas diversas (cuadrangular, triangular, baciliforme, etc.), por lo que se conocen como cuerpos cristalinos. También reciben el nombre de *internum*, mientras que la matriz circundante se denomina *externum*. Habitualmente el *internum* tiene una apariencia homogénea, pero algunas veces se observa en su interior una auténtica estructura cristalina, con una periodicidad de 3-4 nm, ocupando casi la totalidad del gránulo. La densidad electrónica relativa del núcleo y la matriz depende de las técnicas de fijación e inclusión. Así, en la mayoría de las células la densidad

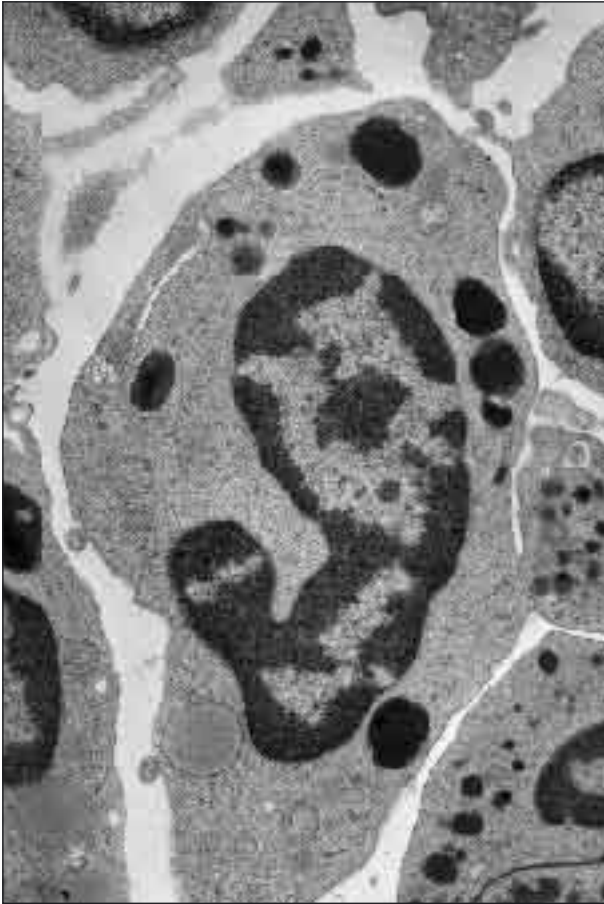


Figura 1. Granulocito eosinófilo con el núcleo en cayado, y citoplasma con su típica granulación y una gota de tipo lipídico. Microscopía electrónica de transmisión (MET). Cortesía del Dr. Luis Escribano.

electrónica del *internum* es muy superior a la del *externum*, aunque en ocasiones puede observarse la situación inversa. Se supone que los gránulos con inclusión constituyen una fase madurativa de los gránulos sin inclusión. La cristalización ocurriría en el interior del gránulo cuando la proteína formadora del *internum* alcanza una concentración crítica. En algunos casos de eosinofilia o incluso en sujetos normales, los gránulos pueden contener más de un cristaloiide. Los gránulos eosinófilos muestran actividad peroxidásica, que en los gránulos con inclusión suele limitarse al *externum*.

Los microgránulos específicos del eosinófilo miden aproximadamente 100 nm, son bastante densos y muy pleomórficos: esféricos, baciliformes, en reloj de arena, en copa, etc. En el granulocito eosinófilo maduro se observan en número variable, de 2 a 8 en cortes ecuatoriales⁴.

Los eosinófilos generan y almacenan gran diversidad de proteínas, que incluyen cuatro proteínas catiónicas mayores, junto a citoquinas, quimoquinas

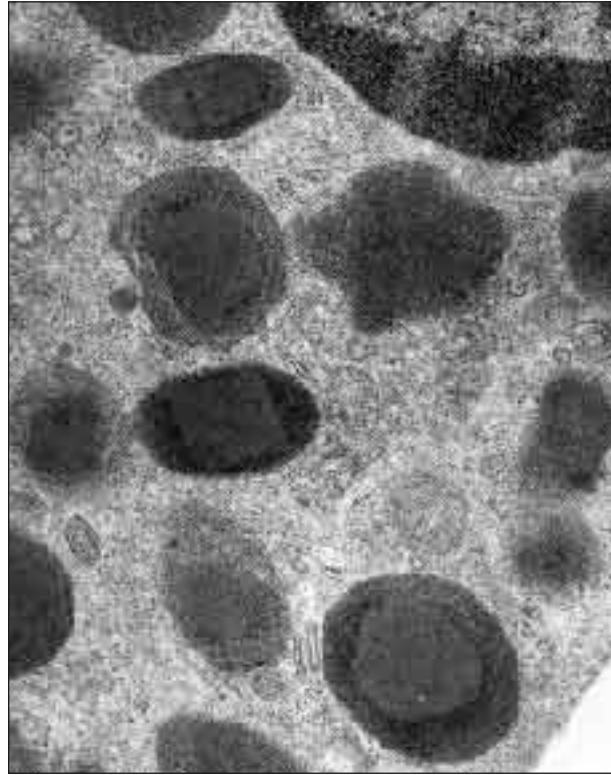


Figura 2. Detalle de diversos gránulos eosinófilos, muchos de los cuales muestran en su interior las típicas inclusiones cristaloides. Cortesía del Dr. Luis Escribano.

y factores de crecimiento, todas ellas acumuladas en los gránulos específicos^{2,3}. Las cuatro proteínas catiónicas citotóxicas que contienen los gránulos eosinófilos son la proteína básica mayor o *major basic protein* (MBP), la proteína catiónica del eosinófilo o *eosinophil cationic protein* (ECP), la peroxidasa del eosinófilo o *eosinophil peroxidase* (EPO) y la neurotoxina derivada del eosinófilo o *eosinophil derived neurotoxin* (EDN). Todas ellas son moléculas citotóxicas, y además ECP y EDN son ribonucleasas². Entre las diversas interleuquinas destaca la interleuquina 4 (IL-4), que los eosinófilos pueden liberar rápidamente al ser estimulados con eotaxina, la citoquina que los activa. La secreción de IL-4 se lleva a cabo por diversos mecanismos, que han sido demostrados a nivel ultraestructural. La IL-4 circula desde los gránulos hasta la membrana plasmática mediante dos tipos de vesículas, unas grandes denominadas vesículas sombrero del eosinófilo (Eo SV), y otras pequeñas, las clásicas vesículas esféricas. Este sistema vesicular intracelular permite la rápida movilización y secreción de IL-4 por los eosinófilos activados².

Cuando se observan al microscopio electrónico de barrido, los eosinófilos muestran en su superficie microvellosidades cortas y algunas estructuras transversales de tipo cresta⁴.

El eosinófilo y su contexto en diferentes hemopatías

La eosinofilia es un hallazgo común en diversas patologías clonales y no clonales, que incluyen^{5,6}:

1. Causas no neoplásicas de eosinofilia secundaria: enfermedades alérgicas, parasitarias, infecciosas, colagenosis, etc.

2. Enfermedades neoplásicas con eosinofilia secundaria no clonal: linfomas T, enfermedad de Hodgkin, leucemia/linfoma linfoblástico, mastocitosis.

3. Enfermedades neoplásicas en que los eosinófilos forman parte de la clona neoplásica: algunos subtipos de leucemia aguda mieloide, leucemia mieloide crónica (con reordenamiento BCR/ABL), otros síndromes mieloproliferativos crónicos y síndromes mielodisplásicos, especialmente leucemia mielomonocítica crónica.

4. Poblaciones linfoides T aberrantes con producción anómala de citoquinas.

5. Eosinofilia de origen desconocido o síndrome hipereosinofílico idiopático.

6. Leucemia eosinofílica crónica.

La nueva propuesta de clasificación de la OMS⁶ divide las eosinofilia clonales de la siguiente manera:

a) Síndrome hipereosinofílico.

b) Neoplasias hematológicas asociadas a eosinofilia y anomalías en PDGFR α (*platelet-derived growth factor receptor α*), PDGFR β (*platelet-derived growth factor receptor β*) o FGFR1 (*fibroblast growth factor receptor 1*) (síndrome mieloproliferativo 8p11).

Las alteraciones morfológicas de los eosinófilos observados en el frotis de sangre periférica no permiten diferenciar los eosinófilos reactivos de los proliferativos. En ambos casos se registra menor densidad granular, vacuolas citoplasmáticas, hiper o hiposegmentación nuclear y aumento del tamaño celular global. La única alteración morfológica que va muy a favor de que el eosinófilo sea proliferativo es la presencia de núcleos en anillo^{1,5}. Excepcionalmente se ha referido un caso de leucemia eosinofílica crónica con anemia hemolítica autoinmune asociada y eritrofagocitosis por parte de los eosinófilos⁷.

Desde el punto de vista diagnóstico, se requiere un cuidadoso trabajo secuencial multidisciplinar para la correcta clasificación de los casos de eosinofilia. La extensión de sangre periférica debe examinarse buscando específicamente monocitosis, signos displásicos, indicadores de mielofibrosis (dacriocitos, mielema, eritroblastos circulantes), y blastos. Se recomienda practicar aspirado y biopsia medular, y en esta última se requiere tinción de fibras y tinciones inmunohistoquímicas para mastocitos (triptasa, CD117, CD25, CD2)⁸.

Algunos datos morfológicos del eosinófilo o del contexto en que se encuentra pueden ayudarnos en el diagnóstico diferencial de las entidades que cursan con eosinofilia. Se exponen a continuación las más relevantes.

Leucemia aguda mieloide con *inv(16)(p13q32), o t(16;16)(p13;q22);(CBF β /MYH11)*

Suele cursar con eosinofilia medular atípica generalmente > 10%, aunque a veces es < 5%, en general sin eosinofilia periférica por aborto intramedular de los eosinófilos patológicos. Dichos eosinófilos patológicos presentan granulación atípica, con frecuentes gránulos de gran tamaño. Es llamativa la coexistencia de gránulos eosinófilos y preeosinófilos (de apetencia tintorial basófila) en todos los estadios madurativos semimaduros de la eosinofilopoyesis. También es frecuente hallar las denominadas células "híbridas", que poseen un núcleo arriñonado de aspecto monocítico, y gránulos eosinófilos patológicos en su citoplasma. Desde el punto de vista citoquímico los gránulos de los eosinófilos patológicos, a diferencia de los normales, son cloro-acetato-esterasa positivos y muestran PAS positividad granular. El examen ultraestructural denota frecuentes bolsillos nucleares y ausencia del cuerpo interno cristalinoide. Mediante técnicas de hibridación *in situ* se ha demostrado que los eosinófilos forman parte de la clona leucémica¹.

Leucemia aguda mieloide con *t(8;21)(q22;q22)(RUNX1/RUNX1T1)*

Puede cursar con aumento de eosinófilos, que no presentan anomalías morfológicas ni citoquímicas destacables. Algunos de los rasgos morfológicos predictivos de este tipo de leucemia son, junto a la eosinofilia medular > 5%, los bastones de Auer finos y largos en blastos y granulocitos, los neutrófilos con citoplasma de color asalmonado en la tinción de Giemsa, la disgranulopoyesis intensa y la presencia de blastos pequeños, de aspecto linfoide¹.

Síndrome mieloproliferativo crónico con eosinofilia y genes de fusión PDGFRA o PDGFRB⁸

Desde el punto de vista morfológico, además de la eosinofilia, suelen mostrar un grado variable de monocitosis, por lo que los hallazgos pueden ser sugestivos de leucemia mieloide crónica atípica o de leucemia mielomonocítica crónica. En la biopsia medular acostumbran a presentar fibrosis y agregados de mastocitos⁸.

Síndrome mieloproliferativo crónico agresivo con eosinofilia (síndrome 8p11, con reordenamiento FGFR1)⁸

Estos casos suelen presentarse como síndromes mieloproliferativos/mielodisplásicos y, en ocasiones,

como leucemia mielomonocítica crónica. El dato clínico más característico es la alta incidencia de linfoma no hodgkiniano o leucemia linfoblástica, generalmente de fenotipo T. Además, suelen evolucionar en 1 o 2 años a leucemia aguda, que generalmente es mieloide³.

Bibliografía

1. Woessner S, Florensa L. La citología óptica en el diagnóstico hematológico. 5.ª ed. Acción Médica y Fundación Española de Hematología y Hemoterapia; 2006.
2. Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 147-74.
3. Melo RC, Spencer LA, Perez SA, Ghiran I, Dvorak AM, Weller PF. Human eosinophils secrete preformed, granule-stored interleukin-4 through distinct vesicular compartments. *Traffic* 2005; 6 (11): 1047-57.
4. Rozman C, Woessner S, Feliu E, Lafuente R, Berga LI. Ultraestructura celular en hematología. 2.ª ed. Salvat Editores; 1990.
5. The World Health Organization (WHO) classification of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC Press; 2001.
6. Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the World Health Organisation criteria and point of care algorithms. *Leukemia* 2008; 22 (1): 14-22.
7. Kuk JS, Maceachern JA, Soamboonsrup P, McFarlane A, Bengner A, Patterson W, et al. Chronic eosinophilic leukemia presenting with autoimmune hemolytic anemia and erythrophagocytosis by eosinophils. *Am J Hematol* 2006; 81: 458-61.
8. Reiter A, Grinwade D, Cross N. Diagnostic and therapeutic management of eosinofilia-associated chronic myeloproliferative disorders. *Haematologica-The Hematology Journal* 2007; 92 (09): 1153-8.

CARACTERÍSTICAS INMUNOFENOTÍPICAS Y ONTOGENIA DEL EOSINÓFILO

C. FERNÁNDEZ GIMÉNEZ, S. QUIJANO, J.A. FLORES, W. NIETO, E. JENSEN, A. LÓPEZ, A. ORFAO

Servicio de Citometría de Flujo.

Universidad de Salamanca.

Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca

Introducción

El eosinófilo es una célula de estirpe hematopoyética, de la familia de los leucocitos granulares, debido a la naturaleza del contenido de los gránulos que se encuentran en su citoplasma. Sin embargo, hasta prácticamente finales del siglo pasado, los conocimientos en cuanto a sus características fisiopatológicas eran

muy escasos, debido a los bajos niveles de eosinófilos circulantes en condiciones normales, su breve tránsito sanguíneo, su corta vida tisular en las situaciones de enfermedad, la imposibilidad de cultivarlo y las limitadas líneas celulares disponibles para la investigación. En 1979, el descubrimiento de la técnica de purificación de eosinófilos circulantes aislados por gradiente de densidad, junto con métodos de selección inmunogenética, ha permitido el estudio de células aisladas de personas enfermas y de personas sanas. La utilización de citoquinas recombinantes ha permitido obtener células muy próximas al eosinófilo maduro a partir de precursores presentes en sangre de cordón umbilical¹. Con el desarrollo de técnicas como la citometría de flujo, la inmunohistoquímica y la biología molecular se ha podido establecer que el eosinófilo tiene una función efectora y moduladora de la respuesta inmune, que es atraído a la piel por diversos factores quimiotácticos, y que participa en la reacción inflamatoria y en su perennización por la secreción de mediadores proinflamatorios y citoquinas². La inmunofluorescencia ha revelado que existen depósitos de gránulos del eosinófilo, constituidos por proteínas tóxicas, en los tejidos y que el depósito de éstos, en varias enfermedades, es mucho mayor que el que podrían producir los eosinófilos identificados, lo que indica que el papel que tiene en la patología cutánea no puede ser juzgado por el número de eosinófilos intactos presentes en los tejidos^{3,4}. Los avances en el conocimiento de los eosinófilos y su rol en el inicio y establecimiento de la reacción inflamatoria y de la respuesta inmune hacen necesario profundizar el estudio de los mismos y abordarlo desde las tecnologías más potentes de las que disponemos hoy en día, como es, entre otras, la citometría de flujo^{5,6}.

Material y métodos

En todos los casos, las muestras tanto de médula ósea como de sangre periférica se recogieron en tubos de 5 mL con EDTA como anticoagulante.

Muestras de sangre periférica

Se contó con 10 individuos voluntarios sanos con edades comprendidas entre 26 y 35 años y con 40 muestras de pacientes (20 hombres y 20 mujeres) que fueron catalogadas como "normales/reactivas/no infiltradas" tras el estudio de citometría de flujo en los que se descartaron hemopatías clonales (*de novo* o tras estudios de enfermedad mínima residual [EMR]) e infecciosas. En todos los casos, las cifras de eosinófilos se situaban dentro de los rangos de la normalidad (0,5-5%) en sangre periférica. Los estudios

Tabla 1. Combinación de los anticuerpos monoclonales utilizados en el panel de estudio

MARCAJE	FITC	PE	PerCP-Cy5	APC
Intracelular	cytCONTROL	cytCONTROL	CD45	CD34
	nTDT	cytMPO	CD45	CD34
	cytCD3	CD7	CD45	CD34
	CD19	cytCD79a	CD45	CD34
Superficie	CONTROL	CONTROL	CD45	CD34
	CD11b	CD13	CD45	CD34
	CD15	CD16	CD45	CD34
	HLADR	CD117	CD45	CD34
	HLADR	CD123	CD45	CD34
	CD36	CD64	CD45	CD14-CD34
	CD22	CD33	CD45	CD34
	CD65	7.1	CD45	CD34
	CD2	CD56	CD45	CD34
	CD38	CD203c	CD45	CD34
	MAR	CD14	CD45	CD34
	CD71	Glicoforina A	CD45	CD34

en médula ósea se llevaron a cabo de manera retrospectiva y se analizaron 50 muestras de pacientes (25 hombres y 25 mujeres) siguiendo los mismos criterios que en el caso de las muestras de sangre periférica. En todos los casos, las cifras de eosinófilos se situaron dentro del rango de la normalidad (0,5-3%) en médula ósea.

Estudios inmunofenotípicos por citometría de flujo

Se dispuso, para todos y cada uno de los casos, de muestras de sangre o médula ósea recogida en tubos de 5 mL de capacidad y EDTA como anticoagulante. El análisis se llevo a cabo siguiendo técnicas de marcaje, lisado con fijación y lavados según los protocolos adecuados y optimizados para cada tipo de muestra y técnica de marcaje (marcadores de superficie o marcadores intracelulares)⁷. Se empleó un panel amplio de anticuerpos monoclonales dispuestos en combinaciones multiparamétricas de 4 marcajes de fluorescencia por cada tubo (fluoresceína [FITC], ficoeritina [PE], peridín clorofil-proteín-cianina 5 [PerCP-Cy5] y aloficocianina [APC]) (Tabla 1). Adicionalmente se emplearon para las muestras del grupo de individuos voluntarios controles sanos (10) los anticuerpos monoclonales peroxidasa de eosinófilo (PEO) y proteína básica principal (PBP), empleando para ello técnicas

de marcaje indirectas, para lo que se usaron estos dos monoclonales puros, sin conjugar con ningún fluorocromo. Como anticuerpo secundario se utilizó IgG policlonal anti-*rabbit* conjugado en FITC. Posteriormente a este marcaje, se procedió a la técnica de marcaje directo para el anticuerpo monoclonal panleucocitario CD45 conjugado con PerCP-Cy5. Las técnicas de tinción intracelular se llevaron a cabo mediante el uso del kit de reactivos "Fix & Perm" (Caltag Laboratories, San Francisco, CA, EE UU), siguiendo de manera estricta las recomendaciones del fabricante. Para la adquisición de las muestras se utilizaron los citómetros de flujo BD FACSCalibur™ y BD FACSCanto™. El análisis de los datos adquiridos se realizó con el programa informático Infinicyt™. El análisis de los datos estadísticos se llevó a cabo con el paquete informático SPSS 15.0.

Resultados

Para la identificación de los eosinófilos en sangre periférica y médula ósea, se tuvieron en cuenta las propiedades de tamaño (FSC) y complejidad interna (SSC) de las células, además de una expresión intensa de CD45. Las muestras de sangre periférica mostraron una mayor homogeneidad en la expresión de los marcadores positivos como son CD11b, CD13, CD15, CD65, CD45, con una menor desviación tí-

Tabla 2. Características inmunofenotípicas de los eosinófilos en sangre periférica y médula ósea

DESCRIPCIÓN Y ESPECIFICIDAD		POBLACIONES CELULARES MÁS REPRESENTATIVAS	PROVEEDOR	FENOTIPO EOSINÓFILOS
Moléculas presentadoras de antígeno				
HLA-DR	HLA clase II	Monocitos, linfocitos B, DC	BDB	-/+d (15-60%)
Moléculas de adhesión				
CD56		NK, subpob. linfocitos T	BDB	-
CD65	Adhesión endotelial	Neutrófilos, monocitos y eosinófilos	IOT	+++
Receptores Fc inmunoglobulinas y complemento				
CD11b	RC3, β 2 LFA1	Neutrófilos, monocitos, Eos, NK	IOT	++
CD16	FCIgG3	Neutrófilos, NK, DCm	IOT	-
CD64	FCIgG1	Neutrófilos, monocitos	IOT	-
Citoquinas y receptores de citoquinas				
CD25	Receptor cadena α IL-2	Linfocitos, basófilos, MC		-/+d (25-75%)
CD117	c-kit, receptor de SCF	PCH, MC	BDB	-
CD123	Receptor cadena α IL-3	DCp, monocitos, basófilos	BDB	-/+d (25-75%)
Antígenos asociados a células mieloides				
CD13	Alanil-aminopeptidasa	Neutrófilos, monocitos, Eos	BDB	++
CD33	Receptores de ácido siálico <i>immunoglobulin-like</i>	Neutrófilos, monocitos, Basófilos	BDB	+
cytMPO	Mieloperoxidasa, fagocitosis	Neutrófilos, monocitos	DAKO	-
Antígenos asociados a células linfoides				
cytCD3	Receptor de linfocitos T y timocitos	Linfocitos T	BDB	-
CD7	Gp40, leu9	Linfocitos T, NK	BDB	-
CD19	Receptor de linfocitos B	Linfocitos B	BDB	-
cytCD79a	Receptor Ig α , MB1	Linfocitos B	IOT	-
CD22	BL-CAM, Lyb8, Siglec-2	Linfocitos B, basófilos	BDB	-
Moléculas coestimuladoras				
CD2	E-rosette, T11, LFA-2	Linfocitos T, NK	BDB	-
Misceláneos				
CD36	Glicoproteína 3b	Eritrocitos, plaquetas, DC	IOT	-
CD38	ADP-ribosil ciclase	Ampliamente representado	CYTOGNOS	-
CD45	LCA, T200, B220, Ly5	Panleucocitario	BDB	++
CD71	Receptor de la transferrina	Todas las líneas hematopoyéticas	BDB	+
CD14	Receptor del lipopolisacárido R	Monocitos	BDB	-
nTDT	Terminal deoxirribonucleotidil transferasa	Precusores linfoides principalmente	DAKO	-
CD15	Lewis X. Desgranulación y fagocitosis	Neutrófilos, monocitos, Eos	BDB	++/+++
7.1	Proteoglicano condroitín, sulfato NG2	Melanoma	IOT	-
Glicoforina A	CD235a	Eritrocitos	IOT	-
CD203	NPP3	Basófilos, MC	IOT	-

BDB: Becton Dickinson; DC: células dendríticas; DCm: células dendríticas mieloides; DCp: células dendríticas plasmocitoides; Eos: eosinófilos; IOT: Immunotec; MC: mastocitos; PCH: precursores de células hematopoyéticas.

pica que en la médula ósea, pero sin diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la intensidad de expresión (canales medios de fluorescencia). Tan-

to para las muestras de sangre periférica como de médula ósea, la expresión de marcadores característicos de línea linfocítica B (nTDT, CD19, y CD79a citoplas-

mático), de línea T (CD7 y CD3 citoplasmático), de línea eritroide/megacariocítica (CD61, CD36), de línea monocítica (CD14) y de línea granulocito/neutrófilo (CD16, MPO citoplasmática) fue sistemáticamente negativa (Tabla 2). Los eosinófilos mostraron expresión parcial (-/+) y débil (25-75%) de CD25 y CD123 en más del 80% de los casos en sangre periférica y médula ósea, y no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de sangre periférica de los controles sanos respecto de las de los pacientes estudiados y con muestras catalogadas como "normales/reactivas/no infiltradas" y las muestras de médula ósea (Tabla 2).

En conjunto, los eosinófilos mostraron expresión en todos los casos de CD11b, CD13, CD15, CD33 (positividad débil), CD45, CD65 y CD71. En ningún caso mostraron expresión de cytMPO, nTDT, CD2, cytCD3, CD7, CD14, CD16, CD19, CD22, CD34, CD38, CD56, CD61, CD64, CD117, CD203c, MAR.

En las muestras de los 10 individuos sanos en los que se llevó a cabo adicionalmente el marcaje con PEO (peroxidasa eosinofílica) y PBP (proteína básica principal de eosinófilo), los eosinófilos mostraron expresión fuerte de ambas proteínas en el 100% de los casos. Los basófilos además mostraron expresión parcial de PEO en todos los casos, oscilando entre el 20 y el 50%. Por último, en las muestras de médula ósea se llevó a cabo un análisis completo de la población de CD34, con el fin de identificar los precursores CD34 comprometidos a línea eosinofílica. Con los marcadores que componen este panel de estudio, somos capaces de identificar los precursores de línea granulocito/neutrófilo (expresión simultánea de CD34 y cytMPO), precursores de línea linfoide B (expresión simultánea de CD34, CD19 y cytCD79a y FSC/SSC disminuido), precursores de línea eritroide/megacariocítica (expresión simultánea de CD45+ débil, HLADR-/+, muy débil, CD36+ homogéneo y ausencia de expresión de CD123), precursores de células dendríticas plasmocitoides (expresión simultánea de CD34, HLADR y CD123), precursores de granulocito basófilo (expresión simultánea de CD34 y CD123, junto con ausencia de CD123) y precursores de monocitos (expresión simultánea de CD34, HLADR, junto con ausencia de CD19, cytCD79a y expresión heterogénea y débil de CD123). A pesar de discriminar estas poblaciones, sin embargo, no tenemos en este panel ningún marcador que nos permita identificar las células CD34+ comprometidas a línea de eosinófilo (Figuras 1 y 2). Al tratarse de monoclonales que empezamos a probar en las muestras de sangre periférica, pero que no estaban incluidos en el panel de estudio previo, en el presente trabajo no se determinaron sus patrones de expresión para cada una de las diferentes poblaciones de médula ósea. En las muestras de médula ósea, el 18% de los casos evi-

denció eosinófilos con expresión parcial y débil de HLADR, junto con expresión débil pero homogénea de CD25 y CD123. Estos resultados se relacionan con activación celular, si bien, debido a la ausencia de datos referentes a parámetros clínicos y farmacológicos, no se puede establecer una relación directa con los datos de nuestro estudio.

Discusión

El análisis del inmunofenotipo de los eosinófilos con el panel de estudio realizado nos permite comprender cuáles son los niveles normales de expresión de algunas de las proteínas que con mayor frecuencia se estudian en el contexto del diagnóstico de hemopatías clonales, por técnicas de citometría de flujo. La información obtenida es muy interesante, ya que, aunque no tenemos en el panel ningún anticuerpo monoclonal específico dirigido contra los eosinófilos, el empleo de marcadores característicos de células mieloides, como son CD33 y CD13, así como marcadores relacionados con la fagocitosis y desgranulación leucocitaria, como es el caso de CD15, nos permite comprender el papel del eosinófilo como una célula capaz de fagocitar y liberar su contenido granular citoplasmático en el contexto de una infección.

Necesita además adherirse a los tejidos y movilizarse y es por esto por lo que expresa en su superficie proteínas que le permiten desempeñar esta función, como es CD15, cuyo sustrato es la E-selectina. Como células efectoras, también deben tener receptores para el complemento, que se activa en circunstancias inflamatorias e infecciosas. Entonces comprendemos que el eosinófilo también es susceptible a la activación del complemento y juega un papel importante en la respuesta inflamatoria e infecciosa.

La evidencia de expresión de receptores de interleuquina 3 (CD123), pero sobre todo la IL-5, con expresión parcial en muchos casos, es un indicio de que el eosinófilo también interviene en procesos de inmunorregulación, específicamente en la inmunidad celular, interaccionando con los linfocitos T. Este hecho también se ve fundamentado en que el porcentaje de eosinófilos que presentan positividad para CD25 es similar al de los que presentan positividad para CD123, pero sobre todo positividad parcial para HLA DR. Ello indica que el eosinófilo tiene capacidad de presentar antígeno a los linfocitos T; de ahí su relación con la función inmunorreguladora. En muchas ocasiones, los granulocitos neutrófilos y los eosinófilos presentan características de tamaño y complejidad interna (FSC/SSC) e intensidad de expresión de CD45 muy parecidas.

Estas situaciones dificultan considerablemente la correcta cuantificación y separación de los eosinófi-

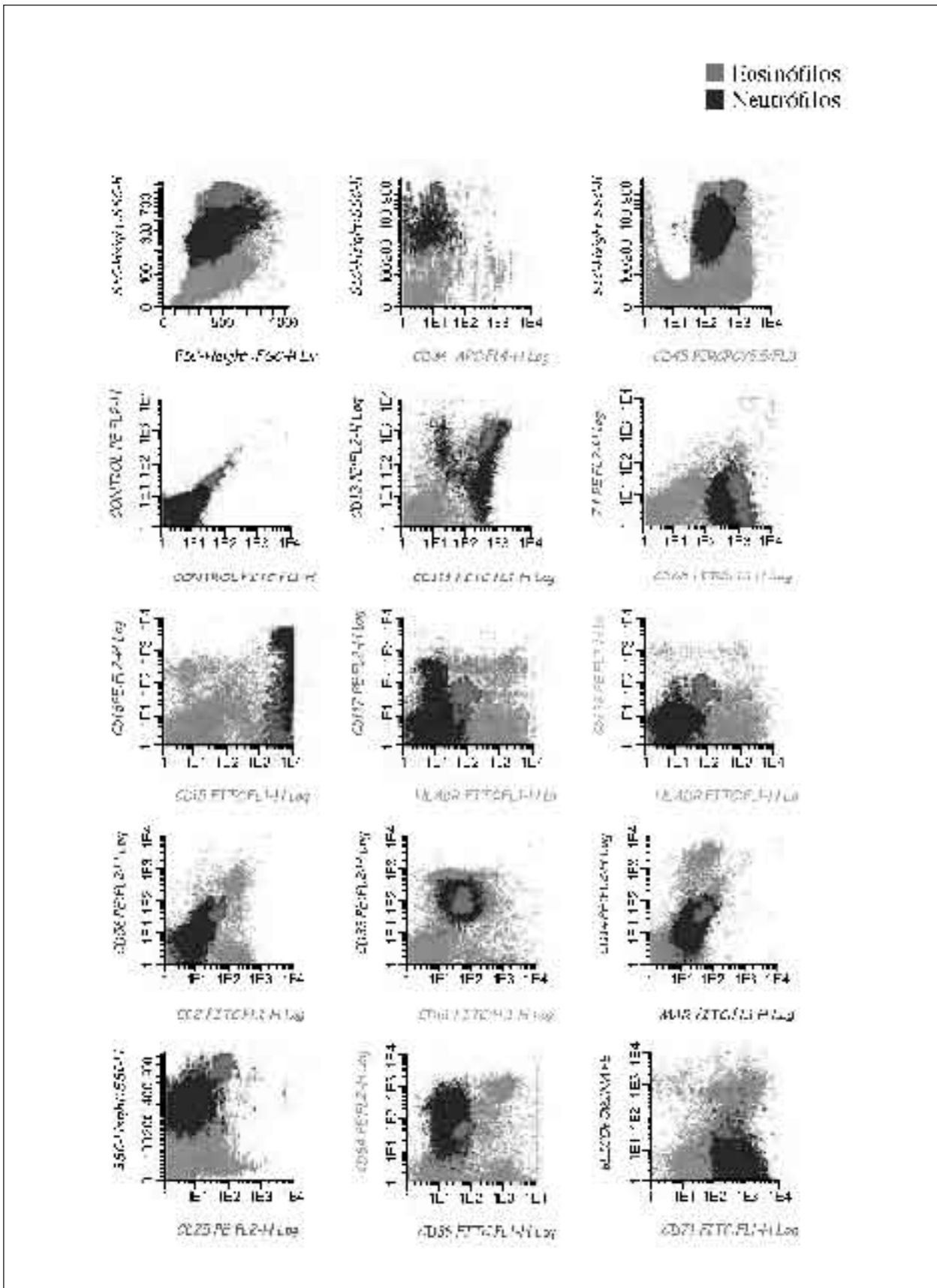


Figura 1. Eosinófilos y neutrófilos. Inmunofenotipo en médula ósea. Marcaje de membrana.

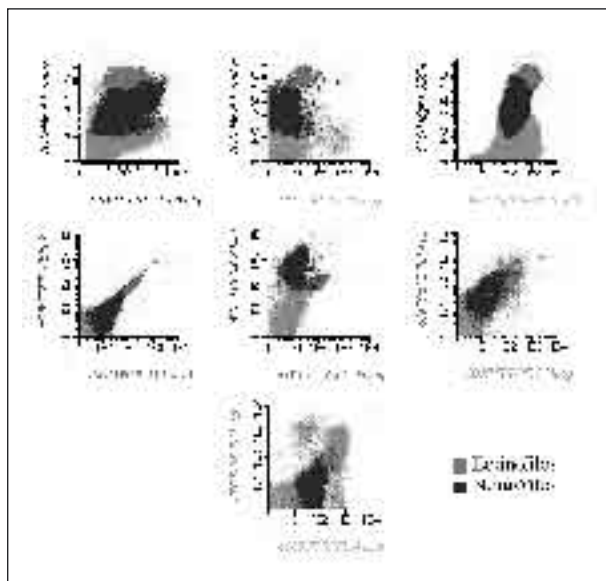


Figura 2. Eosinófilos y neutrófilos. Inmunofenotipo en médula ósea. Marcaje intracelular.

los. Sin embargo, el empleo de CD16 soluciona este problema, ya que los eosinófilos presentan una intensidad de fluorescencia para CD15 muy pareja a la del neutrófilo, si bien carece totalmente de expresión para CD16 en sangre periférica y médula ósea, a diferencia del neutrófilo, que la adquiere con la maduración y alcanza su máxima expresión en las formas más maduras circulantes.

En médula ósea, debido a la riqueza celular y a la coexistencia de formas maduras y competentes junto con elementos más inmaduros, incluso precursores de células hematopoyéticas pluripotenciales, el empleo de anticuerpos que se expresan en etapas más evolucionadas de las células nos permite conocer la maduración de las distintas líneas celulares hematopoyéticas. Sin embargo, con las combinaciones de anticuerpos empleadas en este estudio, ninguno de los marcadores nos permite identificar precursores de eosinófilo.

Durante estos últimos años, los esfuerzos por comprender la biología del eosinófilo, sus funciones e interacciones con otras células durante procesos infecciosos e inflamatorios han permitido el estudio en mayor profundidad de moléculas y proteínas relacionadas con diferentes funciones celulares, como la migración celular, adhesión, fagocitosis, presentación de antígeno o producción de interleuquinas. El precursor hematopoyético pluripotencial en médula ósea es capaz de diferenciarse a cada una de las líneas celulares sanguíneas en función de la presencia de distintos factores transcripcionales.

El conocimiento desarrollado durante los últimos años también abarca al eosinófilo. Múltiples estudios

in vivo e *in vitro* en modelos murinos han demostrado que algunos de los factores transcripcionales como son GATA-1, PU.1 y C/EBP α regulan la diferenciación de estos precursores comunes hematopoyéticos a eosinófilos⁸⁻¹⁰. Asimismo, se han descrito otras moléculas como CCR3, CD33 y Siglec-8 que juegan un importante papel en la diferenciación de los precursores CD34+ hacia eosinófilos maduros^{11,12}.

En la circulación sanguínea tiene una vida media de 6 a 12 horas antes de migrar a los tejidos, y permanece en la sangre de 2 a 5 días. Por tanto, el eosinófilo es una célula de predominio hístico, especialmente en tejidos con superficies epiteliales mucosas como la piel, el tracto respiratorio, el tracto digestivo y los genitales (Figura 3).

La fijación al endotelio vascular se lleva a cabo mediante mecanismos de adherencia lábil en los que intervienen selectinas (CD62-L, CD62-E, CD62-P) y sus ligandos; receptores de la familia de las sialomuquinas (GlyCAM-1, ELAM-1) y sus ligandos. Después, los eosinófilos se adhieren firmemente al endotelio vascular (diapédesis) por mediación de integrinas como el LFA-1 (CD11a) acoplados a ligandos de la superfamilia de las inmunoglobulinas; la ICAM (*intercellular adhesion molecule*)-1 (CD54); el VLA (*very late antigen*)-4 (CD49d), con su ligando endotelial vascular, la VCAM (*vascular cell adhesion molecule*)-1 (CD29). La interacción de VLA-4 con VCAM-1 se hace por la influencia de tres factores solubles o sustancias quimiotácticas: la eotaxina, que induce la expresión de VLA-4, y la IL-4 e IL-13, que inducen la expresión de VCAM-1¹³.

Los eosinófilos, en su migración tisular, localizan rápidamente las fuentes de inflamación tisular aguda a través de receptores para mediadores quimiotácticos inespecíficos (péptidos derivados de las proteínas del complemento y originados en su activación) y receptores específicos para factores quimiotácticos de eosinófilos que pueden ser citoquinas (especialmente, IL-3, IL-5 y GM-CSF) y eotaxina. Los receptores de membrana del eosinófilo para las quimioquinas conocidos son, entre otros, CXC quimioquinas como CXCR1 y CXCR2, y CC quimioquinas, entre las cuales la más importante es la CCR3.

Los eosinófilos tisulares son receptivos a señales del ambiente tisular, señales que les permiten sobrevivir una vez activados y ejercer sus múltiples funciones como son la acción citotóxica; la acción inmunoreguladora de la reacción alérgica por las citoquinas que libera, y su acción en la reparación y remodelación tisular por liberación de TGF- β ¹⁴, sugiriéndose recientemente la participación en la respuesta inmunitaria gracias a la expresión de receptores como la PAR (*protease activated receptors*) y los TLR (*toll-like receptors*)¹⁵.

La activación del eosinófilo se produce por acción de estímulos específicos. Al activarse los eosinófilos,

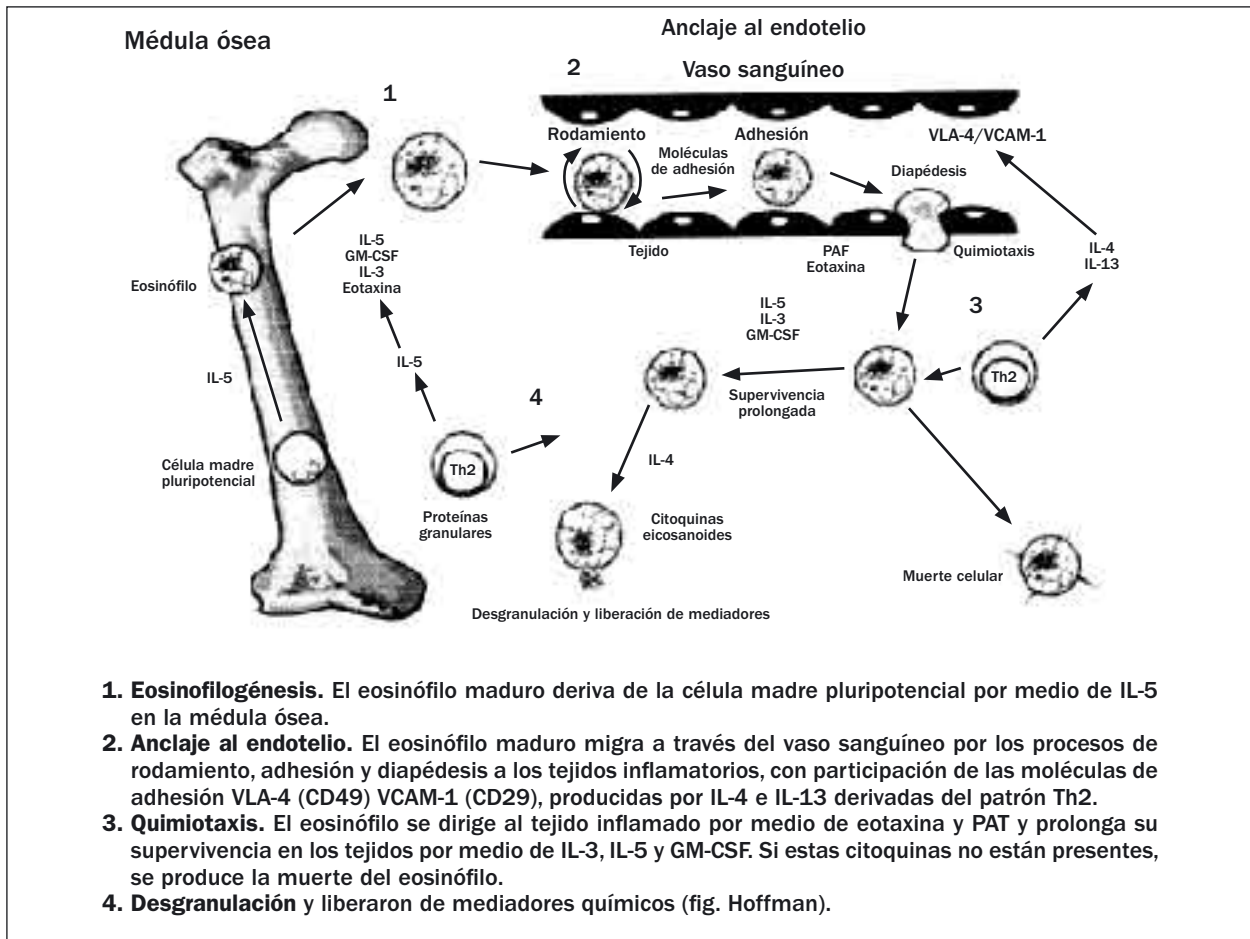


Figura 3. Ciclo vital del eosinófilo³.

la expresión de los receptores –ya presentes en el eosinófilo en reposo– aumenta; además, adquieren receptores de superficie como las moléculas ICAM-1, HLA (*human leucocyte antigen*)-DR, CD25, CD69, CD44 y CD6a (Fc gamma RI).

Una vez activados, los eosinófilos presentan modificaciones estructurales y metabólicas, con la aparición de vacuolas ligadas a la liberación de los gránulos al medio extracelular (desgranulación) y al aumento de cuerpos lipídicos. Estos dos fenómenos modifican la densidad de los eosinófilos activados y dan un fenotipo de eosinófilo hipodenso. Así pues, podemos diferenciar eosinófilos hipodensos activados en los pacientes con enfermedad, de los normodensos presentes en las personas sanas¹⁶. Este hecho se puede constatar con los estudios de citometría de flujo, valorando disminuciones del parámetro SSC en los leucocitos granulares. Se ha descrito positividad para CD16 y CD64 en eosinófilos titulares activados¹⁷. Nuestros datos muestran que los eosinófilos de médula ósea y circulantes carecen de expresión de estos antígenos. Se explica entonces la necesaria

intervención del microambiente en el proceso infeccioso y/o inflamatorio, que propicia la expresión de receptores de la Fc de la inmunoglobulina tipo IgG durante estos procesos en el eosinófilo, pero sólo a nivel local.

En cuanto a la acción citotóxica del eosinófilo tisular activado mediante su desgranulación, los eosinófilos liberan proteínas catiónicas (MBP [proteína básica principal], EPO [peroxidasa de eosinófilo], ECP [proteína catiónica eosinofílica] y EDN [neurotoxina derivada de eosinófilo]) al ambiente tisular, fuertemente citotóxicas, que pueden alterar o destruir numerosos blancos (larvas de parásitos¹⁸, células tumorales¹⁹ e igualmente células epiteliales del huésped). Nuestros resultados en la determinación de EPO en individuos normales son aún insuficientes por el pequeño tamaño de la muestra, pero en todos los individuos se detecta una pequeña población de basófilos que expresan EPO, lo que contradice, de esta manera, la teoría de que era un marcador exclusivo de eosinófilo.

En relación con los roles que se le asignan de amplificador de la respuesta inflamatoria y en la regulación

de la respuesta inmunitaria mediante producción de citoquinas proinflamatorias y moléculas quimioattractantes como la IL-16 y sobre todo la eotaxina²⁰, estos factores son capaces de amplificar la respuesta inflamatoria o de perennizar la infiltración tisular por los eosinófilos. Además, son capaces de secretar citoquinas inmunomoduladoras como las citoquinas de polaridad Th2 (IL-4, IL-10) o Th1 (IFN- γ , IL-12) y de participar, así, en el control de la respuesta inmune²¹, en la angiogénesis y en la remodelación tisular vía la síntesis de neuropéptidos, de factores de crecimiento y de metaloproteínas²².

La última consecuencia de la activación de los eosinófilos es la sensibilización de éstos a las señales que regulan el equilibrio sobrevida/muerte, que depende de que se mantenga o cese la respuesta inflamatoria²³. El ambiente inflamatorio induce paralelamente la expresión de receptores de membrana donde se generan señales mortíferas para los eosinófilos, lo que permite restablecer el equilibrio de las condiciones fisiológicas. Así, los eosinófilos pueden expresar diversas moléculas proapoptóticas como Fas (CD95) y CD69 inducidas por el TNF- α y los receptores CD32 (Fc ϵ psilon RII)²⁴, así como la proteína Siglec-8, que es igualmente expresada por los mastocitos y los basófilos²⁵. Además, el TGF- β y los IFN son capaces de inhibir los factores de supervivencia como la IL-3, el GM-CSF y la IL-5²⁶.

Conclusiones

El eosinófilo desempeña un papel importante en el proceso de la respuesta inflamatoria específica, como célula no sólo fagocítica, sino también reguladora y cooperadora de la respuesta inmune celular. El estudio inmunofenotípico aporta una gran ayuda al conocimiento de su comportamiento biológico y la interacción con otras células proinflamatorias tisulares y hematológicas. El panel de estudio empleado en sangre periférica nos permite comprender características de los eosinófilos circulantes.

No son muchos los marcadores positivos empleados en este panel, pero sí son de crucial importancia, sobre todo CD11b, CD13, CD15, CD65 y la ausencia de CD16, ya que no sólo nos permiten diferenciar a los eosinófilos de los neutrófilos, sino que nos son de gran ayuda a la hora de detectar fenotipos circulantes aberrantes. Estos marcadores nos dan una idea inicial del comportamiento en sangre periférica de los eosinófilos, ya que nos permiten valorar si son competentes en cuanto a su capacidad de adhesión, de movilización a los tejidos y de inducción de respuesta inmune, si son capaces de activarse, de liberar interleuquinas e interactuar con otras células durante el proceso inflamatorio/infeccioso. El incremento de eosinófilos

en número relativo junto con fenotipos de activación como son CD25+, HLADR+ y una discreta disminución de su complejidad interna (SSC), lo que se conoce como eosinófilos hipodensos, es un indicador muy sugerente de procesos inflamatorios/infecciosos relacionados con los eosinófilos. Nuestros resultados confirman la necesidad de estudiar de manera independiente el comportamiento de moléculas de adhesión, de citoquinas y quimiocinas que actualmente no se han estudiado en eosinófilos de médula ósea ni circulantes, con el fin de conocer mejor los cambios estructurales y funcionales que sufre el eosinófilo desde su origen medular hasta los órganos diana. Se hace necesaria la incorporación de nuevas moléculas como anti-CCR3 y anti-Siglec-8 en los estudios de médula ósea, con el fin de identificar mediante citometría de flujo los precursores CD34 de eosinófilo.

Bibliografía

1. Capron M, Morita M, Woerby G, Lengrand F, Soussi-Gounni A, Dalaporte E, et al. Differentiation of eosinophils from cordon blood cell precursors: kinetics of Fc ϵ psilon RII expression. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 113: 48-50.
2. Decot V, Capron M. Eosinophils: structure and functions. *Presse Med* 2006; 35: 113-24.
3. Brito F, Yamazaki M, Espinoza S, Vasquez O, Huerta J, Berrón Pérez R. Eosinófilos: revisión de la literatura. *Alerg Asm Inmunol Pediat* 2003; 12 (2): 56-62.
4. Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Ann Rev Immunol* 2006; 24: 147-74.
5. Carulli G, Sbrana S, Azzarà A, Minnucci S, Angiolini C, Marini A, Ambrogi F. Detection of eosinophils in whole blood samples by flow cytometry. *Cytometry* 1998; 34 (6): 272-9.
6. Stevens WW, Kim TS, Pujanauski LM, Hao X, Braciale TJ. Detection and quantitation of eosinophils in the murine respiratory tract by flow cytometry. *J Immunol Methods* 2007; 327 (1-2): 63-74.
7. Almeida J, Bueno C, Alguero MC, Sánchez ML, Cañizo MC, Fernández ME, et al. Extensive characterization of the immunophenotype and pattern of cytokine production by distinct subpopulations of normal human peripheral blood MHC II+ lineage- cells. *Clin Exp Immunol* 1999; 118: 392-401.
8. Cantor AB. GATA transcription factors in hematologic disease. *Int J Hematol* 2005; 81 (5): 378-84.
9. Koschmieder S, Rosenbauer F, Steidl U, Owens BM, Tenen DG. Role of transcription factors C/EBP α and PU.1 in normal hematopoiesis and leukemia. *Int J Hematol* 2005; 81 (5): 368-77.
10. Friedman AD. Transcriptional control of granulocyte and monocyte development. *Oncogene* 2007; 26 (47): 6816-28. Review.
11. Lamkhioued B, Abdelilah SG, Hamid Q, Mansour N, Deslespess G, Renzi PM. The CCR3 receptor is involved in eosinophil differentiation and is up-regulated by Th2 cytokines in CD34+ progenitor cells. *J Immunol* 2003; 170 (1): 537-47.
12. Zhang M, Angata T, Cho JY, Miller M, Broide DH, Varki A. Defining the in vivo function of Siglec-F, a CD33-related Siglec expressed on mouse eosinophils. *Blood* 2007; 109 (10): 4280-7.
13. Golungr U, Efeogle T. Vascular adhesion and transendothelial migration of eosinophil leukocytes. *Cell Tissue Res* 2004; 318: 473-82.

14. Pivarsci A, Homey B. Chemokine networks in atopic dermatitis: traffic signals of disease. *Curr Allergy Asthma Rep* 2005; 5: 284-90.
15. Nagase H, Okugawa S, Ota Y, Yamaguchi M, Tomizawa H, Matsushima K, et al. Expression and function of toll-like receptors in eosinophils: activation by toll-like receptor 7 ligand. *J Immunol* 2003; 171: 3977-82.
16. Prin L, Capron M, Tonnel AB, Bletty O, Capron A. Heterogeneity of human peripheral blood eosinophils: variability in cell density and cytotoxic ability in relation to the level and the origin of hypereosinophilia. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1983; 72: 336-46.
17. Valdivia-Blondet L. Eosinophils and skin. *Dermatología Peruana* 2007; 17 (2): 83.
18. Nutten S, Papin JP, Woerly G, Dunne DW, Mc Gregor J, Trottein F, et al. Selectin and Lexis (X) are required as co-receptors in antibody-dependent cell mediated cytotoxicity of human eosinophils to *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Eur J Immunol* 1999; 29: 799-808.
19. Costello R, O'Callaghan T, Sebahoun G. Eosinophile et réponse antitumorale. *Rev Med Interne* 2005; 26: 479-84.
20. Decot V, Capron M. Eosinophils: structure and functions. *Presse Med* 2006; 35: 113-24.
21. Lamkhioued B, Soussi-Gounni A, Aldebert D, Delaporte E, Prin L, Capron A, et al. Synthesis of type 1 (IFN gamma) and type 2 (IL-4, IL-5 and IL-10) cytokines by human eosinophils. *Ann NY Acad Sci* 1996; 796: 203-8.
22. Munitz A, Levi-Schaffer F. Eosinophils: 'new' roles for 'old' cells. *Allergy* 2004; 59: 268-75.
23. Simon HU. Molecules involved in the regulation of eosinophil apoptosis. *Chem Immunol Allerg* 2006; 91: 49-58.
24. Foerster M, Haefner D, Kroegel C. Bcl-2 mediated regulation of CD69- induced apoptosis of human eosinophils: identification and characterization of a novel receptor-induced mechanism and relationship to CD95- transduced signalling. *Scand J Immunol* 2002; 56: 417-28.
25. Nutku E, Hudson SA, Bochner BS. Mechanism of Siglec-8 induced human eosinophil apoptosis: role of caspases and mitochondrial injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 336: 918-24.
26. Morita M, Lamkhioued B, Soussi-Gounni A, Aldebert D, Delaporte E, Capron A, et al. Induction by interferons of human eosinophil apoptosis and regulation by interleukin-3, granulocyte/macrophage-colony stimulating factor and interleukin-5. *Eur Cytokine Netw* 1996; 7: 725-32.

HEMATOLOGIC DISORDERS ASSOCIATED WITH EOSINOPHILIA: UPDATE ON DIAGNOSTICS, CLASSIFICATION, AND THERAPY

P. VALENT

Department of Internal Medicine I. Division of Hematology & Hemostaseology. Vienna (Austria)

Summary

Eosinophilia is a consistent finding and diagnostic clue in various hematologic neoplasms. In stem cell-related and myeloid malignancies, eosinophils de-

rive from the malignant clone, whereas in lymphoid neoplasms, eosinophils usually are reactive cells and triggered by eosinopoietic cytokines. Myeloid neoplasms frequently accompanied by eosinophilia include chronic myeloid leukemia (CML), chronic eosinophilic leukemia (CEL), other myeloproliferative neoplasms (MPN), some acute leukemias, mast cell disorders, and rare forms of myelodysplastic syndromes. Diagnostic evaluations in unexplained eosinophilia have to take these diagnoses into account, and are based on a thorough hematologic work-up including bone marrow studies with immunohistochemistry, cytogenetics, molecular markers, and a complete staging of potentially affected organ systems. Endomyocardial fibrosis, the most dangerous cardiovascular complication of hypereosinophilia, is frequently detected in PDGFRA-mutated neoplasms (FIP1L1/PDGFRA+ CEL) but is usually not seen in other eosinophil neoplasms or in reactive eosinophilia, even if eosinophilia is recorded over many years. Therapy of hypereosinophilia is based on the type of underlying disease, organopathy, molecular targets, and overall situation in each case. In a group of patients, oncogenic tyrosine kinases (TK) such as FIP1L1/PDGFRA in CEL, can be employed as therapeutic targets by administering imatinib or other TK inhibitors.

Introduction

Eosinophils are myeloid effector cells that produce and store a number of bioactive molecules¹⁻³. Once activated, eosinophils can release their mediators and cytokines into the tissues, thereby influencing tissue homeostasis and integrity³. In case of massive and permanent activation, eosinophils can induce or trigger inflammatory reactions and cause changes in the microenvironment, sometimes resulting in fibrosis or/and thrombosis, and thus in severe or even life-threatening end organ damage³⁻⁶.

In common with other leukocytes, eosinophils originate from uncommitted and precommitted (CD34+) hematopoietic progenitor cells⁷⁻¹⁰. Precommitted progenitors often are bi-potent and give rise to eosinophils and basophils when exposed to myeloid growth factors^{7,8}. These cells (CFU-eo/ba) are detectable in the bone marrow and blood in healthy subjects as well as in various pathologic conditions^{7,8,11,12}. The most potent growth factors for eosinophils are interleukin-5 (IL-5), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), and IL-3¹³⁻¹⁵. These eosinopoietins are primarily produced and secreted by activated T lymphocytes, mast cells, and tissue stroma cells¹⁶⁻¹⁹. Eosinopoietic cytokines act on progenitor cells and mature eosino-

phils via specific receptors^{20,21}. An interesting aspect is that the receptors for IL-3, IL-5, and GM-CSF display ligand-specific alpha chains, but share a common beta chain^{20,21}.

Transient eosinophilia is a quite frequent phenomenon observed in diverse reactive processes such as non-specific inflammation, allergic reactions, drug reactions, or infections with viruses or with bacteria (recovery phase of infection)²²⁻²⁵. Chronic reactive eosinophilia is found in patients with persistent (viral, fungal, or bacterial) infections, parasitosis, autoimmune disorders, atopy, endocrinopathies, and certain tumors (Table 1)²⁵⁻³⁰. A major cause of persistent eosinophilia are helminth infections^{22,25,26}. In most instances, eosinophilia may result from progenitor stimulation by eosinopoietic cytokines²⁵⁻³⁰. Reactive eosinophilia either is an isolated blood finding or is accompanied by other blood count abnormalities. Sometimes, an excessive increase in eosinophils is seen. If no cause for reactive eosinophilia is found, an underlying hematopoietic disorder must be considered (Figure 1).

The current article provides an overview about recent developments in the field of eosinophil disorders, with special focus on diagnostic procedures and markers, diagnostic algorithms, and current treatment options.

Exclusion of non-hematologic disorders – initial investigations

As mentioned, a number of different pathologic conditions may lead to an increased production and/or accumulation of non-neoplastic (polyclonal) eosinophils. Usually, the underlying cause is known or is found after initial investigations. These include a thorough case history, physical examination, x-ray of chest, lung function test, electrocardiogram, echocardiography, ultrasound of abdomen, a complete blood count with microscopic differential count, and serum chemistry including the sedimentation rate, immunoglobulins with total IgE, C reactive protein, fibrinogen, and serum tryptase (Figure 1). In addition, stool specimens are examined to exclude or reveal a worm (helminth) infection. Depending on findings, an extended search for non-hematologic diseases (including tumors) may be started. The measurement of eosinopoietic cytokines (e.g. IL-5) is helpful to confirm the presence of reactive eosinophilia, but the tests are not generally available. Sometimes, a lung or heart disease is diagnosed, but it remains unclear whether the patient is suffering from secondary eosinophilia or from an underlying hypereosinophilic syndrome (HES). A number of clinically defined syndromes such as the Churg-Strauss syndrome or

Kimura's disease present with eosinophilia^{22,29,30}. In some cases, eosinophilia persists over months but neither an underlying (hematopoietic or non-hematopoietic) disease or molecular marker, nor organopathy is found, and the clinical course is stable. These cases are classified as "chronic idiopathic eosinophilia" (Table 1, Figure 1).

Hypereosinophilic syndrome

Traditionally, the eosinophil count (>1,500/μL for at least 6 months) and specific organ damage are employed as diagnostic criteria for the so called hypereosinophilic syndrome, HES^{31,32}. Patients typically suffer from multi-organ involvement with lung- or/and endomyocardial fibrosis^{31,32}. In a group of patients, thrombosis, neurologic symptoms, mucosal ulcers, or skin involvement is found^{31,32}. HES can present as a primary idiopathic disease (idiopathic HES), but may also develop on the basis of a hematopoietic neoplasm³¹⁻³³. Based on a literature search and review of our registry, most patients with secondary HES and typical cardiac or lung damage (fibrosis) are suffering from a FIP1L1/PDGFRA+ CEL as underlying disease. Rarely, a typical HES with endomyocardial or lung fibrosis is found in patients with other myeloid or lymphoid neoplasms. In these patients, the pattern of organ damage usually is different from that seen in typical CEL/HES. Similarly, in aggressive mastocytosis and mast cell leukemia with eosinophilia, organopathy (e.g. hepatopathy, osteolysis, etc.) is distinctively different from organopathy recorded in HES patients.

Diagnostic approach in patients with suspected hematologic neoplasm

In patients in whom eosinophilia is unlikely to be reactive or is accompanied by major blood count abnormalities or by specific organ damage (HES), specific blood tests are applied, and the bone marrow is examined. Figure 1 provides a diagnostic algorithm for these patients. The advantage of molecular studies is that most can be applied on blood cells and therefore yield rapid (diagnostic) information^{25,34,35}. Depending on the clinical picture and blood counts, these parameters include markers indicative of a) a stem cell- or myeloproliferative neoplasm (clinical signs of myeloproliferation, multi-lineage involvement); b) a primary eosinophil neoplasm, i.e. CEL (isolated marked eosinophilia ± HES); c) a lymphoid neoplasm (lymphomas, lymphocytosis), and d) a mast cell neoplasm (skin lesions, highly elevated tryptase). Molecular markers indicative of a prima-

Table 1. Proposed classification of eosinophilia and related disorders

Disorders	Variant of disease	Mechanism (eosinophilia)
Idiopathic eosinophilia	–	unknown
Reactive eosinophilia	Transient infections allergy drugs others	Cytokines (IL-5, others)
	Chronic/Persistent helminth infections other chronic infections autoimmune diseases & cGvHD syndromes: Churg-Strauss syndrome, Kimura's disease, etc. atopic diseases endocrinopathies solid tumors myeloid neoplasms (rare) B cell lymphoma/leukemia T cell clones T cell lymphoma/leukemia	
Idiopathic hypereosinophilic syndrome (HES ^a)	–	unknown
Chronic eosinophilic leukemia (CEL)	with FIP1L1/PDGFR (± HES ^a)	PDGFR ^b
	with other PDGFR-fusion genes	PDGFR
	with other oncogenic mutants	PDGFRB, FGFR1 ^b
	without known defect	unknown
Classical MPN with eosinophilia (MPN-eo)	CML	BCR/ABL ^c
	JAK2 V617F+ MPN	unknown
Atypical MPN with eosinophilia (aMPN-eo)	with oncogenic PDGFR mutants	PDGFR/B
	with other oncogenic mutants	PDGFRB, FGFR1
	without known defect	unknown
MDS/MPN overlap syndromes with eosinophilia	CMML, rarely others	
	with oncogenic PDGFRB mutants	PDGFRB
	with other oncogenic mutants	PDGFR, FGFR1
	without known defect	unknown
Stem cell leukemia/lymphoma syndrome	8p11 syndrome	oncogenic FGFR1
MDS with eosinophilia (MDS-eo)	Diverse subvariants	unknown
	with oncogenic PDGFR mutants	PDGFR/B
Unclassifiable MDS, MPN, or MDS/MPN with eosinophilia	with oncogenic FGFR1 mutants	FGFR1
	without known defect	unknown
	Smouldering SM (SSM-eo)	unknown
Systemic mastocytosis with eosinophilia (SM-eo)	Aggressive SM (ASM-eo)	unknown
	Mast cell leukemia (MCL-eo)	unknown
	SM-eo with AHNMD:	AHNMD-related
	SM-CEL, SM-CML, etc.	defects

AHNMD: associated clonal hematologic non mast cell lineage disease; aMPN-eo: atypical MPN with eosinophilia; cGvHD: chronic graft versus host disease; CML: chronic myeloid leukemia; FGFR: fibroblast growth factor receptor; IL-5: interleukin-5; MPN: myeloproliferative neoplasm; PDGFR: platelet derived growth factor receptor; SM: systemic mastocytosis.

^a HES can develop as idiopathic disease or as secondary HES, mostly in patients with typical CEL in whom FIP1L1/PDGFR is detectable. ^b The PDGFR and FGFR tyrosine kinase activity is considered to be involved in clonal eosinophil differentiation, but the mechanisms remain unknown. ^c The BCR/ABL tyrosine kinase is considered to be involved in clonal eosinophil differentiation, presumably via IL-3R-like signalling networks.

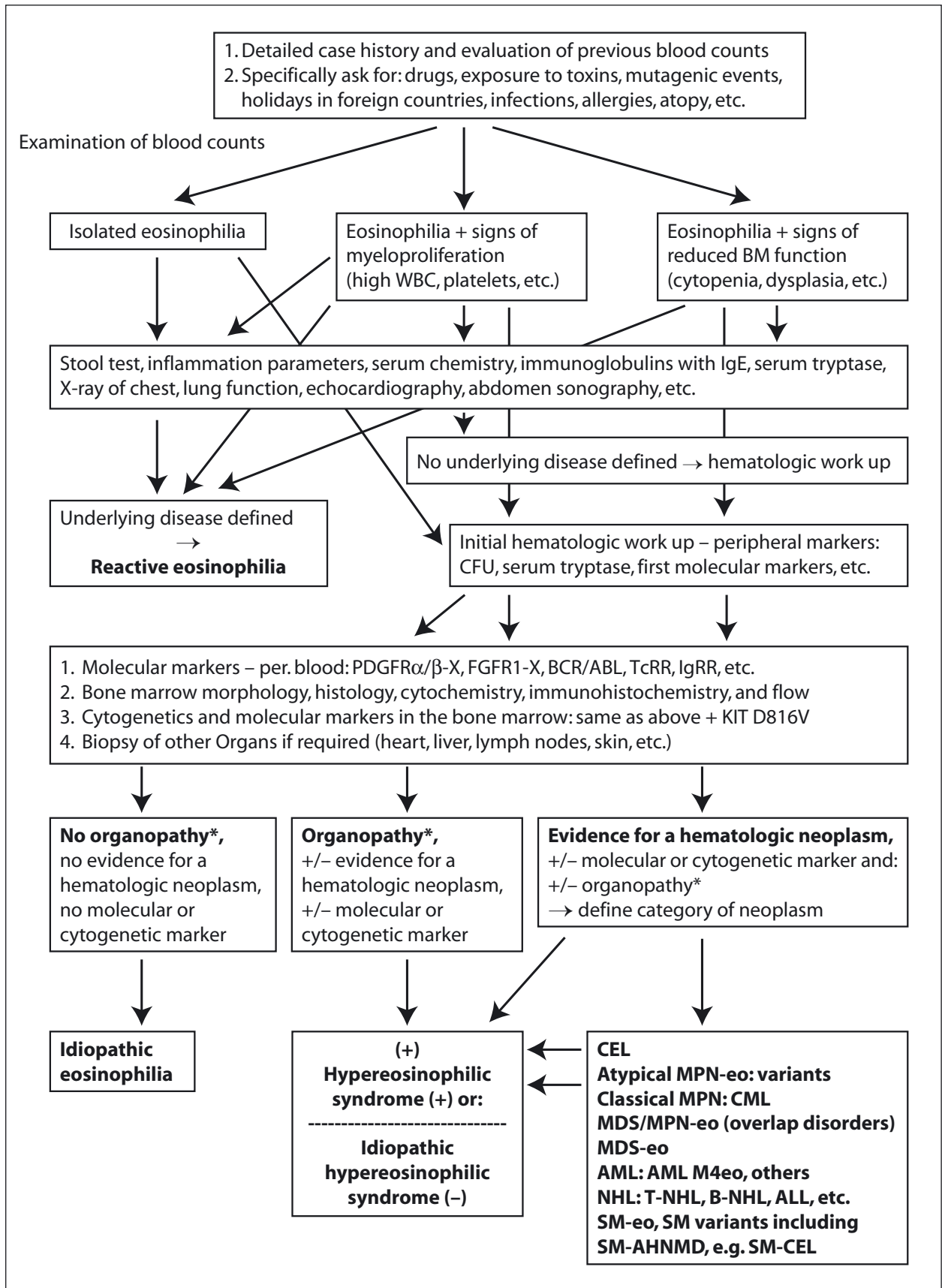


Figure 1. Diagnostic algorithm for persistent blood eosinophilia (> 1,500/ μ L).

Table 2. Molecular markers and related cytogenetic defects occurring in myeloid neoplasms presenting with eosinophilia*

Molecular defect oncprotein	Cytogenetic defect	Disorder/Diagnosis
BCR/ABLp210	t(9;22)	CML
CBFB/MYH11	inv(16)	AML M4-eo
FIP1L1/PDGFR	del(4q12)	CEL, SM-CEL, CMML, atypical/unclassifiable MPN-eo
BCR/PDGFR	t(4;22)(q12;q11)	CEL, unclassifiable MPN-eo
KIF5B/PDGFR	t(4;10)(q12;p11)	CEL
CDK5RAP2/PDGFR	ins(9;4)(q33;q12q25)	CEL
ETV6/PDGFRB	t(5;12)(q33;p13)	CMML-eo, atypical MPN-eo, CEL
BABAPTIN5/PDGFRB	t(5;17)(q33;p13)	CMML-eo
HCMOGT1/PDGFRB	t(5;17)(q33;p11.2)	JMML-eo
CEV14/PDGFRB	t(5;14)(q33;q32)	AML-eo
NIN/PDGFRB	t(5;14)(q33;q24)	atypical/unclassifiable MPN-eo
KIAA1509/PDGFRB	t(5;14)(q31;q32)	CMML-eo
TP53BP1/PDGFRB	t(5;15)(q33;q22)	atypical/unclassifiable MPN-eo
PDE4DIP/PDGFRB	t(1;5)(q23;q33)	atypical/unclassifiable MPN-eo
HIP1/PDGFRB	t(5;7)(q33;q11.2)	CMML-eo
H4/PDGFRB	t(5;10)(q33;q22)	atypical/unclassifiable MPN-eo
ZNF198/FGFR1	t(8;13)(p11;q12)	SCLL, atypical MPN-eo, CEL
FOP/FGFR1	t(6;8)(p27;p11)	SCLL
TIF1/FGFR1	t(7;8)(q34;p11)	SCLL
MYO18A/FGFR1	t(8;17)(p11;q23)	SCLL
HERVK/FGFR1	t(8;19)(p12;q13.3)	SCLL
BCR/FGFR1	t(8;22)(p11;q11)	atypical MPN-eo (CML-like)
CEP110/FGFR1	t(8;9)(p12;q23)	SCLL
FGFR10P2/PDGFR	ins(12;8)(p11;p11p22)	SCLL
KIT D816V	–	SM-eo: ISM, SSM, ASM, MCL, SM-AHNMD
JAK2 V617F	–	Classical MPN: PV, ET, CIMF

AHNMD: associated clonal hematologic non-mast cell lineage disorder; AML: acute myeloid leukemia; ASM: aggressive SM; CEL: chronic eosinophilic leukemia; CIMF: chronic idiopathic myelofibrosis; CML: chronic myeloid leukemia; CMML: chronic myelomonocytic leukemia; ET: essential thrombocytosis; ISM: indolent SM; JMML: juvenile myelomonocytic leukemia; MCL: mast cell leukemia; MPN: myeloproliferative neoplasm; PV: polycythemia vera; SCLL: stem cell leukemia/lymphoma syndrome; SM: systemic mastocytosis; SSM: smouldering SM.

*Data were collected from the available literature^{25,34,35,38-40}.

ry eosinophil disease include oncogenic variants of the platelet derived growth factor receptors (PDGFRA and PDGFRB) and fibroblast growth factor receptor-1 (FGFR1). The KIT mutant D816V is typically found in systemic mastocytosis (SM), but the test may be false-negative in the blood, and thus should be performed on bone marrow cells^{36,37}. In addition, not all patients with SM (e.g. only about 50-70% with mast cell leukemia) harbour KIT D816V^{36,37}. Table 2 shows a summary of markers indicative of hematopoietic neoplasms frequently presenting with eosinophilia.

Bone marrow studies include a biopsy with immunohistochemistry using B cell- and T cell markers,

CD34, KIT, tryptase and CD25 to evaluate progenitor cells and mast cells, and a platelet marker (e.g. CD42 or CD61), as well as an aspirate for morphologic assessment, flow cytometry, chromosome analysis, and molecular analyses, including *KIT* mutation analysis if required. Chromosome analysis should be performed on bone marrow cells and includes conventional karyotyping as well as fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with probes specific for CHIC2 (4q12) and other markers. When all laboratory tests are negative, and there is no indication for an underlying disease, the condition (blood count) is monitored. In some patients, organopathy or/and a frank hematologic disease is detected in the follow up.

Chronic eosinophilic leukemia

Chronic eosinophilic leukemia (CEL) is a myeloproliferative neoplasm defined by the following criteria: persistent eosinophilia ($>1,500/\mu\text{L}$ for at least 6 months) and molecular or (and) cytogenetic evidence of monoclonal eosinophils, and/or presence of blast cells in the peripheral blood ($>2\%$) or bone marrow (5-19%), and exclusion of all other hematologic and non-hematologic causes of eosinophilia, with recognition of the principle possibility of co-existence of two separate disorders (e.g. co-existing helminth infection or lymphoma can not as per definition exclude the presence of a CEL)³⁸⁻⁴⁰. In most patients with CEL (about 60-70%), eosinophils display *PDGFRA* fusion genes and related cytogenetic defects^{25,38-41}. The most commonly detected fusion-oncoprotein is FIP1L1/*PDGFRA*. The related chromosome defect, a deletion of *CHIC2* at 4q12, is detectable by FISH^{39,41,42}. Other less common fusion partners for *PDGFRA* in CEL are *BCR*, *KIF5B*, and *CDKRAP2* (Table 2)^{25,39}. The respective cytogenetic defects are usually detectable by conventional karyotyping³⁹. There are also oncogenic *PDGFRB* fusion gene products that can be detected in patients with CEL, although most are classified as atypical MPN or chronic myelomonocytic leukemia (CMML) (Table 2)^{25,39}. The most frequent oncoprotein is ETV6-*PDGFRB* associated with t(5;12)(q33;p13)^{25,39}. Other fusion gene products involving *PDGFRB* have also been described, but are less common. Several CEL-related oncoproteins can serve as targets for imatinib⁴¹⁻⁴⁵. A very few patients presenting with CEL have been described to display defects in the *FGFR1* gene and related chromosome defects involving 8p11^{25,39}. The most common translocation is t(8;13)(p11;q12) that is related to the ZNF198-*FGFR1* oncoprotein^{25,39}. However, most of these patients have multilineage involvement, and thus no typical CEL. Table 2 shows a summary of fusion gene products and related chromosome defects detectable in CEL and other myeloid neoplasms presenting with eosinophilia. In a few patients with CEL, no specific chromosome abnormality or molecular marker is found. In some of these cases, eosinophils display activated or overexpressed *PDGFRA*, *PDGFRB*, or *FGFR1*, suggesting the presence of further (unknown) defects in these target genes.

Myeloproliferative and stem cell neoplasms, myelodysplastic syndromes and overlap syndromes

Eosinophilia is a typical feature of classical myeloproliferative neoplasms (MPN). In Ph+ CML, eosin-

ophilia and basophilia are almost always present at diagnosis, and often also when the disease progresses. In patients with JAK2 V617F+ MPN, eosinophilia is less frequently recorded. However, in certain variants of (atypical) MPN involving oncogenic forms of *PDGFRA*, *PDGFRB*, or *FGFR1*, eosinophilia is a common finding^{25,33-35,38-40}. This holds true also for myeloid neoplasms classified as MDS/MPN overlap, such as CMML (CMML-eo), and atypical variants of MDS (MDS-eo)^{25,33-35,38-40}. However, not all patients with MPN-eo, MDS-eo, or MDS/MPN-eo display cytogenetic abnormalities. The new WHO classification separates classical MPN-eo without a clonal marker from cytogenetically (molecular) defined subvariants⁴⁰. A special multilineage neoplasm is the "8p11 syndrome", also referred to as "stem cell leukemia/lymphoma syndrome"^{25,39}. These patients have multilineage involvement, monoclonal eosinophils, a mutated variant of the *FGFR1*, and often present with a T cell lymphoma. Several of these patients develop AML or progress with a sarcoma-like disease, and the prognosis is grave.

In patients with MPN, MDS, or MDS/MPN, eosinophilia may develop during the course of disease. Likewise, about 10% of all patients with MDS develop massive eosinophilia ($>10\%$ in differential blood counts) in the follow up, especially when the disease progresses⁴⁶. Moreover, in MDS, eosinophilia is of prognostic significance, as these patients have an increased risk to develop AML⁴⁷. From a clinical point of view, it is important to note that patients with CML, MDS/MPN, or MDS who have permanent eosinophilia ($>1,500$ for at least 6 months) usually do not develop lung- or endomyocardial fibrosis or thrombosis, contrasting the course in CEL/HES.

Mast cell disorders – systemic mastocytosis

Although indolent and aggressive forms of SM can be accompanied by eosinophilia (SM-eo), an increase in blood eosinophils is more commonly detected in advanced forms of the disease, i.e. smoldering SM (SSM-eo), aggressive SM (ASM-eo), and MCL (MCL-eo)^{48,49}. Moreover, eosinophilia in SM is of prognostic significance⁴⁹. A subvariant of ASM-eo is lymphadenopathic SM with eosinophilia^{36,50}. In (advanced) SM, eosinophils are considered to belong to the neoplastic clone^{51,52}. Rarely, they represent the predominant cell type in the bone marrow and peripheral blood, which may be a diagnostic challenge. The situation is complicated by the fact that SM can be accompanied by an associated clonal hematologic non-mast cell lineage

disorder (AHNMD) including CEL^{36,49}. Thus, in SM, eosinophilia must be considered as a “pre-diagnostic” checkpoint (SM-eo) at which molecular markers need to be applied, but is not a final diagnosis (holds true for other neoplasms as well)^{36,37,49}. Rather, only a complete staging and grading and search for disease-specific markers will yield the information necessary for the correct final diagnosis^{36,37}. In most patients with SM-eo, no AHNMD (no CEL/HES) is found. Notably, these patients usually do not develop a HES, even if eosinophilia persists for many years or even decades. On the other hand, an increase in atypical CD25+ mast cells is frequently seen in patients with CEL, although the criteria for SM usually are not met^{25,37-40,53}. This may sometimes be because (otherwise diagnostic) mast cell infiltrates are distorted by the co-existing eosinophil infiltrate (occult SM). Similarly, while most cases of CEL with an increase in mast cells are described to be KIT D816V-negative, it remains unclear whether this is because neoplastic mast cells are outnumbered by eosinophils, bear other *KIT* mutations or are non-neoplastic but still CD25+ cells. The possibility that FIP1L1/PDGFR α (*per se*) is a major trigger of mast cell differentiation would be another alternative. Whatever the explanation is, it should be emphasized that FIP1L1/PDGFR α remains a molecular marker of CEL, but is not a marker of SM^{37-39,54}. On the other hand, diagnostic criteria for SM are sometimes fulfilled in patients with CEL, and then the final diagnosis is SM-AHNMD/CEL^{42,49}.

Lymphoid neoplasms

Several lymphoid neoplasms may be accompanied by eosinophilia. These neoplasms include T cell lymphomas, Hodgkin's disease, and less frequently B cell non Hodgkin's lymphomas (NHL), NK cell neoplasms, acute lymphoblastic leukemia (ALL), and other B cell malignancies^{25,33,38,39}. In an early phase of the disease, eosinophilia may be the only sign indicative for a (T cell) lymphoma^{38,39}. In other patients, a monoclonal T cell population is detected but may not develop into overt lymphoma^{55,56}. In most lymphomas, eosinophils may be reactive (non-neoplastic) in nature. In fact, neoplastic (T) lymphocytes are considered to produce eosinopoietic growth factors, like IL-5^{55,56}. However, rarely, eosinophilia may arise on the basis of an associated myeloid neoplasm or a stem cell disease. Notably, the co-existence of 2 myeloid disorders or of a myeloid and a lymphoid neoplasm in one patient may be a more frequent phenomenon than has so far been assumed. Therefore, it is important to evaluate these patients carefully and to apply appropriate

histopathologic, cytogenetic, and molecular markers in all cases.

Therapy of hypereosinophilia

A number of molecular targets related to CEL or to other hematopoietic malignancies presenting with eosinophilia have been defined recently^{25,38-44,57}. A summary of potential targets is shown in Table 2. In each individual patient, it is of importance to define the nature of eosinophilia by application of such markers, but also to define the clinical impact of eosinophilia by appropriate staging and assessment of organ infiltration and organ function. Only after having established the correct diagnosis, a treatment plan should be established. By contrast, it is not appropriate to establish a diagnosis or even a treatment plan based on the presence of eosinophilia alone, or only based on expression of a certain target. Note that some of these patients may harbour such marker, but will never develop a frank (malignant) neoplasm.

The most frequent mutant and target detectable in patients with CEL is FIP1L1/PDGFR α ^{25,38,39-44}. This fusion gene product is a target of imatinib and nilotinib unless the oncogene is mutated^{41-44,58}. In addition, FIP1L1/PDGFR α is a target of dasatinib⁵⁹. Most patients with FIP1L1/PDGFR α + CEL develop a life-threatening organopathy (HES) over time. Therefore, early therapeutic intervention is recommended³⁹⁻⁴⁴. Imatinib is considered standard first line therapy, the starting dose being 100 mg *per os* daily. Whereas most patients respond well, a few may require dose-escalation (to 400 mg daily) or rarely may become resistant, which might be caused by FIP1L1/PDGFR α point mutations associated with decreased (loss of) drug-binding capacity. For these patients, novel TK inhibitors may be considered^{58,59}. Another approach is to apply alternative cytoreductive agents such as interferon-alpha or hydroxyurea. In patients who progress into acute leukemia, high dose chemotherapy (\pm stem cell transplantation) or palliative cytoreduction have to be considered.

Secondary and thus reactive hypereosinophilia should be managed by treating the underlying disease if necessary (and if possible). However, it is not appropriate to treat hypereosinophilia *per se* i.e. without severe and clearly related organopathy (e.g. HES). If the underlying disease cannot be treated or is resistant, the eosinophil count can usually be kept under control using glucocorticosteroids or (additional) anti-IL-5 antibodies⁶⁰. In these patients, the risks and side effects of therapy have to be weighed against the potential benefit. Some patients with hypereosinophil-

ia and organopathy (e.g. mucosal ulcers) may benefit from treatment with interferon-alpha.

Summary and future perspectives

Eosinophilia is an important feature and can serve as a diagnostic clue or even prognostic variable in various myeloid neoplasms. We recommend the use of the appendix "eo" (e.g. MPN-eo, SM-eo) for patients in whom this important checkpoint in the diagnostic algorithm is reached. Cytogenetic and molecular markers are then applied, and are helpful for determining the final diagnosis, patient selection for therapies, and the use of appropriate (targeted) drugs. Patients with oncogenic variants of the PDGFR are candidates for treatment with PDGFR-targeting agents such as imatinib. In reactive hypereosinophilia, the condition is best controlled by treating the underlying disease. If this is not possible and eosinophilia leads to clinical problems, eosinophil counts can be kept under control using glucocorticosteroids or additional IL-5-targeting agents. Our increasing knowledge about the nature of eosinophilia and development of more specific therapeutic approaches should improve treatment and prognosis in patients with eosinophil-related disorders in the future.

References

- Gleich GJ, Adolphson CR, Leiferman KM. The biology of the eosinophilic leukocyte. *Annu Rev Med* 1993; 44: 85-101.
- Weller PF. Eosinophils: structure and functions. *Curr Opin Immunol* 1994; 6: 85-90.
- Gleich GJ. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 651-63.
- Hogan SP, Rosenberg HF, Moqbel R, Phipps S, Foster PS, Lacy P, et al. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 709-50.
- Ackerman SJ, Bochner BS. Mechanisms of eosinophilia in the pathogenesis of hypereosinophilic disorders. *Immunol Allergy Clin North Am* 2007; 27: 357-75.
- Ogbogu PU, Rosing DR, Horne MK 3rd. Cardiovascular manifestations of hypereosinophilic syndromes. *Immunol Allergy Clin North Am* 2007; 27: 457-75.
- Leary AG, Ogawa M. Identification of pure and mixed basophil colonies in culture of human peripheral blood and marrow cells. *Blood* 1984; 64: 78-83.
- Denburg JA, Telizyn S, Messner H, Lim B, Jamal N, Ackerman SJ, et al. Heterogeneity of human peripheral blood eosinophil-type colonies: evidence for a common basophil-eosinophil progenitor. *Blood* 1985; 66: 312-8.
- Huang S, Terstappen LW. Lymphoid and myeloid differentiation of single human CD34+, HLA-DR+, CD38- hematopoietic stem cells. *Blood* 1994; 83: 1515-26.
- Shalit M, Sekhsaria S, Mauhorter S, Mahanti S, Malech HL. Early commitment to the eosinophil lineage by cultured human peripheral blood CD34+ cells: messenger RNA analysis. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: 344-54.
- Denburg JA. Hemopoietic progenitors and cytokines in allergic inflammation. *Allergy* 1998; 53: 22-6.
- Linden M, Svensson C, Andersson M, Greiff L, Andersson E, Denburg JA, Persson CG. Circulating eosinophil/basophil progenitors and nasal mucosal cytokines in seasonal allergic rhinitis. *Allergy* 1999; 54: 212-9.
- Clutterbuck E, Shields JG, Gordon J, Smith SH, Boyd A, Callard RE, et al. Recombinant human interleukin 5 is an eosinophil differentiation factor but has no activity in standard human B cell growth factor assays. *Eur J Immunol* 1987; 17: 1743-50.
- Saito H, Hatake K, Dvorak AM, Leiferman KM, Donnenberg AD, Arai N, et al. Selective differentiation and proliferation of hematopoietic cells induced by recombinant human interleukins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 2288-92.
- Valent P, Schmidt G, Besemer J, Mayer P, Zenke G, Liehl E, et al. Interleukin-3 is a differentiation factor for human basophils. *Blood* 1989; 73: 1763-9.
- Feldmann M, Londei M, Haworth C. T cells and lymphokines. *Br Med Bull* 1989; 45: 361-70.
- Del Prete G. Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy. *Allergy* 1992; 47: 450-5.
- Denburg JA. Microenvironmental influences on inflammatory cell differentiation. *Allergy* 1995; 50: 25-8.
- Shakoori B, Fitzgerald SM, Lee SA, Chi DS, Krishnaswamy G. The role of human mast cell-derived cytokines in eosinophil biology. *J Interferon Cytokine Res* 2004; 24: 271-81.
- López AF, Vadas MA, Woodcock JM, Milton SE, Lewis A, Elliott MJ, et al. Interleukin-5, interleukin-3, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor cross-compete for binding to cell surface receptors on human eosinophils. *J Biol Chem* 1991; 266: 24741-7.
- López AF, Elliott MJ, Woodcock J, Vadas MA. GM-CSF, IL-3 and IL-5: cross-competition on human haemopoietic cells. *Immunol Today* 1992; 13: 495-500.
- Kay AB. The eosinophil in infection diseases. *J Infect Dis* 1974; 129: 606-13.
- Tas S, Simonart T. Management of drug rash with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS syndrome): an update. *Dermatology* 2003; 206: 353-6.
- Sade K, Mysels A, Levo Y, Kivity S. Eosinophilia: a study of 100 hospitalized patients. *Eur J Intern Med* 2007; 18: 196-201.
- Tefferi A, Patnaik MM, Pardanani A. Eosinophilia: secondary, clonal and idiopathic. *Br J Haematol* 2006; 133: 468-92.
- Mahmoud AA. The ecology of eosinophils in schistosomiasis. *J Infect Dis* 1982; 145: 613-22.
- Kargili A, Bavbek N, Kaya A, Koşar A, Karaaslan Y. Eosinophilia in rheumatologic diseases: a prospective study of 1000 cases. *Rheumatol Int* 2004; 24: 321-4.
- Lotfi R, Lee JJ, Lotze MT. Eosinophilic granulocytes and damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs): role in the inflammatory response within tumors. *J Immunother* 2007; 30: 16-28.
- Nutman TB. Evaluation and differential diagnosis of marked, persistent eosinophilia. *Immunol Allergy Clin North Am* 2007; 27: 529-49.
- Simon D, Simon HU. Eosinophilic disorders. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 1291-300.
- Klion AD, Bochner BS, Gleich GJ, Nutman TB, Rothenberg ME, Simon HU, et al. The Hypereosinophilic Syndromes Working Group. Approaches to the treatment of hypereosinophilic syndromes: a workshop summary report. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 1292-302.
- Roufosse FE, Goldman M, Cogan E. Hypereosinophilic syndromes. *Orphanet J Rare Dis* 2007; 2: 37.
- Bain BJ. Eosinophilic leukaemias and the idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Br J Haematol* 1996; 95: 2-9.
- Gotlib J, Cross NC, Gilliland DG. Eosinophilic disorders: molecular pathogenesis, new classification, and modern therapy. *Best Pract Res Clin Haematol* 2006; 19: 535-69.
- Haferlach T, Bacher U, Kern W, Schnittger S, Haferlach C. The diagnosis of BCR/ABL-negative chronic myeloprolifer-

- ative diseases (CMPD): a comprehensive approach based on morphology, cytogenetics, and molecular markers. *Ann Hematol* 2008; 87: 1-10.
36. Valent P, Horny HP, Escribano L, Longley BJ, Li CY, Schwartz LB, et al. Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal. *Leuk Res* 2001; 25: 603-25.
 37. Valent P, Akin C, Escribano L, Födinger M, Hartmann K, Brockow K, et al. Standards and standardization in mastocytosis: consensus statements on diagnostics, treatment recommendations and response criteria. *Eur J Clin Invest* 2007; 37: 435-53.
 38. Bain BJ, Fletcher SH. Chronic eosinophilic leukemias and the myeloproliferative variant of the hypereosinophilic syndrome. *Immunol Allergy Clin North Am* 2007; 27: 377-88.
 39. Fletcher S, Bain B. Eosinophilic leukaemia. *Br Med Bull* 2007; 81-82: 115-27.
 40. Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* 2008; 22: 14-22.
 41. Cools J, DeAngelo DJ, Gotlib J, Stover EH, Legare RD, Cortes J, et al. A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *N Engl J Med* 2003; 348: 1201-14.
 42. Pardanani A, Ketterling RP, Brockman SR, Flynn HC, Pateroster SE, Shearer BM, et al. CHIC2 deletion, a surrogate for FIP1L1-PDGFR α fusion, occurs in systemic mastocytosis associated with eosinophilia and predicts response to imatinib mesylate therapy. *Blood* 2003; 102: 3093-6.
 43. Apperley JF, Gardembas M, Melo JV, Russell-Jones R, Bain BJ, Baxter EJ, et al. Response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloproliferative diseases with rearrangements of the platelet-derived growth factor receptor beta. *N Engl J Med* 2002; 347: 481-7.
 44. Pardanani A, Reeder T, Porrata LF, Li CY, Tazelaar HD, Baxter EJ, et al. Imatinib therapy for hypereosinophilic syndrome and other eosinophilic disorders. *Blood* 2003; 101: 3391-7.
 45. Tefferi A. Modern diagnosis and treatment of primary eosinophilia. *Acta Haematol* 2005; 114: 52-60.
 46. Wimazal F, Baumgartner C, Sonneck K, Zauner C, Geissler P, Schur S, et al. Mixed-lineage eosinophil/basophil crisis in MDS: a rare form of progression. *Eur J Clin Invest* 2008; 38: 447-55.
 47. Matsushima T, Handa H, Yokohama A, Nagasaki J, Koiso H, Kin Y, et al. Prevalence and clinical characteristics of myelodysplastic syndrome with bone marrow eosinophilia or basophilia. *Blood* 2003; 101: 3386-90.
 48. Hauswirth AW, Sperr WR, Ghannadan M, Scherthaner GH, Jordan JH, Fritsche-Polanz R, et al. A case of smouldering mastocytosis with peripheral blood eosinophilia and lymphadenopathy. *Leuk Res* 2002; 26: 601-6.
 49. Böhm A, Födinger M, Wimazal F, Haas OA, Mayerhofer M, Sperr WR, et al. Eosinophilia in systemic mastocytosis: clinical and molecular correlates and prognostic significance. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 192-9.
 50. Metcalfe DD. Classification and diagnosis of mastocytosis: current status. *J Invest Dermatol* 1991; 96: 2S-4S; 60S-65S.
 51. Akin C. Multilineage hematopoietic involvement in systemic mastocytosis. *Leuk Res* 2003; 27: 877-8.
 52. 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.
 53. Bain BJ. Relationship between idiopathic hypereosinophilic syndrome, eosinophilic leukemia, and systemic mastocytosis. *Am J Hematol* 2004; 77: 82-5.
 54. Valent P, Akin C, Metcalfe DD. FIP1L1/PDGFR α is a molecular marker of chronic eosinophilic leukaemia but not for systemic mastocytosis. *Eur J Clin Invest* 2007; 37: 153-4.
 55. Simon HU, Plötz SG, Dummer R, Blaser K. Abnormal clones of T cells producing interleukin-5 in idiopathic eosinophilia. *N Engl J Med* 1999; 341: 1112-20.
 56. Roufosse F, Schandené L, Sibille C, Willard-Gallo K, Kenes B, Eflora A, et al. Clonal Th2 lymphocytes in patients with the idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Br J Haematol* 2000; 109: 540-8.
 57. Tefferi A. Blood eosinophilia: a new paradigm in disease classification, diagnosis, and treatment. *Mayo Clin Proc* 2005; 80: 75-83.
 58. Stover EH, Chen J, Lee BH, Cools J, McDowell E, Adelsperger J, et al. The small molecule tyrosine kinase inhibitor AMN107 inhibits TEL-PDGFR β and FIP1L1-PDGFR α in vitro and in vivo. *Blood* 2005; 106: 3206-13.
 59. Baumgartner C, Gleixner KV, Peter B, Ferenc V, Gruze A, Remsing-Rix LL, et al. Dasatinib inhibits the growth and survival of neoplastic human eosinophils (EOL-1) through targeting of FIP1L1-PDGFR α . *Exp Hematol*, in press. 2008.
 60. Rothenberg ME, Klion AD, Roufosse FE, Kahn JE, Weller PF, Simon HU, et al.; Mepolizumab HES Study Group. Treatment of patients with the hypereosinophilic syndrome with mepolizumab. *N Engl J Med* 2008; 358: 1215-28.

Diagnóstico integrado de la leucemia linfática crónica

COORDINADOR: N. GUTIÉRREZ. *Salamanca*

Resumen del simposio

El curso clínico de la leucemia linfática crónica (LLC) es extremadamente variable, con una supervivencia que oscila entre uno o dos años y más de 15 años. Los avances recientes en el campo de la genética y de la biología molecular han contribuido a entender mejor la patofisiología de la LLC y han repercutido en un manejo más racional de la enfermedad. Estos nuevos hallazgos, unidos al incesante desarrollo de fármacos cada vez más activos en la erradicación del clon tumoral de la LLC, han obligado a revisar los criterios de diagnóstico, estadificación, y de respuesta al tratamiento, con el fin de adaptar la práctica clínica a los conocimientos biológicos actuales y a la mayor eficacia de los esquemas terapéuticos modernos.

Dentro de las herramientas de laboratorio utilizadas en el estudio de la LLC, el inmunofenotipo sigue siendo indispensable en el diagnóstico, especialmente porque el análisis simultáneo de múltiples antígenos permite diferenciarla de otros síndromes linfoproliferativos (SLP) cuando el patrón fenotípico no es el característico. La Dra. Villamor actualizará el papel de la citometría de flujo tanto en el diagnóstico como en la predicción del pronóstico de los pacientes con LLC, y en la evaluación de la enfermedad residual mínima. Además, revisará los nuevos criterios del International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (IWCLL) referentes al diagnóstico y a la evaluación de la respuesta, que en buena parte se apoyan en los análisis de inmunofenotipo. Para profundizar en estas cuestiones, se presentarán los resultados preliminares del ensayo clínico para el tratamiento de primera línea de la LLC con inmunoquimioterapia (R-FCM) seguida de mantenimiento con rituximab (Dr. Abrisqueta).

Al igual que sucede en otras hemopatías malignas, los estudios citogenéticos ayudan a definir el pronóstico de los pacientes con LLC. El Dr. Hernández explicará cómo la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) en interfase se ha convertido en la técnica más adecuada para el análisis de aquellas alteraciones cromosómicas con influencia reconocida en la supervivencia de la LLC. También expondrá los avances que ha supuesto la aplicación de las técnicas de análisis genómico modernas en el conocimiento biológico de esta leucemia. En este sentido, se presentará una comunicación (A. Rodríguez) en la que el estudio de expresión génica mediante *microarrays* muestra que las LLC con una elevada proporción de células con delección de 13q tienen características biológicas que reflejan mayor proliferación y menor apoptosis celular.

Uno de los progresos más importantes que ha generado la investigación de la LLC ha sido la identificación de marcadores moleculares que podrían llegar a predecir la progresión de la enfermedad. De hecho, hoy día la clasificación de la LLC basada en el estado mutacional de los genes de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgVH) es fundamental a la hora de entender gran parte de los aspectos biológicos y del comportamiento clínico de la LLC. Este punto será discutido por el Dr. González, quien abordará los últimos hallazgos acerca del uso no aleatorio de los segmentos VH en los reordenamientos del gen *IGH*, y la consiguiente hipótesis de que la estructura del receptor de la célula B (BCR) está íntimamente ligada a la etiología y a la historia natural de la LLC.

ESTUDIO INMUNOFENOTÍPICO EN EL DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE LOS PACIENTES CON LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA

G. GHITA, G. GUTIÉRREZ, N. VILLAMOR
 Unitat d'Hematopatologia. Hospital Clínic.
 Institut d'Investigacions Biomèdiques
 August Pi i Sunyer (IDIBAPS). Barcelona

La leucemia linfática crónica (LLC) es debida a la acumulación y proliferación de linfocitos B maduros y constituye la leucemia crónica más frecuente en los países occidentales. La mediana de edad de aparición de la enfermedad es la década de los 60-70 años, siendo la mayoría de los enfermos mayores de 50 años. La LLC se caracteriza por la presencia de linfocitosis en sangre acompañada o no por infiltración tisular que se manifiesta por citopenias, adenopatías o visceromegalias. La contrapartida ganglionar de la LLC se denomina *linfoma linfocítico de células pequeñas*¹. Recientemente, el International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (IWCLL)² ha revisado los criterios diagnósticos de esta entidad y proponen los siguientes: 1) presencia de $> 5 \times$

$10^9/L$ linfocitos B en sangre periférica mantenida como mínimo tres meses; 2) clonalidad de los linfocitos B demostrada por estudio inmunofenotípico; 3) linfocitosis constituida por linfocitos pequeños de aspecto maduro, escaso citoplasma, núcleo denso sin nucléolos evidentes y con cromatina cuarteada. En la extensión se acostumbra a observar las típicas sombras nucleares. Aparte de la forma morfológica típica de LLC se reconocen dos formas atípicas: la LLC/PL, que se caracteriza por un porcentaje de prolinfocitos superior al 10% e inferior al 55%, y la forma de celularidad mixta, caracterizada por la presencia de más de un 15% de células hendidas, linfoplasmocitos, células grandes, estimuladas o atípicas; 4) cuando la linfocitosis B es inferior a $5 \times 10^9/L$, el diagnóstico de LLC debe establecerse por la presencia de linfadenopatía u organomegalia, citopenias o sintomatología atribuible a la LLC. En ausencia de dichos signos de enfermedad el IWCLL propone clasificar a los enfermos como afectos de linfocitos B monoclonal. Estudios preliminares³ alertan que la aplicación de los nuevos criterios propuestos por IWCLL implicará que un porcentaje de los pacientes que serían considerados estadios precoces de LLC⁴ serán catalogados de linfocitosis B monoclonal. La próxima clasificación de la OMS probablemente recogerá una reflexión sobre este aspecto.

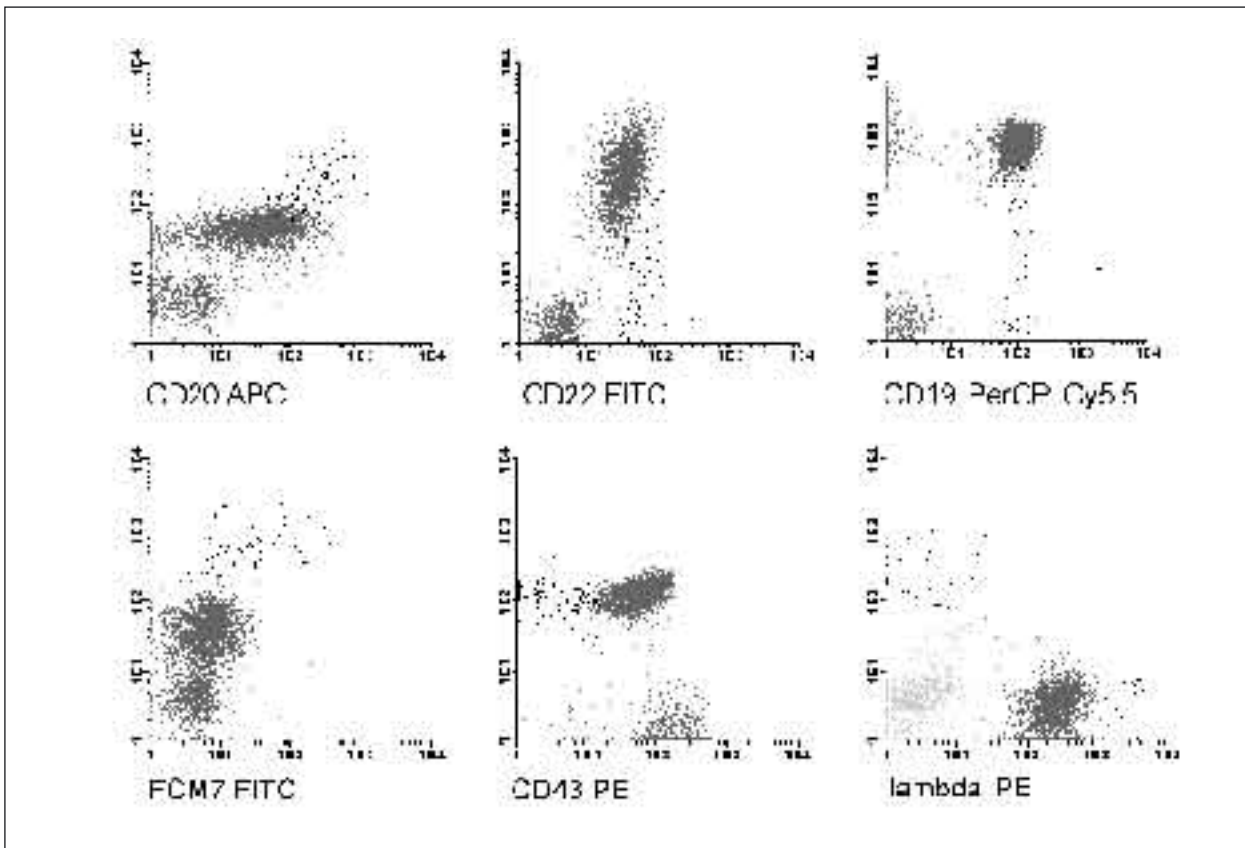


Figura 1. Fenotipo característico de la LLC. Los linfocitos de LLC tienen un perfil antigénico diferente muy diferente de los linfocitos B normales (puntos grandes negros).

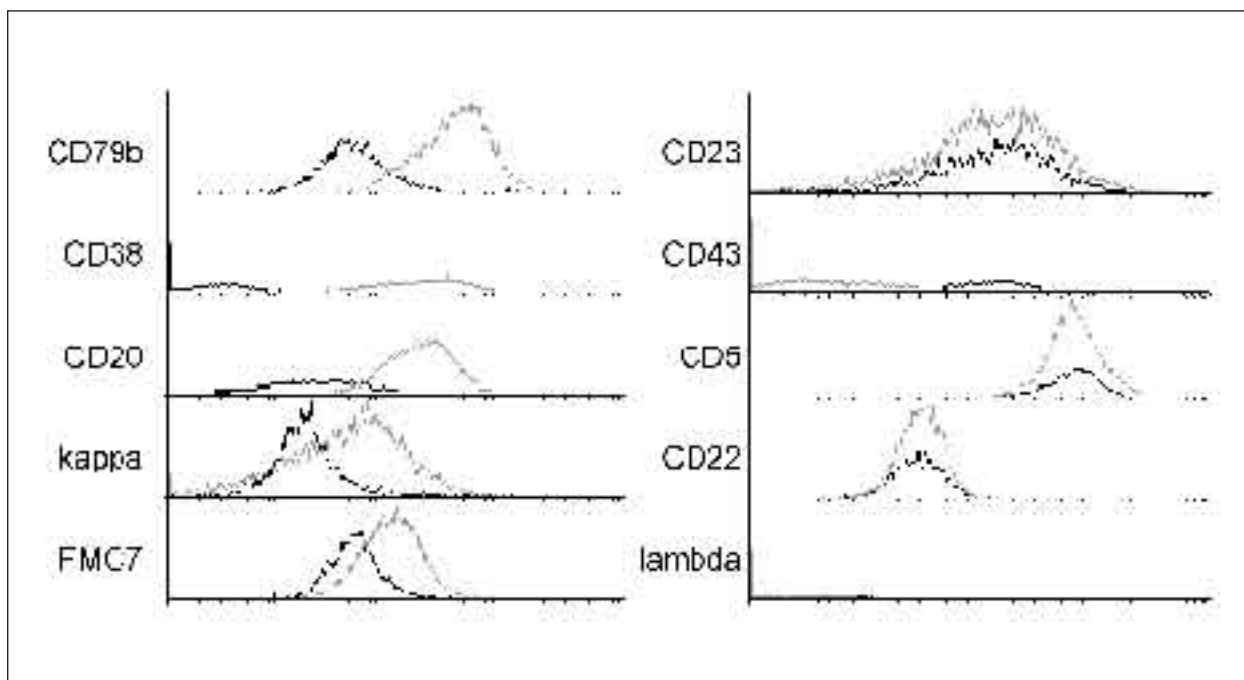


Figura 2. Fenotipo de LLC en relación con la presencia de trisomía 12. En los histogramas se recoge la intensidad de expresión de diversos marcadores en una LLC con trisomía 12 (gris) y una LLC de fenotipo típico (negro). La expresión de marcadores típicamente débiles en la LLC es más intensa en un porcentaje de pacientes con LLC y trisomía 12.

Inmunofenotipo en el diagnóstico de la leucemia linfática crónica

El fenotipo de los linfocitos leucémicos tiene un papel fundamental en el diagnóstico de la LLC^{1,2}. De forma característica, los linfocitos de LLC expresan de forma débil o son negativos para antígenos pan-B como CD22, CD22 y CD79b. Igualmente, la inmunoglobulina de membrana es más débil en los linfocitos de LLC respecto de los normales y, en general, son positivos para IgM, IgD o ambas. Además, los linfocitos de LLC coexpresan CD5 o CD43, marcadores que sólo están presentes en pequeñas subpoblaciones de linfocitos B normales⁵. Finalmente, los linfocitos de LLC acostumbran a ser negativos para antígenos presentes en linfocitos B maduros normales como FMC7 (Figura 1). La gran mayoría de las LLC (95%) acostumbran a tener 3 o más de las características fenotípicas típicamente asociadas a la LLC (CD5+, CD23+, IgS débil, CD79b débil, FMC7-)⁶.

De forma similar a lo que acontece con la morfología, hay LLC que tienen un perfil de antigénico menos característico, ya sea por una expresión normal para antígenos pan-B (CD20, CD22, CD79b o inmunoglobulinas de superficie) o negatividad o débil expresión de CD5 o CD23. En estas situaciones es necesario realizar pruebas complementarias para el diagnóstico diferencial. El casos de proliferaciones B clonales CD5

negativas, además del estudio morfológico, se debe ampliar el estudio fenotípico con antígenos característicos de otros síndromes linfoproliferativos crónicos como CD10, CD11c o CD103. La negatividad de CD23 en presencia de CD5 obliga a descartar el linfoma de células del manto mediante pruebas complementarias (tinción para ciclina D1 o técnicas de citogenética). Finalmente, se debe hacer énfasis en que la realización de biopsia ganglionar o de otro tejido puede ser imprescindible para la catalogación del síndrome linfoproliferativo cuando las características citológicas y fenotípicas no son concluyentes¹.

Los antígenos hasta ahora mencionados se utilizan en el diagnóstico de los pacientes, pero existen estudios que analizan más ampliamente el fenotipo de los linfocitos de LLC en relación con características citogenéticas y moleculares. Por ellos sabemos que la LLC con trisomía 12 es la que con mayor frecuencia se asocia a morfología atípica y a patrones fenotípicos atípicos caracterizados por mayor expresión de antígenos pan-B (Figura 2)⁷. La expresión de moléculas de adhesión esta reducida en pacientes con del(11q)⁸ y el perfil fenotípico de las LLC varía según el estado mutacional del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgVH) en la expresión de moléculas de activación y de respuesta a estímulos vía receptor de células B⁹, aunque sólo algunas se emplean en el ámbito clínico.

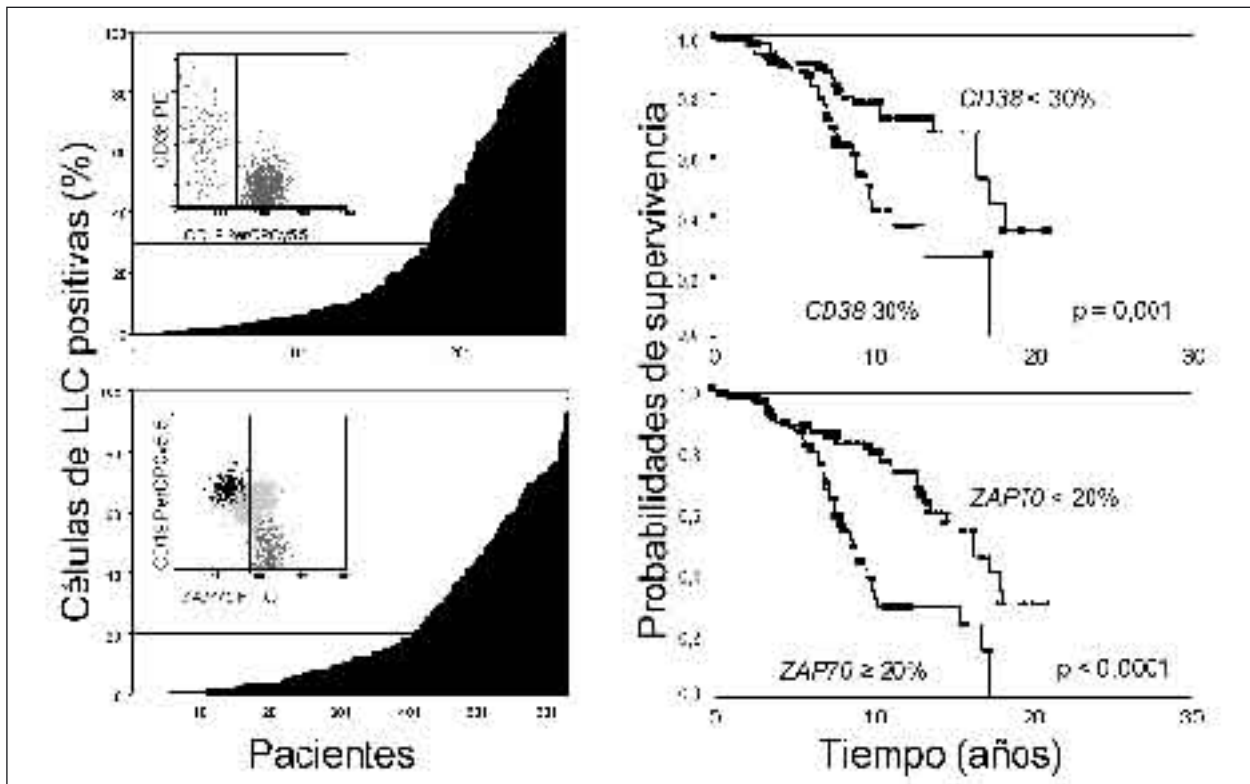


Figura 3. Antígenos con valor pronóstico en pacientes con LLC. En el panel superior se muestra la distribución de pacientes según la expresión de CD38 en los linfocitos de LLC con el valor del punto de corte y una imagen bidimensional de un caso negativo para CD38. A la derecha se representan las curvas de supervivencia global según la positividad para CD38. En el panel inferior izquierdo se observa la distribución de pacientes según el porcentaje de expresión de ZAP70 en los linfocitos de LLC. La línea horizontal indica el punto de corte para ZAP70 (20%). La imagen bidimensional muestra la expresión de ZAP70 en linfocitos B normales (negro), linfocitos T (gris oscuro) y LLC (gris claro) en un caso con expresión elevada de ZAP70. A la derecha se observa la supervivencia global de los pacientes de acuerdo con la expresión de ZAP70.

Antígenos celulares con valor pronóstico en pacientes con LLC

Los enfermos con LLC evolucionan de forma heterogénea. Así, hay pacientes que sucumben en pocos años por causas relacionadas con la enfermedad, mientras que en otros la presencia de LLC no va a conllevar una esperanza de vida diferente de la de la población general. El estadio clínico permite identificar los pacientes que requieren tratamiento de aquellos que deben ser inicialmente observados sin tratamiento². La clasificación por estadios clínicos no permite identificar aquellos enfermos que progresarán, a pesar de que en la actualidad la mayoría de los pacientes se diagnostican en estadios precoces. Se han identificado diferentes factores biológicos que permiten evaluar el riesgo de progresión de los pacientes, que incluyen desde parámetros séricos simples de realizar como la beta-2 microglobulina hasta el complejo análisis del estado mutacional de IgVH².

La identificación del estado mutacional de IgVH como predictor de la evolución de los pacientes con

LLC supuso una revolución en el campo de la LLC, ya que permitía, mediante la determinación de un solo parámetro de laboratorio, dividir a los pacientes en dos grupos de supervivencia muy diferente¹⁰. Desgraciadamente, la dificultad técnica del estudio motivó que sólo una proporción de pacientes pudiera acceder a este factor pronóstico. El análisis de las características biológicas asociadas al estado mutacional de IgVH puso de manifiesto que en la mayoría de los pacientes del grupo de mal pronóstico los linfocitos de LLC expresaban la ectoenzima CD38 (Figura 3). Para realizar el análisis de CD38 se recomienda el empleo de sangre periférica, ya que la expresión de CD38 es superior en médula ósea o ganglio linfático¹¹, y el uso simultáneo de anticuerpos que permitan identificar los linfocitos leucémicos de los linfocitos T, NK y B normales, que también pueden ser CD38 positivos. El punto de corte que permite dividir a los pacientes ha sido motivo de controversia¹². Las primeras descripciones utilizaron un valor del 30%, pero diversos autores sugieren que la presencia de población de LLC con expresión de CD38 ya es indicativo de mal pronóstico.

El análisis de expresión génica comparando pacientes afectos de LLC con mutaciones de IgVH o sin ellas puso de manifiesto un grupo de genes diferencialmente expresados, entre los que se encontraba la proteína ZAP70. Esta proteína se crea restringida a linfocitos T y NK, donde ejerce funciones de activación y proliferación tras la estimulación. Posteriormente se ha demostrado que es necesaria para la maduración de los linfocitos B y que se expresa en estadios inmaduros de diferenciación B. La proteína ZAP70 se expresa en la mayoría de los pacientes del subgrupo sin mutaciones en IgVH y se sugirió que permitiría identificar de forma más simple a estos pacientes¹³. Estudios posteriores parecen indicar que ZAP70 sería un mejor indicador de la evolución de los pacientes que el estado mutacional de IgVH¹⁴. El marcaje de ZAP70 es intracitoplasmático y requiere la utilización de marcadores que nos permitan discriminar los linfocitos T y NK, que expresan altos niveles de ZAP70 (Figura 3). La citometría de flujo parece una técnica muy indicada para su análisis, ya que permite valorar la expresión de dicha proteína en cada una de las subpoblaciones linfoides sin necesidad de purificación física de los linfocitos leucémicos. Las clonas de anticuerpo más empleadas en estudios clínicos son el 2F3.2 y el 1E7.2 mediante marcaje indirecto o anticuerpos marcados con Alexa 488 y no siendo recomendado el empleo de conjugados con ficocitrina¹². El valor de corte del 20% es el más empleado^{13,14}. Dada la importancia de la determinación de ZAP70, se han realizado esfuerzos de estandarización del marcaje, del análisis y de los resultados entre laboratorios¹⁵, aunque no se ha establecido un método de análisis consensuado.

El marcador con valor pronóstico de más reciente descripción en pacientes afectos de LLC, cuyo análisis se realiza por citometría de flujo, es CD49d¹⁶. Esta molécula forma parte de la familia de las integrinas de membrana y tiene un importante papel en la regulación y anidamiento de los linfocitos B en los órganos linfoides. De forma similar a las proteínas descritas anteriormente, se recomienda un estudio multiantigénico para determinar la expresión de CD49d de los linfocitos de LLC. Se desconoce la estabilidad de la expresión de esta molécula durante la evolución de los pacientes, y es necesario un mayor número de series para establecer el papel de este marcador en relación con otros factores pronósticos.

Determinación de enfermedad residual como indicador pronóstico de la evolución

En los últimos años se ha asistido a la introducción de nuevos fármacos que se han demostrado eficaces en el tratamiento de la LLC de manera que hoy día la admi-

nistración de regímenes poliquimioterápicos o el uso de inmunoterapia permite inducir la remisión completa en un porcentaje significativo de pacientes con LLC. El análisis de la enfermedad residual ha permitido demostrar que el curso evolutivo de los pacientes que alcanzan la remisión clínica completa según los criterios de National Cancer Institute de 1996⁴ pero con evidencia de enfermedad residual es igual a la de los que consiguen una remisión parcial, y que el pequeño porcentaje de pacientes en remisión parcial sin evidencia de enfermedad residual negativa siguen una evolución similar a la de los que consiguen la remisión clínica completa sin enfermedad residual negativa¹⁷. Ello pone de manifiesto que la ausencia de enfermedad residual tras tratamiento es un factor de buena evolución clínica, y actualmente se está analizando si supone un beneficio para los enfermos erradicar la enfermedad residual.

En pacientes tratados, en primera o sucesivas líneas, con esquemas de poliquimioterapia, inmunoterapia, tratamientos combinados o trasplante autólogo de precursores hematopoyéticos, la presencia de enfermedad residual tras tratamiento se asocia a un mayor riesgo de recaída (revisado en Sayala *et al.*¹⁷) (Figura 4). Además, la reaparición de enfermedad residual precede temporalmente a la recaída clínica. En cambio, en pacientes sometidos a trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos el efecto negativo de la detección de enfermedad residual es más difícil de valorar por el efecto injerto contra la leucemia.

La determinación de enfermedad residual en pacientes con LLC se realiza mediante técnicas de citometría de flujo o de biología molecular. La sensibilidad que se obtiene con dichas técnicas oscila entre 1% y el 0,01%, según el diseño de las mismas. Centrándonos en la citometría de flujo, la detección de enfermedad residual únicamente por doble marcaje con CD19 y CD5 es poco sensible y puede inducir a falsos positivos y negativos. El empleo de cuatro anticuerpos simultáneos para la detección de los linfocitos leucémicos mejora la sensibilidad de detección hasta el 0,01%. Como se ha mencionado anteriormente, los linfocitos de LLC difieren de los linfocitos normales en la expresión de muchos anticuerpos de membrana. Este hecho ha conllevado que cada grupo utilizara para la detección de enfermedad residual combinaciones de anticuerpos diferentes, que pueden diferir en especificidad y sensibilidad. Para poder comparar los resultados de los diferentes esquemas terapéuticos es necesario disponer de un ensayo de cuantificación de enfermedad residual reproducible entre los diversos laboratorios. Por este motivo, y bajo el auspicio de la European Research Initiative on CLL, se realizó un trabajo cooperativo internacional para la estandarización de la detección de enfermedad residual en la LLC¹⁸ (Figura 4). Tras la estandarización se dispone de combinaciones de anticuerpos

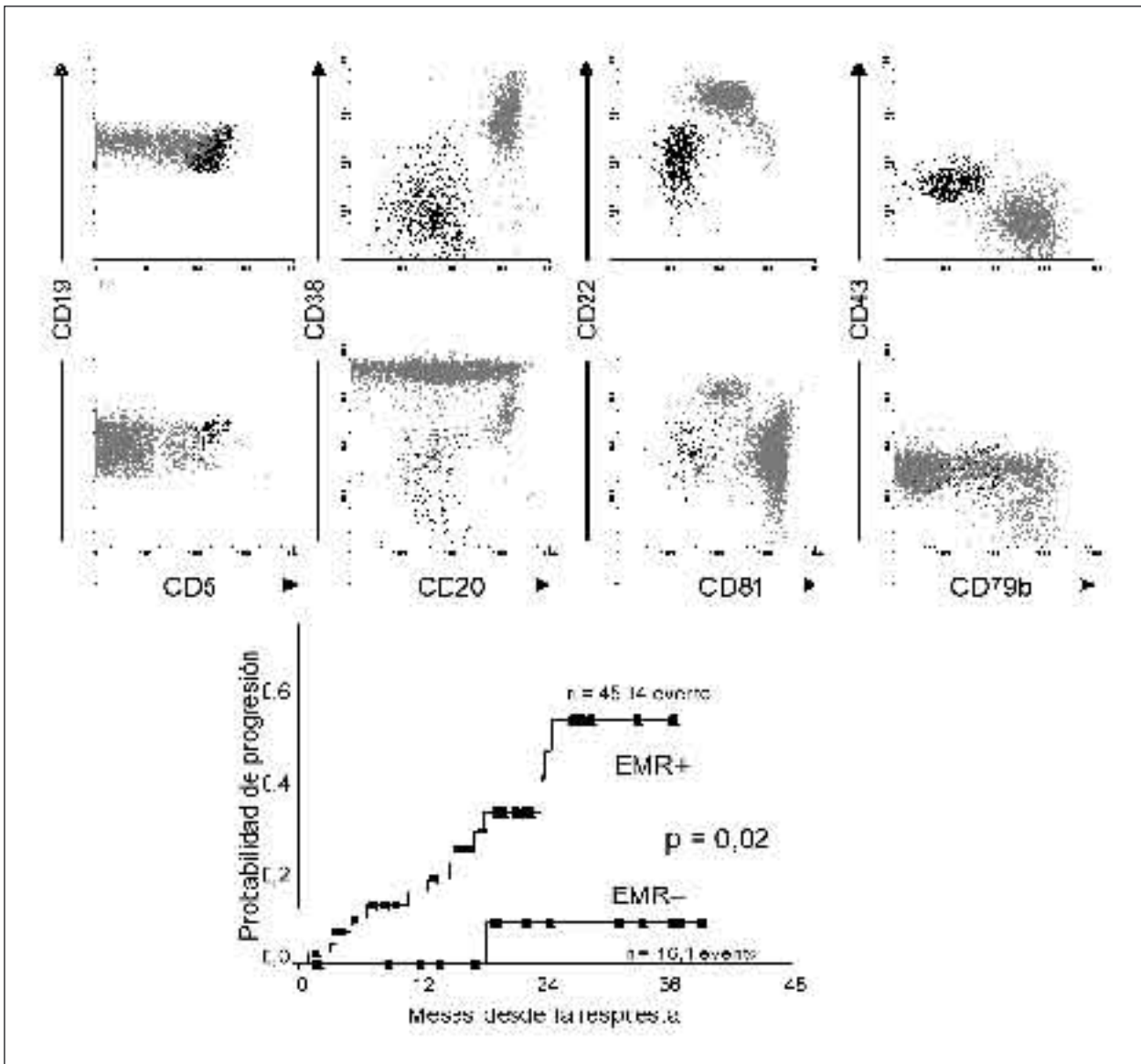


Figura 4. Cuantificación de enfermedad residual mínima y evolución de los pacientes. En los gráficos bidimensionales se muestra el panel estandarizado para la detección de enfermedad mínima residual utilizando una muestra de sangre periférica (panel superior) y médula ósea (panel inferior). La discriminación entre los linfocitos B normales (gris) y residuales de LLC (negro) no es óptima cuando se analiza sólo CD19 vs. CD5 (paneles izquierdos). En el resto de los gráficos se observa que la población de LLC se sitúa en espacios no ocupados por linfocitos B maduros o precusores (CD38⁺⁺⁺ CD20^{débil} CD81⁺⁺⁺ CD22^{débil}). En la gráfica inferior se muestra cómo la probabilidad de progresión después de tratamiento con poliquimioterapia de tipo FCM es más elevada si detecta persistencia de LLC (EMR+) comparado con los enfermos en los que se erradica la enfermedad (EMR-).

que permiten cuantificar la enfermedad residual en sangre periférica y médula ósea en el 100% de los pacientes con LLC de fenotipo típico, incluso en pacientes tratados con rituximab, con una sensibilidad de detección establecida, con poca variabilidad interlaboratorio en los valores bajos de enfermedad, que proporciona un análisis de la calidad de la muestra y del nivel de sensibilidad del ensayo y que aconseja cómo realizar el informe de resultados.

Citometría de flujo en la evaluación de la respuesta clínica

La IWCLL ha modificado también los criterios para definir la respuesta tras tratamiento, en las dos vertientes, asistencial y de ensayo terapéutico (Tabla 1). La definición de remisión completa en pacientes tratados asistencialmente incluye demostrar la ausencia de linfocitos B clonales por citometría convencional

en sangre. Para enfermos tratados con protocolos terapéuticos la definición de remisión completa precisa un estudio de citometría de flujo negativo también en médula ósea. Además, para este grupo de enfermos, incorpora la categoría de remisión completa con enfermedad residual negativa. Para esta categoría se precisa la realización de estudios con una sensibilidad de detección 0,01% mediante citometría de flujo multiantigénica (como mínimo cuatro antígenos simultáneos) o PCR (*polymerase chain reaction*) aleloespecífica. Excepto en enfermos que han recibido tratamiento con anticuerpos monoclonales en un periodo inferior a los tres meses, el análisis de enfermedad residual puede realizarse en muestras de sangre periférica².

Conclusiones y consideraciones finales

El estudio fenotípico es una herramienta imprescindible para el diagnóstico de la leucemia linfática crónica, ya que esta entidad tiene un fenotipo característico (CD5+ CD23+ CD43+ CD10- FMC7- con expresión débil de inmunoglobulinas de superficie, CD20, CD22 y CD79b). En los casos con fenotipo atípico, la morfología, citogenética y –sobre todo–, la histología ganglionar serán necesarias para establecer el diagnóstico. El análisis por citometría de flu-

jo de CD38, ZAP70 y CD49d permite identificar pacientes con LLC de mayor riesgo de progresión. Para su estudio es necesario un estudio multiparamétrico que permita analizar dichas proteínas en la población de LLC, ya que las otras subpoblaciones de linfocitos pueden expresar dichos antígenos. Finalmente, la presencia de enfermedad residual tras tratamiento indica un elevado riesgo de recaída. La citometría de flujo es ahora un requisito indispensable para valorar la respuesta clínica tras tratamiento. En la práctica clínica asistencial no deben detectarse linfocitos B clonales por métodos convencionales en sangre para considerar que el enfermo está en remisión completa. En pacientes incluidos en ensayos terapéuticos, la médula ósea debe estar también libre de linfocitos B clonales para ser catalogados de remisión completa. La remisión completa con enfermedad residual negativa requiere la utilización de técnicas de sensibilidad del 0,01%. La necesidad de poder comparar los resultados de los distintos protocolos terapéuticos ha conllevado al diseño y la estandarización de un método de citometría de flujo aplicable al 100% de los pacientes con LLC típica y con una sensibilidad de 0,01%.

Bibliografía

- Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (eds.). World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press; 2001.
- Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (IWCLL) updating the National Cancer Institute-Working Group (NCI-WG) 1996 guidelines. *Blood* 2008; 111 (12): 5446-56.
- Shanafelt TD, Kay NE, Call TG, Zent CS, Jelinek DF, Laplant B, et al. MBL or CLL: which classification best categorizes the clinical course of patients with an absolute lymphocyte count $\geq 5 \times 10^9/L$ but a B-cell lymphocyte count $< 5 \times 10^9/L$? *Leuk Res* 2008; 32 (9): 1458-61.
- Cheson BD, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, O'Brien S, Rai KR. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 1996; 87: 4990-7.
- Deneys V, Mazzon AM, Marques JL, Benoit H, De BM. Reference values for peripheral blood B-lymphocyte subpopulations: a basis for multiparametric immunophenotyping of abnormal lymphocytes. *J Immunol Methods* 2001; 253: 23-36.
- Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, Morilla AM, Morilla RM, Owusu-Ankomah KA, et al. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol* 1997; 108: 378-82.
- Matutes E, Oscier D, García-Marco J, Ellis J, Copplestone A, Gillingham R, Hamblin T, et al. Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. *Br J Haematol* 1996; 92: 382-8.
- Sembries S, Pahl H, Stilgenbauer S, Dohner H, Schriever F. Reduced expression of adhesion molecules and cell signaling receptors by chronic lymphocytic leukemia cells with 11q deletion. *Blood* 1999; 93: 624-31.

Tabla 1. Utilización de la citometría de flujo en el manejo de pacientes con LLC

Diagnóstico
· Linfocitosis B clonal $> 5 \times 10^9/L$ más de 3 meses
· Clonalidad demostrada por citometría de flujo
· Fenotipo característico CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD23 ⁺ CD20 ^{+débil} CD22 ^{+débil} IgS ^{+débil} CD79b ^{+débil}
Diagnóstico diferencial
Con morfología o fenotipo atípico se requieren pruebas adicionales
Evaluación de la respuesta
Remisión completa en tratamiento asistencial
Ausencia de linfocitos B clonales en sangre por método convencional
Remisión completa en ensayo terapéutico
Ausencia de linfocitos B clonales en sangre y médula ósea por método convencional
Remisión completa con enfermedad residual negativa en ensayo terapéutico
Ausencia de linfocitos de LLC con métodos de alta sensibilidad (0,01%)
Indicadores pronósticos en la LLC
Al diagnóstico (expresión en los linfocitos leucémicos)
· CD38
· ZAP70
· CD49d
Postratamiento
Detección de enfermedad mínima residual

9. Damle RN, Ghiotto F, Valetto A, Albesiano E, Fais F, Yan XJ, et al. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood* 2002; 99: 4087-93.
10. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 1840-7.
11. Jaksic O, Kardum Paro MM, Kardum S, I, Kusec R, Pejsa V, Jaksic B. CD38 on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells has higher expression in lymph nodes than in peripheral blood or bone marrow. *Blood* 2004; 103: 1968-9.
12. Hamblin TJ. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007; 20: 455-68.
13. Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2003; 348: 1764-75.
14. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, Chen L, Keating MJ, Gribben JG, et al. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2004; 351: 893-901.
15. Letestu R, Rawstron A, Ghia P, Villamor N, Leuven NB, Boettcher S, et al. Evaluation of ZAP-70 expression by flow cytometry in chronic lymphocytic leukemia: a multicentric international harmonization process. *Cytometry B Clin Cytom* 2006; 70: 309-14.
16. Gattei V, Bulian P, Del Principe MI, Zucchetto A, Maurillo L, Buccisano F, et al. Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008; 111: 865-73.
17. Sayala HA, Rawstron AC, Hillmen P. Minimal residual disease assessment in chronic lymphocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007; 20: 499-512.
18. Rawstron AC, Villamor N, Ritgen M, Bottcher S, Ghia P, Zehnder JL, et al. International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 2007; 21: 956-64.

CITOGENÉTICA Y TECNOLOGÍA DE MICROARRAYS EN EL ESTUDIO DE LA LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA

A. RODRÍGUEZ¹, J.Á. HERNÁNDEZ²,
J.L. GARCÍA¹, R. BENITO¹, M. AREFI³,
M. GONZÁLEZ³, N.C. GUTIÉRREZ³,
J.M. HERNÁNDEZ^{1,3}

¹Centro de Investigación del Cáncer. IBMCC.
Universidad de Salamanca-CSIC.

²Servicio de Hematología. Hospital Infanta Leonor. Madrid.

³Servicio de Hematología. Hospital Universitario.
Salamanca.

Introducción

La leucemia linfática crónica (LLC) es una hemopatía maligna con una heterogeneidad clínica manifiesta, fundamentalmente debido a las características genéticas de sus células¹⁻⁴. Los sistemas de estadificación

clínica constituyen los índices más utilizados en la práctica para establecer el pronóstico. Sin embargo, no pueden predecir el curso individual de los pacientes en estadios iniciales. En los últimos años se han producido avances en el conocimiento de la patogenia y de las alteraciones moleculares de la LLC, que han definido nuevos factores pronósticos bioquímicos (beta-2 microglobulina, timidina quinasa sérica, niveles de IL-6 e IL-10), antigénicos (CD38, ZAP70) y citogenético-moleculares⁵⁻⁸. Entre éstos, cabe destacar las alteraciones citogenéticas estudiadas mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH: *fluorescent 'in situ' hybridation*)^{7,9-11}, que identifican grupos con pronóstico favorable (13q-) y desfavorable (11q- y 17p-), y el estudio de las mutaciones somáticas en la región variable del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgV_H), que han puesto de manifiesto que los pacientes con mutaciones somáticas presentan características clínico-citogenéticas y pronósticas favorables^{8,12}. Aun así, la importancia clínica de estas alteraciones presenta controversias, ya que un 10% de los enfermos con 11q- o con 17p- presentan patrón mutado, mientras que hasta un 50% de los pacientes con 13q- no lo tienen. Además, quedan por definir aspectos pronósticos de las LLC con algunas alteraciones menos frecuentes, como las que afectan a 14q32¹³.

En los últimos años, la secuenciación del genoma humano y los avances en la informática y robótica han producido una revolución en la genética. La conjunción de estas tres metodologías ha desarrollado la tecnología de *microarrays*, que permite analizar simultáneamente miles de genes. Dentro de los estudios de biochips se incluyen los *microarrays* de expresión¹⁴ y los *arrays* genómicos o CGH-*arrays*¹⁵. En la LLC se ha comenzado a obtener resultados, aún preliminares, que indican que algunos de los genes que se alteran con mayor frecuencia se localizan en las regiones cromosómicas donde existen las aberraciones cromosómicas. Sin embargo, los datos que relacionan las alteraciones genéticas determinadas mediante FISH o el estado mutacional con los resultados de *arrays* no son aún muy consistentes.

Citogenética y FISH

Los estudios mediante citogenética convencional son poco rentables en las LLC porque los cariotipos suelen ser normales. Las alteraciones observadas fundamentalmente son pérdidas en 11q y la trisomía del cromosoma 12¹⁶. Sin embargo, algunos estudios recientes sugieren que el uso de oligonucleótidos como factores estimulantes puede aumentar el número de metafases clonales en la LLC¹⁷. A pesar de ello, en la actualidad, el estudio mediante citogenética convencional en la LLC está en entredicho porque los estu-

Tabla 1. Incidencia de alteraciones genómicas y del estado mutacional de IgVH en diversas series de enfermos con LLC-B

Estudio	13q-	13q-, única alteración	11q-	+12	17p-	Patrón no mutado	Patrón mutado
Dohner et al.	55%	36%	18%	16%	7%	56%	44%
CLL1*	59%	40%	10%	13%	4%	41%	59%
CLL4*	53%	34%	21%	11%	3%	69%	31%
CLL3*	52%	27%	22%	12%	3%	68%	32%
CLL2*	48%	14%	32%	18%	27%	81%	19%
HUS**	47%	37%	9%	12%	4%	44%	56%

CLL1: pacientes no tratados en estadio A de Binet sin indicación clásica de tratamiento (Grupo Alemán de Estudio de la LLC); CLL2: pacientes refractarios a fludarabina con indicación de tratamiento incluidos en un ensayo clínico de alemtuzumab subcutáneo (Grupo Alemán de Estudio de la LLC); CLL3: pacientes menores de 60 años con estadio B y C de Binet que, como máximo, habían recibido una línea de tratamiento previo y que se incluyeron en un ensayo clínico de radioquimioterapia mieloablativa seguida de autotrasplante (Grupo Alemán de Estudio de la LLC); CLL4: pacientes menores de 65 años con estadios B y C de Binet con indicación de tratamiento, incluidos en el ensayo clínico aleatorizado fludarabina vs. fludarabina + ciclofosfamida (Grupo Alemán de Estudio de la LLC).

* Parcialmente modificado de Seiler et al.⁽⁴³⁾.

** 350 pacientes con LLC-B analizados en el Hospital Universitario de Salamanca (HUS) procedentes de varios hospitales españoles.

diagnósticos de FISH permiten demostrar la presencia de clonalidad en la mayoría de los enfermos con LLC. Hace varios años se publicó una serie numerosa de enfermos en los que se analizaron las alteraciones genéticas por FISH, las cuales se correlacionaron con la supervivencia⁷. Tras utilizar un panel de 8 sondas, se observó que el 82% de los pacientes presentaban alteraciones cromosómicas, algunas de las cuales tenían relevancia pronóstica. Los cambios más frecuentes eran la pérdida de 13q14 (13q-), seguidos de la pérdida de 11q22-23 (11q-), la trisomía del cromosoma 12 (+12), la delección de 17p13 (17p-) y la delección de 6q21 (Tabla 1). Cabe destacar que sólo el 18% de los enfermos no tenían alteraciones por FISH y que un tercio de los pacientes tenían dos o más alteraciones citogenéticas. La supervivencia de los pacientes con 17p- o con 11q- fue más corta que los casos que tenían +12 o citogenética normal, mientras que las LLC con 13q- lograban la supervivencia más prolongada. Además, los enfermos con 17p- presentaban el menor intervalo de tiempo hasta el primer tratamiento (9 meses), mientras que en los que tenían 13q- dicho periodo era el más prolongado de todos los grupos estudiados (92 meses). Las alteraciones genéticas tenían valor pronóstico independiente: los pacientes con 17p- tenían una tasa de riesgo 8 veces mayor respecto al resto de enfermos, mientras que en los que presentaban 11q- la tasa de riesgo era algo inferior a 3.

Algunas de las alteraciones citogenéticas se relacionan con características de la enfermedad: así, los pacientes con 11q- o con trisomía del cromosoma 12 suelen tener linfadenopatía marcada⁷, mientras que los que presentan 17p- no suelen responder a los tratamientos habituales, entre ellos a la fludarabina¹⁸. Estos resultados, así como el valor pronóstico de las alteraciones citogenéticas, han sido reproducidos por varios grupos, incluido

el nuestro (Figura 1)^{16,19,20}. Aun así, quedan algunos aspectos por aclarar como, por ejemplo, la importancia de incluir la determinación de IGH en el estudio molecular de la LLC, ya que un estudio reciente demuestra que los pacientes con LLC y reordenamientos de IGH presentan un pronóstico intermedio/adverso²¹.

El estado mutacional de IgV_H y las principales alteraciones citogenéticas separan dos grupos fundamentales a nivel pronóstico, lo que indica una correlación entre ellos (Tabla 1). Así, las alteraciones de curso desfavorable, 17p- y 11q-, se observan con mayor frecuencia en los casos de LLC que muestran un patrón no mutado, mientras que los casos mutados son más frecuentes en los pacientes con 13q-, bien como única alteración o en combinación con otras. Aun así, alrededor de dos terceras partes de los casos no mutados no presentan alteraciones de mal pronóstico, lo que indica el valor independiente del patrón mutacional y una influencia diferencial de este factor de riesgo^{12,22}.

Debido a ello, se deben seguir investigando nuevos marcadores, como la relación entre la sobreexpresión del gen *Vav* en los pacientes con LLC y delección de 13q²³, la lipoproteinlipasa²⁴, o el estudio de nuevos genes candidatos, que añadan información pronóstica a la predicción del riesgo en este grupo de pacientes²⁵⁻²⁷.

El uso de las nuevas herramientas de estudio genético en la LLC

El transcriptoma de la LLC

El análisis de la expresión génica mediante *microarrays* de ARN ha permitido en los pacientes con leucemia mejorar el proceso diagnóstico y la clasificación de

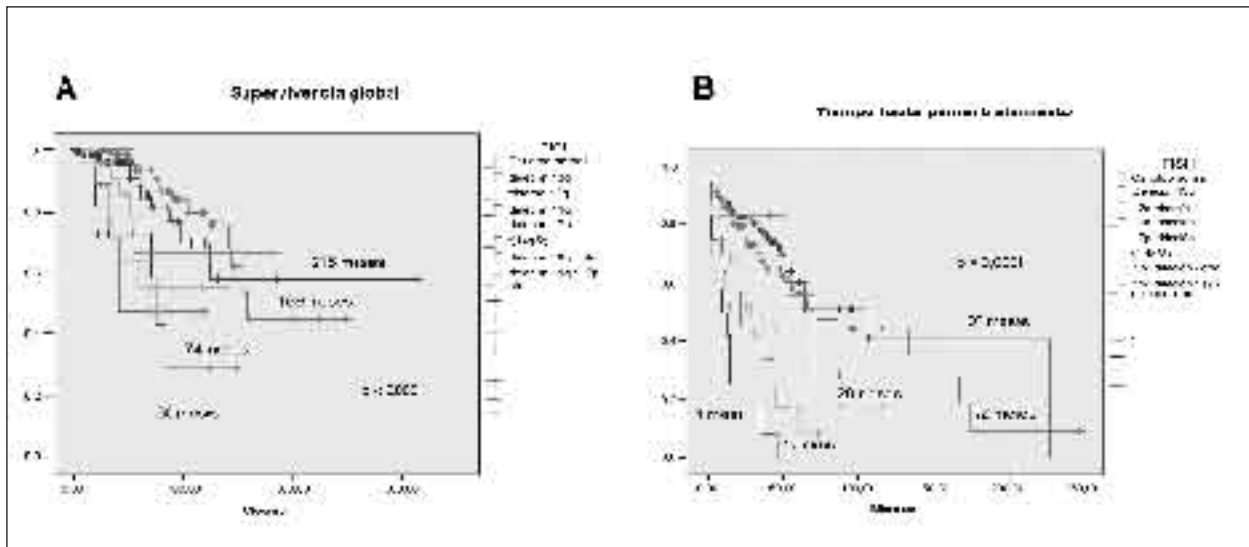


Figura 1. A: supervivencia global de 350 pacientes de LLC-B. B: tiempo hasta el primer tratamiento de 350 enfermos con LLC-B.

estas neoplasias. En el caso de la LLC, estos análisis revelan la existencia de una firma molecular única, a pesar de la heterogeneidad clínica de la enfermedad. Este perfil característico la diferencia del resto de las enfermedades linfoproliferativas de tipo B y parece estar más próximo al de linfocitos B de memoria que al de células B *naïve*, CD5+, y las células del centro germinal²⁸. Esta “firma genética” incluye genes característicos de la LLC como *CD5*, *IL2RA* (*CDC25*) y *Bcl2*, pero también otros cuya expresión se desconocía en esta enfermedad, como *WNT3* y *ROR1*. Muchos de los genes sobreexpresados están implicados en rutas de transducción de señales. Así, *CDC25* es un intercambiador de nucleótidos de guanina en la ruta de Ras, mientras que *EPAC* desempeña un importante papel en la señalización de la vía de Rap y se relaciona con oncogénesis. Los receptores de superficie que se sobreexpresan en la LLC (por ejemplo, el receptor para *ROR1* o para tromboxano A2) son dianas terapéuticas potenciales. Los genes infraexpresados están involucrados en la progresión del ciclo celular y en la replicación del ADN y metabolismo (*CDC2*, ciclina B, timidina quinasa, topoisomerasa IIa, dihidrofolato reductasa), lo que sugiere un fenotipo quiescente. El perfil de expresión de la LLC también se diferencia de otras enfermedades hematológicas como el mieloma múltiple o la macroglobulinemia de Waldenström²⁹. Aunque se ha demostrado que, independientemente de la presencia o ausencia de mutación en IgV_H, todos los pacientes con LLC comparten un perfil génico común, las diferencias clínicas entre estos dos subgrupos sugieren que deben existir diferencias a nivel biológico. Por eso se han realizado estudios comparativos atendiendo al es-

tado mutacional y se ha observado una asociación entre el patrón de mutación y la expresión diferencial de genes como *ZAP70*, *ciclina D2*, *HPRT*, *GFI-1*, *adenilato quinasa 2*, *ILK*, *CTP-sintetasa* o *FGFR1* (todos sobreexpresados en el subgrupo no mutado)³⁰⁻³². Nuestro grupo también ha demostrado que los dos subgrupos (mutado y no mutado) presentaban un perfil de expresión distinto. Los enfermos sin mutación somática presentaban cambios en la expresión de 80 genes, la mayoría sobreexpresados y relacionados con angiogénesis (*ANGPT2*) y proliferación celular (*ZAP70*, *SMAD3*, *CSNK2A1*), lo que podría correlacionarse con una mayor agresividad clínica de este subgrupo (Figura 2). También se ha descrito una correlación en la expresión de genes implicados en la señalización por BCR en los casos no mutados. Este hallazgo sugiere que la estimulación de los linfocitos a través de BCR puede ser importante en la patogénesis de la LLC, por lo que esta ruta y la regulación del **factor de transcripción nuclear** (NF-κB) pueden ser los mayores determinantes de la supervivencia celular en la LLC³³.

Estudio de la LLC mediante ‘arrays’ de CGH

Los *arrays* genómicos, o CGHa (*comparative genomic hybridization arrays*), permiten estudiar el global del genoma mediante la identificación de las ganancias y de las pérdidas del material tumoral. Esta técnica combina la metodología de los *arrays* con la hibridación genómica comparada (HGC), pero en este caso la hibridación se realiza sobre segmentos de ADN de pequeño tamaño, clonados en cromosomas

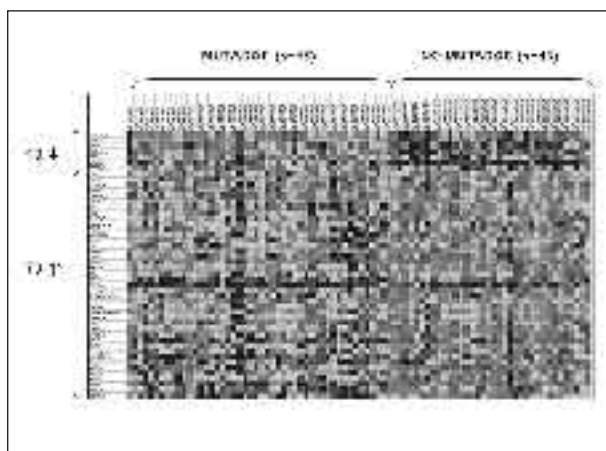


Figura 2. Perfil de expresión génica en pacientes con LLC.

Comparación entre los enfermos con mutaciones somáticas de IGH y los no mutados. Se observan diferencias en la expresión de 80 genes de los que 10 están infraexpresados en las LLC-B mutadas.

artificiales bacterianos (BAC: *bacterial artificial chromosome*) o plasmídicos (PAC: *P1-derived artificial chromosome*), respectivamente). Estos segmentos de ADN son secuencias genómicas cuya localización es conocida en base a los datos aportados por el Proyecto Genoma Humano. Los CGHa se aplicaron por primera vez en cáncer al estudio de las LLC: se comprobó que, junto con los cambios ya conocidos en esta enfermedad, había afectación de otras regiones como 2p24 o el cromosoma 19³⁴.

En nuestro grupo hemos elaborado un CGHa con resolución de 1 megabase que contiene aproximadamente 3.500 sondas que representan todo el genoma humano y los genes implicados en tumores. En la LLC los análisis preliminares corroboran los datos obtenidos por FISH. En el 71% de los enfermos analizados había alteraciones génicas, y las más frecuentes eran las ganancias en 1p/1q (24%), 22q (24%) y 16q, 20q y 21q (22%), mientras que las pérdidas se observaron en 3q (22%), 2p (19%) y 4q y 14q (17%). El grupo de pacientes con mutación somática de IgV_H no presentaba un perfil diferente de alteraciones genómicas. En el grupo de enfermos con trisomía del cromosoma 12, estudiada por FISH, se observó una ganancia que afectaba no al cromosoma completo, sino a una región circunscrita a 12q12-q24, en la que se localizan los genes que están sobreexpresados por *microarrays* de expresión, tales como *LEMD3* y *CAND1* (implicados en proliferación celular), *MARS* (transcripción) y *DIRK4* (ciclo celular), lo que confirma un efecto de dosis génica³¹.

Los polimorfismos de nucleótido único (SNP: *single nucleotide polymorphism*) son variaciones naturales de la secuencia del genoma debidas a sustituciones

de una base. Los *arrays* de SNP son una nueva herramienta que puede detectar cambios en el número de copias, así como regiones con pérdida de heterocigosidad (LOH: *low of heterozygosity*) en todo el genoma con una resolución muy alta. Aunque es una tecnología desarrollada recientemente, ya se ha aplicado para el estudio de muchas enfermedades, entre ellas la LLC. Las regiones alteradas son similares a las observadas en los *arrays* de CGH y los resultados obtenidos deben refrendarse en series más amplias³⁵⁻³⁷. En algunos trabajos se ha asociado la presencia de muchos cambios génicos con un menor tiempo hasta el tratamiento³⁸ y se han descrito genes asociados con mayor susceptibilidad a padecer LLC³⁹.

Los miRNA en la LLC

Los micro-RNA (miRNA) son RNA de pequeño tamaño (22 nucleótidos), que modulan la expresión de genes a nivel postranscripcional. Estas moléculas se hallan implicadas en el cáncer, en la apoptosis y en el metabolismo celular. Se han identificado más de 400 miRNA en el genoma humano. La expresión de los miRNA se ha estudiado también mediante *microarrays*. La primera relación que se estableció entre miRNA y cáncer fue estudiada en enfermos con LLC, donde se observó una pérdida del clúster miR-15/16-1, que se encuentra en 13q14.3, concretamente entre los exones 4 y 5 del gen *DLEU2*⁴⁰, así como una sobreexpresión de los miRNA-21 y miRNA-155. También se han identificado un grupo de 13 miRNA cuya expresión se correlaciona con parámetros biológicos de relevancia, fundamentalmente con el estado mutacional de IgV_H, la expresión de *ZAP70* y la progresión de la enfermedad^{41,42}.

En resumen, la genética molecular está permitiendo un mejor conocimiento de los factores pronósticos relacionados con la LLC-B, por lo que es obligado realizar estudios moleculares en esta entidad. Son necesarias nuevas series que confirmen los resultados obtenidos, así como la correlación de los estudios citogenéticos "clásicos" y el patrón mutacional de IgV_H con los datos obtenidos en los perfiles de expresión mediante *microarrays* de ARN. Es posible que, en un futuro próximo, la citogenética molecular aporte nueva información que contribuya a un mejor conocimiento de esta enfermedad.

Agradecimientos

Trabajo parcialmente subvencionado con Becas de Investigación del SACYL (106/A/06); "Ayuda predoctoral FIS de formación en investigación" (AR), F106/00126; Fondo Caja de Burgos de Investigación Clínica y Redes de Investigación RTIIC (FIS). Agra-

decemos a Eva Lumbreras, Cristina Robledo, Teresa Prieto, María Pozo, M. Ángeles Hernández, Ana Simón, Ana Díez, Almudena Prieto, Irene Rodríguez y Sara González su asistencia técnica.

Bibliografía

- Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 1995; 333: 1052-7.
- Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; 352: 804-15.
- Carney DA, Wierda WG. Genetics and molecular biology of chronic lymphocytic leukemia. *Curr Treat Options Oncol* 2005; 6: 215-25.
- Guipaud O, Deriano L, Salin H, Vallat L, Sabatier L, Merle-Beral H, et al. B-cell chronic lymphocytic leukaemia: a polymorphic family unified by genomic features. *Lancet Oncol* 2003; 4: 505-14.
- Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2003; 348: 1764-75.
- Hus I, Podhorecka M, Bojarska-Junak A, Rolinski J, Schmitt M, Sieklucka M, et al. The clinical significance of ZAP-70 and CD38 expression in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Ann Oncol* 2006; 17: 683-90.
- Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; 343: 1910-6.
- Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, Chen L, Keating MJ, Gribben JG, et al. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2004; 351: 893-901.
- Kearney L, Horsley SW. Molecular cytogenetics in haematological malignancy: current technology and future prospects. *Chromosoma* 2005; 114: 286-94.
- Goorha S, Glenn MJ, Drozd-Borysiuk E, Chen Z. A set of commercially available fluorescent in-situ hybridization probes efficiently detects cytogenetic abnormalities in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Genet Med* 2004; 6: 48-53.
- Reddy KS. Chronic lymphocytic leukaemia profiled for prognosis using a fluorescence in situ hybridisation panel. *Br J Haematol* 2006; 132: 705-22.
- Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 1848-54.
- Nowakowski GS, Dewald GW, Hoyer JD, Paternoster SF, Stockero KJ, Fink SR, et al. Interphase fluorescence in situ hybridization with an IGH probe is important in the evaluation of patients with a clinical diagnosis of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2005; 130: 36-42.
- Haferlach T, Kohlmann A, Schnittger S, Dugas M, Hiddemann W, Kern W, et al. Global approach to the diagnosis of leukemia using gene expression profiling. *Blood* 2005; 106: 1189-98.
- Inazawa J, Inoue J, Imoto I. Comparative genomic hybridization (CGH)-arrays pave the way for identification of novel cancer-related genes. *Cancer Sci* 2004; 95: 559-63.
- Hernández JM, Mecucci C, Criel A, Meeus P, Michaux I, Van HA, et al. Cytogenetic analysis of B cell chronic lymphoid leukemias classified according to morphologic and immunophenotypic (FAB) criteria. *Leukemia* 1995; 9: 2140-6.
- Dicker F, Schnittger S, Haferlach T, Kern W, Schoch C. Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: A study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgVH status, and CD38 expression. *Blood* 2006; 108: 3152-60.
- Dohner H, Fischer K, Bentz M, Hansen K, Benner A, Cabot G, et al. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood* 1995; 85: 1580-9.
- Cuneo A, Rigolin GM, Bigoni R, De AC, Veronese A, Cavazzini F, et al. Chronic lymphocytic leukemia with 6q shows distinct hematological features and intermediate prognosis. *Leukemia* 2004; 18: 476-83.
- Grever MR, Lucas DM, Dewald GW, Neuberger DS, Reed JC, Kitada S, et al. Comprehensive assessment of genetic and molecular features predicting outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the US Inter-group Phase III Trial E2997. *J Clin Oncol* 2007; 25: 799-804.
- Cavazzini F, Hernández JA, Gozzetti A, Russo Rossi A, De Angeli C, Tiseo R, et al. Chromosome 14q32 translocations involving the immunoglobulin heavy chain locus in chronic lymphocytic leukaemia identify a disease subset with poor prognosis. *Br J Haematol* 2008 (en prensa).
- Vasconcelos Y, Davi F, Levy V, Oppezio P, Magnac C, Michel A, et al. Binet's staging system and VH genes are independent but complementary prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3928-32.
- Prieto-Sánchez RM, Hernández JA, García JL, Gutiérrez NC, San MJ, Bustelo XR, et al. Overexpression of the VAV proto-oncogene product is associated with B-cell chronic lymphocytic leukaemia displaying loss on 13q. *Br J Haematol* 2006; 133: 642-5.
- Heintel D, Kienle D, Shehata M, Krober A, Kroemer E, Schwarzingen I, et al. High expression of lipoprotein lipase in poor risk B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2005; 19: 1216-23.
- Josefsson P, Geisler CH, Leffers H, Petersen JH, Andersen MK, Jurlander J, et al. CLLU1 expression analysis adds prognostic information to risk prediction in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007; 109: 4973-9.
- Chang CC, Lorek J, Sabath DE, Li Y, Chitambar CR, Logan B, et al. Expression of MUM1/IRF4 correlates with clinical outcome in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 100: 4671-5.
- Winkler D, Schneider C, Krober A, Pasqualucci L, Lichter P, Dohner H, et al. Protein expression analysis of chromosome 12 candidate genes in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leukemia* 2005; 19: 1211-5.
- Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Keller JL, Haddad J, Jr., Miljkovic V, et al. Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100: 2639-44.
- Gutiérrez NC, Ocio EM, de Las Rivas J, Maiso P, Delgado M, Ferriñán E, et al. Gene expression profiling of B lymphocytes and plasma cells from Waldenström's macroglobulinemia: comparison with expression patterns of the same cell counterparts from chronic lymphocytic leukemia, multiple myeloma and normal individuals. *Leukemia* 2007; 21: 541-9.
- Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RM, Yu X, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2001; 194: 1639-47.
- Haslinger C, Schweifer N, Stilgenbauer S, Dohner H, Lichter P, Kraut N, et al. Microarray gene expression profiling of B-cell chronic lymphocytic leukemia subgroups defined by genomic aberrations and VH mutation status. *J Clin Oncol* 2004; 22: 3937-49.
- Vasconcelos Y, De VJ, Vallat L, Reme T, Lalanne AI, Wanherdrick K, et al. Gene expression profiling of chronic lymphocytic leukemia can discriminate cases with stable disease and mutated Ig genes from those with progressive disease and unmutated Ig genes. *Leukemia* 2005; 19: 2002-5.
- Rodríguez A, Villuendas R, Yáñez L, Gómez ME, Díaz R, Pollan M, et al. Molecular heterogeneity in chronic lymphocytic leukemia is dependent on BCR signaling: clinical correlation. *Leukemia* 2007; 21: 1984-91.
- Schwaenen C, Nessling M, Wessendorf S, Salvi T, Wrobel G, Radlwimmer B, et al. Automated array-based genomic profiling in chronic lymphocytic leukemia: development of a

- clinical tool and discovery of recurrent genomic alterations. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101: 1039-44.
35. Sellick GS, Webb EL, Allinson R, Matutes E, Dyer MJ, Jonsson V, et al. A high-density SNP genome wide linkage scan for chronic lymphocytic leukemia-susceptibility loci. *Am J Hum Genet* 2005; 77: 420-9.
 36. Pfeifer D, Pantic M, Skatulla I, Rawluk J, Kreutz C, Martens UM, et al. Genome-wide analysis of DNA copy number changes and LOH in CLL using high-density SNP arrays. *Blood* 2007; 109: 1202-10.
 37. Ouillet P, Erba H, Kujawski L, Kaminski M, Shedden K, Malek SN. Integrated genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia identifies subtypes of deletion 13q14. *Cancer Res* 2008; 68: 1012-21.
 38. Kujawski L, Ouillet P, Erba H, Saddler C, Jakubowiak A, Kaminski M, et al. Genomic complexity identifies patients with aggressive chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008 [Epub ahead of print].
 39. Sellick GS, Goldin LR, Wild RW, Slager SL, Ressenti L, Strom SS, et al. A high-density SNP genome-wide linkage search of 206 families identifies susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007; 110: 3326-33.
 40. Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101: 11755-60.
 41. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di LG, Shimizu M, Wojcik SE, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; 353: 1793-801.
 42. Fulci V, Chiaretti S, Goldoni M, Azzalin G, Carucci N, Tavolaro S, et al. Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007; 109: 4944-51.
 43. Seiler T, Dohner H, Stilgenbauer S. Risk stratification in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 2006; 33: 186-94.

MARCADORES MOLECULARES DE LA LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA: SIGNIFICADO PRONÓSTICO

D. GONZÁLEZ DE CASTRO

Clinical Scientist. Head of Molecular Diagnostics. The Institute of Cancer Research and The Royal Marsden NHS Trust. Sutton (Surrey, Reino Unido)

Introducción

A pesar de que clásicamente la leucemia linfática crónica (LLC) se ha considerado una enfermedad indolente, la realidad es que su curso clínico es extremadamente variable y, en aquellos casos en los que el tratamiento es necesario, continúa siendo una enfermedad incurable. La mayoría de los pacientes diagnosticados de LLC suelen ser de edad avanzada (> 65 años), con una mediana de supervivencia global cercana a los 10 años. Sin embargo, algunos pacientes pueden sobrevivir más de 20 años –o fallecer debido a causas aje-

nas a la leucemia–, mientras que en otros casos la supervivencia no alcanza los 12 meses. La estadificación clínica, implantada hace 30 años, ha sido y sigue siendo utilizada para predecir el pronóstico de los pacientes con LLC^{1,2} y se continúa utilizando como criterio internacional para iniciar el tratamiento en pacientes con LLC, de modo que los pacientes con enfermedad en estadio clínico A permanecerán sin tratamiento en condiciones normales, mientras que aquellos en estadios avanzados (Binet B/C) o progresivos requerirán tratamiento. Desafortunadamente, la estadificación clínica no distingue entre aquellos pacientes en estadios precoces (Binet A) –los cuales hoy día suponen entre el 75 y el 85% del total de pacientes diagnosticados de LLC– que van a progresar en su enfermedad o que, por el contrario, tendrán un curso indolente. Otro factor pronóstico clave en LLC es el tiempo de duplicación de linfocitos (TDL), que sí puede predecir qué pacientes van a progresar y, consecuentemente, requerir tratamiento³. Sin embargo, la medición del TDL no es posible, por definición, hasta al menos varios meses después del diagnóstico inicial.

Tanto la estadificación clínica como la medición del TDL son parámetros descriptivos de la carga y la cinética tumoral. Comúnmente, se acepta que la cinética tumoral depende de factores genéticos y biológicos que, en teoría, podrían ser medidos en el momento del diagnóstico. Durante los últimos diez años, se han descrito multitud de marcadores biológicos con una influencia evidente en el pronóstico de la LLC. Algunos de ellos, como son las alteraciones cromosómicas detectadas por FISH, el estado mutacional de la región variable de los genes de las cadenas pesadas de inmunoglobulinas (*IGVH*) y la expresión de moléculas de membrana como CD38 o ZAP70, se han confirmado como factores pronósticos independientes del estadio clínico o del TDL⁴⁻⁶. Otros factores pronósticos descritos recientemente necesitan todavía ser revalidados por otros grupos y en el contexto de ensayos clínicos, antes de que puedan considerarse en la práctica clínica. A continuación revisaremos los principales marcadores moleculares con valor pronóstico en la LLC y su potencial aplicación clínica.

Mutaciones de IGVH

Durante el desarrollo linfocitario B en la médula ósea, los diferentes segmentos V, D y J de los genes de las cadenas pesadas de inmunoglobulinas (*IGH*) se reordenan para formar la región que codificará la parte variable de la molécula de inmunoglobulina (Ig). Los linfocitos vírgenes que presentan Ig de superficie migran hasta la periferia y los órganos linfoides secundarios, llegando a los centros germinales de los folículos linfocitarios, donde entran en contacto con an-

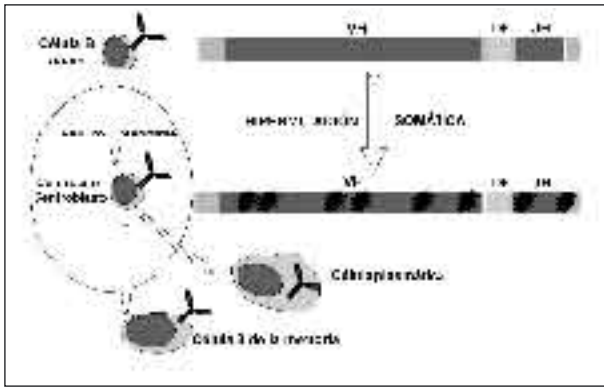


Figura 1. Esquema del proceso de hipermutación somática en el centro germinal. Los linfocitos vírgenes (naïve) llegan al centro germinal de los folículos linfoides, donde se produce el proceso de mutación somática –mutaciones en las regiones variables VDJ de los genes de Ig–. Los linfocitos así seleccionados (mutados) abandonarán los folículos linfoides para convertirse en células B de la memoria o células plasmáticas.

tígenos externos, que llevan a estos linfocitos a madurar en un proceso dependiente de células T. Parte de este proceso incluye mutaciones somáticas de los genes de las inmunoglobulinas, con el propósito teórico de aumentar la afinidad de las Ig frente al antígeno(s) que han reconocido. Los linfocitos seleccionados de esta manera –y, por tanto, con mutaciones somáticas en sus *IGVH*– evitan así el proceso de apoptosis y proliferan para proporcionar el repertorio linfoide de la memoria requerido en la respuesta inmunitaria secundaria (Figura 1).

Históricamente, la LLC se ha descrito como una proliferación de linfocitos B que no habían pasado por el centro germinal, bien linfocitos vírgenes circulantes o provenientes del manto folicular. Esto fue cuestionado al demostrarse que hasta un 50% de los casos de LLC contenían mutaciones somáticas, lo que a su vez llevó a investigar si había alguna diferencia clínica entre estos dos grupos de LLC⁷. En 1999, dos grupos independientes pusieron de manifiesto la asociación entre el nivel de mutaciones de *IGVH* y el pronóstico de los pacientes con LLC^{5,6}. Ambos trabajos demostraron que aquellos casos de LLC no mutados (LLC-NM) padecían un curso clínico más agresivo comparado con el de las LLC con mutaciones somáticas (LLC-M). En concreto: a) la incidencia de LLC-NM era mayor en estadios avanzados (B o C) que en pacientes asintomáticos (estadio A); b) los casos de LLC-NM progresaban más rápidamente (requerían tratamiento) que los LLC-M; c) los casos con LLC-NM tenían una supervivencia mucho más corta que los LLC-M^{5,6} (Figura 2). Pese a que ambos estudios eran retrospectivos y contenían un número re-

lativamente pequeño de muestras, los resultados se han confirmado posteriormente por multitud de grupos internacionales. Recientemente, estudios prospectivos ligados a ensayos clínicos han presentado datos preliminares que confirman el valor pronóstico del análisis de mutaciones de *IGVH*⁸. Hay que esperar, sin embargo, a los resultados de nuevos ensayos clínicos en los que se investigue si existe algún beneficio en tratar a las LLC-NM en estadios asintomáticos de la enfermedad. Por otra parte, no parece existir evidencia científica en relación con la respuesta al tratamiento de pacientes con LLC-NM frente a los LLC-M. Por tanto, es necesario disponer de otros factores pronósticos que ayuden a predecir la respuesta al tratamiento para la estratificación de los pacientes con LLC.

Uso de familias VH y receptores de célula B “estereotipados”

Los estudios de las mutaciones de *IGVH* en la LLC no sólo demostraron la existencia de dos grupos biológica y clínicamente distintos (LLC-NM y LLC-M), sino que también describieron una tendencia significativa de los reordenamientos de Ig a usar ciertos segmentos variables (VH) en la LLC distintos a las células B normales. De las 7 familias de segmentos VH, VH1 muestra una representación significativamente mayor respecto a células B normales CD5⁺. Esto es debido –al menos en parte– a la elevada frecuencia en el uso de un segmento en particular en la LLC, VH1-69. Después de VH1-69, los segmentos más comúnmente utilizados en la LLC son VH3-07, VH3-23 y VH4-34. El uso no aleatorio de segmentos VH en reordenamientos de *IGH* funcionales en la LLC hace pensar que éstos tienen una importancia significativa en la etiología de la enfermedad, posiblemente por estímulos antigénicos restringidos. Además, el uso de ciertos segmentos VH está asociado con los niveles de mutación, lo cual a su vez se asocia a diferente pronóstico como ya hemos visto. Por ejemplo, VH1-69 tiene un uso preferente en las LLC-NM y se ha asociado con estadios avanzados de la enfermedad y factores pronósticos desfavorables, si bien no se ha relacionado con menor supervivencia⁹, mientras que VH3-72 está casi exclusivamente representado en la LLC-M con enfermedad indolente y estable¹⁰. Un caso mucho más interesante es el uso de VH3-21, mucho más frecuente en la población escandinava y británica que en la Europa mediterránea. En los últimos años, varios estudios de diferentes grupos han demostrado que el uso de VH3-21 está asociado con un peor pronóstico en la LLC, independientemente del estado mutacional de *IGVH* en estos casos^{11,12}. Este hecho ha llevado a algunos grupos a incluir los casos de LLC con VH3-21

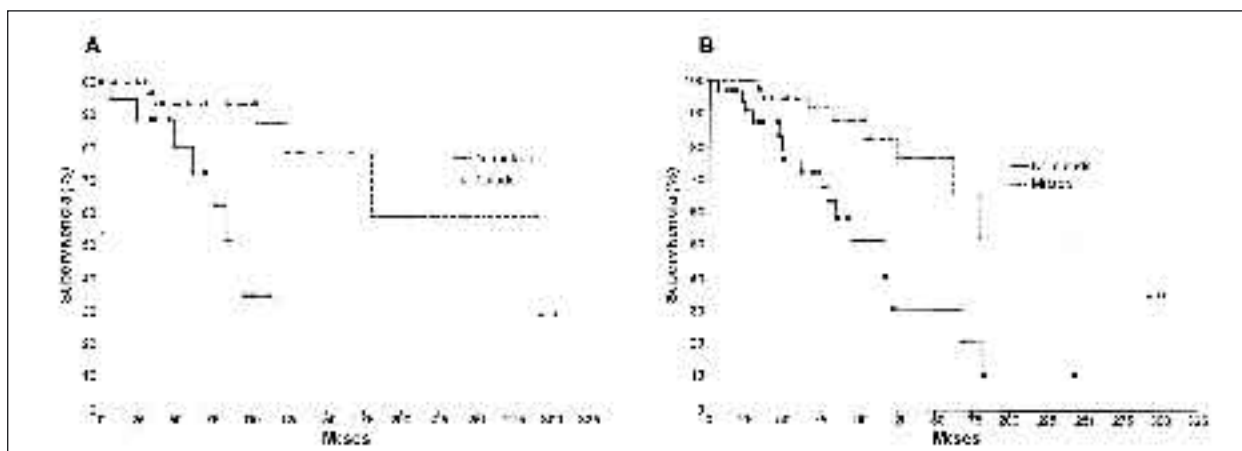


Figura 2. Supervivencia global en pacientes con LLC-NM frente LLC-M, comparada con pacientes en estadio A (A) o con pacientes en todos los estadios (B). (Adaptado de Hamblin et al.⁽⁶⁾)

(tanto LLC-M como LLC-NM) en el mismo grupo de riesgo que los LLC-NM⁸.

Todos estos datos indican que la estructura del receptor de célula B (BCR o *B-cell receptor*) está íntimamente ligada a la etiología, así como a la historia natural de la LLC. Recientemente, diferentes grupos europeos han estudiado la estructura del BCR en detalle mediante análisis de las regiones CDR3 de los genes de las inmunoglobulinas. De este modo se han identificado al menos 35 “estereotipos” de BCR, que están presentes en más del 20% de los pacientes con LLC, o del 35% de las LLC-NM o con un repertorio seleccionado (p. ej., VH1-69, VH3-21, etc.). Estos resultados sugieren que ciertas regiones de unión antigénica en la molécula de Ig pueden ser críticas para determinar el comportamiento biológico y clínico –y, por tanto, pronóstico– de la LLC¹³. Por último, también se ha descrito recientemente que el patrón de mutaciones somáticas en ciertos grupos de LLC también son “estereotipadas”¹⁴, así como el uso restringido de segmentos DH¹⁵, todo ello apoyando la hipótesis de selección antigénica en estos casos.

Perfiles de expresión génica en LLC

Los estudios de expresión génica apuntan a que la LLC-NM y la LLC-M comparten un progenitor u origen clonal común¹⁶, y algunos autores han señalado que ambos subtipos de LLC provienen de precursores de linfocitos B activados y autorreactivos¹⁷. Sin embargo, en el estudio original de expresión génica también se identificaron algunos genes que estaban diferencialmente expresados en LLC-NM frente a LLC-M¹⁶. Entre ellos destaca *ZAP70*, una importante quinasa en la señal a través del BCR, que está sobre-expresada en

LLC-NM⁴. Otros genes cuya expresión también parece estar asociada con LLC-NM han demostrado cierto valor pronóstico, como es el caso de *LPL*, *ADAM29*¹⁸ o, más recientemente *FCRL2*. Por último, merece la pena destacar *CLU1*, un gen expresado exclusivamente en LLC, cuya expresión elevada ha sido asociada a una menor supervivencia y tiempo hasta el tratamiento, aunque su valor pronóstico parece estar limitado solamente a pacientes jóvenes¹⁹. Aunque prometedores, todos estos estudios necesitan ser confirmados en estudios prospectivos multicéntricos antes de ser evaluados en ensayos clínicos.

Mutaciones de TP53 y ATM

Anteriormente se han descrito diferentes marcadores biológicos asociados con el pronóstico de la LLC. Sin embargo, ninguno de ellos ha demostrado hasta ahora ser capaz de predecir la respuesta a los tratamientos recomendados. En este sentido, sabemos que dos de las alteraciones citogenéticas detectadas por FISH (deleción de 17p y 11q) en la LLC están asociadas con un pronóstico desfavorable y con resistencia al tratamiento con fludarabina o clorambucilo. La deleción de 11q en la LLC está asociada a mutaciones en *ATM* –un gen supresor tumoral localizado en 11q22– en el otro alelo en el 36% de los casos, y conlleva un peor pronóstico y fallo en la respuesta, o respuesta transitoria parcial en algunos casos de del(11q), a quimioterapia convencional²⁰. La región perdida en la del(17p) contiene el gen supresor tumoral *TP53*, el cual se encuentra mutado en el alelo restante en más del 80% de los casos con del(17p), y va asociado con un pronóstico fatal y nula o casi nula respuesta al tratamiento convencional. Los datos preliminares presentados

en el último congreso del IWCLL (2007) en un estudio prospectivo indican que las mutaciones de *TP53* –incluso en casos sin del(17p)– son un factor pronóstico independiente, y se asocian a una menor supervivencia global y menor supervivencia libre de progresión (D. González *et al.*, en preparación). En este sentido, su detección puede resultar de gran utilidad para identificar pacientes que no van a responder a fludarabina, y que podrían ser elegidos para terapias alternativas como CAMPATH y altas dosis de corticoides, y ser candidatos a consolidación con trasplante alogénico en el caso de pacientes jóvenes.

Conclusión

En la última década se han descrito multitud de marcadores moleculares, algunos de los cuales tienen un valor pronóstico reconocido. En general, el marcador pronóstico analizado con más rigor y, por tanto, el más fiable es el estado mutacional de las *IGVH*, que permite distinguir dos tipos de LLC con pronóstico totalmente diferente: LLC-NM (mal pronóstico) y LLC-M (pronóstico más favorable). La detección de las mutaciones de *IGVH*, cuando se describieron por primera vez diez años atrás, era complicada tecnológicamente y difícil de aplicar en la práctica rutinaria, lo que ha llevado a la búsqueda de factores que la sustituyan. Sin embargo, hoy día la mayoría de los laboratorios de genética molecular cuentan con analizadores automáticos que permiten la detección de estas mutaciones con relativa sencillez y bajo precio. Además, el estudio genético proporciona una diana altamente estable cuyos resultados no varían entre diferentes laboratorios, permitiendo su análisis inequívoco en la mayoría de los pacientes con LLC. Su aplicación clínica está siendo actualmente investigada por múltiples grupos en ensayos clínicos, y los datos resultantes verán la luz en los próximos años. Respecto a los marcadores moleculares predictivos de respuesta a tratamiento, la detección de mutaciones de *TP53* y *ATM* parecen añadir información adicional a los datos de FISH, y su estudio en el contexto de nuevos ensayos clínicos está garantizado.

Bibliografía

- Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975; 46: 219-34.
- Binet JL, Lepoprier M, Dighiero G, et al. A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia: prognostic significance. *Cancer* 1977; 40: 855-64.
- Montserrat E, Sánchez-Bisono J, Vinolas N, Rozman C. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance. *Br J Haematol* 1986; 62: 567-75.
- Crespo M, Bosch F, Villamor N, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2003; 348: 1764-75.
- Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 1848-54.
- Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 1840-7.
- Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest* 1998; 102: 1515-25.
- Oscier DG, Wade R, Orchard J, et al. Prognostic factors in the UK LRF CLL4 trial. *Blood* 2006; 108: 92A.
- Panovska-Stavridis I, Ivanovski M, Siljanovski N, Cevreska L, Efremov DG. Chronic lymphocytic leukemia patients with a V1-69 gene rearrangement do not have inferior survival with respect to patients that express other unmutated V(H) genes. *Leuk Res* 2007; 31: 245-8.
- Capello D, Guarini A, Berra E, et al. Evidence of biased immunoglobulin variable gene usage in highly stable B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2004; 18: 1941-7.
- Ghia EM, Jain S, Widhopf GF, et al. Use of IGHV3-21 in chronic lymphocytic leukemia is associated with high-risk disease and reflects antigen-driven, post-germinal center leukemogenic selection. *Blood* 2008; 111: 5101-8.
- Tobin G, Thunberg U, Johnson A, et al. Chronic lymphocytic leukemias utilizing the VH3-21 gene display highly restricted Vlambda2-14 gene use and homologous CDR3s: implicating recognition of a common antigen epitope. *Blood* 2003; 101: 4952-7.
- Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, et al. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood* 2007; 109: 259-70.
- Murray F, Darzentas N, Hadzidimitriou A, et al. Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for the role of antigen selection in leukemogenesis. *Blood* 2008; 111: 1524-33.
- Tschumper RC, Geyer SM, Campbell ME, et al. Immunoglobulin diversity gene usage predicts unfavorable outcome in a subset of chronic lymphocytic leukemia patients. *J Clin Invest* 2008; 118: 306-15.
- Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2001; 194: 1639-47.
- Herve M, Xu K, Ng YS, et al. Unmutated and mutated chronic lymphocytic leukemias derive from self-reactive B cell precursors despite expressing different antibody reactivity. *J Clin Invest* 2005; 115: 1636-43.
- Oppezzo P, Vasconcelos Y, Settegrana C, et al. The LPL/ADAM29 expression ratio is a novel prognosis indicator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2005; 106: 650-7.
- Josefsson P, Geisler CH, Leffers H, et al. CLLU1 expression analysis adds prognostic information to risk prediction in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007; 109: 4973-9.
- Austen B, Skowronska A, Baker C, et al. Mutation status of the residual ATM allele is an important determinant of the cellular response to chemotherapy and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia containing an 11q deletion. *J Clin Oncol* 2007; 25: 5448-57.

Optimización del uso de concentrados de plaquetas y plasma

COORDINADOR: M.A. CORREA. *Jerez de la Frontera (Cádiz)*

Resumen del simposio

Antes de que la transfusión de plaquetas fuera una práctica posible, la muerte por complicaciones hemorrágicas era común en los pacientes diagnosticados de leucemia que recibían quimioterapia. En un estudio publicado en 1962 por Gaydos *et al.*, se demuestra la relación entre hemorragia y cifra de plaquetas en pacientes diagnosticados de leucemia aguda. A raíz de este estudio, comienza la práctica de la transfusión profiláctica de plaquetas si la cifra era $\leq 20 \times 10^9/L$. Cuarenta años después del uso rutinario de esta práctica, se plantean cuestiones tales como si la transfusión profiláctica es necesaria, si estaría indicada en pacientes con trombocitopenia crónica para prevenir el sangrado o si sería igual de efectivo transfundir plaquetas sólo de manera terapéutica con el comienzo de sangrado activo. También se cuestiona el umbral seguro y efectivo para la transfusión profiláctica y la dosis más rentable clínicamente para mantener la hemostasia y reducir la utilización de plaquetas.

Por otro lado, la refractariedad plaquetaria o falta de incremento postransfusión puede complicar la transfusión de plaquetas de los pacientes trombocitopénicos. Se ha demostrado que al aumentar el número de transfusiones de plaquetas hay un descenso progresivo en el incremento de las mismas y en los días hasta la siguiente transfusión, incluso en ausencia de aloinmunización. Se reconocen muchos factores asociados a la refractariedad plaquetaria: factores del paciente y del producto, causas inmunológicas y no inmunológicas. El diagnóstico y el tratamiento de estos pacientes son un reto para el clínico y para el hemoterapeuta.

Con respecto a la transfusión del plasma, su uso inapropiado según los estudios puede variar del 10% al 70%. Asumimos que las anomalías del TP/INR se correlacionan con riesgo de sangrado y que el PFC puede corregir las anomalías del INR y reducir el riesgo de sangrado, pero en la mayoría de los estudios realizados en procedimientos invasivos, los pacientes con valores anormales de coagulación tienen el mismo riesgo de sangrado que los que tienen cifras de coagulación normales. La conclusión de diversas revisiones realizadas es que la evidencia para el uso del PFC es limitada, tanto para el tratamiento de pacientes con hemorragia como para el uso profiláctico.

De todo esto van a hacer, a continuación, una revisión los siguientes compañeros, que aúnan conocimientos y experiencia en este campo:

- En primer lugar, el Dr. Joan Cid, del Servicio de Hematología del Hospital Juan XXIII (Tarragona), va a hablar de la transfusión de plaquetas en la práctica diaria, del uso profiláctico *versus* el terapéutico, de la dosis y de la importancia de la compatibilidad ABO y Rh (D).
- A continuación, el Dr. Miguel Á. Álvarez Rivas, del Servicio de Hematología del Hospital Reina Sofía (Córdoba), desarrollará una revisión de la refractariedad plaquetaria, del diagnóstico y de las estrategias terapéuticas en la actualidad.
- Por último, el Dr. Javier Anguita, del Servicio de Hematología del Hospital Gregorio Marañón (Madrid), nos hablará del uso del plasma y de las evidencias científicas para su indicación.
- Para cerrar el simposio, el Dr. Contreras, del Banco de Sangre y Tejidos de Cataluña, presentará la comunicación titulada "Características de los receptores de componentes sanguíneos. Resultados del estudio epidemiológico de la transfusión de sangre en Cataluña y Baleares"; y el Dr. García Erce, del Servicio Regional de Hematología y Hemoterapia del Hospital Miguel Servet (Zaragoza), presentará la comunicación titulada "Grandes diferencias en la política transfusional entre las diecisiete comunidades autónomas españolas".

USO RACIONAL DE PLAQUETAS EN LA PRÁCTICA TRANSFUSIONAL DIARIA

J. CID VIDAL

Servicio de Hematología.

Hospital Universitario Joan XXIII. Tarragona

Existen diferentes estudios en animales de experimentación¹⁻³ y en humanos⁴ que sugieren que las plaquetas proporcionan un soporte endotelial para prevenir las hemorragias, ya que se encargan de cubrir físicamente las pequeñas soluciones de continuidad entre las células endoteliales de los vasos sanguíneos.

A partir de estos estudios se deduce que las plaquetas son extraídas de la circulación a través de dos mecanismos⁵. El primero es por simple envejecimiento de las plaquetas, mecanismo principal en un individuo sano, cuyas plaquetas presentan una vida media de 9-10 días. El segundo mecanismo es por una constante pérdida de plaquetas debido al mantenimiento de la integridad del endotelio vascular. La pérdida de plaquetas por este segundo mecanismo se ha cuantificado en $7,1 \times 10^3/\mu\text{L}/\text{día}$. Este número fijo de plaquetas que se pierde de forma diaria representa un pequeño porcentaje de pérdidas del total en un individuo sano, mientras que con recuentos de plaquetas inferiores el porcentaje de plaquetas perdidas es mayor, lo cual da lugar a una relación directa entre el recuento de plaquetas y la supervivencia de plaquetas cuando los niveles son $< 100 \times 10^3/\mu\text{L}$.

Transfusión profiláctica de plaquetas

Con los datos hasta aquí expuestos se entiende que es necesario un aporte de plaquetas en individuos trombocitopénicos para que puedan mantener íntegro el endotelio vascular y no aparezcan hemorragias. La evidencia científica que soporta el uso profiláctico de plaquetas se inicia en el año 1962⁶. En este trabajo, Gaydos *et al.* encontraron una relación directa entre la aparición de episodios hemorrágicos y el recuento de plaquetas, aunque la hemorragia grave fue poco frecuente, incluso en pacientes con recuentos de plaquetas $< 1 \times 10^3/\mu\text{L}$, y los propios autores no fueron capaces de establecer un umbral a partir del cual indicar una transfusión profiláctica de plaquetas. Sin embargo, este estudio ha sido la base durante muchos años para establecer la indicación de transfusión profiláctica de plaquetas en recuentos $\leq 20 \times 10^3/\mu\text{L}$.

Otro estudio publicado en 1978 analizó la presencia de sangre oculta en heces en 20 pacientes con trombocitopenia⁷. Con recuentos de plaquetas $< 10 \times 10^3/\mu\text{L}$, la presencia de sangre en heces no fue diferente

que en individuos sanos ($< 5 \text{ mL}/\text{día}$), mientras que con recuentos de plaquetas de entre 5 y $10 \times 10^3/\mu\text{L}$, la presencia de sangre aumentó ligeramente ($9 \pm 7 \text{ mL}/\text{día}$). Sin embargo, cuando los recuentos de plaquetas fueron $< 5 \times 10^3/\mu\text{L}$, la pérdida de sangre aumentó hasta $50 \pm 20 \text{ mL}/\text{día}$.

En resumen, estos estudios sugieren que el umbral para la indicación de una transfusión profiláctica de plaquetas podría ser de tan sólo $5 \times 10^3/\mu\text{L}$ para mantener la integridad vascular y, por tanto, prevenir episodios hemorrágicos importantes⁸. Como se observa, este valor es muy similar al valor calculado de $7,1 \times 10^3/\mu\text{L}/\text{día}$ necesario para el mantenimiento del endotelio vascular⁴.

En 1992, Beutler *et al.*⁹ discutían la necesidad de disminuir el umbral transfusional a recuentos de plaquetas $< 20 \times 10^3/\mu\text{L}$, y posteriormente aparecieron diferentes estudios controlados y aleatorizados que comparaban la seguridad de usar recuentos de plaquetas de $20 \times 10^3/\mu\text{L}$ o $10 \times 10^3/\mu\text{L}$ ¹⁰⁻¹². Estos estudios no encontraron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia y gravedad de episodios hemorrágicos entre los dos grupos de pacientes. A partir de estas conclusiones, ampliamente reconocidas y aceptadas, se han puesto en marcha protocolos más restrictivos de transfusiones profilácticas de plaquetas con recuentos de plaquetas $< 10 \times 10^3/\mu\text{L}$. Sin embargo, ninguno de los estudios citados fue diseñado para demostrar no inferioridad o equivalencia entre los dos umbrales de transfusión y la frecuencia de episodios hemorrágicos. Se ha sugerido incluso que la combinación de los datos de estos estudios no tiene suficiente poder estadístico para demostrar equivalencia entre los dos umbrales de transfusión¹³. Además, un editorial y dos artículos recientes en transfusión analizan las dificultades de garantizar el cumplimiento de transfundir de forma profiláctica con recuento de plaquetas $< 10 \times 10^3/\mu\text{L}$, incluso en el escenario optimizado de un estudio controlado y aleatorizado¹⁴⁻¹⁶. Por ello, en la realidad de la práctica diaria, no debe sorprender si de forma repetida aparecen dificultades a la hora de cumplir con el umbral transfusional.

Uno de los objetivos esperables con la reducción del umbral transfusional es la disminución en el número de plaquetas transfundidas. Sin embargo, la magnitud de este descenso es variable en los diferentes estudios analizados. Existen modelos matemáticos que predicen una reducción del 14,5% en el número de plaquetas transfundidas cuando el umbral de transfusión profiláctica de plaquetas se reduce de $20 \times 10^3/\mu\text{L}$ a $10 \times 10^3/\mu\text{L}$, mientras que los valores de reducción varían entre el 21,5 y el 60% en diferentes estudios analizados^{10-12,16}. Algunos autores sugieren otras opciones que ayudarían a reducir el número de plaquetas transfundidas, como la disminución de la dosis de plaquetas transfundidas, que se comentará más adelante.

En resumen, a pesar de la práctica habitual de usar transfusiones profilácticas de plaquetas, no se ha probado nunca que una estrategia profiláctica sea necesaria. Es más, recientemente se ha demostrado que una estrategia de transfusiones terapéuticas de plaquetas es segura y posible en pacientes sometidos a trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos por una enfermedad de base hematológica u oncológica¹⁷. En este estudio, las necesidades de plaquetas disminuyeron un 50% en el grupo de pacientes que las recibieron sólo de forma terapéutica.

Dosis de plaquetas a transfundir

Ya sea de forma profiláctica o terapéutica, cuando se decide realizar una transfusión de plaquetas, se dispone en el banco de sangre de concentrados con una cantidad variable de plaquetas en su interior. Ello es debido a que el origen de las plaquetas es por donación de sangre de forma voluntaria y altruista y los donantes presentan una cantidad variable de plaquetas, que en nuestro medio se sitúa entre 125 y $300 \times 10^9/L$ ¹⁸.

Existen modelos matemáticos que sugieren que un programa de transfusión profiláctica de plaquetas con dosis bajas sería igual de efectivo que con las dosis habituales y ayudaría a reducir el número total de plaquetas transfundidas¹⁹. Sin embargo, existen estudios clínicos publicados hasta la fecha que concluyen que un programa de transfusión profiláctica de plaquetas con dosis altas podría ser efectivo y aumentaría el intervalo transfusional, lo cual ayudaría a disminuir el número total de plaquetas transfundidas. Ante estos hallazgos contradictorios no es extraño que el rango de dosis utilizada sea muy amplio.

No existen estudios bien diseñados que analicen el efecto de la dosis de plaquetas transfundidas en la hemostasia y el número total de plaquetas transfundidas. Existe una revisión amplia sobre este tema²⁰ y un metaanálisis reciente²¹. En el citado metaanálisis, los autores fueron capaces de incluir cinco estudios controlados y aleatorizados que cumplieron los criterios de inclusión preestablecidos. Cabe decir que tan sólo uno de los estudios presentó una calidad metodológica buena y que los otros cuatro presentaron una calidad metodológica media-baja, de acuerdo a la escala usada por los autores. Las unidades de observación fueron el incremento del recuento de plaquetas posttransfusional, el intervalo transfusional y la probabilidad de sangrado. Los pacientes se dividieron en dos grupos: un grupo recibió una dosis alta de plaquetas y el otro grupo recibió una dosis baja de plaquetas. La definición de dosis alta o baja se hizo de acuerdo al criterio de los diferentes autores de los estudios analizados. Los principales resultados fueron los siguientes. Primero, el grupo de pacientes que recibió

una dosis alta de plaquetas presentó un incremento estadísticamente significativo en el intervalo transfusional cuando se comparó con el grupo de pacientes que recibieron una dosis baja de plaquetas (diferencia ponderada media [WMD]: 1,04 días; IC 95%: 0,89-1,19 días; $p < 0,00001$). Segundo, el grupo de pacientes que recibió una dosis alta de plaquetas presentó un aumento estadísticamente significativo en el incremento de plaquetas posttransfusional cuando se comparó con el grupo de paciente que recibió una dosis baja de plaquetas, siempre que se respetara la compatibilidad ABO en la transfusión de plaquetas (WMD: $23,6 \times 10^9/L$; IC 95%: $18,28-28,92 \times 10^9/L$; $p < 0,00001$). Tercero, la probabilidad de sangrado en los dos grupos de pacientes dio resultados contradictorios y no se pudo llegar a ninguna conclusión.

Los autores del citado metaanálisis fueron incapaces de analizar dos importantes unidades de observación, como son el incremento corregido del recuento (ICR o CCI en terminología inglesa) y el número total de plaquetas transfundidas. Respecto al ICR, este dato sólo estaba disponible en un estudio y no presentó diferencias estadísticamente significativas ($12,5 \pm 5,8$ vs. $10,6 \pm 5,4$; $p = 0,116$). Respecto al número total de plaquetas, este dato estaba disponible en dos estudios, pero la metodología usada en el metaanálisis impidió su utilización.

En resumen, de acuerdo a los datos hallados en el citado metaanálisis, cabe concluir que el uso de una dosis alta de plaquetas se asocia a un incremento del intervalo transfusional y a un aumento del incremento del recuento posttransfusional, siempre que se garantice la compatibilidad ABO, cuando se compara con la transfusión de una dosis baja de plaquetas. Sin embargo, no hay una respuesta definitiva a esta pregunta, y sólo un estudio controlado y aleatorizado, bien diseñado y con el suficiente poder estadístico podrá finalmente establecer la forma más eficaz y eficiente de transfundir concentrados de plaquetas. Existen dos estudios en marcha en este sentido, y quizás alguno de ellos ya esté publicado cuando el lector tenga en sus manos este artículo.

Compatibilidad Rh(D) en la transfusión de plaquetas

Las plaquetas presentan en su membrana los antígenos del grupo ABO, pero carecen de los antígenos del sistema Rh. Sin embargo, en el proceso habitual de elaboración de concentrados de plaquetas en el banco de sangre, ya sea a partir de las donaciones de plaquetas con sistemas de aféresis o de sangre total, una cantidad mínima de hematíes se encuentra siempre presente en el interior²². Estos hematíes sí que expresan en su membrana los antígenos del sistema Rh y pue-

den convertirse en el estímulo antigénico que origine la aloinmunización anti-D en pacientes Rh(D) negativo que reciben plaquetas procedentes de donantes Rh(D) positivo. Clásicamente se citaba que la incidencia de aloinmunización anti-D en pacientes Rh(D) inmunodeprimidos que recibían plaquetas procedentes de donantes Rh(D) positivo podía alcanzar el 19%. Sin embargo, estudios recientes indican que esta probabilidad es menor e incluso puede ser nula^{23,24}.

Es necesario revisar diferentes aspectos para interpretar de forma correcta estos hallazgos. Primero, algunos estudios han administrado de forma sistemática la inmunoglobulina anti-D cuando un paciente Rh(D) negativo ha recibido plaquetas procedentes de donantes Rh(D) positivo. Es ampliamente conocido que de esta forma se evita la aloinmunización anti-D.

Segundo, el nivel de inmunosupresión de los pacientes Rh(D) negativo que reciben plaquetas procedentes de donantes Rh(D) positivo es muy variable y cabe destacar que los estudios con mayor incidencia de aloinmunización anti-D incluían pacientes inmunocompetentes. Cuando se analizan los estudios que incluyen sólo pacientes inmunodeprimidos por su enfermedad de base o porque reciben tratamiento con quimioterapia y/o radioterapia, la incidencia de aloinmunización es cero²⁵.

Tercero, es básico conocer que la causa de la aloinmunización anti-D en los pacientes Rh(D) negativo es resultado de la transfusión de plaquetas procedentes de donantes Rh(D) positivo, y no la consecuencia de una inmunización secundaria resultado de una respuesta anamnésica a un estímulo antigénico ocurrido en el pasado, como una transfusión de hematíes Rh(D) positivo o un antecedente gestacional. Para diferenciar entre una respuesta inmunitaria primaria y una secundaria se necesitaría conocer el tipo de inmunoglobulina producida: IgM en la primaria e IgG en la secundaria. Este dato no se encuentra disponible en los estudios analizados, pero podemos hacernos una idea si se estudia el tiempo que transcurre entre la transfusión de plaquetas procedentes de donantes Rh(D) positivo y la aparición del aloanticuerpo anti-D en los pacientes aloinmunizados. En individuos sanos Rh(D) negativo, inmunocompetentes, el tiempo mínimo de aparición anti-D tras una primera exposición a hematíes Rh(D) positivo es de 4 semanas. Por tanto, es lógico pensar que en los pacientes inmunodeprimidos, como mínimo, hay que esperar 4 semanas para que aparezca el aloanticuerpo anti-D. Con este dato en mente, si se analiza el estudio que publica una incidencia de aloinmunización anti-D del 19% y se excluyen aquellos pacientes que presentan un anti-D a las 2 semanas de recibir una transfusión de plaquetas procedentes de donantes Rh(D) positivo, se verá que la nueva incidencia calculada es del 6%. Además, algunos de los pacien-

tes que presentaron el aloanticuerpo de forma precoz tras la transfusión de plaquetas eran mujeres con antecedentes gestacionales, motivo por el cual no es posible descartar un aloinmunización secundaria en estos casos²⁶.

Por último, aunque no por ello menos importante, es necesario analizar la cantidad de hematíes presentes en los concentrados de plaquetas, ya que son los responsables de la aloinmunización anti-D²⁷. Se sabe que un volumen tan bajo como 0,03 mL de hematíes Rh(D) positivo será capaz de producir una aloinmunización anti-D en individuos sanos Rh(D) negativo. La cantidad de hematíes presentes en los concentrados de plaquetas no se analiza de forma rutinaria, pero varía entre 0,005 y 3 mL en las plaquetas procedentes de aféresis, y entre 0,2 y 0,75 mL en las plaquetas procedentes del fraccionamiento de las bolsas de sangre total. Los sistemas automáticos de aféresis disponibles hoy en día, así como la automatización del proceso de elaboración de componentes sanguíneos a partir del fraccionamiento de las bolsas de sangre total, han permitido reducir mucho el contenido de hematíes en los concentrados de plaquetas. Actualmente, el contenido de hematíes en las plaquetas de aféresis es prácticamente indetectable, mientras que en las plaquetas procedentes del fraccionamiento todavía superan el mínimo considerado necesario para producir la aloinmunización anti-D en individuos Rh(D) positivo sanos.

En resumen, la incidencia de aloinmunización anti-D en pacientes Rh(D) negativo inmunodeprimidos por su enfermedad de base o por el tratamiento inmunosupresor que reciben es menor que la citada habitualmente. Con todos estos datos revisados, mi recomendación es que no es necesario administrar la inmunoglobulina anti-D a los pacientes Rh(D) negativo de sexo masculino y de sexo femenino que hayan superado la edad gestacional, que estén afectados de una enfermedad hematológica y que vayan a recibir una transfusión de plaquetas procedentes de donantes Rh(D) positivo.

Bibliografía

1. Kitchens CS, Weiss L. Ultrastructural changes of endothelium associated with thrombocytopenia. *Blood* 1975; 46: 567-78.
2. Tranzer JP, Baumgartner HR. Filling gaps in the vascular endothelium with blood platelets. *Nature* 1967; 216: 1126-8.
3. Aursnes I. Blood platelet production and red cell leakage to lymph during thrombocytopenia. *Scand J Haematol* 1974; 13: 184-95.
4. Hanson SR, Slichter SJ. Platelet kinetics in patients with bone marrow hypoplasia: evidence for a fixed platelet requirement. *Blood* 1985; 66: 1105-9.
5. Slichter SJ. Relationship between platelet count and bleeding risk in thrombocytopenic patients. *Transfus Med Rev* 2004; 18: 153-67.

6. Gaydos LA, Freireich EJ, Mantel N. The quantitative relation between platelet count and hemorrhage in patients with acute leukemia. *N Engl J Med* 1962; 266: 905-9.
7. Slichter SJ, Harker LA. Thrombocytopenia: mechanisms and management of defects in platelet production. *Clin Haematol* 1978; 7: 523-39.
8. Slichter SJ. Platelet transfusion therapy. *Hematol Oncol Clin North Am* 2007; 21: 697-729.
9. Beutler E. Platelet transfusions: the 20,000/microL trigger. *Blood* 1993; 81: 1411-3.
10. Heckman KD, Weiner GJ, Davis CS, et al. Randomized study of prophylactic platelet transfusion threshold during induction therapy for adult acute leukemia: 10,000/microL versus 20,000/microL. *J Clin Oncol* 1997; 15: 1143-9.
11. Rebutta P, Finazzi G, Marangoni F, et al. The threshold for prophylactic platelet transfusions in adults with acute myeloid leukemia. Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto. *N Engl J Med* 1997; 337: 1870-5.
12. Zumberg MS, del Rosario ML, Nejame CF, et al. A prospective randomized trial of prophylactic platelet transfusion and bleeding incidence in hematopoietic stem cell transplant recipients: 10,000/L versus 20,000/microL trigger. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002; 8: 569-76.
13. Stanworth SJ, Hyde C, Brunskill S, et al. Platelet transfusion prophylaxis for patients with haematological malignancies: where to now? *Br J Haematol* 2005; 131: 588-95.
14. Brecher ME. The platelet prophylactic transfusion trigger: when expectations meet reality. *Transfusion* 2007; 47: 188-91.
15. Cameron B, Rock G, Olberg B, et al. Evaluation of platelet transfusion triggers in a tertiary-care hospital. *Transfusion* 2007; 47: 206-11.
16. Greeno E, McCullough J, Weisdorf D. Platelet utilization and the transfusion trigger: a prospective analysis. *Transfusion* 2007; 47: 201-5.
17. Wandt H, Schaefer-Eckart K, Frank M, et al. A therapeutic platelet transfusion strategy is safe and feasible in patients after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2006; 37: 387-92.
18. Lozano M, Narváez J, Faundez A, et al. [Platelet count and mean platelet volume in the Spanish population]. *Med Clin (Barc)* 1998; 110: 774-7.
19. Hersh JK, Hom EG, Brecher ME. Mathematical modeling of platelet survival with implications for optimal transfusion practice in the chronically platelet transfusion-dependent patient. *Transfusion* 1998; 38: 637-44.
20. Tinmouth AT, Freedman J. Prophylactic platelet transfusions: which dose is the best dose? A review of the literature. *Transfus Med Rev* 2003; 17: 181-93.
21. Cid J, Lozano M. Lower or higher doses for prophylactic platelet transfusions: results of a meta-analysis of randomized controlled trials. *Transfusion* 2007; 47: 464-70.
22. Cid J, Claparols M, Pinacho A, et al. Comparison of blood component preparation methods from whole blood bags based on buffy coat extraction. *Transfus Apher Sci* 2007; 36: 243-7.
23. Cid J, Ortin X, Elies E, et al. Absence of anti-D alloimmunization in hematologic patients after D-incompatible platelet transfusions. *Transfusion* 2002; 42: 173-6.
24. Cid J. PLT transfusions from D+ blood donors to D-patients with hematologic diseases: an update. *Transfusion* 2003; 43: 1759-60.
25. Cid J, Lozano M, Fernández-Avilés F, et al. Anti-D alloimmunization after D-mismatched allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with hematologic diseases. *Transfusion* 2006; 46: 169-73.
26. Lozano M, Cid J. The clinical implications of platelet transfusions associated with ABO or Rh(D) incompatibility. *Transfus Med Rev* 2003; 17: 57-68.
27. Cid J, Lozano M. Risk of Rh(D) alloimmunization after transfusion of platelets from D+ donors to D- recipients. *Transfusion* 2005; 45: 453-4.

REFRACTARIEDAD PLAQUETARIA: ACTUALIZACIÓN DIAGNÓSTICA Y ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS

M.Á. ÁLVAREZ RIVAS¹, G. FORNÉS TORRES², V. MARTÍN PALANCO¹, A. TORRES GÓMEZ¹

¹Servicio de Hematología y Hemoterapia.

Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba

²Centro Regional de Transfusión Sanguínea. Córdoba

Introducción

La primera descripción del cese del sangrado en un paciente trombocitopénico tras la administración de una transfusión sanguínea que determinó un incremento en la cifra de plaquetas fue publicado en 1910 por Duke¹. No obstante, fue principalmente en la década de los sesenta cuando diferentes estudios clínicos demostraron que la transfusión terapéutica de concentrados de plaquetas (CP) determinaba un descenso en la mortalidad en las complicaciones hemorrágicas en pacientes con trombocitopenia, así como que el uso en profilaxis de las transfusiones reducía los episodios de sangrado. Ambas prácticas se han generalizado, fundamentalmente en sangrado secundario a patología plaquetaria y en hematooncología.

Actualmente, se acepta que el beneficio hemostático de las transfusiones de CP está mediado a través de un incremento en el contaje plaquetario postransfusional, y no se admite que pueden ser beneficiosas en ausencia de dicho incremento. La falta de incremento postransfusional es conocida como refractariedad plaquetaria.

Definición de refractariedad

A diferencia de los pacientes transfundidos con concentrados de hematíes, los receptores de transfusiones de CP deben "merecerse" una investigación inmunohematológica. Así, un paciente se considera refractario cuando se confirma un escaso rendimiento postransfusional en al menos dos transfusiones consecutivas. La probabilidad de subsiguientes fracasos terapéuticos en estos pacientes es de un 46%, que se incrementa a un 68% y un 75% si se consideran tres o cuatro transfusiones consecutivas. Dado que un adecuado *rendimiento postransfusional* se encuentra influido por factores como el número absoluto y la calidad de las plaquetas transfundidas, así como el volumen sanguíneo del receptor (efecto dilucional) y el secuestro esplénico, para su valoración se utilizan índices como el "porcentaje de recuperación plaquetaria" (PPR) o el "incremento corregido del contaje plaquetario" (CCI), en los que se tienen en conside-

$$\text{Incremento corregido (CCI)} = \frac{\text{Incremento de plaquetas}/\mu\text{L} \times \text{s.c. (m}^2\text{)}}{\text{N.}^\circ \text{ de plaquetas transfundidas (} \times 10^{11}\text{)}}$$

$$\text{Porcentaje recup. plaquetaria (PPR)} = \frac{\text{Incremento plaquetas}/\mu\text{L} \times \text{peso (kg)} \times \text{vol. sanguíneo (75 mL/kg)}}{\text{N.}^\circ \text{ de plaquetas transfundidas (} \times 10^{11}\text{)}} \times 100$$

Figura 1. La refractariedad plaquetaria está definida por un valor de CCI a los 10-60 minutos o a las 18-24 horas postransfusión de < 5.000 y < 2.500, respectivamente, o un PPR de < 20% a los 10-60 minutos o < 10% a las 18-24 horas tras la transfusión.

ración dichos factores (Figura 1). Ambos índices permiten definir una recuperación inadecuada (evaluada a los 10-60 minutos) y una inadecuada supervivencia postransfusional (evaluada a las 18-24 horas) y “teóricamente” permiten la comparación entre diferentes pacientes y diferentes tipos de CP².

Causas de refractariedad

La refractariedad plaquetaria puede ser motivada por factores **inmunes** o **no inmunes**. Estos últimos pueden ser diferenciados en factores que alteran la calidad del producto transfundido y factores clínicos en el receptor de la transfusión.

Calidad del producto transfundido

Este factor muestra una gran influencia en el resultado de la transfusión. El uso de CP leucodeplecionados mediante filtración predepósito ha mostrado un menor CCI, especialmente si el tiempo de almacenamiento previo a la transfusión supera las 72 horas y los pacientes presentan factores clínicos asociados a refractariedad^{3,4}. Este hecho vendría justificado por la activación de las plaquetas durante el periodo de almacenamiento, lo que determinaría un aclaramiento más rápido tras su transfusión. El efecto negativo del envejecimiento en las plaquetas almacenadas fue confirmado en el estudio TRAP: la transfusión de CP con menos de 48 horas de almacenamiento determinaba mayores incrementos postransfusionales⁵.

Otro factor de aparente refractariedad es la administración de dosis inadecuadas, bien por modificaciones realizadas al producto (filtración) o por ajuste escaso al volumen sanguíneo del paciente. Asimismo, alteraciones en el producto durante el almacenamiento por una incorrecta temperatura, inadecuada agitación o un pH menor de 6,2 pueden determinar un peor rendimiento. La irradiación gamma no afecta a la función ni la supervivencia postransfusional a la dosis habitualmente administrada para prevenir la EICH asociada a transfusión. En cambio, la irradia-

ción con UVB se mostró en el estudio TRAP como un factor independiente asociado con menores CCI postransfusión⁵.

Factores no inmunes clínicos

Los pacientes trombocitopénicos tienen una supervivencia aparentemente reducida de las plaquetas transfundidas, debido al consumo fijo diario necesario para mantener la integridad vascular; por ello, cuanto menor sea el número de plaquetas circulantes, mayor será la fracción de plaquetas transfundidas gastadas para este propósito⁶.

Otros factores pueden determinar un consumo acelerado de plaquetas. Así, la presencia de esplenomegalia, CID, el sangrado activo, la terapia con anfotericina B u otros antibióticos (ciprofloxacino y/o vancomicina), el tratamiento con heparina, la fiebre asociada o no a sepsis/infección y el trasplante de CPH condicionan un menor incremento postransfusional^{7,8}. En especial, resaltar que en los pacientes sometidos a trasplante de CPH pueden asociarse diversas condiciones que determinan una muy escasa recuperación, como son la presencia de enfermedad venooclusiva hepática, de EICH tanto aguda como crónica, el uso de ICT en el régimen de acondicionamiento, los niveles elevados de ciclosporina A o tacrolimus y el desarrollo de PTT/SHU o trombocitopenias autoinmunes. En general, la presencia de factores clínicos de refractariedad determina un rendimiento postransfusional normal a los 10-60 minutos, con una pobre supervivencia a las 18-24 horas.

Factores inmunes

Incompatibilidad ABO. Es especialmente evidente en aquellos receptores con títulos elevados de isoaglutininas anti-A y anti-B, en los que la transfusión de plaquetas incompatibles se asocia a una respuesta inadecuada. Además, la mayor o menor densidad de antígenos en la superficie plaquetaria (A₁ vs. A₂) se relaciona con una peor o mejor recuperación, res-

pectivamente. Asimismo, la transfusión de plaquetas resuspendidas en plasma "ABO incompatible" con el receptor también resulta en peores recuperaciones, probablemente por la formación de inmunocomplejos circulantes⁹.

Alosensibilización HLA. Es la causa más común de refractariedad inmune a las transfusiones de plaquetas, y participa, aislada o asociada a otros factores, en un 17-30% de los pacientes refractarios. No obstante, el número de pacientes que presentan anticuerpos anti-HLA es muy superior, alrededor del 50%⁵. Sin embargo, las plaquetas por sí mismas no son capaces de provocar una respuesta inmune primaria. Para ello, se necesita la presencia de leucocitos alogénicos. En efecto, la presencia de células presentadoras de antígenos del donante induce una respuesta inmune primaria, interactuando con los linfocitos T del receptor y determinando el desarrollo de células B memoria. Esta respuesta inmune a los antígenos HLA ocurre alrededor de 3-4 semanas tras la primera transfusión en aquellos pacientes que reciben múltiples transfusiones. Pacientes con exposición previa al sistema HLA tienen un riesgo muy alto de desarrollar aloinmunización y refractariedad plaquetaria, y lo hacen más precozmente que en aquellos sin antecedentes previos¹⁰.

Alosensibilización a antígenos plaquetarios (HPA). Aproximadamente un 10% de los pacientes desarrollan anticuerpos frente a HPA, la mayoría de las veces (80%) asociados a la presencia de anticuerpos anti-HLA, siendo las especificidades más frecuentemente reportadas el anti-HPA-5b y 1b.

Medidas para prevenir alosensibilización HLA:

- **Reducción del número de exposiciones.** La reducción del número de transfusiones y, por consiguiente, de contactos mediante el uso de plaquetas de aféresis ha mostrado un efecto dilatorio en la aparición de aloinmunización, aunque no la evita¹¹.
- **Depleción leucocitaria.** La depleción leucocitaria mediante filtración pre- o post-depósito determina una importante reducción en la frecuencia de alosensibilización HLA, aunque su efecto es menor en cuanto a la sensibilización al sistema HPA⁵.
- **Irradiación ultravioleta.** La irradiación con UVB ha mostrado un efecto beneficioso similar al de la filtración⁵.

Población en riesgo de refractariedad

Las transfusiones de concentrados de plaquetas predominan de forma global en el ámbito quirúrgico (60%) sobre el médico, aunque son fundamentalmente los pacientes con patología hematooncológica su principal indicación (25% de las unidades transfundidas). Le siguen en frecuencia los pacientes afectados de patolo-

gía cardiovascular (20%) y digestiva (20%)¹². Son por tanto estos grupos, específicamente aquellos pacientes que reciben productos sanguíneos celulares de forma seriada, los que en un 20-60% aproximadamente se hace refractarios a las transfusiones de plaquetas.

El riesgo de refractariedad de causa inmune está influido por: la enfermedad de base, más frecuente en pacientes con anemia aplásica, el uso o no de productos leucorreducidos, la circunstancia de historia de embarazo o transfusiones previas (>20 unidades) o el tipaje HLA del receptor¹³.

Diagnóstico de refractariedad por alosensibilización inmune

La presencia en un paciente de anticuerpos frente al sistema HLA de clase I o HPA se correlaciona con la ausencia de incremento en los contajes plaquetarios a los 10 minutos-1 hora postransfusión.

Son diversas las técnicas de laboratorio utilizadas para ponerlos de manifiesto. El método clásico es el *test de linfocitotoxicidad (TLC) estándar o modificado*, adicionando antiglobulina humana. Detecta aquellos anticuerpos (Ac) dependientes del complemento que son capaces de lisar linfocitos. El porcentaje de células de un panel frente a los que un paciente presenta Ac citotóxicos se conoce como PRA (*panel reactive antibody*). Un valor de PRA > 20-40% indica una alosensibilización significativa en el paciente estudiado, especialmente si el panel es representativo de la población en cuanto a la frecuencia de los antígenos HLA. No obstante, aunque existe una clara relación entre la presencia de Ac anti-HLA y refractariedad plaquetaria, menos de la mitad de los pacientes refractarios muestran un TLC positivo.

Esta técnica se ha visto desplazada por la disponibilidad de *ELISA en fase sólida*, en que los antígenos del sistema HLA de clase I se encuentran fijados a los pocillos de la placa, o por técnicas de *citometría de flujo*, en las que se utilizan esferas con especificidades antigénicas múltiples o restringidas. Dado que los antígenos fijados pueden ser tanto del sistema HLA como HPA, y con especificidades limitadas o múltiples, ambas técnicas pueden utilizarse tanto para escrutinio como para identificación del anticuerpo. Una modificación de la técnica de ELISA es el *MAIPA (monoclonal antibody-specific immobilization of platelets)*, donde las plaquetas son incubadas con el Ac monoclonal frente a la especificidad a estudiar y el suero a testar. Posteriormente son lisadas y solubilizadas, lo que permite fijar el complejo sobre la superficie de un pocillo revestido con Ig anti-ratón. De esta forma el complejo capturado es detectado por una IgG antihumana marcada con una enzima. El MAIPA es un ensayo más sensible y fiable que el TLC, y se utiliza fundamentalmente para detectar

Tabla 1. Estrategia en pacientes refractarios a transfusiones de plaquetas

<i>A) CCI < 5.000 a 10-60 minutos postransfusión</i>
1. Transfundir CP isogrupo de < 48 h de almacenamiento
2. Valorar CCI a 10-60 minutos postransfusión
3. Evaluar para presencia de factores clínicos de refractariedad
4. Determinar existencia de anticuerpos anti-HLA y anti-HPA si CCI < 5.000 a 10-60 min postransfusión
<i>B) Presencia de alosensibilización</i>
1. Determinar especificidad y realizar selección de donantes:
a) En base al tipaje HLA del receptor
b) Realización de prueba cruzada (en caso de presencia de Ac anti-HLA o anti-HPA)
c) Selección de unidades negativas (en caso de presencia de Ac anti-HLA o anti-HPA)
2. Ausencia disponibilidad unidades compatibles:
a) No transfundir en profilaxis. Valorar asociar antifibrinolíticos
b) Si hemorragia activa valorar otras alternativas (IGIV, factor rVIIa...)
<i>C) Ausencia de alosensibilización y presencia de factores clínicos</i>
1. Tratar los factores clínicos
2. Evaluar transfusiones frecuentes y con menor n.º absoluto de plaquetas transfundidas
3. En caso de esplenomegalia, valorar aumentar el n.º absoluto de plaquetas transfundidas
<i>D) Ausencia de alosensibilización y ausencia de factores clínicos aparentes</i>
1. Valorar posible dependencia de fármaco, y retirarlo si se comprueba relación
2. Repetir estudio de alosensibilización (aparición de un nuevo anticuerpo frente a otra especificidad)

Ac frente a las glicoproteínas plaquetarias y como técnica de escrutinio de Ac anti-HLA, si se utiliza un monoclonal reactivo frente a β_2 -microglobulina. Un test más simple es el *test de aglutinación en fase sólida* (Capture-P). En dicho test las plaquetas son fijadas a la superficie de pocillos. Tras la adición del plasma o suero se incuba la mezcla y se muestra la reacción utilizando IgG ligada a hematíes. La utilidad de esta técnica es fundamentalmente en la realización de pruebas cruzadas. Sin embargo, presenta como limitación que puede detectar los Ac de grupo ABO, y no diferencia entre Ac anti-HLA y anti-HPA¹⁴.

Tratamiento de la refractariedad plaquetaria

Dado los múltiples factores involucrados en la refractariedad plaquetaria, una cuidadosa evaluación tanto de los factores clínicos como del riesgo de aloinmunización es clave a la hora de decidir la mejor estrategia en cada caso (Tabla 1).

- a) La transfusión de una dosis adecuada de concentrado(s) de plaquetas isogrupo de corto periodo de almacenamiento (<48 horas) es una buena práctica inicial a la hora de excluir la posible influencia de incompatibilidad ABO y de una defectuosa calidad de las plaquetas transfundidas. Si una hora después de la transfusión el CCI es inferior a 5.000, hay que considerar la posible existencia de factores inmunes. Dado que la refractariedad inmune es la única causa que puede ser soslayada, está indicado un estudio de alosensibilización frente a antígenos plaquetarios (HLA de clase I y HPA). Otros factores que pueden determinar también un pobre CCI a la hora postransfusión son el sangrado activo y la esplenomegalia.
- b) Si el estudio muestra la presencia de aloanticuerpos, evaluar las siguientes aproximaciones en la selección de los donantes^{14,15}:

Selección en base al tipaje HLA del receptor. Precisa de un importante número de donantes tipados para el sistema HLA. Se buscan donantes lo más parecidos posible al receptor. Para ello se utiliza un sistema de grados de compatibilidad (Tabla 2)¹⁶. El grado D se considera similar a una selección al azar del producto a transfundir. Aquellos pacientes con alosensibilización restringida a pocas especificidades son los que tienen más probabilidad de éxito al transfundir unidades de donantes BX, B2X o C. Se considera la mejor opción en caso de presencia de anticuerpos anti-HLA con especificidades múltiples o frente antígenos públicos.

Selección en base a prueba cruzada (PC). Precisa de plaquetas de los donantes de aféresis. La realización de PC permite detectar productos compatibles sin necesidad de disponer del tipaje HLA del paciente o de la especificidad del anticuerpo(s). Detecta tanto anticuerpos dirigidos frente al sistema HLA y HPA. En cambio, su utilidad en pacientes con sensibilización frente a múltiples especificidades es improbable y costosa. El éxito de la transfusión de unidades seleccionadas mediante PC es de alrededor de un 57%.

Selección en base a la especificidad de los anticuerpos. En este caso se seleccionan aquellas unidades que no presentan los antígenos frente a los que el paciente ha desarrollado anticuerpos. En caso de disponer de varias unidades se elige la unidad isogrupo con mayor grado de paridad con el paciente. Esta opción aumenta de forma considerable el número de unidades compatibles, y es tan eficaz como la PC.

Cuando no se dispone de unidades compatibles, no se ha mostrado beneficioso el uso de profilaxis con productos que van a determinar un escaso o nulo rendimiento. Es preferible no transfundir, salvo que se produzca una complicación hemorrágica, y en este caso valorar algunos de los tratamientos posteriormente indicados, a fin de mejorar los resultados pos-

Tabla 2. Grados de compatibilidad HLA

Grado	Descripción	Ejemplo (receptor/donante)
A	HLA idéntico, en los 4 antígenos	A2,10 B7,12 / A2,10 B7,12
BU	Todos los antígenos idénticos, sólo se detectan 3 antígenos	A2,10 B7,12 / A2 B7,12
B2U	Todos los antígenos idénticos, sólo se detectan 2 antígenos	A2,10 B7,12 / A2 B7
BX	3 antígenos idénticos, 1 no idéntico del mismo grupo CREG	A2,10 B7,12 / A2,32 B7,12
BUX	2 antígenos idénticos, 1 no idéntico del mismo grupo CREG	A2,10 B7,12 / A2,32 B7
B2X	2 antígenos idénticos, 2 no idénticos del mismo grupo CREG	A2,10 B7,12 / A2,32 B7,13
C	Sólo 1 antígeno no idéntico	A2,10 B7,12 / A2,3 B7,12
D	≥ 2 antígenos no idénticos	A2,10 B7,12 / A2,3 B7,17

transfusionales. No obstante, ante situaciones de posible necesidad de transfusiones de CP (p. ej., candidatos a trasplante hepático) se podrían intentar terapias inmunosupresoras para disminuir los títulos de anticuerpos, lo que permitiría realizar el procedimiento. Asimismo, dado que en algunos pacientes su espectro de sensibilizaciones puede incrementarse o, por el contrario, reducirse e incluso desaparecer (especialmente en pacientes oncohematológicos sometidos a quimioterapia), se aconseja realizar periódicamente estudios de alosensibilización (p. ej., mensuales) en aquellos pacientes que persisten en riesgo de precisar transfusiones de CP.

Estrategias alternativas:

Uso de altas dosis de inmunoglobulinas IV (IGIV). Un estudio aleatorizado en pacientes alosensibilizados ha mostrado que aquellos pacientes que recibían IGIV presentaban un CCI a la hora significativamente mayor que los pacientes que recibían placebo. Este efecto era de corta duración, de forma que no se mantenía a las 24 horas y precisaba de la administración de dosis muy elevadas > 5 g/kg¹⁷. Por ello, esta opción queda relegada a pacientes con sangrado de riesgo vital sin otras alternativas. Por el contrario, el uso de gammaglobulina anti-D ha mostrado resultados desalentadores.

Plasmaféresis aislada o asociada a inmunoadsorción. Este tratamiento ha mostrado resultados dispares y, en el mejor de los casos, escasa mejoría en los rendimientos postransfusionales. La combinación con terapia inmunosupresora, tipo rituximab, puede determinar una mejoría en la recuperación postransfusional.

Terapia inmunosupresora. En estudios animales, el uso de ciclosporina A y timoglobulina ha mostrado que puede revertir la inmunización, aunque requiere de un mínimo de 2-3 semanas. Muy escaso número de pacientes se ha beneficiado de dicha actuación.

Agentes antifibrinolíticos. El ácido tranexámico puede reducir el número de periodos hemorrágicos sin incrementar el riesgo tromboembólico en pacientes con

leucemia aguda promielocítica¹⁸. De igual manera, el EACA ha mostrado su capacidad de prevenir episodios hemorrágicos mayores en pacientes leucémicos¹⁹.

Criopreservación de plaquetas autólogas. Si la disponibilidad de donantes es escasa y se prevén periodos posteriores de pancitopenia en un paciente, es factible recolectar plaquetas mediante aféresis en el periodo de recuperación plaquetaria y criopreservarlas para su utilización en la fase de trombocitopenia²⁰.

Factor rVIIa. El factor rVIIa parece tener un impacto positivo en el sangrado de pacientes con trombocitopenia refractaria a transfusiones. Sin embargo, los datos son escasos y limitados mayoritariamente a casos clínicos o pequeños estudios²¹. Un estudio realizado en pacientes sometidos a trasplante de CPH no fue capaz de demostrar su eficacia²². Además, hay que aclarar la posible ventaja de asociarlo a otros fármacos (antifibrinolíticos) o bien a las transfusiones de plaquetas para mejorar la generación de trombina. Se necesitan ensayos clínicos que prueben su eficacia.

c) Si sólo se evidencian factores clínicos asociados con un incremento en el consumo de plaquetas, una opción sería administrar transfusiones frecuentes y con menor dosis, con el objetivo de asegurar el consumo derivado del mantenimiento de la integridad vascular, más que incrementar la dosis de cada transfusión. Una excepción es la esplenomegalia, donde puede ser de más valor incrementar el número de plaquetas transfundidas.

d) En aquellos pacientes refractarios sin una causa clara, se debe intentar comprobar si existe una relación evidente entre el comienzo de la misma y la administración de un fármaco.

Conclusiones

La refractariedad plaquetaria, pese a las medidas introducidas para reducir su incidencia (leucofiltración), continúa siendo una complicación grave y un

reto para los servicios de transfusión a la hora de decidir la mejor estrategia transfusional en estos pacientes. Además, conlleva unos elevados costes derivados tanto del diagnóstico de laboratorio y de los estudios para la localización de unidades compatibles como del despilfarro de productos sanguíneos, así como de los riesgos relacionados con el incremento de contactos, especialmente de lesión pulmonar asociada a transfusión. Por ello, un mejor conocimiento de los mecanismos de refractariedad y de la eficacia de las medidas actuales puede determinar una toma de decisiones más temprana para evitar o al menos disminuir el riesgo de refractariedad plaquetaria, así como para adoptar aquellas más eficaces en los pacientes con refractariedad plaquetaria.

Bibliografía

- Duke WW. The relation of blood platelets to haemorrhagic disease: Description of a method for determining the bleeding time and coagulation time and report of three cases of haemorrhagic disease relieved by transfusion. *JAMA* 1910; 55: 1185-92.
- Davis KB, Slichter SJ, Corash L. Corrected count increment and percent platelet recovery as measures of posttransfusion platelet response: problems and a solution. *Transfusion* 1999; 39: 586-92.
- Novotny VMJ, van Doorn R, Rozier Y, D'Amaro J, Harvey MS, Brand A. Transfusion results of filtered and subsequently stored random platelet transfusions prepared from buffy coats. *Vox Sang* 1992; 63: 23-30.
- Norol F, Kuentz M, Cordonnier C, Beujean F, Kaioun C, Vernant JP, Duedari N. Influence of clinical status on the efficiency of stored platelet transfusions. *Br J Haematol* 1994; 86: 125-9.
- Slichter SJ. Leukocyte reduction and ultraviolet B irradiation of platelets to prevent alloimmunization and refractoriness to platelet transfusions. The trial to reduce alloimmunization to platelets study group. *N Eng J Med* 1997; 337: 1861-9.
- Slichter SJ. Evidence-based platelet transfusion guidelines. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007; 2007: 172-8.
- Slichter SJ, Davis K, Enright H, Braine H, Gernsheimer T, Kao KJ, et al. Factors affecting posttransfusion platelet increments, platelet refractoriness, and platelet transfusion intervals in thrombocytopenic patients. *Blood* 2005; 105: 4106-14.
- Ishida A, Handa M, Wakui M, Okamoto S, Kamakura M, Ikeda Y. Clinical factors influencing posttransfusion platelet increments in patients undergoing hematopoietic progenitor cell transplantation: a prospective analysis. *Transfusion* 1998; 38: 839-47.
- Heal JM, Blumberg N, Masel D. An evaluation of crossmatching, HLA and ABO matching for platelet transfusions to refractoriness. *Blood* 1987; 70: 23-30.
- Sintnicolaas K, van Marwijk Kooij M, van Prooijen HC, van Dijk BA, van Putten WL, Claas FH, et al. Leukocyte depletion of random single-donor platelet transfusions does not prevent secondary human leukocyte antigen-alloimmunization and refractoriness: a randomized prospective study. *Blood* 1995; 85: 824-8.
- Sintnicolaas K, Vriesendorp HM, Sizoo W, Stenfert Kroese WF, Haije WG, Hop WCJ, et al. Delayed alloimmunisation by random single donor platelet transfusions. A randomised study to compare single donor and multiple donor platelet transfusions in cancer patients with severe thrombocytopenia. *Lancet* 1981; 1: 750-4.
- Cobain TJ, Vamvakas EC, Wells A, Titlestad K. A survey of the demographics of blood use. *Transfus Med* 2007; 17: 1-15.
- Novotny VMJ. Prevention and management of platelet transfusion refractoriness. *Vox Sang* 1999; 76: 1-13.
- Engelfriet CP, Reesink HW, Aster RH, Brand A, Tomson B, Claas FHJ, et al. Management of alloimmunized, refractory patients in need of platelet transfusion. *Vox Sang* 1997; 73: 191-8.
- Delaflor-Weiss E, Mintz PD. The evaluation and management of platelet refractoriness and alloimmunization. *Transfus Med Rev* 2000; 14: 180-96.
- Dusquenoy RJ, Filip DJ, Rodey GE, Rimm AA, Aster RH. Successful transfusion of platelets "mismatched" for HLA antigens to alloimmunized thrombocytopenic patients. *Am J Hematol* 1977; 2: 219-26.
- Kickler T, Braine HG, Piantadosi S, Ness PM, Herman JH, Rothko K. A randomized, placebo-controlled trial of intravenous gammaglobulin in alloimmunized thrombocytopenic patients. *Blood* 1990; 75: 313-6.
- Avvisati G, ten Cate JW, Büller HR, Mandelli F. Tranexamic acid for control of haemorrhage in acute promyelocytic leukaemia. *Lancet* 1989; 2: 122-4.
- Gardner FH, Helmer RE. Antifibrinolytic therapy for bleeding control during remission induction for acute leukemia. *Blood* 1983; 62: 202A (abstr).
- Torretta L, Perotti C, Pedrazoli P, Domini G, Viarengo G, Livraghi A, et al. Autologous platelet collection and storage to support thrombocytopenia in patients undergoing high-dose chemotherapy and circulating progenitor cell transplantation for high-risk breast cancer. *Vox Sang* 1998; 75: 224-9.
- Poon MC. The evidence for the use of recombinant Human Activated Factor VII in the treatment of bleeding patients with quantitative and qualitative platelet disorders. *Transfus Med Rev* 2007; 21: 223-36.
- Pihusch M, Bacigalupo A, Szer J, von Depka Prondzinski M, Gaspar-Blaudschun B, Hyveled L, et al. Recombinant activated factor VII in treatment of bleeding complications following hematopoietic stem cell transplantation. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1935-44.

USO DEL PLASMA FRESCO CONGELADO: INDICACIONES BASADAS EN LA EVIDENCIA

J. ANGUIA VELASCO

Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid

Introducción

La transfusión de plasma fresco congelado (PFC) continúa siendo habitual en la mayoría de los servicios médicos y quirúrgicos de los hospitales. Se han publicado numerosas guías sobre su uso. Sin embargo, los ensayos clínicos bien diseñados que avalan su eficacia, son más bien escasos y con numerosos defectos metodológicos¹.

Fuera de la púrpura trombótica trombocitopénica, el uso actual del PFC se aplica a situaciones donde se encuentran alteraciones en alguno de los parámetros del estudio básico de coagulación (INR, actividad de protrombina, tiempo de tromboplastina parcialmente activado), tanto en pacientes con hemorragia activa como, de forma profiláctica, en pacientes sin sangrado pero que precisan someterse a algún tipo de procedimiento invasivo o cirugía. La evidencia bibliográfica sobre la eficacia y el uso del PFC en un contexto terapéutico es mínima, recogiendo la mayoría de estudios clínicos su empleo en un contexto de profilaxis¹⁻⁴.

Se considera que un resultado anormal en el estudio de coagulación es un factor predictivo de sangrado ante un procedimiento invasivo o en cualquier otra situación de riesgo, y se piensa que la transfusión del PFC mejorará los parámetros hemostáticos y reducirá el riesgo hemorrágico. En contra de este argumento está que la indicación del uso del PFC, recogido en las guías clínicas, como uso profiláctico no está respaldado por ensayos aleatorizados de buena calidad metodológica. Incluso el mejor ensayo clínico sobre el uso profiláctico del PFC indica que no es efectivo en la mayoría de las situaciones clínicas, y esto se puede inferir de los datos de estudios no aleatorizados en pacientes con alteraciones leves o moderadas en los parámetros de coagulación.

Definición de plasma fresco congelado. Estado actual del PFC en España

Una unidad de PFC proviene de una donación de sangre total o de plasmaféresis, que se congela dentro de un margen específico de tiempo después de su extracción (idealmente en menos de 8 horas) y que después se almacena congelado al menos a -30°C .

Para su uso se descongela bajo condiciones de temperatura controlada a 37°C en unos 20 minutos, conservando los niveles plasmáticos normales de la mayoría de las proteínas plasmáticas, incluyendo los factores procoagulantes (factores de la coagulación) e inhibidores de todo el sistema hemostático, proteínas reactantes de fase aguda, inmunoglobulinas y albúmina. Estos componentes se encuentran ligeramente diluidos debido a la solución anticoagulante añadida a la donación de sangre total. El único control de calidad al que se tiene que someter según normativas europeas y nacionales consiste en mantener unos niveles de factor VIII por encima del 70%. Una unidad de PFC tiene un volumen de entre 200 y 300 mL, y la dosis recomendada es de 10 a 20 mL/kg. Se recomienda transfundir en menos de 2 horas para

preservar los factores lábiles de la coagulación. Aunque en un contexto clínico se asume que todas las unidades son equivalentes en términos de eficacia, se ha evidenciado una gran heterogeneidad, reflejando la variabilidad biológica de los donantes (por ejemplo, factor VIII en el grupo sanguíneo 0), diferencias en el procesamiento, almacenamiento y formas de administración.

En España la legislación establece que al PFC para su uso clínico se le debe aplicar alguna medida que aumente su perfil de seguridad y se adecue a criterios de eficacia demostrada. Entre las medidas que contempla la norma se encuentra el “cuarentenado” del plasma durante un periodo de varios meses hasta que el donante realiza una nueva donación. Otras medidas recogidas en la normativa son las técnicas de inactivación viral, debidamente autorizadas, como la atenuación de patógenos mediante el azul de metileno o solvente detergente. Los datos disponibles a nivel nacional sobre los métodos utilizados apuntan que el 63% del PFC empleado es fotoinactivado con azul de metileno y que el resto (37%) es cuarentenado⁵.

El PFC es la fuente fundamental de obtención de derivados plasmáticos: concentrados de factores de la coagulación, albúmina, inmunoglobulinas, etc. La mayoría del plasma obtenido de las donaciones es utilizado con este fin. En el año 2006 en España se obtuvieron 362.426 litros de PFC, de los cuales sólo el 19,6% fue empleado para uso transfusional, mientras que el resto fue derivado a la industria fraccionadora⁵.

Uso actual del PFC en España y otros países de nuestro entorno

El consumo de PFC ha permanecido relativamente estable en los últimos 10 años, oscilando entre los 50.000 y 60.000 litros (248.052 unidades totales). En términos relativos, el parámetro más utilizado es la ratio número de unidades de PFC transfundido/número de concentrados de hematíes (CH) transfundidos. Actualmente la ratio PFC/CH en España varía de 1:6,6 a 1:4,5 según las distintas comunidades autónomas. Es interesante destacar cómo esta ratio varía sensiblemente cuando se analiza comparando los centros hospitalarios según el consumo de CH transfundidos e incluso dentro de un mismo grupo de centros⁵. Por ejemplo, entre los grandes hospitales (más de 10.000 unidades de CH/año) se pueden encontrar ratios desde 1:3,1 hasta 1:8,0 con una media de 1:4,3. Estos datos nos situarían dentro de la media de la Unión Europea (ratio PFC/CH 1:6,0 y en mejor situación que EE UU, con un dramático incremento superior al 70% en los últimos 10 años y una ratio cercana a 1:3.

Tabla 1. Indicaciones del PFC según guía sobre la transfusión de componentes sanguíneos y derivados plasmáticos. SETS⁷

<i>1. Indicaciones en las que su uso está establecido y su eficacia demostrada</i>
· Púrpura trombótica trombocitopénica
· Púrpura fulminante del recién nacido, secundaria a deficiencia congénita de la proteína C o proteína S, siempre que no se disponga de concentrados específicos de esos factores
· Exanguinotransfusión en neonatos para reconstituir el concentrado de hematíes cuando no se disponga de sangre total
<i>2. Indicaciones cuyo uso está condicionado a la existencia de una hemorragia grave y alteraciones de las pruebas de coagulación</i>
· En pacientes que reciben transfusión masiva
· Trasplante hepático
· Reposición de los factores de la coagulación en las deficiencias congénitas cuando no existan concentrados de factores específicos
· Situaciones clínicas con déficit de vitamina K que no permitan esperar la respuesta a la administración de vitamina K endovenosa o no respondan adecuadamente a ésta (malabsorción, enfermedad hemorrágica del recién nacido, etc.)
· Neutralización inmediata del efecto de los anticoagulantes orales
· Hemorragias secundarias a tratamientos trombolíticos
· Coagulación intravascular diseminada aguda
· Cirugía cardíaca con circulación extracorpórea
· En pacientes con insuficiencia hepatocelular grave y hemorragia microvascular difusa o hemorragia localizada con riesgo vital
· Reposición de los factores plasmáticos de la coagulación deplecionados durante el recambio plasmático cuando se haya utilizado albúmina como solución de recambio
<i>3. Indicaciones en ausencia de clínica pero con alteración de las pruebas de coagulación</i>
· En pacientes con déficits congénitos de la coagulación, cuando no existan concentrados de factores específicos, ante la eventualidad de una actuación agresiva, procedimientos invasivos y/o traumáticos
· En pacientes sometidos a anticoagulación oral que precisen cirugía inminente y, por consiguiente, no se pueda esperar el tiempo necesario para la corrección de la hemostasia con vitamina K endovenosa (6-8 horas)

Indicaciones para el uso del PFC

Antes de la Conferencia de Consenso de 1993 para el uso y riesgos del PFC⁶ se transfundía PFC en situaciones de hipovolemia, expansión de volumen, insuficiencia proteica y otras actualmente no indicadas. Afortunadamente, hoy en día existen numerosas guías, además de la anteriormente citada, que delimitan claramente el uso clínico del PFC. La mayoría de las publicaciones que han auditado la transfusión del PFC reflejan en mayor o menor medida estas recomendaciones. Los escenarios clínicos habituales donde el PFC es requerido son hepatopatía, cirugía cardíaca, reversión del exceso de anticoagulación producido por los anticoagulantes orales, trasplante hepático, coagulación intravascular diseminada, transfusión masiva y, por supuesto, la púrpura trombótica trombocitopénica (PTT). M. Algora⁵, del Centro de Transfusiones de Madrid, en un estudio preliminar ha podido objetivar el uso de más de 1.700 unidades de PFC en una encuesta realizada a los hospitales de Madrid. El 48% de los casos el PFC estaba indicado para la reposición de factores de la coagulación (sangrado quirúrgico, hemorragia aguda grave), el 13% se indicaba en el trasplante hepático, el 12%

en el tratamiento para la PTT, la transfusión masiva constituía el 11% de las indicaciones y las hepatopatías en general el 10%. En las Tablas 1 y 2 se recogen las indicaciones de la última guía de la Sociedad Española de Transfusión Sanguínea⁷. La guía británica sobre transfusión de PFC y crioprecipitado recoge en algunas de sus indicaciones el nivel de evidencia y el grado de recomendación⁸.

Dejando aparte el tratamiento de la PTT, las deficiencias congénitas de factor V y de cualquier factor cuando no se dispone del concentrado específico, la realidad actual de la transfusión del PFC refleja un uso en los enfermos con coagulopatía y sangrado o con coagulopatía que precisan someterse a algún procedimiento invasivo.

Cuando un médico está solicitando PFC asume que:

1. Las alteraciones en los parámetros de la coagulación TP e INR predicen el riesgo de sangrado de un paciente.
2. La transfusión del PFC corregirá los tiempos de coagulación prolongados y reducirá o eliminará el riesgo de sangrado.
3. La transfusión profiláctica de PFC en los pacientes con coagulopatía que van a ser sometidos a un pro-

Tabla 2. El uso del PFC no está indicado

Situaciones en las que el uso del PFC NO ESTÁ INDICADO:
· Todas aquellas que puedan resolverse con terapéuticas alternativas o coadyuvantes (antifibrinolíticos, DDAVP, concentrados específicos...)
· Como expansor de volumen o para recuperación o mantenimiento de presión oncótica y/o arterial
· Como parte integrante de esquemas de reposición predeterminados (p. ej.: 1 unidad de PFC por cada 2 o 3 de CH)
· Prevención de hemorragia intraventricular del recién nacido prematuro
· Como aporte de inmunoglobulinas
· Uso profiláctico en pacientes diagnosticados de hepatopatía crónica con alteración de las pruebas de coagulación, que van a ser sometidos a procedimientos invasivos menores
· En pacientes con hepatopatía crónica e insuficiencia hepatocelular avanzada en fase terminal
· El PFC no debe utilizarse como aporte nutricional o para la corrección de hipoproteïnemia, ni en alimentación parenteral prolongada o inespecíficamente en el paciente séptico. Tampoco debe utilizarse como aporte de componentes del complemento, ni como aporte de factores de coagulación en el recambio plasmático, excepto lo aclarado anteriormente
· Corrección del efecto anticoagulante de la heparina
· Reposición del volumen en las sangrías del recién nacido con policitemia
· Ajuste del hematocrito de los concentrados de hemáties que van a ser transfundidos a los recién nacidos

cedimiento invasivo disminuirá la probabilidad de sangrado.

4. En cualquier caso, en la mayoría de los casos los beneficios de la transfusión del PFC superan a los riesgos.

Estas suposiciones han sido motivo de estudio en revisiones y estudios controlados publicados en los últimos años, sentando una cierta base que nos ayude a dirigir la transfusión del PFC basado en la evidencia.

Alteraciones de los parámetros de la coagulación y riesgo de sangrado

Las pruebas clásicas que exploran la vía extrínseca (tiempo de tromboplastina parcialmente activado, TTPA) e intrínseca (tiempo de protrombina o INR) se crearon para diagnosticar deficiencias congénitas de algún factor de la coagulación en pacientes con historia de sangrado. El valor de estos parámetros en un contexto clínico más general es motivo de discusión. El TTPA y el TP dependen del tipo de reactivos empleados (sensibilidad), de los controles de calidad y de los analizadores empleados, por lo que sus valores pueden estar fuera de los rangos de referencia sin relacionarse con el riesgo de sangrado. Deitcher⁹ demostró que INR de entre 1,3 y 1,9 representaban concentraciones de factor II del 31-65%, de factor V del 40-70% y de factor VII de un 22-60%, todos ellos dentro del rango hemostático. En esta misma línea, Segal *et al.*¹⁰ publicaron una revisión de todos los trabajos que describían el riesgo de sangrado en relación con las alteraciones de la coagulación ante un procedimiento invasivo. Este

análisis encontró un solo estudio controlado metodológicamente bien diseñado en pacientes que se iban a someter a una biopsia hepática, y otros 24 estudios observacionales (sólo 14 con un grupo control) que cubrían un amplio espectro de situaciones (broncoscopias, colocación de catéteres centrales, arteriografías femorales, biopsias hepáticas, paracentesis y toracocentesis y biopsias renales). Considerados todos ellos, la evidencia no apoya que las alteraciones de los parámetros de la coagulación se correlacionen con el riesgo de sangrado durante el procedimiento.

Ya que la hemostasia entendida de una forma global depende de una compleja red de interrelaciones entre el endotelio, las plaquetas, algunas células proinflamatorias, actividad fibrinolítica, así como de los factores procoagulantes e inhibitorios de la coagulación, no sorprende que las alteraciones de un solo componente (prolongación de los tiempos de coagulación) no sean un marcador predictivo sensible del riesgo de sangrado².

Eficacia de la transfusión de PFC

Los estudios aleatorizados controlados deberían servir para demostrar la mayor eficacia del PFC frente a la no transfusión o a la administración de otros productos no hemoderivados, como lo cristaloides o coloides, aunque es sabido que estos últimos producen por sí mismos efectos variables sobre la hemostasia, por lo que este tipo de estudios se deberían evaluar de forma independiente. En este sentido, Stanworth *et al.*³ encontraron, después de una revi-

sión de la literatura sobre el uso del PFC, un total de 57 estudios. Sólo 17 comparaban la transfusión del PFC con la no intervención o con algún tipo de solución no sanguínea en adultos. En este mismo estudio, que analizaba la transfusión en profilaxis ante un procedimiento invasivo con alteraciones en los parámetros de la coagulación, no se encontró evidencia sobre su eficacia.

S.J. Stanworth, en una revisión reciente analizó la información disponible en algunas situaciones clínicas concretas².

Transfusión masiva y coagulación intravascular diseminada (CID)

Existen muy pocos estudios que analicen la transfusión del PFC en este contexto clínico. Desde un punto de vista fisiopatológico parece razonable el empleo de PFC en estas situaciones, aunque un estudio aislado en neonatos con muy pocos pacientes no encontró diferencias en el grupo que recibía el PFC en cuanto a normalización de los parámetros de la coagulación o supervivencia. Recientemente se ha publicado un estudio a favor de iniciar la transfusión precozmente en el contexto de la cirugía de la rotura de aneurisma aórtico. La mayoría de las guías recomiendan que el empleo del PFC en estas situaciones se realice siempre monitorizando los parámetros analíticos de laboratorio, así como los datos clínicos de cada momento.

Hepatopatía

La coagulopatía de las hepatopatías es muy compleja, ya que intervienen varios factores (plaquetas, fibrinólisis, inhibidores de la coagulación, deficiencias de factores múltiples, etc.). Sólo un estudio aleatorizado demostró que la transfusión de PFC de forma profiláctica en hepatopatía por sobredosis por paracetamol no era superior a la no transfusión. Otros estudios no controlados de menor calidad tampoco han encontrado beneficio a la transfusión de PFC en las coagulopatías de los hepatópatas sin sangrado importante.

Exceso de anticoagulación producido por los anticoagulantes orales

En ausencia de sangrado, la vitamina K es la opción de elección. Cuando existe sangrado o cuando es precisa una corrección del efecto rápidamente (por ejemplo, para proceder a una cirugía urgente), la transfusión de PFC o de concentrados protrom-

bínicos (CP) está recomendada. Sin embargo, no existen estudios que demuestren superioridad de uno u otro tratamiento. Un autor encontró una recuperación más rápida de los parámetros de laboratorio con el uso de los CP que con el PFC, pero se desconoce su repercusión en la clínica y el verdadero riesgo de incremento de las complicaciones trombóticas.

Cirugía cardíaca

La cirugía extracorpórea produce cambios hemostáticos a muchos niveles. Superficie extraña, hipotermia, empleo de heparina, trombocitopenia y trombopatía; y cuando se produce un sangrado importante, deficiencia de los factores de la coagulación. La revisión de la literatura (incluyendo un metaanálisis) evidencia que la transfusión profiláctica de PFC en este contexto está contraindicada. De nuevo, la monitorización analítica debe guiar su empleo.

Unidades de cuidados intensivos (UCI)

El empleo del PFC en UCI se debe guiarse por la enfermedad o complicación subyacente, y no es diferente de lo anteriormente expuesto. No obstante, cabe destacar el incremento de riesgo de TRALI objetivado en pacientes ingresados en UCI que recibían PFC de forma profiláctica. Es posible que el estado proinflamatorio de estos pacientes favorezca la aparición de esta grave complicación.

¿Cuál es la dosis óptima del PFC?

Sobre una teórica base fisiopatológica la eficacia del PFC sería dosis-dependiente. De tal forma que a más cantidad transfundida más aporte de factores y mejor control de la hemorragia y recuperación de los parámetros de la coagulación. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que las dosis habituales empleadas de PFC no corrigen las alteraciones leves o moderadas del INR (1,1-1,85). Abdel-Wahab *et al.*¹¹ objetivaron en un estudio prospectivo de su centro que sólo el 1% de los pacientes normalizaban el INR después de la transfusión del PFC, y que el 15% corregían en un 50% este parámetro. En otro estudio que evaluaba dos dosis diferentes (12,2 mL/kg vs. 33,5 mL/kg), se encontró que la dosis menor no conseguía el objetivo marcado en la recuperación de los factores de la coagulación. En los estudios en los que se ha comunicado cierto beneficio, éste ha sido sólo marginal (media de reducción del INR: 0,2; rango: 0-0,7).

Tabla 3. Reacciones adversas debidas a la transfusión de PFC. Año 2006

Motivo de la reacción adversa	Número de casos
Alérgicas	151
Febriles	10
Edema pulmonar no cardiogénico	5
Error en administración	5
Casi incidentes	9

Reacciones adversas del PFC

Como cualquier otro derivado sanguíneo, el PFC tiene unos efectos adversos bien definidos. En la Tabla 3 se muestran los comunicados al sistema nacional de hemovigilancia en el año 2006. Además, siempre existe el riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas conocidas o no (priones), como con cualquier otro hemoderivado. Estas reacciones adversas deben ser tenidas en cuenta junto con la evidencia mostrada por los diferentes estudios publicados a la hora de indicar la transfusión del PFC, pues no es evidente, a la vista de lo comentado en esta revisión, que los beneficios superen a los riesgos.

Consideraciones finales

De las revisiones publicadas, se puede concluir que no existen estudios bien diseñados y de adecuado tamaño muestral que apoyen el empleo de las alteraciones de los parámetros de la coagulación (al menos las leves y moderadas) como guía para la transfusión de PFC en el manejo de la coagulopatía de los enfermos con sangrado o en aquellos que se vayan a someter a un procedimiento invasivo. Generalmente, los trabajos que se incluyen en estas revisiones están inadecuadamente diseñados para encontrar un efecto, por diversas razones¹:

1. Se recoge un número escaso de pacientes, por lo que restan potencia estadística en las conclusiones.
2. No se exponen claros objetivos en los estudios o, cuando se plantean, éstos son demasiado groseros para poder sacar conclusiones relevantes. Pequeños beneficios sobre la hemostasia de estos enfermos pasarán desapercibidos.
3. La dosis empleada en la mayoría de las publicaciones representa una dosis mínima de plasma que va desde los 6 mL a los 15 mL por kg de

peso. Aunque la dosis adecuada de PFC se desconoce, existe una base biológica que indicaría que el efecto es dosis-dependiente.

4. En los estudios se ha incluido un número escaso de pacientes con alteraciones de la coagulación moderadas o graves (INR > 2), por lo que todo lo aquí expuesto no es extrapolable a los casos con coagulopatías graves.

Existe una clara necesidad de llevar a cabo estudios nuevos que evalúen la eficacia y la seguridad, en pacientes con o sin sangrado activo, para poder establecer que los beneficios de la transfusión del PFC superan los riesgos. Además, es necesario validar nuevos parámetros hemostáticos que definan mejor el riesgo hemorrágico de un determinado enfermo y, además, sirvan para monitorizar la eficacia de la transfusión del PFC. Los cambios que se produzcan como consecuencia de los nuevos estudios deben servir de oportunidad para desarrollar estrategias educativas efectivas dirigidas a un uso racional del PFC.

Bibliografía

1. Triulzi DJ. The art of plasma transfusion therapy. *Transfusion* 2006; 46: 1268-70.
2. Stanworth SJ. The evidence-based use of FFP and cryoprecipitate for abnormalities of coagulation tests and clinical coagulopathy. *Am Soc Hematol Educ Program* 2007; 2007: 179-86.
3. Stanworth SJ, Brunskill S, Hyde CJ, McClelland DBL, Murphy MF. Is fresh frozen plasma clinically effective? A systematic review of randomized controlled trials. *Br J Haematol* 2004; 126: 139-52.
4. Holland L, Sarode R. Should plasma be transfused prophylactically before invasive procedures? *Curr Opin Hematol* 2006; 13: 447-51.
5. Algora M, Barbolla L. Uso del plasma fresco congelado en España. Libro de ponencias del III Congreso de la Asociación Madrileña de Hematología y Hemoterapia. Madrid: Acción Médica; 2008. p. 69-73.
6. Consensus conference. The clinical indications and risks with fresh frozen plasma in Spain. *An Esp Pediatr* 1993; 39: 335-8.
7. Guía sobre la transfusión de componentes sanguíneos y derivados plasmáticos. 3.^a edición. Sociedad Española de Transfusión Sanguínea (SETS); 2006. p. 63-7.
8. BCSH Guidelines for the use of fresh frozen plasma, cryoprecipitate and cryosupernatant. *Br J Haematol* 2004; 126: 11-28.
9. Dietcher SR. Interpretation of international normalised ratio in patients with liver disease. *Lancet* 2002; 359: 47-8.
10. Segal JB, Dzik WH. Paucity of studies to support that abnormal coagulation test results predict bleeding in the setting of invasive procedures: an evidence-based review. *Transfusion* 2005; 45: 1413-25.
11. Abdel-Wahab OI, Healy B, Dzik WH. Effect of fresh-frozen plasma transfusion on prothrombin time and bleeding in patients with mild coagulation abnormalities. *Transfusion* 2006; 46: 1279-85.

Gestión en hematología

COORDINADOR: R. SALINAS. *Barcelona*

Resumen del simposio

En los últimos años la AEHH, de forma sistemática cada dos o tres años, incluye un simposio de gestión entre los temas del congreso. La gestión entre los profesionales sanitarios se entiende como una rareza, una situación o anécdota a la que se han de dedicar sólo los responsables de los servicios o áreas. La realidad es que el profesional de la medicina es, en sí mismo, un asignador o controlador de recursos económicos, y el buen criterio en el uso de estos recursos es lo que permitirá que nuestra sanidad siga siendo universal, gratuita y sin límite en las prestaciones. El modelo sanitario español es, hoy por hoy, uno de los más equitativos del mundo. La tecnología está al alcance de la mayoría de los ciudadanos y esa tecnología es cada día más puntera. Por ello, es importante que periódicamente reflexionemos conjuntamente sobre cómo debemos organizarnos y que, con la ayuda de expertos en la materia, observemos hacia dónde se encamina el futuro de la sanidad, para poder posicionar nuestros servicios y a nosotros mismos como profesionales.

Este simposio tiene como objetivo analizar la realidad actual del sistema sanitario y visualizar cuáles son las tendencias organizativas del futuro. Siendo la hematología y hemoterapia una especialidad con componentes asistenciales clínicos y de laboratorio, se reflexiona sobre dos modelos reales (Málaga y Murcia) y se analiza la situación actual y el razonable futuro de nuestra especialidad en el actual entorno sanitario.

Manel Peiró (ESADE, Barcelona) es uno de los médicos españoles pioneros en temas de gestión sanitaria. En su ponencia analiza el papel del hospital como organización de profesionales así como el papel de los profesionales en la propia institución. Los profesionales ejercen su profesión bajo modalidades diferentes: unos se dedican exclusivamente al ejercicio de la medicina privada, ya sea solos o en grupo, y otros trabajan como asalariados en hospitales públicos. Sin embargo, el 50% ejerce la medicina en ambos ámbitos. Esos profesionales, que encuentran en el hospital cierto grado de satisfacción, sobre todo en relación con los ámbitos cognoscitivos, expresan, por contra, una clara insatisfacción en lo referente a los modelos organizativos y, sobre todo, por los conflictos entre gerentes y profesionales, especialmente por el control de los recursos y el control del trabajo. Es por ello por lo que se postula que los hospitales públicos deben adquirir una capacidad de gestión de la que ahora carecen, que debe basarse en varios ejes: gobernabilidad, autonomía de gestión, alianzas –creación de redes, integración entre niveles asistenciales, gestión de procesos transversales y externalización de servicios.

Gemma Ramírez, Isabel Caparrós y Anabel Gallardo (del Hospital Clínico Virgen de la Victoria de Málaga) analizan el laboratorio de hematología. En primer lugar, comentan los conceptos de laboratorio general y de laboratorio especializado, que definen como un recinto único en el que se comparten recursos comunes y se actúa por un modelo de gestión de competencias. En Andalucía, la Consejería de Salud, que promueve la gestión por procesos asistenciales integrados, desarrolló la del laboratorio en el año 2004. En ese proceso intervienen los representantes de análisis clínicos, hematología, microbiología, anatomía patológica, enfermería, médicos de familia, y dirección. La razón de que se incluya la medicina de familia se debe a que el 50% de la actividad es originaria de atención primaria. Se crean dos figuras: el enlace entre el laboratorio y los clientes, y el coordinador autonómico, cuya principal misión es la gestión de las externalizaciones y la cartera de servicios. Los laboratorios de investigación especializados, en Andalucía, también están centralizados. Así, uno se encuentra en Granada (CABIMER, especializado en biología molecular, señalización celular, células troncales, terapia celular, y medicina regenerativa y genómica) y otros dos en Málaga, en el Hospital Regional Carlos Haya y en el Hospital Clínico Virgen de la Victoria. Finalmente, explican el modelo organizativo de su centro, el cual se podría resumir en un *core lab* y áreas de conocimiento específicas. La dirección del laboratorio es consensuada entre análisis clínicos y hematología.

El Prof. Vicente Vicente, del Hospital Universitario Morales Meseguer de Murcia, comenta la situación actual de la especialidad de hematología y hemoterapia, así como la evolución de la misma desde el modelo original del servicio clásico hasta la fragmentación presente. Plantea como pregunta clave si es imprescindible la fragmentación en unidades independientes con interacción variable, pero deja claro que el contenido doctrinal de la hematología y hemoterapia es incuestionable. Una idea clave es la del “bilingüismo” de la hematología. Así, por una parte, se encuentra la vertiente clínica y la capacidad de estudio biológico facilitada por la cercanía al laboratorio, situación que ha dado lugar a que algunas otras especialidades, que también la han vislumbrado, intenten introducir esos conceptos. Posiblemente –indica Vicente–, el mayor error que podamos cometer en la aplicación de nuestra disciplina sea propiciar que se pierda esa riqueza o no conceder valor al bilingüismo. Posteriormente, el profesor comenta el nuevo modelo de formación de médicos especialistas, en el que se contempla la troncalidad como eje de la evolución de las especialidades médicas. La hematología se engloba dentro del tronco médico, lo que implicará un periodo troncal más amplio en medicina interna. Vicente señala que posiblemente no sean suficientes los cuatro años para la formación global en la especialidad. Por último, analiza los modelos de servicio de hematología y hemoterapia: después de comentar cómo se han desarrollado en el Estado español servicios dispares con la división de la hematología y hemoterapia en áreas descohesionadas, se postula claramente a favor del servicio integral de hematología y hemoterapia. Esta afirmación se basa en varias ideas: la existencia de un servicio integral no exige la utopía de tener hematólogos altamente especializados en cada una de las áreas de la hematología, pero sí requiere un equipo interesado y motivado, así como un contacto diario entre todos los integrantes del servicio, de manera que cada día de la semana se aborden los temas de cada sección y, en la medida de lo posible, todo el personal facultativo tiene que tener contacto con una consulta ambulatoria, y cada sección ha de tener su línea específica de trabajo. Este modelo permite que el residente pueda vivir la especialidad y visualizarla como un conjunto.

La organización del congreso ha tenido la brillante idea de presentar las dos mejores comunicaciones relacionadas con los temas del simposio. Dicha iniciativa, de interés remarcable, permitirá que podamos compartir las iniciativas en gestión y organización que actualmente se desarrollan en nuestro país.

SANIDAD, EL NUEVO CONCEPTO DE HOSPITAL Y LA RED DE CENTROS. NUEVOS RETOS SANITARIOS PARA UNA ECONOMÍA DEFICITARIA

M. PEIRÓ

Director del Área de Gestión Sanitaria y Vicedecano Académico. ESADE-Universitat Ramon Llull

La consolidación del hospital como organización durante el siglo XX ha afectado y transformado profundamente la concepción tradicional del ejercicio de la medicina. En las sociedades desarrolladas la mayor parte de los diferentes profesionales ejercen su profesión en organizaciones, y la organización por excelencia de los médicos, el hospital, ha influido notablemente tanto en la manera de ejercer la medicina como en la concepción de la profesión y en la percepción que los médicos tienen de sí mismos.

Esta consolidación del hospital tiene que ver fundamentalmente con su conversión en una organización de complejidad superior, la organización de profesionales, algo más que una organización convencional que se esfuerza por alcanzar sus objetivos. El hospital pide resultados a sus médicos y ejerce un control mayor sobre su actividad. Por su parte, los facultativos sienten amenazada su autonomía profesional y tienen dificultades para entender y aceptar las demandas de una organización hospitalaria más capaz, con más instrumentos de gestión y de control, y también más burocrática.

Los principios y los valores de una organización burocrática no son los mismos que los principios y los valores de los profesionales, y frecuentemente coliden, de lo que se deriva lo que se ha catalogado como conflicto organización-profesional¹⁻⁴. El descontento, la desmotivación y la insatisfacción profesional manifestados por los médicos de forma reiterada y muy generalizada en los últimos años, y que han suscitado intensos debates en el seno de la profesión, deben interpretarse como algunos de los síntomas con que se presenta este conflicto.

En el contexto español los médicos ejercen su profesión bajo modalidades diferentes: algunos se dedican exclusivamente al ejercicio de la medicina privada, de forma individual o en grupo en centros y clínicas privadas; la gran mayoría trabaja como asalariado en centros de atención primaria o en hospitales vinculados al sistema sanitario público, y bastantes integrantes de este segundo grupo –prácticamente el 50% en algunos estudios⁵– compatibilizan ambas actividades, el ejercicio privado y el asalariado.

Por regla general, los médicos hospitalarios asalariados expresan una cierta satisfacción por trabajar en su hospital, en muchos casos tras años de esfuerzos para estabilizar y consolidar su situación laboral. Esta satisfacción tiene que ver, probablemente, con el componente retador de su trabajo, que les impele a profundizar en sus conocimientos y a incorporar las innovaciones, para mantener y mejorar su competencia profesional y alcanzar el reconocimiento y respeto de los colegas y de los pacientes que atienden.

Pero de forma simultánea, estos médicos manifiestan descontento y malestar por el funcionamiento del hospital, porque buena parte de las decisiones que se toman les resultan incomprensibles y no les parece que tengan en consideración sus opiniones o necesidades. No perciben el apoyo de la dirección en su trabajo y se sienten sometidos a unas exigencias de productividad excesivas y de adecuación de su manera de trabajar a las directrices impulsadas desde la dirección de los centros, que no siempre comparten.

Diversos autores que se han ocupado del denominado conflicto organización-profesional en colectivos médicos han establecido diferentes causas del mismo: el exceso de trabajo y la falta de apoyo⁶, la pérdida de autonomía profesional⁷, la erosión de los valores y de la integridad profesional⁸, una mayor exigencia de responsabilidad por parte de la sociedad⁹ o la clásica “ineficiencia e interferencia de los administradores”². Posiblemente, todas esas causas se pueden explicar acudiendo a una razón última: la interrelación en el hospital de dos modelos, el profesional y el organizativo, basados en principios diferentes y, en muchas ocasiones, contrapuestos, que ejercen una exigencia simultánea de lealtad sobre los médicos, de compromiso con la profesión y con el hospital, lo que generaría este conflicto organización-profesional.

La introducción de la figura de los gerentes en los hospitales españoles durante los años ochenta inició un conflicto entre profesionales y organización, muy contundente en una primera fase, cuando se pusieron de manifiesto dos formas diferentes de entender el funcionamiento del hospital, y se avivó posteriormente por la afirmación de la autoridad de los gerentes sobre la autonomía de los profesionales. Este conflicto entre gerentes y médicos por el control del trabajo y la asignación de los recursos marca profundamente las relaciones entre directivos y profesionales, y caracteriza unas relaciones entre los dos colectivos basadas en la desconfianza, hasta cierto punto características de las organizaciones de profesionales³. En una fase posterior, el conflicto se instala en esta desconfianza de los facultativos hacia los equipos directivos, que por su parte disponen de un escaso margen

de maniobra, sometidos a unas regulaciones normativas poco adecuadas para el funcionamiento administrativo de los centros y excesivamente dependientes de los poderes políticos y de sus avatares.

Diversos estudios y propuestas han sugerido de forma prácticamente unánime la necesidad de fomentar la participación y el compromiso de los médicos con el hospital como la vía más adecuada para superar el conflicto organización-profesional y contribuir a una mejora de la eficiencia de los centros¹⁰⁻²¹. Pero la superación del conflicto difícilmente se puede abordar desde posiciones más sólidas, si la mayoría de los hospitales públicos españoles no adquieren una capacidad de gestión de la que carecen. Mediante esta capacidad de gestión cabe esperar que se puedan implantar políticas de recursos humanos satisfactorias para los profesionales y se afronten con garantías los retos de innovación, de nuevas demandas y de restricciones económicas a las que se ven sometidos los hospitales.

Situación actual y nuevo concepto de hospital

El sistema nacional de salud español ha alcanzado unos logros formidables. La universalidad y gratuidad de la cobertura sanitaria, el alto nivel técnico de los profesionales, los avances tecnológicos incorporados, la adecuación de una red asistencial, que facilita la equidad de acceso... Sin duda, el sistema nacional de salud ha contribuido a mejorar la salud de las personas, garantizando la atención a los ciudadanos, protegiéndoles frente al coste de la enfermedad y contribuyendo a la cohesión social.

En este contexto, el funcionamiento de los hospitales públicos –como el de los centros de salud– no es el que cabría esperar, basado aún en el modelo tradicional de los hospitales INSALUD, transferidos en su totalidad a las comunidades autónomas en 2001. Este modelo de hospital público no resulta el mejor para atender a las necesidades de servicios de la población, a la incorporación permanente de innovaciones, algo habitual en organizaciones de conocimiento, o a las demandas de los profesionales. Tanto desde el punto de vista jurídico como administrativo y organizativo, los hospitales públicos españoles han dado de sí más de lo que podía esperarse, pero su transformación resulta necesaria para que sean organizaciones eficientes y eficaces, que les permita abordar con garantías los nuevos retos. Esta transformación precisa obviamente del acuerdo de muchos actores sociales, algo que en demasiadas ocasiones parece demasiado difícil. Pero abstenerse de nuevo de abordar unas reformas es tanto como confiar en que sin modificar nada los mismos hospitales sean capaces de obtener resultados distintos.

Cualquier reforma de los hospitales públicos españoles debe ir encaminada a dotarles de una capacidad de gestión de la que ahora carecen y que debería sustentarse en los siguientes ejes:

Gobernabilidad

Para garantizar la gobernabilidad de los hospitales se requiere un cambio en su figura jurídica. En la actualidad, en el mejor de los casos los hospitales se tratan como centros de costes presupuestarios, lo que no permite que organizaciones de esa complejidad puedan disponer de la autonomía necesaria para la toma de decisiones que les son propias. La gobernabilidad de las instituciones pasa por que adquieran personalidad jurídica propia y, en consecuencia, se doten de un órgano de gobierno –consejos de administración, patronatos..., en función de la figura jurídica adoptada– con participación de los poderes públicos, pero de carácter independiente. Es fundamental que los poderes públicos sepan respetar la singularidad e independencia de cada institución, porque de lo contrario no es necesario emprender este camino. La finalidad última de los órganos de gobierno de las instituciones es la de garantizar su autonomía, preservar su identidad y velar por su buen funcionamiento.

Autonomía de gestión

La capacidad y autonomía de gestión de los hospitales públicos españoles es muy escasa. Los equipos directivos se ven limitados por unas estrictas normativas, probablemente adecuadas para otro tipo de organizaciones públicas, pero muy poco apropiadas para las instituciones sanitarias, que deben maximizar los recursos escasos de que disponen para hacer frente a demandas crecientes.

La autonomía de gestión implica riesgo, pero también incrementar las posibilidades de mejora, aplicando políticas y gestionando la distinta realidad de cada hospital. La autonomía de gestión debe permitir que las actividades cotidianas de la vida administrativa de los hospitales –contratar personas, comprar bienes y productos necesarios...– dejen de ser el *vía crucis* permanente, las “heroicidades” diarias de los directivos, y se conviertan en operaciones habituales y eficientes.

El marco regulatorio actual prioriza la garantía de respeto a la legalidad vigente antes que el funcionamiento eficiente de las organizaciones. Por desdoblado, abogar por la eficiencia no significa que las instituciones no deban ser respetuosas ni escrupulosas con el cumplimiento de la legalidad, pero el cumpli-

miento estricto de la legislación vigente –por ejemplo, los estatutos de personal o la ley de contratos del Estado– aproxima a los hospitales a la parálisis administrativa más que a garantizar su funcionamiento adecuado.

Alianzas: creación de redes

Un hospital sin autonomía de gestión difícilmente establecerá alianzas sólidas con otras organizaciones. En un mundo tan interrelacionado como el actual las alianzas estratégicas permiten afrontar los rápidos y frecuentes cambios tecnológicos, compartir conocimiento o reducir riesgo financiero. Las alianzas que fracasan suelen hacerlo en la mayoría de las ocasiones porque no han definido claramente los objetivos o no han tenido la capacidad de gestionar la relación entre las organizaciones implicadas.

El desarrollo de una alianza puede concretarse, por ejemplo, en la creación de una red de centros, para lo que se tendrían que cumplir tres condiciones previas: 1) la decisión estratégica de impulsar o utilizar la alianza como una forma para desarrollar el hospital; 2) la autonomía y capacidad de gestión contrastada de las instituciones implicadas, y 3) el compromiso y el acuerdo explícito entre las partes.

De modo que no todos los hospitales y organizaciones sanitarias tienen la capacidad para impulsar alianzas e integrarse en redes: se requiere que los objetivos comunes estén claramente definidos y sean compartidos, los incentivos obtenidos por formar parte de la red deben “alinearse” a todos los integrantes, los recursos destinados a la red deben ser suficientes, las responsabilidades deben estar claramente identificadas, la vigilancia del funcionamiento y evolución de la red de centros debe ser permanente..., como principales factores de éxito.

Integración entre niveles asistenciales

Un buen exponente de la poca capacidad de los centros sanitarios públicos para gestionar redes es la falta de integración entre los niveles asistenciales, entre la atención primaria y la especializada, sin duda la gran asignatura pendiente de nuestro sistema.

Diversos factores favorecen una mayor integración entre los distintos niveles asistenciales: la presión ejercida por los propios usuarios de los servicios asistenciales, el acceso generalizado a nuevas tecnologías de información que facilita la comunicación entre los niveles de atención y posibilita nuevas formas de relación entre ellos, las innovaciones diagnósticas y terapéuticas, que difuminan las fronteras tradicionales entre atención primaria y hospitalaria y permiten

aproximar la atención al usuario, o la presión para el cumplimiento del objetivo presupuestario que fuerza a obtener resultados más eficientes en los procesos diagnósticos y terapéuticos así como la evitación de duplicidades.

No debe extrañar que las experiencias de éxito en integración de servicios se den mayoritariamente en organizaciones con personalidad jurídica propia. Son procesos que han sido impulsados desde los hospitales, que asumen la gestión de áreas básicas de salud en su ámbito geográfico de influencia²². Esta iniciativa de los hospitales ha sido cuestionada por diversos autores, porque en apariencia reproduce el esquema de “hospitalcentrismo” propio de otro contexto histórico y económico ya superado y, fundamentalmente, porque se considera que limita el efecto de puerta de entrada al sistema de salud que debería desempeñar la atención primaria, a fin de reasignar los recursos a través del sistema con mayor eficiencia²³. Este proceso de integración de servicios impulsado desde los hospitales cabe interpretarlo también como la consecuencia del desarrollo de una mentalidad estratégica, derivada de su capacidad de gestión para abordar sus problemas organizativos, económicos y de cartera de servicios. Por tanto, la integración asistencial puede considerarse como una forma de las estrategias cooperativas descritas por Galbraith²⁴, entendida como una respuesta estratégica de los hospitales involucrados para garantizarse un flujo regular de pacientes y, por consiguiente, económico en un entorno de incertidumbre.

Procesos transversales

La estructura básica tradicional de los hospitales basada en los servicios clínicos no es suficiente por sí misma para garantizar la atención adecuada a las nuevas demandas. Los servicios clínicos se fundamentan en la ordenación del conocimiento médico, compartimentado en el ámbito de las especialidades. No obstante, la preponderancia de las patologías crónicas, la pluripatología de unos pacientes progresivamente de más edad, requieren de la intervención simultánea de más de un especialista. Desde esta perspectiva, parece adecuado que sin dismantelar los servicios se desarrolle una visión transversal de la organización, abordando los procesos fundamentales y creando en su caso unidades multidisciplinarias. La consecuencia de todo ello es que el hospital se convierte en una organización aún más compleja que requiere ser gestionada y, como pescadilla que se muerde la cola, sólo las organizaciones con capacidad de gestión contrastada pueden acometer con mínimas garantías este tipo de transformaciones.

Externalización de servicios

La capacidad de gestión de los hospitales debe permitir que algunos de los servicios los preste una organización ajena al mismo. Esta externalización de servicios pretende aprovecharse del mayor grado de experiencia de la organización contratada. En la actualidad hay suficiente experiencia acumulada en diversos ámbitos (diagnóstico por la imagen, análisis clínicos o bancos de sangre) como para confirmar la bondad de esta medida cuando las organizaciones implicadas toman las decisiones desde una perspectiva estratégica y tienen la autonomía y la capacidad de gestión suficiente para llevarlas a término.

Conclusiones

El desarrollo de un nuevo concepto de hospital requiere que se transforme la personalidad jurídica y el marco normativo que regula a los hospitales públicos. Sólo de este modo se puede hablar de la posibilidad de gestionar los hospitales y sólo desde la gestión se puede abordar el conflicto organización-profesional desde una perspectiva diferente y con unas mínimas garantías. En este sentido, los estudios recientes⁵ apuntan las siguientes conclusiones:

1. Los médicos constituyen un colectivo diverso y heterogéneo, en el que existen diferentes concepciones de la profesión, y el ejercicio de la medicina no tiene el mismo significado para todos los profesionales. Una política de recursos humanos dirigida específicamente al colectivo médico, impulsada por el propio hospital o por los servicios centrales de organizaciones sanitarias más extensas pero adecuada a la realidad de cada centro requiere de una identificación previa de diferentes tipologías profesionales, para que las políticas y las acciones que se impulsen sean apropiadas para cada grupo profesional. La gestión de un colectivo de médicos y la resolución de los potenciales conflictos entre la organización y los profesionales precisan que las acciones que se lleven a cabo se adecuen a las demandas y necesidades de cada grupo profesional.
2. El compromiso de los médicos con el hospital en el que trabajan suele ser mayor que el esperado, pero además es gestionable. La dirección del hospital, con sus decisiones y actuaciones, puede conseguir que los médicos se sientan más o menos comprometidos con la organización. Las experiencias favorables en el trabajo, como recompensas organizativas, justicia procedimental, imparcialidad en la distribución de recursos, apoyo del superior, y recompensas y condiciones del puesto de trabajo^{25,26}, contribuyen a que los facultativos valoren el apoyo

organizativo percibido, que es un constructo relacionado intensamente con el compromiso organizativo de los profesionales, por aplicación de una norma de reciprocidad²⁶.

La cuestión es muy obvia: ¿cómo puede conseguirse que los facultativos valoren el apoyo de su hospital cuando la dirección del hospital tiene una limitada capacidad de gestión, que es tanto como decir una limitada capacidad para modificar el curso de los acontecimientos?

3. La figura y la capacidad del jefe de servicio condicionan el grado de compromiso de los médicos con su institución. El jefe de servicio es una figura cuestionada por muchos facultativos y además, en muchos casos, tampoco cuenta con la plena confianza de la alta dirección del hospital.

Conseguir que los jefes de servicio sean mejores directivos, de manera que tanto la dirección del hospital como los médicos se sientan razonablemente satisfechos con quienes ocupan estas posiciones, no es una tarea sencilla. Por una parte, ello implica que la posición jerárquica se desvincule de la carrera profesional, que los jefes de servicio puedan ser destituidos o premiados; por otra parte, implica una capacitación necesaria, que hayan recibido una formación específica y acreditada, para asumir esa responsabilidad. Que los facultativos lleguen a sentirse intensamente comprometidos con el jefe de servicio debe comportar, supuestamente, mayores beneficios para el hospital.

4. En algunas investigaciones se constata que prácticamente la mitad de los médicos compatibilizan la actividad profesional en el hospital con el ejercicio privado de la medicina. Es importante subrayar que los facultativos que llevan a cabo este doble ejercicio se sienten más comprometidos con el hospital y más satisfechos con su trabajo⁵.

Esta realidad afecta de un modo desigual a las especialidades y varía según el área geográfica en la que ejerce el facultativo, pero compatibilizar las dos actividades profesionales comporta para los médicos beneficios económicos, reconocimiento profesional y buena reputación. Para el hospital, el doble ejercicio puede comportar consecuencias no deseadas²⁷: absentismo y elusión de tareas, desvío de pacientes a la práctica privada, selección de pacientes o, incluso, apropiación o uso indebido de recursos públicos. Por el contrario, otros autores²⁸ destacan los aspectos positivos que la práctica dual implica si el mismo hospital la promociona entre sus facultativos, para que éstos compatibilicen el doble ejercicio en el mismo hospital donde ya trabajan. Con argumentos económicos, jurídicos y éticos, justifican que los hospitales vinculados a la esfera pú-

blica efectúen prestaciones asistenciales privadas. Esta práctica se explica por la necesidad de los hospitales con personalidad jurídica propia integrados en la red pública de obtener más ingresos económicos y, simultáneamente, de convertir la doble práctica de los médicos en un mecanismo de recompensa y reconocimiento que permita disponer de un cuerpo médico más involucrado y comprometido con el hospital.

La gestión de los hospitales no es en sí misma la panacea universal, pero difícilmente los hospitales públicos españoles, administrados y no gestionados, van a poder afrontar con garantías los retos que plantean los escenarios de futuro.

Bibliografía

- Gouldner AW. Cosmopolitans and locals: towards an analysis of latent social roles. *Administrative Science Quarterly* 1957; 2: 281-306.
- Scott WR. Professionals in bureaucracies-Areas of conflict. En: Vollmer HM, Mills DL (ed.). *Professionalization*. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice-Hall; 1966.
- Benveniste G. *Professionalizing the organization. Reducing bureaucracy to enhance effectiveness*. San Francisco; Londres: Jossey-Bass Publishers; 1987.
- Freidson E. *Professionalism reborn. Theory, prophecy and policy*. Londres: University of Chicago Press; 1994.
- Peiró M. Lleialtats contraposades? El comprimís dels metges amb l'hospital i amb la professió. Departament de Política d'Empresa, Recursos Humans i Sistemes d'Informació. Universitat Ramon Llull; 2007. [Tesi doctoral.]
- Smith R. Why are doctors so unhappy? *British Medical Journal* 2001; 322: 1073-4.
- Colby DC. Doctor's and their discontents. *Health Affairs* 1997; 16 (6): 112-4.
- Richards T. Disillusioned doctors. *British Medical Journal* 1997; 314: 1705.
- Morlans M. El nou paradigma professional: entre l'autonomia i la responsabilitat. *Servei d'Informació Col·legial* 1999; 101 (novembre de 2001-gener de 2002). *Col·legi Oficial de Metges de Barcelona*; 2001. <www.comb.es/cat/publicacions/sic/sic101/sic03.htm> (16 d'abril de 2003).
- Comisión de análisis y evaluación del Sistema Nacional de Salud. Informe y recomendaciones. Madrid: Comisión de Análisis y Evaluación del Sistema Nacional de Salud; 1991.
- Obeso C. Gestión de las organizaciones profesionales sanitarias. Barcelona: ESADE; 1992. [Papers ESADE, 87.]
- Fulls Econòmics del Sistema Sanitari [Barcelona, 1990-], núm. 25 (maig de 1995): Departament de Sanitat i Seguretat Social. Generalitat de Catalunya.
- Costa J. Participació i compromís dels professionals sanitaris en la gestió. Una sinergia necessària? *Fulls Econòmics del Sistema Sanitari* 1995; 25: 14-6. Generalitat de Catalunya. Departament de Sanitat i Seguretat Social.
- Nogueras A. Punt de vista d'un professional del sector sobre la participació i el compromís dels professionals en la gestió. *Fulls Econòmics del Sistema Sanitari* 1995; 25: 17-9. Departament de Sanitat i Seguretat Social. Generalitat de Catalunya.
- Ortún V. La participació dels professionals en la gestió. *Fulls Econòmics del Sistema Sanitari* 1995; 25: 10-3. Departament de Sanitat i Seguretat Social. Generalitat de Catalunya.
- Bengoa R, Camprubí J, Echebarría K, Fernández JM, Via JM. Sanidad, la reforma posible. Arazuri: Merck Sharp & Dohme de España. Bega Comunicación; 1997. [Estudio realizado por un equipo de profesores de ESADE, Barcelona.]
- Mendoza X. La gestió de les organitzacions de professionals en el sector públic: de l'antagonisme a la cooperació. Departament d'Economia Política, Hisenda Pública i Dret Financer i Tributari. Universitat de Barcelona; 1999. [Tesi doctoral.]
- Fortuny B. Disseny aplicació i avaluació d'un model de gestió hospitalària de qualitat total: GESHQUAT. Departament d'Organització d'Empreses. Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Industrial de Barcelona. Universitat Politècnica de Catalunya; 2001. [Tesi doctoral.]
- Vilardell M. Les alternatives per a la sanitat del futur. *Fulls Econòmics del Sistema Sanitari* 2002; 36. Departament de Sanitat i Seguretat Social. Generalitat de Catalunya.
- Oriol i Bosch A, Oleza R de (ed.). *Llibre blanc de les professions sanitàries a Catalunya*. Departament de Sanitat i Seguretat Social. Generalitat de Catalunya; 2003. <http://www.gencat.net/salut/depsan/units/sanitat/pdf/llibreblanc.pdf> (20 de juliol de 2004).
- Grup de Treball per la Racionalització i el Finançament de la Despesa Sanitària. Document marc; 2005. <http://www.metgesdecatalunya.net/c-document-savis-sanitat.pdf>
- Peiró M. Integración de proveedores de servicios asistenciales. *Cuadernos de Gestión* 2001; 7: 59-64.
- Ortún V. Los contornos de las organizaciones sanitarias. En: Ibern P (ed.). *Incentivos y contratos en los servicios de salud*. Barcelona: Springer-Verlag Ibérica; 1999.
- Galbraith J. *Organization design*. Reading, Massachusetts: Addison-Wesley; 1977.
- Eisenberger R, Huntington R, Hutchinson S, Sowa D. Perceived organizational support. *Journal of Applied Psychology* 1986; 71: 500-7.
- Rhoades L, Eisenberger R, Armeli S. Affective commitment to the organization: the contribution of perceived organizational support. *Journal of Applied Psychology* 2001; 86: 825-36.
- García-Prado A, González P. El pluriempleo en los profesionales sanitarios: un análisis de sus causas e implicaciones. *Gaceta Sanitaria* 2006; 20 (Supl. 2): 29-40.
- Camps V, López G, Puyol À. Les prestacions privades en les organitzacions sanitàries públiques. *Informes de la Fundació Víctor Grífols i Lucas*, núm. 4. Barcelona: Fundació Víctor Grífols i Lucas; 2006.

LABORATORIO GENERAL O LABORATORIO ESPECIALIZADO. EXPERIENCIAS REALES Y ADAPTACIÓN AL ENTORNO ACTUAL

G. RAMÍREZ, I. CAPARRÓS, A. GALLARDO
Hospital Clínico Virgen de la Victoria. Málaga

Introducción

El concepto de laboratorio general (LG) puede definirse o explicarse de varias maneras; puede entenderse como un laboratorio dentro de un centro sanitario que debe ser regional o de especialidades, o de

cualquier nivel independientemente de su complejidad, que, dependiendo del servicio correspondiente (Hematología o Análisis Clínicos), proporcione una cartera de servicios ajustada a sus necesidades. Este laboratorio tiene dos áreas diferenciadas y son dos servicios y a veces dos recintos independientes. Casi siempre se hace necesaria la adquisición de determinadas pruebas especiales fuera del centro en cuestión, por ser más rentable su externalización, debido al escaso número de dichas peticiones, no justificándose la realización dentro del centro. También puede entenderse como LG aquel que está ubicado en un mismo recinto físico, que comparte recursos humanos, informáticos y de gestión económica, pero cuya área de competencias técnicas viene definida por la especialización pertinente, encargándose la Hematología de las áreas que le son propias, con algunos mestizajes que veremos más adelante. En los centros que han apostado por este modelo también se hace necesaria la externalización de ciertas pruebas especiales. Este tipo de laboratorios no son frecuentes en nuestro entorno, aunque cada día se tiende más a este modelo de gestión, que podemos denominar como mixta, con el fin de aunar recursos. En un hospital comarcal el LG es obligado e incluye la Microbiología y la Anatomía Patológica, que son partícipes del modelo de gestión unificado, pero naturalmente con diferentes competencias técnicas.

El laboratorio especializado (LE) también podemos analizarlo desde un mismo prisma, puede ser un laboratorio en que las distintas especialidades están separadas por barreras físicas y no comparten ningún recurso, siendo lo que tradicionalmente se dice en los hospitales el Laboratorio y Hematología. En Hematología se realizan las hematemetrías, hemostasia, banco de sangre, citomorfología y citotómica, citometría de flujo, laboratorio relacionado con el trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) y el desarrollo de la biología molecular (BM) referida a la Hematología, sobre todo a la par que el desarrollo de TPH, aunque haya otro aparataje similar en el LG y en Microbiología; incluso en la misma zona de Laboratorio de Hematología se reserva un área para el control del tratamiento anticoagulante oral (TAO) que, a pesar del proceso de descentralización imparables que está surgiendo con relación a dicho control, todavía recibe muchos enfermos en el hospital, y en nuestro entorno hay algunos centros en los cuales en el área de Hematología convive el laboratorio con los pacientes en TAO. En algunos hospitales de nuestro país, independientemente de la comunidad autónoma a la que pertenezca y “por tradición”, en el Laboratorio de Hematología se realizan los estudios de anemia y gammapatías monoclonales, con la justificación

de que se realizan mejores estudios, se generan algoritmos diagnósticos y se obtienen mejores tiempos de respuesta, de manera que el propio hematólogo que valida dichos estudios realiza al mismo tiempo la gestión clínica pertinente.

Podemos pensar que LE es también un recinto único donde, compartiendo los recursos comunes, se actúa en el modelo de gestión por competencias y donde dicho ahorro redonda en la ampliación cada vez más extensa de la cartera de servicios, de manera que se autoabastezca a sí mismo y a su población de referencia, siendo cada vez más infrecuente solicitar pruebas a un centro externo.

El concepto de la especialización, incluyendo la del laboratorio, es tan cambiante como la evolución de la sociedad en general y de la Hematología en particular. De los mestizajes mencionados anteriormente, el ejemplo de la BM es el más interesante. En muchos centros dicha tecnología ha nacido empujada por la investigación de las quimeras en TPH alogénico y ya han seguido los hematólogos con dicha disciplina, cuando en otros centros que no disponen de TPH, a la hora de incorporar las técnicas a la cartera de servicios, se ha realizado a partir de los especialistas de análisis clínicos que proporcionan los resultados a los hematólogos.

Continuando con la BM, de momento una disciplina considerada como muy especializada, y si reparamos en el ejemplo de Jak 2, cuando esta técnica se realiza de manera “fácil” deja de ser especializada para convertirse en rutinaria, y así se observa cuando se analiza el número de determinaciones solicitadas (a veces indiscriminadas) si el centro dispone de la técnica, de manera que las peticiones aumentan considerablemente, pasando a ser un test de *screening* junto con la dosificación de EPO, en vez de un test de confirmación para el diagnóstico de los síndromes mieloproliferativos crónicos BCR-ABL negativos¹.

Situación actual y relación con el entorno referido a la Comunidad Autónoma Andaluza

En Andalucía la Consejería de Salud promueve la Gestión por Procesos Asistenciales Integrados, considerando que la gestión por procesos constituye una herramienta con la que se analizan todos los componentes que intervienen en la prestación sanitaria para ordenar los diferentes flujos de trabajo de la misma, integrar el conocimiento actualizado y procurar cierto énfasis en los resultados obtenidos, intentando disminuir la variabilidad de las actuaciones y lograr un grado de homogenización valorable. El Proceso Laboratorios Clínicos se desarrolló en 2004 entendiendo que el laboratorio, aunque está ubicado en los hospitales, ocu-

pa un puesto clave en el proceso asistencial, de manera que está presente en la gran mayoría de las actuaciones médicas. Por ello participamos en la elaboración de dicho proceso² un representante de Laboratorio de Análisis Clínicos, Hematología, Microbiología, Anatomía Patológica, Enfermería, Médico de Familia y un Directivo. Entendiendo que la actividad en la atención primaria representa a casi la mitad de los clientes del laboratorio, se elaboró un texto para su implementación paulatina en los hospitales de la comunidad, con un acuerdo sobre profesionales, actividades propias, cartera de servicio, fases del análisis, eliminación de residuos, transporte de muestras, calidad, comunicación con los distintos clientes, etc., que constituye actualmente el marco por el que se regulan los nuevos laboratorios. El Proceso Laboratorios aconseja que exista la figura de un enlace entre el laboratorio y los clientes del mismo donde converjan llamadas de dudas, sugerencias, modificar o corregir actuaciones, sobre todo en los pasos de la fase preanalítica.

De las instituciones privadas que actúan en la Comunidad Autónoma Andaluza pocas tienen actividad propia de laboratorio y tienen concertados o subcontratados a grandes laboratorios privados con implantación nacional y al tener en las provincias una red comercial se facilita el envío de las muestras generales o especiales que se generan en los distintos hospitales.

Aunque éste es el modelo que la administración sanitaria recomienda seguir, ello no invalida, ni fue su misión contemplarlo, que la gran mayoría de los laboratorios públicos en nuestro entorno externalicen la genética convencional, FISH, genética molecular, reordenamientos T, etc., y que las muestras se envíen a distintos laboratorios del país, ya sean públicos o privados.

Por la variabilidad de la cartera de servicios de cada centro y por el número de pruebas externalizadas, la administración ha contemplado y creado la figura del coordinador autonómico de laboratorios, que está recabando información de los profesionales de laboratorios de Hematología, Análisis Clínicos y Bioquímica Clínica sobre todas las facetas que inciden sobre las carteras de servicios, externalizaciones que se realizan en los distintos centros, etc., de manera que se homogeneicen las actuaciones. En definitiva, para que las diferencias entre los modelos de laboratorio o entre centros del mismo nivel sean las menores posibles y para que, dentro de la lógica de variabilidad, todos los laboratorios puedan ser al mismo tiempo generales y especiales. Dicho coordinador autonómico valora el poder realizar un Laboratorio Autonómico Centralizado o centralizar las muestras en uno ya existente para las pruebas más especiales, cada día más solicitadas porque han pasado a ser una herramienta fundamental para el pronóstico, tal como sucede, por ejemplo, en el caso de las hemopatías y su relación con tratamientos más agresivos o no³.

Laboratorios especializados en investigación

Es más que probable que dichos laboratorios que hoy día realizan pruebas de investigación clínica y aplicada sean los laboratorios que en poco tiempo consideremos como laboratorios especializados.

En la Comunidad Autónoma Andaluza, uno de ellos se denomina Cabimer (Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa), está situado en Granada y es fruto de las alianzas entre la Consejería de Salud, Innovación, Ciencia y Empresa, el CSIC, la Universidad de Sevilla y la Universidad Pablo de Olavide. Dicho laboratorio tiene departamentos de Biología Molecular, Señalización Celular, Células Troncales, Terapia Celular y Medicina Regenerativa⁴. Acaba de incorporar el Servicio de Genómica, donde se realizan técnicas de expresión génica con tecnología de hibridación de *microarrays*, análisis de integridad de ARN y apoyo en el estudio e interpretación de los resultados obtenidos.

También, y con un concepto mixto de laboratorio de investigación que realiza investigación translacional que casi se traduce en la asistencia diaria, existen en Málaga dos laboratorios de investigación en el Hospital Regional Carlos Haya y en el Hospital Virgen de la Victoria patrocinados por la Fundación IMABIS donde participan los servicios que tienen área de investigación en marcha, pero que han incorporado tecnologías que también pueden ser aplicables al estudio de algunas patologías, ya sean o no hematológicas, como el desarrollo de los cultivos celulares, la potenciación de la citometría en el campo de la investigación, el estudio de *microarrays* u otras.

Nuestra situación actual (nuestra experiencia real)

El Hospital Clínico Virgen de la Victoria es un centro de especialidades, con 700 camas, y aunque teóricamente debe ser considerado un hospital de tipo 2 y es considerado de alta complejidad, es el único hospital de la Comunidad Autónoma Andaluza que no tiene Pediatría, aunque sí Neonatología, y recibe muestras de la mitad del área metropolitana, valle del Guadalquivir y Torremolinos.

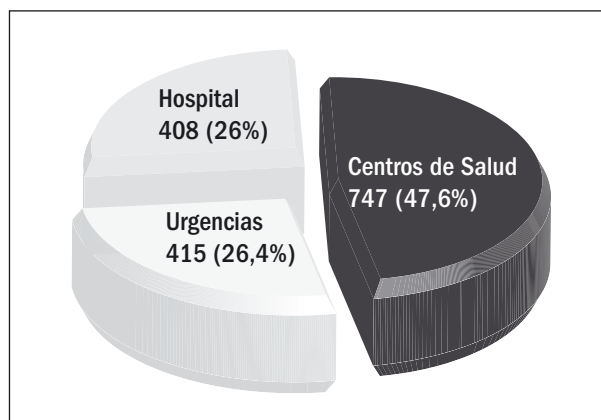
En febrero de 2007, a consecuencia de una reestructuración de los espacios y a la vista de que los laboratorios necesitaban una importante remodelación, se inauguró en el hospital una zona llamada Laboratorios, donde estamos ubicados los Servicios de Análisis Clínicos y Hematología, compartiendo la supervisión de enfermería, recursos humanos como enfermeras, administrativos y técnicos y el SIL, así como la centralización y envío de las muestras que se externalizan, salvo las adscritas a algún protocolo terapéutico, que

Tabla 1. Actividad del Hospital Universitario Virgen de la Victoria (muestras/día)

	<i>Rutina</i>	<i>Urgencia</i>	<i>Total</i>
Promedio	1.162	408	1.570
Máximo	1.360	482	1.842
Mínimo	1.030	334	1.364

tienen su mensajería independiente. Las decisiones que competen a la organización del Laboratorio las toman conjuntamente los responsables de ambos servicios y/o áreas de competencia. El resultado global es satisfactorio, aunque existen áreas de mejora continua que se van analizando puntualmente y creemos que la calidad de los resultados ha mejorado al satisfacer con prontitud y fiabilidad las demandas de los clientes internos y externos, evidenciándose fundamentalmente en los tiempos de respuesta que se obtienen en la fase analítica. Desgraciadamente, sobre los tiempos de fase preanalítica, tanto interna como externa, no podemos incidir, aunque nuestro modelo de actuación es el de reuniones periódicas con los directores de distritos de Atención Primaria para consensuar cada cambio que se introduzca. Siguiendo las directrices del Proceso Laboratorios, hemos establecido la figura del coordinador técnico, que enlaza las relaciones entre los diversos profesionales y agentes (p. ej.: transportistas) que actúan en la realización de una prueba, de manera que dicho coordinador se encarga de estudiar los fallos de trazabilidad de la muestra entre atención primaria y laboratorio o entre sala de extracciones y laboratorio, intentando corregir los errores.

Hemos apostado, por mor del espacio que nos concedían a ambos servicios, por un modelo de laboratorio mixto, central y especializado, incorporando en el espacio general lo que previamente existía (Coagulación especial, Citomorfología y Citoquímica, Anemias, Citometría de flujo), recuperando la hematimetría como competencia técnica de Hematología e incorporando la Biología Molecular, realizada por un especialista en Inmunología, para los servicios que la necesiten, incluida la Hematología Clínica. Optimizamos el aparataje para realizar técnicas que utilicen el mismo sistema independientemente del servicio que las realice, siendo sólo la validación facultativa lo que difiere, y aprovechamos los recursos del personal MIR para rotaciones conjuntas, sesiones clínicas y trabajos para publicaciones y/o congresos de las diferentes especialidades, así como la entrega de protocolos clínicos de algunas patologías, como en Inmunología, donde, como ejemplo, al responsable de la sección se le proporcionan las guías clínicas para el tratamiento del mieloma múltiple y, a la vista de las mismas, según la fase del proceso, realiza inmunofijación o no, o conge-

**Figura 1. Actividad de distribución del Hospital Universitario Virgen de la Victoria (muestras/día).**

la muestras para el estudio de cadenas ligeras libres en suero, redundando en un mejor control del paciente y aprovechamiento de los recursos.

De manera independiente se realizan la resolución de concursos para la provisión de aparatajes, y técnicas, aunque la fecha de fallo del concurso sea la misma. La aplicación de I + D generada también es independiente y se procura que revierta sobre las propias secciones de trabajo.

El volumen de trabajo que realizamos es un promedio de 1.570 muestras/día (Tabla 1), siendo la mitad de las muestras, recibidas de los centros de atención primaria (Figura 1), y en la distribución global las muestras de rutina constituyen el 74% (Figura 2), siendo el 64% de éstas, derivadas de atención primaria (Figura 2).

A la vista de nuestra corta experiencia, y dada la necesidad de cumplir con criterios de eficacia y eficiencia, apostamos por laboratorios con modelo mixto, generales y especializados al mismo tiempo, que incorporen el mayor número posible de técnicas diagnósticas, que sean gestionadas y analizadas convenientemente, donde se compartan los recursos necesarios pero donde la independencia entre las competencias sea absoluta, de manera que cada uno de los miembros del personal facultativo sea el responsable de su área de conocimientos y, aunque la dirección del laboratorio recaiga en los hospitales comarcales en algún miembro de Análisis Clínicos, respete la competencia propia de cada especialista y la decisión en la provisión de los concursos y en el aprovisionamiento de los equipos que cada especialista considere que se adaptan mejor a su proyecto o que cumplen mejor con las especificaciones técnicas.

Nuestro entorno provincial se rige por modelos de laboratorio mixto, con gestión unificada en mayor o menor grado, tanto en nuestro hospital, en el hospital

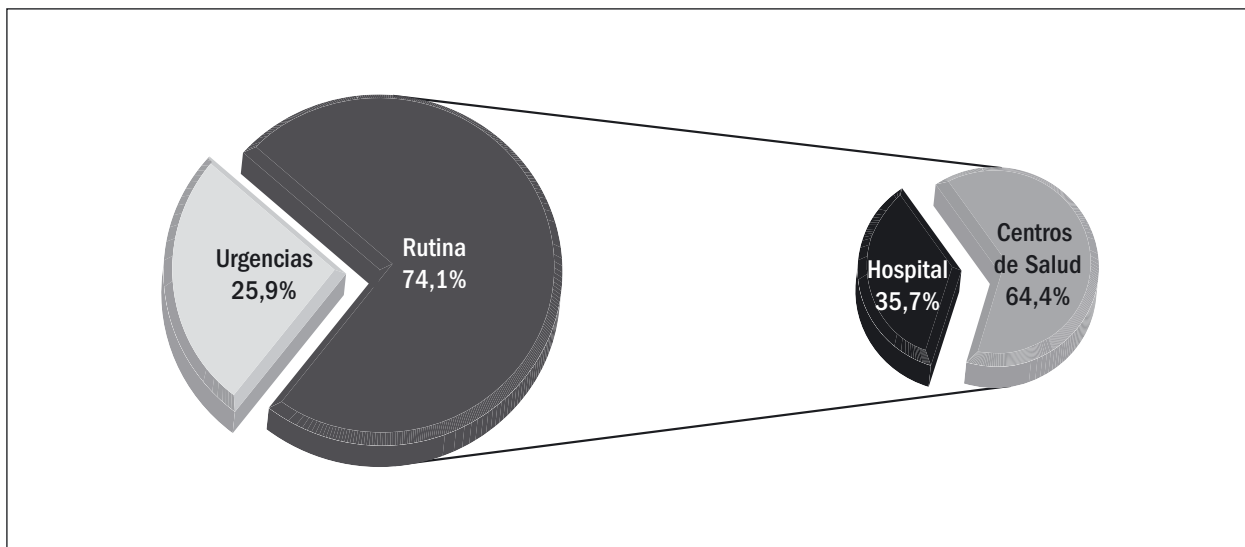


Figura 2. Actividad de distribución del Hospital Universitario Virgen de la Victoria (muestras/día).

regional (de tipo 1) como en los laboratorios de los tres hospitales comarcales de nuestra provincia, situados en Vélez-Málaga, Antequera y Ronda, que son considerados de tipo 3, y en el del Hospital Costa del Sol de Marbella, que es modelo de gestión privada. Todos ellos reciben muestras de análisis de los centros de salud de su demarcación.

Bibliografía

1. Tefferi A. Classification, diagnosis and management of myeloproliferative disorders in the JAK2V617F era. *Hematology* 2006;: 240-5.
2. Aguilera Gámiz C, Aznar Martín J, Durán Serrantes M, Gascón Luna F, De Haro Muñoz T, Hortas Nieto M^ªL, et al. Procesos Asistenciales Integrados. Laboratorios Clínicos. Consejería de Salud; 2004.
3. Cilloni D, Messa F, Rosso V, Arruga F, Defilippi I, Carturan S, et al. Increase sensitivity to chemotherapeutical agents and cytoplasmatic inercation between NPN leukemic mutant and NF-kappaB in AML carrying NPM1 mutations. *Leukemia* 2008; Apr 10.
4. Cabimer. Memoria Anual; 2006.

¿SIGUE SIENDO ÚTIL EL MODELO DE SERVICIO DE HEMATOLOGÍA Y HEMOTERAPIA CLÁSICO E INTEGRAL? ORGANIZACIÓN ACTUAL Y FUTURO PREVISIBLE

V. VICENTE, F. DE ARRIBA, M.L. AMIGO, I. HERAS
*Servicio de Hematología y Oncología Médica.
 Hospital Universitario Morales Meseguer. Murcia*

La especialidad de Hematología y Hemoterapia tiene unos rasgos adquiridos desde su nacimiento que le confieren una personalidad propia dentro de las especialidades médicas. Este hecho puede contemplarse de una forma privilegiada con la lectura del libro *Blood, pure and eloquent*¹, que constituye un documento clásico y magistral donde se analiza el nacimiento, desarrollo e integración de cada uno de los aspectos que han llegado a conformar la especialidad.

Curiosamente, pese a los rasgos característicos que la definen, existe desde hace años una cierta inquietud acerca de la viabilidad y futuro de la especialidad, circunstancia que curiosamente no es nueva ni exclusiva de nuestro país²⁻⁶. Todos estos aspectos han sido tratados desde hace algunos años por la Asociación Española de Hematología y Hemoterapia^{2,3} y, recientemente, en la reunión anual de Pamplona en el simposio “La Hematología-Hemoterapia y las especialidades frontera”⁷⁻¹¹.

La realidad de la especialidad condiciona en gran medida el modelo de servicio asistencial donde debe ser ejercida: servicio integral o de unidades separadas, pero como veremos otros factores ajenos a la propia disciplina pueden influir en esta situación. La experiencia recogida desde la creación de los primeros Servicios de Hematología y Hemoterapia nos muestra la realidad de diferentes “modelos” de Servicios de Hematología y Hemoterapia, que se han ido construyendo no por cambios doctrinales en su contenido, sino por circunstancias locales o personales, impulsadas en muchas ocasiones por el innegable impulso tecnológico que estamos viviendo desde hace más de 20 años en toda la medicina. En

definitiva, creemos que nos enfrentamos a dos cuestiones distintas y que no se condicionan: una es la realidad y contenido doctrinal de la Hematología y Hemoterapia, y la otra cuestión es la reflexión acerca de en qué modelo de servicio asistencial se debe llevar adelante. En definitiva, la doble cuestión planteada es la siguiente: ¿siguen siendo útiles los modelos integrados con sus partes tradicionales de la clínica, hematología biológica, hemostasia y trombosis y medicina transfusional e inmunohematología?, o, por el contrario, ¿es imprescindible para un mejor funcionamiento la fragmentación en unidades independientes con una interacción variable entre ellas?

Futuro de la Hematología y Hemoterapia

Orígenes y fortalezas

Como hemos indicado previamente, éste es un tema que de forma recidivante levanta ciertas intranquilidades y, sin embargo, algunos pensamos que el temor no está justificado, más aún, sostenemos que la Hematología y Hemoterapia tiene un excelente porvenir, al poseer una serie de “valores” propios, mantenidos y en continuo desarrollo desde su nacimiento. La Hematología se ha mostrado como una disciplina diligente con la incorporación tecnológica imprescindible para hacer una medicina adecuada a tiempos tan exigentes como los que vivimos. El futuro estará íntimamente ligado a la disposición y determinación para mantener esos “valores”.

La Hematología y Hemoterapia nace en España de forma similar a lo que acontece en otros países más avanzados. Reflejo de ello es que este año conmemoramos el 50 Congreso de la AEHH y también el 50 aniversario de la American Society of Hematology^{12,13}. Se trata de una disciplina con una amplia tradición y un rico cuerpo doctrinal. Pero verdaderamente el aspecto que le da mayor solidez y singularidad es la peculiaridad de su nacimiento, fruto de una interacción de médicos provenientes de la Medicina Interna, el Laboratorio y de la Hemoterapia. Afortunadamente, tenemos unas magníficas referencias históricas del nacimiento y desarrollo de la Hematología y Hemoterapia española^{14,15}. La Hematología tiene un valor añadido respecto a otras especialidades médicas, pues requiere poseer una mente clínica bien formada y una capacidad para el estudio profundo de los hechos biológicos, situación que es facilitada por la cercanía del Laboratorio. Esta visión “bilingüe” de la medicina, que constituye un hecho excepcional dentro de las especialidades médicas, ha propiciado que el hema-

tólogo disfrute de un espacio privilegiado entre las disciplinas médicas.

En un país como Estados Unidos, con una sólida tradición, desarrollo y empuje de la Hematología y Hemoterapia, recientemente Kenneth Kaushansky y Stanford J. Shattil han manifestado, de una forma clarividente y magistral, la importancia de poder contar con puntos de referencia que tengan esa clara mentalidad “bilingüe”, con una sólida formación clínica y que sean capaces al mismo tiempo de “hablar y entender” el lenguaje moderno que nos presenta la biomedicina¹⁶. Por ello, uno de los retos de nuestra especialidad es saber mantener y completar su esencia, y ser conscientes de que otras especialidades, que hemos denominado frontera, han entendido la importancia de esa situación y han iniciado el legítimo camino para intentar conseguir, o al menos aproximarse a, un estatus parecido, pero con un camino todavía largo por recorrer^{17,18}.

Los hematólogos deben ser consciente de su situación privilegiada, que les permite ver al paciente, estudiarlo en su propio laboratorio con tecnología en muchas ocasiones compleja, y aplicarle su tratamiento. En definitiva, investigan, estudian e intentan solucionar los problemas clínico-biológicos con *mentalidad clínica*, aspecto crucial que separa la función del hematólogo del trabajo estricto del Laboratorio de Análisis Clínicos o Bioquímica Clínica y de otras especialidades médicas.

Algunas especialidades también han vislumbrado recientemente la importancia del “bilingüismo” Laboratorio-Clinica para realizar una medicina moderna. Ejemplo cercano es el de la propia Oncología Médica, que tiende a incorporar el Laboratorio a su cuerpo doctrinal, esencialmente clínico, con el objetivo de facilitar el diagnóstico y seguimiento de sus enfermos. A su vez, el Laboratorio general quiere “introducir” sus “guías clínicas” para darles un sentido clínico a las pruebas analíticas que realiza. Estos aspectos para nosotros no son nuevos, sino que forman parte de la formación y mentalidad tradicional del hematólogo. El mayor error que podemos cometer desde dentro de nuestra disciplina es propiciar que esta riqueza se pierda o no concederle el importante valor que tiene ese “bilingüismo”.

Entorno europeo de la Hematología y Hemoterapia y periodo de formación

Existe un interés por armonizar las especialidades médicas en el entorno de la Unión Europea (UE). El objetivo es claro: además de facilitar la libre circulación de médicos especialistas, es también una meta acercar las diferencias en el camino de formación de los futuros especialistas. Recientemente, un magní-

fico documento realizado por el Consejo Nacional de Especialidades en Ciencias de la Salud nos aporta información muy interesante y detallada de la situación de las especialidades médico-quirúrgicas en la UE, los procedimientos de formación en los diferentes países, y el análisis de previsión del periodo de formación en un futuro cercano para los nuevos especialistas¹⁹.

De los 25 países que constituyen la UE, 21 reconocen la especialidad de Hematología y Hemoterapia, 4 la de Hematología Biológica, 12 la de Análisis Clínicos, 15 la de Bioquímica Clínica, y la Oncología Médica es una especialidad desarrollada en España pero sin coordinación europea al ser pocos los países que cuentan con ella. En este contexto, la especialidad de Hematología y Hemoterapia tiene un respaldo en los países de nuestro entorno que garantiza su estabilidad y desarrollo.

Todo apunta a que en muy poco tiempo contaremos con un nuevo sistema de formación para los nuevos especialistas. Con muy buen criterio, la Hematología y Hemoterapia se considera materia troncal “médica”, lo que exigirá un periodo inicial de formación más intenso en Medicina Interna. La Comisión Nacional de la Especialidad en Hematología y Hemoterapia tendrá la importante responsabilidad de perfilar bien sus contenidos. En nuestra opinión, 4 años tal vez sean insuficientes para el periodo completo de formación, teniendo en cuenta la dedicación previa de 2 años a Medicina Interna, y la obligada necesidad del aprendizaje “bilingüe” de nuestra especialidad, con amplio contenido clínico y de laboratorio. Por todo ello, consideramos necesario aumentar el periodo global de formación a 5 años.

Un aspecto de crucial importancia para mantener la estructura y nivel de la disciplina de Hematología y Hemoterapia en el futuro, e impedir desviaciones observadas en años pasados, es la labor que tienen que llevar adelante las instituciones responsables de mantener activos los programas de formación de los médicos especialistas. Hay que evitar la ausencia de sistemas serios de reacreditación de los centros hospitalarios capacitados para ofrecer la formación especializada. Deben mantenerse unos requisitos de acreditación vivos, teniendo en cuenta que el crecimiento tecnológico y la capacidad de incorporación metodológica es una herramienta muy valiosa de defensa de la especialidad, estimulando a los servicios a mantener un desarrollo equilibrado del bagaje que debe poseer un especialista en las diferentes áreas que conforman la Hematología y Hemoterapia. El problema se genera, como ha sucedido, cuando surgen especialistas que conocen muy parcialmente, o a veces de forma desfigurada, aspectos básicos de la especialidad. En tal caso, la defensa y el compromiso con ésta serían parciales, condicio-

nado ello en gran medida por lo conocido y adquirido en el periodo de residencia.

Modelos de Servicio de Hematología y Hemoterapia

Han pasado casi 40 años desde que se organizaron los primeros Servicios de Hematología y Hemoterapia. Las unidades asistenciales nacieron y crecieron con coherencia interna, alrededor del paciente con enfermedades de la sangre y/o de los órganos hematópoyéticos, y también con la tarea de propiciar y mejorar el uso de la sangre y sus derivados como terapia de soporte.

Como hemos comentado previamente, desde su inicio el hematólogo debía actuar como clínico ante el paciente y con mentalidad clínica en el Laboratorio: ése ha sido su rasgo diferenciador. De ahí que los Servicios de Hematología y Hemoterapia hayan desarrollado desde sus comienzos una actividad clínica, de diagnóstico biológico, estudio y tratamiento de las diátesis hemorrágicas y estados trombofílicos, y hayan tomado la responsabilidad de establecer la primera base hemoterápica organizada en nuestra red de asistencia hospitalaria.

La estructura mencionada constituyó un modelo básico y eficaz durante años para los Servicios de Hematología. El paso del tiempo ha traído de la mano una serie de circunstancias que en no pocos sitios ha modificado la estructura ya establecida para esta unidad asistencial. Mencionaremos algunas de ellas: aparición de hospitales con diferentes funciones y tamaños, desarrollo tecnológico no abordable por todos los servicios, sofisticación de procedimientos diagnósticos y terapéuticos, incluido el trasplante de médula ósea, crecimiento de áreas específicas dentro de la especialidad, creación de los centros de transfusión, nacimiento y desarrollo de especialidades que venimos denominando frontera, nuevos modos de abordar la gestión hospitalaria con la creación de unidades funcionales, etc. Todos estos aspectos, junto a otros más de carácter local o personal, han ido variando y diluyendo en ocasiones el sentido integral con el que nacieron y empezaron a crecer los primeros Servicios de Hematología.

Actualmente vemos cómo la realidad de los Servicios de Hematología en España es muy dispar. Las opiniones están sesgadas por la situación vivida por cada uno. En nuestra opinión, sigue siendo mucho más ventajosa la visión y el trabajo integral de las unidades de hematología y hemoterapia que la división en áreas o parcelas, con el riesgo evidente de que se produce por falta de cohesión y también se corre el peligro de pérdida del sentido clínico, especialmen-

te en las áreas de Laboratorio que no están cercanas al paciente.

Factores generales a tener en cuenta en un servicio integral

En la defensa de los servicios integrales es lógico que tengamos en consideración una serie de elementos aparecidos en el transcurso de los años, los cuales, si bien puede ser que no faciliten en determinadas ocasiones su desarrollo, sin embargo no son justificación para la desarticulación o desmembramiento de un servicio. No debemos ser ajenos a los cambios organizativos, estructurales y funcionales en nuestros hospitales, que obviamente influyen en la situación de la especialidad y para los que debemos estar preparados. Hemos asistido a un movimiento absolutamente contradictorio en la estructuración del rango de hospitales. Se ha perdido o difuminado la referencia imprescindible para el crecimiento científico que constituía la Medicina Académica¹⁶. Existe desde hace años un movimiento no desdeñable en absoluto, el de ampliar el concepto de “hospital universitario”, pero el problema aparece con el significado de esa denominación genérica, pues lo único que traduce es la “acreditación formal” para que los alumnos puedan acudir a realizar sus prácticas clínicas a un hospital. Tal acreditación no demanda en absoluto criterios de calidad y capacidad para una buena formación reglada, generación de conocimiento –investigación–, etc., elementos estos imprescindibles y nítidos de referencia general^{20,21}.

El cambio de mentalidad es otro elemento que nos impone la nueva medicina. La medicina de hoy exige interacción con otras especialidades, compartir recursos, metodologías e incluso espacios⁹, lo que no implica en modo alguno una renunciar de la esencia y el cuerpo doctrinal de la disciplina. Adicionalmente, es absolutamente impensable mantener laboratorios especializados al día sin la participación multidisciplinaria; por ejemplo, presencia estable de biólogos moleculares o genetistas modernos. La generación de conocimiento, manteniendo líneas de trabajo e investigación competitivas internacionalmente, es otro requerimiento fundamental para mantener un servicio de referencia²⁰. También habrá que tener flexibilidad y capacidad de adaptación a las peculiaridades de cada institución hospitalaria.

Cerraremos este apartado general con la idea que impera desde hace años, y que no parece desacertada si se lleva a cabo con coherencia, conocimiento y responsabilidad, como es que la mejor norma de suficiencia para atender profesionalmente un área asistencial la otorga la *competencia profesional* y la *capacidad de resolución de problemas*, aspectos para los que

creo que sobradamente podemos y debemos estar preparados.

Factores específicos a tener en cuenta en un servicio integral

Los servicios integrales tienen unas importantes ventajas en la atención del paciente hematológico, pero también exigen una mayor disciplina, trabajo organizado y en equipo. La existencia de un servicio integral no exige la utopía de que todos los hematólogos del mismo se hallen altamente especializados en cada una de las áreas de la Hematología, desde el trasplante de médula ósea, de sangre o de cordón umbilical al tratamiento de las coagulopatías congénitas. Obviamente no, pero sí un equipo *interesado y motivado* en solucionar cada uno de los problemas que llegan a una unidad de estas características. ¿Es esto una realidad factible? La respuesta también es tajante y rotunda: sí. Obliga a tener un contacto diario entre todos los integrantes del servicio, donde cada día de la semana se vayan abordando temas de cada sección y que afectan a los pacientes que pueden ser vistos por cualquier miembro del servicio durante el periodo de guardia que le corresponda. En la medida de lo posible, todo el personal facultativo debe tener contacto con una consulta ambulatoria. Cada sección debe tener su línea de trabajo específica, que en muchas ocasiones requerirá el trabajo conjunto de las diferentes secciones.

El médico residente en formación debe “vivir” y visualizar la especialidad como un conjunto desde su inicio. Si la percibe como compartimentos diferenciados, poco permeables, con intereses independientes y sin un sentido clínico coordinado, nunca tendrá claro el contenido de la especialidad médica que ha realizado.

Un servicio no integrado, con unidades separadas y no coordinadas de forma real, podrá tener áreas sólidas con un desarrollo específico, pero siempre adolecerá de una visión enriquecedora proveniente de sus propios integrantes, que trabajan con mayor intensidad los diferentes aspectos de la disciplina. Curiosamente, puede darse el caso de que algunos de estos servicios adolezcan de los criterios estrictos exigibles para poder ofrecer una formación coordinada, amplia y real de la propia especialidad. La ausencia de auditorías y acreditaciones exigentes de los centros con capacidad docente da lugar a esas situaciones, y este aspecto debería cuidarse lo antes posible.

Conclusión

Es indudable que el “bilingüismo” de la Hematología, con su quehacer clínico y de laboratorio, hace

que sea una especialidad diferenciada. Su nacimiento y tradición desde hace años, su reconocimiento como especialidad médica en 21 países de la UE, su rico contenido doctrinal, la alta capacidad para integrar nueva tecnología a sus laboratorios para el cuidado de los pacientes son, entre otras, fortalezas que le auguran un futuro muy esperanzador. Más complicado es plantear modelos de servicios de hematología y hemoterapia para el futuro, ya que hacer previsiones de variables poco controlables, donde pueden influir el tamaño y las características del hospital, su modelo de gestión, la persona responsable del servicio, el desarrollo de los servicios cercanos por su actividad, el desarrollo tecnológico, la capacidad de interacción y colaboración de servicios, etc., hacen que esa tarea sea muy ardua y difícil de predecir. La experiencia de los servicios que hoy vemos en España es un exponente de la dificultad a la que nos estamos refiriendo. Es indudable, a nuestro modo de ver, que los servicios integrales aportan una serie de importantes ventajas que repercuten en la atención al paciente, y también en la motivación y actitud de trabajo en equipo de los facultativos. A su vez, la concepción integral de los servicios, si bien es más exigente, aporta una visión más clara y coherente de lo que es el cuerpo doctrinal de la especialidad a los médicos en formación y a nuestros propios compañeros de hospital, que en frecuentes ocasiones desconocen su contenido.

Bibliografía

1. Wintrobe MM. Blood, pure and eloquent. New York: McGraw-Hill; 1980.
2. Vicente V, Barbolla L, García-Conde J, González-Silva M, León A, Luño E, et al. Situación actual y directrices de desarrollo de la especialidad de Hematología y Hemoterapia. Editado por Asociación Española de Hematología y Hemoterapia. Barcelona: Acción Médica; 1998.
3. Hernández Nieto L, Batlle J, Feliu E, Contreras E, Solé F, Martínez R, et al. Hematología y Hemoterapia. Declaración oficial de la AEHH sobre la especialidad en relación con otras especialidades frontera. Editado por Asociación Española de Hematología y Hemoterapia. Barcelona: Acción Médica; 2007.
4. Schafer A. The future of Hematology: the need to reassert its identity. *Hematologist* 2004; 1: 6.
5. Schier SL. Thoughts on the future of hematology. *Hematologist* 2005; 2: 5.
6. Chottiner EG. The future of Hematology in the private-practice setting. *Hematologist* 2007; 4: 5.
7. Montserrat E. Hematología clínica. *Haematologica* 2007; 92 (Supl 1): 382-4.
8. Burgaleta C. Morfología y Biología Hematológicas. *Haematologica* 2007; 92 (Supl 1): 384-9.
9. Vicente V, Roldán V, Lozano ML. Hemostasia y Trombosis. *Haematologica* 2007; 92 (Supl 1): 389-94.
10. Barbolla L. Medicina Transfusional-Inmunoematología. *Haematologica* 2007; 92 (Supl 1): 394-7.
11. Torres Gómez A. Trasplante de progenitores hematopoyéticos. *Haematologica* 2007; 92 (Supl 1): 397-402.
12. Jaffé ER, Kaushansky K. The American Society of Hematology: a success at age 50. *Blood* 2008; 111: 11-5.
13. Dunbar C. Blood and the American Society of Hematology in 2008: looking back and moving forward. *Blood* 2008; 111: 9-10.
14. Rozman C. Breve historia de la Hematología española. En: Fernández J, Rozman C, Ríos A, Giralt M, Vigil C (eds.). Pasado, presente y futuro de la Hematología española. Oviedo: Editado por el Ilustre Colegio Oficial de Médicos de Asturias; 1998.
15. Rozman C. Breve historia de la Asociación Española de Hematología y Hemoterapia (AEHH) y algunas reflexiones para el futuro. *Haematologica* 2008; 93 (Extraordinario n.º 1): (en prensa): 67-76.
16. Kaushansky K, Shattil SJ. Bloodlines: the importance of mentoring for the future of hematology. *Blood* 2007; 109: 1353-4.
17. Kennedy BJ. Origin and evolution of medical oncology. *Lancet* 2000 (Supl IV2); 354: 41.
18. Cavalli F. The future of oncology: more of the same? *Lancet* 2000 (Supl IV2); 354: 42.
19. La troncalidad en las especialidades médicas. Consejo Nacional de Especialidades en Ciencias de la Salud. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo y Ministerio de Ciencia e Innovación (en prensa).
20. Vicente V. La investigación clínica hospitalaria, antigua deuda de la nueva medicina. Murcia: Real Academia de Medicina y Cirugía de Murcia; 2005.
21. Vicente V. Formación del investigador clínico. *Haematologica* 2004; 89 (Supl 1): 75-7.

Epidemiología y fisiopatología de la trombosis venosa

COORDINADOR: J. FONTCUBERTA. *Barcelona*

Resumen del simposio

La enfermedad tromboembólica venosa (ETE) es una entidad extraordinariamente común en la mayoría de las especialidades médicas y quirúrgicas. En los países desarrollados, la trombosis –considerando las venosas y las arteriales– es la primera causa de mortalidad de los adultos, superando en más de tres veces la mortalidad producida por enfermedades neoplásicas.

La incidencia anual de la ETE es, aproximadamente, de 1-3 casos por cada 1.000 personas, pero crece exponencialmente con la edad: de menos de 5 casos anuales por cada 100.000 niños en la infancia, pasa a más de 400 casos anuales por cada 10.000 personas en adultos mayores de 80 años.

Las manifestaciones clínicas más frecuentes son las trombosis venosas profundas (TVP) en las extremidades inferiores y el embolismo pulmonar (EP). No obstante, las manifestaciones clínicas pueden afectar de forma mucho más infrecuente a las extremidades superiores, a los vasos venosos mesentéricos, a los senos venosos cerebrales, a los vasos venosos del hígado, a los vasos de la retina y, en general, a cualquier parte del organismo donde haya vasos venosos.

La complicación más frecuente de la ETE es el síndrome posttrombótico, que genera un alto índice de bajas laborales al sistema de salud y produce profundo malestar a los pacientes. La otra gran complicación de la ETE es la muerte por embolia pulmonar, que ocurre aproximadamente en el 1-2% de los pacientes.

La necesidad de establecer una trombofilaxis en esta entidad clínica está basada en una sólida evidencia científica. Diversos estudios han demostrado que todos los pacientes hospitalizados por cualquier razón, al menos tienen un factor de riesgo para ETE, y el 40% de ellos sufren tres o más factores de riesgo para desarrollar ETE. Sin profilaxis de ETE, la incidencia, probada objetivamente, de TVP es de 10-40% en pacientes médicos hospitalizados y en pacientes sometidos a cirugía general; en pacientes quirúrgicos por cirugía mayor ortopédica, la incidencia es del orden del 40 al 60%.

En este simposio sobre nuevos aspectos fisiopatológicos de la trombosis venosa, el Dr. John H. Griffin nos expone el interesante tema de la relación de los lípidos y lipoproteínas con las bases fisiopatológicas en la trombosis venosa. Nos describe cómo la deslipoproteinemia HDL está asociada a la presencia de enfermedad tromboembólica venosa y a sus recidivas. También nos expone la posibilidad de que la HDL tenga un papel antitrombótico por disminución de la generación de trombina y la atenuación de la exposición de factor tisular y de selectinas P y E en el endotelio vascular y en la superficie de las plaquetas.

Otro papel importante de las HDL es promover la producción de óxido nítrico (NO) mediante la estimulación de las NO sintetas. Como es sabido, el NO tiene un efecto ateroprotector del endotelio vascular. Las HDL también intervienen en el sistema fibrinolítico inhibiendo la producción de PAI-I y promoviendo la generación del activador tisular del plasminógeno (t-PA).

Otro aspecto interesante desarrollado por el Dr. Griffin es el papel de los esfingolípidos, y especialmente el esfingolípido neutral llamado glucosilceramida. La glucosilceramida y otros glicosfingolípidos neutrales son cofactores lipídicos anticoagulantes para la vía de activación de la proteína C con funciones anticoagulantes. Niveles bajos de glucosilceramida se han asociado a ETE.

También se ha observado que los anticonceptivos orales de segunda y tercera generación disminuyen la concentración plasmática de glucosilceramida. Esta disminución se correlaciona con una reducción en la activación de las proteínas C y S. Consiguientemente, también se correlaciona con un incremento del riesgo de desarrollar ETE.

Los aspectos de la genómica en la patología trombótica están desarrollados en este simposio por el Dr. José M. Soria. En el apartado de las bases genéticas de la trombofilia, el Dr. Soria nos expone cómo ha evolu-

cionado el concepto de trombofilia desde que en 1965 se descubrió la primera familia con trombofilia ocasionada por la deficiencia de antitrombina. Inicialmente se creía que la trombofilia era un defecto genético dominante con reducida penetrancia. Se creía que esta enfermedad era monogénica; posteriormente, con el descubrimiento de otros factores genéticos, se consideró a la trombofilia como una enfermedad poligénica. En la actualidad se admite que la trombofilia es una enfermedad multifactorial (interacción de factores genéticos y ambientales) y compleja, en la que la suma de múltiples genes –y, cada uno de ellos, con un efecto variable con el ambiente– determinan en cada individuo un grado de susceptibilidad a la trombosis.

Otro apartado desarrollado por el Dr. Soria ha sido la importancia de los estudios de asociación caso-control y los estudios de ligamiento genético como herramientas en la identificación y localización de genes implicados en el riesgo de padecer trombosis. La conclusión es que ambos métodos son complementarios y no antagonicos.

En la última parte de su exposición, el Dr. Soria aborda el problema de las herramientas necesarias para identificar los factores genéticos de susceptibilidad a la trombosis. Según el autor, el desarrollo de DNA chips a partir de métodos de detección colorimétricos o por fluorescencia puede representar un avance significativo en el diagnóstico genético de la trombosis a gran escala.

El último ponente en este simposio, el Dr. R. Lecumberri aporta los datos del Registro RIETE sobre trombofilia y ETEV. En el momento de realizar la revisión, en el Registro RIETE se habían incluido 21.367 pacientes consecutivos con ETEV objetivamente diagnosticada, y en 4.494 casos (21%) se había efectuado un estudio de trombofilia que resultó positivo para al menos un defecto en 1.436 pacientes (32,4% de los estudiados).

En términos de eficiencia, el estudio de trombofilia era superior en pacientes con menos de 50 años (45%; IC 95%: 42-48) respecto a pacientes con más de 50 años (26%; IC 95%: 24-28). La probabilidad de encontrar un defecto trombofílico era particularmente alta en ETEV asociada a embarazo (51%; IC 95%: 32-51). En el análisis individualizado de los defectos trombofílicos, cabe destacar la menor incidencia de EP en portadores de mutación FV Leiden. Los pacientes con positividad a anticuerpos antifosfolípidos presentaron una mayor incidencia de recurrencias trombóticas en los primeros tres meses de seguimiento (5,7% vs. 2,1% en pacientes con estudio de trombofilia negativo).

Todos los datos aportados en este simposio creo que incrementan y aportan nuevos conocimientos en la fisiopatología, el diagnóstico, la profilaxis y el tratamiento de la ETEV.

PLASMA LIPIDS, LIPOPROTEINS AND VENOUS THROMBOSIS: HDL DYSLIPOPROTEINEMIA

H. DEGUCHI, J.A. FERNÁNDEZ, J.H. GRIFFIN
*Department of Molecular and Experimental Medicine,
 The Scripps Research Institute. La Jolla, CA, USA*

Abstract

High-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) is anti-atherogenic and plays a major role in mediating cholesterol efflux from cells. However, HDL has multiple additional endothelial and antithrombotic actions, including anticoagulant properties. Recently, HDL dyslipoproteinemia was associated with occurrence and recurrence of venous thromboembolism (VTE), implying that deficiency of HDL antithrombotic activity may be linked to VTE. Possible mechanisms for HDL anticoagulant activity may include downregulation of thrombin generation via the protein C pathway as well as attenuation of expression of tissue factor and of P-selectin and E-selectin. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) is a major determinant of HDL-C level, and its polymorphisms are associated with risk of VTE. Curiously, CETP may be a source of procoagulant activity by enhancing prothrombinase activity. In other recent developments, sphingolipids were shown to alter the functional activity of the coagulation system. Major sphingolipids participate in a dynamic metabolism of lipids, and significant amounts of various sphingolipids are present in plasma. Compared to numerous studies of phospholipids in coagulation reactions, relatively few studies have addressed the relationships between sphingolipids and the coagulation system. Interestingly glucosylceramide is an anticoagulant cofactor for the protein C anticoagulant pathway, and plasma glucosylceramide imbalances have been linked to risk of VTE. In purified reaction mixtures, sphingosine itself is a strong anticoagulant lipid. Both basic and clinical investigations of plasma lipids and lipoproteins for their correlations and their effects on blood coagulation and VTE may provide new biomarkers, new mechanistic insights, and new prophylactic or therapeutic strategies to combat thrombotic disorders.

Introduction

There are several classes of plasma lipid transporters which carry and exchange lipids in the circulation and between plasma and cells. These include chylomicrons (CM), very low-density lipoproteins (VLDL), intermediate density lipoproteins (IDL), low-density lipoproteins (LDL) and high-density lipoproteins (HDL).

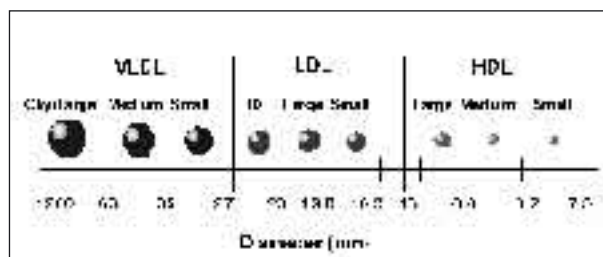


Figure 1. Diameter of lipoprotein particles in lipoprotein subclasses defined by NMR spectroscopy.

The spectrum and the levels of various lipoproteins in blood are in constant flux and are determined by many factors that dynamically modulate lipid and lipoprotein metabolism. There are a number of subpopulations of each major lipoprotein type, i.e., VLDL, LDL and HDL. Each major lipoprotein contains a neutral lipid-rich core with major and minor apo-lipoproteins associated with hydrophilic surfaces that contain polar or charged lipids (phospholipids, cholesterol and sphingolipids). Lipids of minor abundance can convey a variety of functional properties. Technologies, eg., NMR spectroscopy or lipidomics, permit quantification of major plasma lipoprotein subclasses and lipids (Figure 1). Our group reported that HDL enhances the anticoagulant activities of plasma protein S and activated protein C¹ and that the deficiency of HDL particles is associated with VTE². Here we review plasma lipids, lipoprotein and VTE, especially focusing on the association of HDL and lipids with blood coagulation and VTE.

VTE and dyslipidemia and dyslipoproteinemia

Deep vein thrombosis and pulmonary embolism (VTE) are estimated to have an annual incidence of 1 per 1,000 resulting in ~ 50,000 deaths each year in the USA, with similar prevalence in Europe. VTE is a clinically distinct entity from arterial thrombosis, with notable differences in thrombus appearance, etiology, and appropriate therapeutic approaches. Whereas arterial thrombosis is highly dependent on platelet activation and altered blood flow, VTE is driven by processes involving coagulation factors and venous stasis. The predisposing risk factors postulated by Virchow in the 19th century hold true today: stasis, endothelial injury, and hypercoagulable states. In modern medical terminology, the major predisposing risk factors include recent surgery, immobilization, prior thrombosis, increasing age, obesity, malignancy, pregnancy, and estrogen use. Clinical evidence linking dyslipidemia with VTE has recently emerged (Table 1), and

Table 1. Association of dyslipidemia and dyslipoproteinemia with venous thrombosis

References	Study design	Study population	Case vs control	Major findings
Kawasaki <i>et al.</i> , 1997, <i>Thromb Res</i>	Case-control	Adults with VTE Healthy controls	109 vs 109	Hyperlipidemia associated with VTE
G. Lippi, <i>et al.</i> , 1999, <i>Thromb Res</i>	Case-control	Adults with VTE Healthy controls	64 vs 64	No association of VTE with lipid lipoprotein disorder
Von Depka <i>et al.</i> , 2000, <i>Blood</i>	Case-control	Patient with VTE aged 11-77 Majority < 50	685 vs 266	Increased Lp(a) levels as independent risk factor for VTE
McColl <i>et al.</i> , 2000, <i>Blood Coag Fibrinolysis</i>	Case-control	Females > 50 with VTE	62 vs 98	Hypertriglyceridemia associated with VTE
Tsai <i>et al.</i> , 2002, <i>Am J Med</i>	Prospective cohort	Adults > 45	215 (out of 19,293)	Dyslipidemia was not associated with risk for VTE
Vaya <i>et al.</i> , 2002, <i>Br J Haematol</i>	Case-control	Adults with VTE Healthy controls	143 vs 194	Hypercholesterolemia associated with VTE
González-Ordóñez <i>et al.</i> , 2003, <i>Haematológica</i>	Case-control	Adults with VTE Healthy controls	126 vs 125	Hyperlipidemia, especially in males, associated with VTE
Marcucci <i>et al.</i> , 2003, <i>Am J Med</i>	Case-control	Adults with VTE Healthy controls	603 vs 430	Lp(a) independent predictor for VTE
Doggen <i>et al.</i> , 2004, <i>ATVB</i>	Case-control	Postmenopausal women	477 vs 1986	High HDL reduced the risk for VTE High TG increased the risk for VTE
Glynn <i>et al.</i> , 2005, <i>Am J Epidemiol</i>	Prospective cohort	Male physicians aged 40-84	358 (out of 18,622)	Elevated cholesterol was not associated with VTE
Deguchi <i>et al.</i> , 2005, <i>Circulation</i>	Case-control	Males > 55 with VTE	49 vs 49	LDL and HDL particles are associated with the risk factors for VTE
Eichinger <i>et al.</i> , 2007, <i>Circulation</i>	Prospective cohort	VTE recurrence	100 (out of 772)	Deficiency of apoAI is associated with risk for VTE recurrence
Vaya <i>et al.</i> , 2007, <i>Thromb Haemost</i>	Case-control	Adults with VTE Healthy controls	149 vs 185	EA, hyperlipidemia, obesity associated with VTE

these studies and a meta-analysis³ indicate that elevated HDL is associated with lower risk of VTE. Observational studies revealed that statin use, which modestly raises HDL levels, may decrease the occurrence of VTE by approximately 50% in postmenopausal women. However, because hormone replacement therapy causes elevations in HDL levels but results in increased risk of VTE, the mechanism by which HDL levels are raised should be considered when interpreting correlations between HDL levels and clinical events and whether they potentially represent direct or indirect causal relationships between elevated HDL and protection against thrombosis.

Recent lipoprotein subclasses analysis by NMR for VTE patients (< 55 years old for first episode of VTE) showed that male VTE cases had a significantly lower mean HDL particle concentration than controls². Among HDL lipoprotein subclasses, large HDL particle concentrations were lower in patients than controls. Moreover, lower levels of total HDL particle concentration and large HDL particle concentration were associated with increased VTE risk. Further, LDL par-

ticle concentrations in VTE patients were significantly higher than in control subjects. Among LDL subclasses, small LDL particle concentrations were higher in cases. Higher levels of total LDL, IDL and small LDL particle concentrations were associated with increased VTE risk ($p = 0.03$, 0.03 and 0.03 , respectively)².

The risk of VTE recurrence depends upon the number and severity of risk factors in an individual patient. Important risk factors for recurrence include antithrombin deficiency, the lupus anticoagulant, high factor VIII, hyperhomocysteinemia, previous VTE, cancer, or male gender⁴. Patients with recurrence compared to those without recurrence had lower mean plasma levels of apoAI. The relative risk of recurrent VTE was 0.87 (95% confidence interval 0.80 to 0.94) for each increase of 0.1 mg/mL in plasma apoAI⁵. In Kaplan-Meier analysis, the cumulative probability of recurrence after 4 years was significantly lower among those with apoAI levels above 67th percentile of control (Figure 2)⁵. Thus, the association of deficiency of apoAI, the major protein in HDL, with risk for VTE recurrence was discovered.

HDL and hypercoagulability

Hypercoagulability is well described in hyperlipidemic patients with arterial disease and arterial thrombotic events. There are major knowledge gaps between the extensive clinical literature about dyslipidemia linked to arterial thrombosis and the modest literature about dyslipidemia or dyslipoproteinemia linked to hypercoagulability. One key finding is that elevated HDL-C, the “good cholesterol”, is not only a marker but also an active agent for protection against arterial atherothrombotic disease. Drugs, diet, moderate alcohol use, and exercise elevate HDL-C with beneficial effects. HDL is antithrombotic via multiple mechanisms including anticoagulant mechanisms. There is a positive correlation between plasma apoA-I levels and anticoagulant response to APC/protein S *in vitro*¹, and there is also an inverse correlation between HDL and plasma thrombin activation markers such as prothrombin fragments F₁₊₂ *in vivo*, suggesting that HDL may modify thrombin generation under normal conditions. More concrete evidence of HDL-related anticoagulant and anti-platelet activity in humans includes the finding that the infusion of reconstituted HDL limits the development of a procoagulant state in healthy volunteers given low doses of endotoxin⁶. Furthermore, low HDL in healthy males is associated with increased sensitivity toward inflammatory stimuli as reflected by enhanced inflammatory and coagulation responses on endotoxin challenge⁷. These collective observations related to arterial and VTE and coagulation status in humans have heightened interest in the potential mechanisms by which HDL is antithrombotic (Figure 3).

HDL and thrombus initiation

During inflammation, cytokines induce the appearance of tissue factor and of P-selectin and E-selectin on the surfaces of platelets and endothelial cells. These prothrombotic factors are also present on subsets of cell-derived, circulating microparticles. Such prothrombotic microparticles can contribute both to the initiation of thrombus formation when they bind to perturbed endothelium and to the progression of thrombus formation when they bind to the luminal surface of a growing thrombus. Because the adhesive reactions between microparticles and endothelium or blood cells in a growing thrombus are critical to the thrombotic process, downregulation of the expression of selectins or of tissue factor inhibits thrombus formation. As summarized by Barter *et al.*, the lipid components of HDL can contribute to the downregulation of E-selectin expression on endothelial cell surfaces⁸.

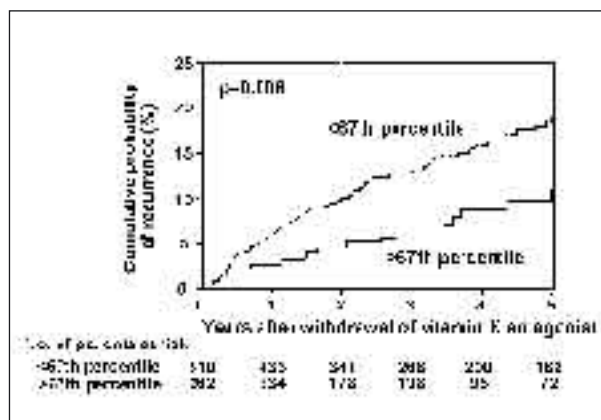


Figure 2. Kaplan-Meier analysis of the probability of recurrent venous thromboembolism. The plot shows probability of recurrence for patients with apolipoprotein AI levels equal to or greater than 1.30 mg/mL (67th percentile of thrombosis patients) and among patients with lower levels. The 67th percentile of apolipoprotein AI was 1.22 (mg/mL) in men and 1.35 (mg/mL) in women.

Thrombin-induced endothelial cell tissue factor expression *in vitro* is directly downregulated by reconstituted HDL⁹. Moreover, HDL may decrease tissue factor induction on endothelial cells indirectly by increasing the synthesis of nitric oxide (NO)¹⁰. Consistent with the documentation of these processes *in vitro*, there is an inverse correlation between HDL levels and the abundance of P-selectin-positive platelets in humans. In addition to the effects of HDL on tissue factor and selectins expression, HDL may also be antithrombotic because it prevents endothelial cell apoptosis. Along with being an important source of circulating microparticles, apoptotic endothelial cells enhance adhesive reactions between unactivated platelets and leukocytes and the intimal surface, and apoptotic endothelial cells exhibit procoagulant properties.

HDL and activated protein C anticoagulant system

Thrombin generation via blood coagulation pathways induces platelet activation and platelet-derived growth factor release and directly causes fibrin clot formation by cleaving fibrinogen. The protein C pathway provides a major physiological anticoagulant mechanism to downregulate thrombin formation by inactivating factors Va and VIIIa in plasma, and the majority of currently identifiable genetic defects associated with VTE involve protein C pathway dysfunction. For example, the laboratory abnormality known as activat-

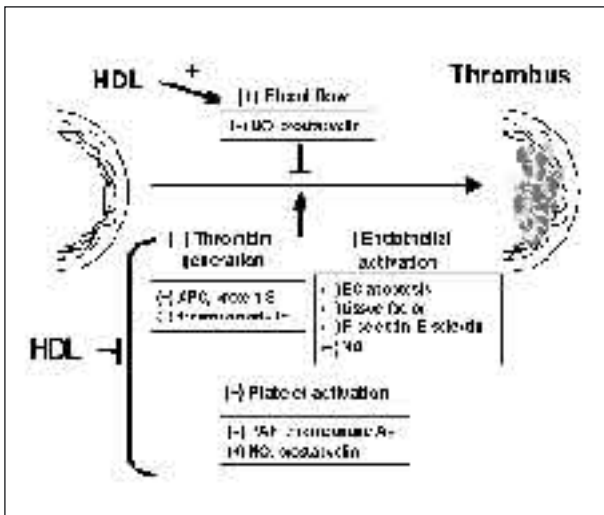


Figure 3. Multiple antithrombotic actions of HDL. HDL has multiple antithrombotic actions involving the promotion of blood flow and the attenuation of thrombin generation and endothelial and platelet activation. Inhibitory actions of HDL are designated with (-), and stimulatory actions are designated with (+). HDL increases blood flow by increasing NO and prostacyclin production. HDL related decreases in thrombin generation are mediated by enhanced anticoagulant activity of activated protein C (APC) and protein S and by the upregulation of endothelial cell thrombomodulin. The reduction of endothelial activation by HDL occurs through the blunting of endothelial cell apoptosis and of microparticle formation, the inhibition of expression of tissue factor and of P-selectin or E-selectin, and the promotion of NO production. HDL antagonism of platelet activation also involves the downregulation of platelet activating factor release and thromboxane A2 (TxA2) synthesis and the upregulation of NO and prostacyclin synthesis¹⁰.

ed protein C (APC) resistance, which is caused by a subnormal anticoagulant response of patient plasma to APC, causes a mild hypercoagulable state and is a risk factor for VTE and ischemic stroke. The positive correlation between plasma apolipoprotein A-I levels and anticoagulant response to APC/protein S *in vitro*¹ suggests that HDL may modify APC anticoagulant system under normal conditions. HDL, particularly HDL₂ or large HDL, functions as an anticoagulant cofactor when it enhances the inactivation of purified coagulation factor Va by APC and protein S *in vitro*, which blunts thrombin generation and fibrin clot formation (unpublished observations)¹. Moreover, studies of HDL infusions into cholesterol-fed rabbits indicate that HDL upregulates endothelial cell thrombomodulin, which is an additional anticoagulant factor that supports the generation of APC and the suppression of thrombin generation¹¹. Because thrombomodulin is both an antithrombotic factor via

the generation of APC and an anti-inflammatory factor via currently unknown mechanisms, the upregulation of thrombomodulin expression by HDL may have a variety of important implications regarding HDL action in humans.

Other HDL anti-thrombotic properties

HDL has multiple additional endothelial and anti-thrombotic actions, besides anticoagulant property¹⁰. HDL promotes the production of the atheroprotective signaling molecule NO by upregulating endothelial NO synthase (eNOS aka NOS3) expression, by maintaining the lipid environment in caveolae, where eNOS is co-localized with partner signaling molecules, and by stimulating eNOS as a result of kinase cascade activation via the HDL receptor, scavenger receptor class B type I (SR-BI). HDL also protects endothelial cells from apoptosis and promotes their growth and migration by signaling initiated via scavenger receptor class B type I.

Fibrinolysis reactions provide proteolytic clearance of fibrin and the lysis of fibrin-rich thrombi by plasmin, which is generated by plasminogen activation. The contribution of hypofibrinolysis to arterial thrombosis has been described and is more evident than the contribution of hypofibrinolysis to VTE. HDL may promote fibrinolysis by downregulating plasminogen activator inhibitor-I (PAI-I) and by upregulating tissue plasminogen activator (t-PA). The oxidation of HDL alters the influence of HDL on fibrinolysis because oxidized HDL₃, but not native HDL₃, promotes PAI-I expression and consequently suppresses fibrinolysis. The antithrombotic properties may also be related to the abilities of HDL to promote prostacyclin synthesis and to blunt platelet activation¹².

Cholesteryl ester transfer protein (CETP), the determinants of HDL

The main participants in the reverse cholesterol transport pathway are principal contributors to the HDL plasma levels. Mutations in the genes encoding ABCA1, LCAT, CETP, PLTP, HL, LPL, EL and SR-B1 have an impact on the HDL-C levels. CETP plays a pivotal role in lipoprotein metabolism and remodels HDL by transferring lipids out of HDL into other lipoprotein particles or membranes. CETP deficiency or CETP inhibitors increase HDL-C levels, mainly due to increasing levels of large HDL particle levels. The CETP gene and its association with lipoprotein concentrations as well as with CETP mass and activity have been related to dozens of single nucleotide

polymorphisms (SNP) and several haplotypes, including two predominant haploblocks (5' and 3') that are in strong linkage disequilibrium. A common TaqI B1 variation in the CETP gene was linked to VTE in young males² as were two relatively rare CETP missense variations, Ala373 to Pro and Arg451 to Gln, that cause elevated plasma CETP and an unfavorable pattern of lipoproteins¹³.

CETP, beyond the determinants of HDL

Although some blood clotting reactions are directly affected by lipoprotein particles^{1,14} and HDL has multiple antithrombotic properties, there is currently a dearth of information addressing the potential relationships between plasma CETP, a key modulator of lipoprotein metabolism, especially HDL metabolism, and blood coagulation reactions. Recent data showed that coagulation initiated via either the extrinsic or the intrinsic coagulation pathway is positively correlated with CETP plasma antigen levels in plasmas from healthy normal subjects¹⁵. This interesting correlation between CETP antigen levels and coagulability remains even after adjusting for variation in HDL-C level¹⁵. One recombinant CETP preparation dose-dependently shortened factor Xa-1-stage clotting times, showing that it augmented procoagulant activity in plasma. In reaction mixtures containing purified factors Xa and Va and prothrombin, the recombinant CETP preparation dose-dependently increased prothrombin activation, suggesting it specifically enhances prothrombinase activity¹⁵. Thus, our recent data highlight a previously unknown positive relationship between CETP plasma levels and blood coagulability that might relate to risks for thrombotic events.

CETP inhibitors which markedly raise HDL-C levels represent a new class of potential drugs, and several companies are developing CETP inhibitors. Unfortunately the *ILLUMINATE* phase III trial of the CETP inhibitor, torcetrapib, was halted due to excess deaths in the torcetrapib treated arm. The study showed that, although torcetrapib increased HDL-C by 72% and lowered LDL-C by 25%, there was a 58% increased risk of death among patients in the torcetrapib group and a 25% increase in the risk of cardiovascular event. The observations that blood coagulability in plasmas from healthy normal subjects is positively correlated with CETP antigen and that a recombinant CETP preparation promotes prothrombin activation might help provide a possible explanation for the discrepancy between the remarkable increase of HDL-C induced by torcetrapib and the negative outcome of the *ILLUMINATE* torcetrapib trial. One might hypothesize that the increase of

CETP antigen by torcetrapib can increase blood coagulability with a negative influence on pro-atherosclerotic or prothrombotic processes. Further experimentation is necessary to confirm the procoagulant properties of CETP and to explore this hypothesis.

Sphingolipids and antithrombotic activities

The association of phospholipids with coagulation reactions has been extensively studied *in vitro*. However, the relationships between sphingolipids, especially neutral sphingolipids, and coagulation reactions or thrombotic events have not been very well explored. However, a few provocative findings have been reported. Glucosylceramide and related neutral glycosphingolipids are anticoagulant lipid cofactors for activated protein C's anticoagulant actions^{16,17}, and low plasma levels of glucosylceramide are associated with VTE¹⁶. Furthermore, use of either second or third generation oral contraceptives decreases plasma glucosylceramide and this reduction is correlated with the reduction of plasma sensitivity to the anticoagulant proteins, activated protein C/protein S¹⁸. These findings support the hypothesis that, in some significant part, the effect of oral contraceptives on glucosylceramide metabolism could cause a reduction in the sensitivity of plasma to the protein C anticoagulant pathway, thereby increasing VTE risk. Finally, sphingosine at concentrations similar to those found in plasma inhibits prothrombin activation on platelet surfaces and in model coagulation assay systems. Mechanistically, the anticoagulant action of sphingosine is apparent in its ability to inhibit procoagulant interactions between purified factors Xa and Va. Thus, sphingosine may directly downregulate thrombin generation; no clinical study of sphingosine in relationship to arterial thrombosis or VTE has been reported¹⁹.

The anticoagulant sphingolipids, glucosylceramide and sphingosine, are dynamically metabolically related to ceramide (Figure 4). Ceramide is one of the most studied sphingolipids and it contributes to induction of apoptosis that may be implicated in endothelial cell damage and, thereby, the expression of procoagulant activity. The dynamic metabolic balances among various sphingolipid metabolites may be shifted by a variety of factors. Changes in the relative concentrations of sphingolipids might regulate inflammatory events such as cell proliferation and also might down-regulate blood coagulation and thrombin generation. Various enzymes that regulate sphingolipid metabolism are capable of shifting the balance between levels of sphingosine and ceramide, sphingosine and sphingosine-1-phosphate (S1P), glucosylceramide and ceramide, etc. Although no clin-

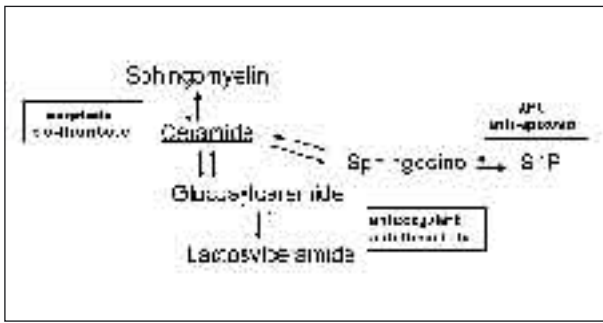


Figure 4. Sphingolipid metabolism and possible association with thrombosis. Apoptosis generates procoagulant membranes and microparticles. Ceramide is pro-apoptotic and thus potentially prothrombotic whereas sphingosine and sphingosine-1-phosphate (S1P) are anti-apoptotic and thus indirectly anticoagulant. Moreover, sphingosine itself is anticoagulant and inhibits prothrombin activation in mixtures of purified coagulation factors. Glucosylceramide and lactosylceramide promote the anticoagulant activities of activated protein C/protein S and are thereby antithrombotic lipid cofactors. Activated protein C can exert anti-apoptotic activity directly on stressed endothelial cells, thereby indirectly exerting antithrombotic activity.

ical evidence for sphingolipid imbalances and VTE risk have been reported, certain sphingolipid imbalances might potentially influence risk of VTE, and indeed we would like to speculate that certain sphingolipid metabolic imbalances could actually be causally associated with VTE.

Other lipoproteins and coagulation

Epidemiologic studies show that increased levels of all vitamin K dependent procoagulant factors are associated with hypertriglyceridemia, and, furthermore, that triglyceride-rich lipoproteins bind vitamin K dependent clotting factors and promote procoagulant reaction. LDL and VLDL can have significant procoagulant influences on blood coagulation reactions (as reviewed in 14). For example, VLDL enhances prothrombin activation by factor Xa in the presence of factor Va and, in this regard, VLDL is much more active than LDL or HDL. Moreover, oxidation of LDL enhances tenfold its ability to promote prothrombin activation. These studies demonstrate that VLDL and oxidized LDL, but not HDL, may be considered as potentially prothrombotic agents because they can directly support thrombin generation. The ability of purified lipoproteins to support activation of factor X by factor IXa in the presence of factor VIIIa were also reported. On the vessel walls, oxidized-LDL supports intrinsic pathway activation of factor X much better

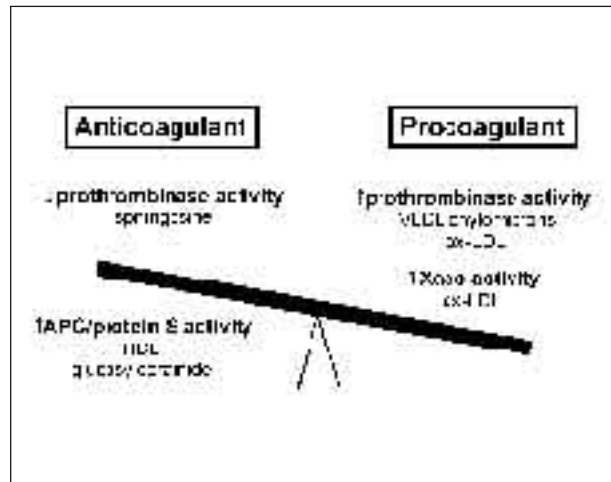


Figure 5. Antithrombotic and prothrombotic influences of lipids and lipoproteins that influence mechanisms which help determine the hemostatic balance. The anticoagulant factors, HDL, sphingosine and glucosylceramide inhibit coagulation and are indicated on the left side of the balance bar, while the competing procoagulant factors, VLDL/chylomicrons and oxidized-LDL are indicated on the right side of the balance bar.

than native LDL²⁰ implying oxidation may promote coagulation reactions via oxidized lipoproteins. Although further studies are needed to characterize factor X activation on lipoprotein surfaces, the available reports clearly indicate that lipoprotein surfaces and/or lipids derived from lipoproteins may directly promote factor X activation. Overall, lipoproteins and plasma lipids of minor abundance can contribute significantly to the hemostatic balance (Figure 5).

Acknowledgements

We thank our collaborators, Drs. S. Eichinger, D.J. Elias, P. Kyrle, N. Pecheniuk, and S. Yegneswaran, for stimulating studies together and helpful discussions. We apologize to colleagues whose important work could not be cited due to severe space limitations.

Funding

This work was supported in part by NIH grants HL21544 and HL52246.

References

1. Griffin JH, Kojima K, Banka CL, Curtiss LK, Fernández JA. High-density lipoprotein enhancement of anticoagulant ac-

- tivities of plasma protein S and activated protein C. *J Clin Invest* 1999; 103: 219-27.
2. Deguchi H, Pecheniuk NM, Elias DJ, Averell PM, Griffin JH. High-density lipoprotein deficiency and dyslipoproteinemia associated with venous thrombosis in men. *Circulation* 2005; 112: 893-9.
 3. Ageno W, Becattini C, Brighton T, Selby R, Kamphuisen PW. Cardiovascular risk factors and venous thromboembolism: a meta-analysis. *Circulation* 2008; 117: 93-102.
 4. Kyrle PA, Eichinger S. Deep vein thrombosis. *Lancet* 2005; 365: 1163-74.
 5. Eichinger S, Pecheniuk NM, Hron G, Deguchi H, Schemper M, Kyrle PA, Griffin JH. High-density lipoprotein and the risk of recurrent venous thromboembolism. *Circulation* 2007; 115: 1609-14.
 6. Pajkrt D, Lerch PG, van der PT, Levi M, Illi M, Doran JE, et al. Differential effects of reconstituted high-density lipoprotein on coagulation, fibrinolysis and platelet activation during human endotoxemia. *Thromb Haemost* 1997; 77: 303-7.
 7. Birjmohun RS, van Leuven SI, Levels JH, van 't Veer C, Kuivenhoven JA, Meijers JC, et al. High-density lipoprotein attenuates inflammation and coagulation response on endotoxin challenge in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 1153-8.
 8. Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res* 2004; 95: 764-72.
 9. Wadham C, Albanese N, Roberts J, Wang L, Bagley CJ, Gamble JR, et al. High-density lipoproteins neutralize C-reactive protein proinflammatory activity. *Circulation* 2004; 109: 2116-22.
 10. Mineo C, Deguchi H, Griffin JH, Shaul PW. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res* 2006; 98: 1352-64.
 11. Nicholls SJ, Cutri B, Worthley SG, Kee P, Rye KA, Bao S, Barter PJ. Impact of short-term administration of high-density lipoproteins and atorvastatin on atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 2416-21.
 12. Korporaal SJ, Akkerman JW. Platelet activation by low density lipoprotein and high density lipoprotein. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2006; 35: 270-80.
 13. Pecheniuk NM, Deguchi H, Elias DJ, Xu X, Griffin JH. Cholesteryl ester transfer protein genotypes associated with venous thrombosis and dyslipoproteinemia in males. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 2080-2.
 14. Griffin JH, Fernández JA, Deguchi H. Plasma lipoproteins, hemostasis and thrombosis. *Thromb Haemost* 2001; 86: 386-94.
 15. Deguchi H, Fernández JA, Griffin JH. Plasma cholesteryl ester transfer protein levels correlate with blood coagulability. *Thromb Haemost* 2007; 98: 1160-4.
 16. Deguchi H, Fernández JA, Pabinger I, Heit JA, Griffin JH. Plasma glucosylceramide deficiency as potential risk factor for venous thrombosis and modulator of anticoagulant protein C pathway. *Blood* 2001; 97: 1907-14.
 17. Deguchi H, Fernández JA, Griffin JH. Neutral glycosphingolipid-dependent inactivation of coagulation factor Va by activated protein C and protein S. *J Biol Chem* 2002; 277: 8861-5.
 18. Deguchi H, Bouma BN, Middeldorp S, Lee YM, Griffin JH. Decreased plasma sensitivity to activated protein C by oral contraceptives is associated with decreases in plasma glucosylceramide. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 935-8.
 19. Deguchi H, Yegneswaran S, Griffin JH. Sphingolipids as bioactive regulators of thrombin generation. *J Biol Chem* 2004; 279: 12036-42.
 20. Ananyeva NM, Kouivaskaia DV, Shima M, Saenko EL. Intrinsic pathway of blood coagulation contributes to thrombogenicity of atherosclerotic plaque. *Blood* 2002; 99: 4475-85.

GENÓMICA EN PATOLOGÍA TROMBÓTICA

J.M. SORIA

Unitat de Genòmica de Malalties Complexes.

Unitat d'Hemostasia i Trombosi.

Institut de Recerca. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona

Introducción

A principios del siglo XX, Archibald Garrod describió sus observaciones en familias afectas de alcaptonuria que le llevaron a concluir que la enfermedad se comportaba como los caracteres recesivos descritos por Mendel muchos años antes. Este importante trabajo, publicado en *Lancet* en 1902¹, coincide con el redescubrimiento de las Leyes de Mendel y marca el comienzo de la Genética Humana.

A lo largo del siglo XX se consolidaron los conceptos de que la mayoría de las enfermedades, si no todas, tienen un componente genético y de que el papel de los genes (considerados defectuosos) que causan enfermedades es considerable en la especie humana. Estos avances en el área de la Genética han exigido el constante desarrollo de nuevas herramientas de trabajo y aproximaciones experimentales. Todos estos esfuerzos culminan el 14 de abril de 2003. Esta fecha marcará un hito en la historia de la Ciencia, ya que el Consorcio Internacional para la secuenciación del genoma humano² anunció que había logrado determinar las letras de nuestro genoma, coincidiendo con el 50 aniversario de la publicación del modelo estructural del DNA por Watson y Crick³. Gracias al Proyecto Genoma Humano se ha producido un revolucionario avance en el campo de la Genética Humana, permitiendo la transición del análisis clásico de enfermedades monogénicas al acercamiento a la base genética de las enfermedades complejas y comunes, tales como la obesidad, la diabetes, el cáncer, la hipertensión, el asma o la trombosis. La era de la genómica ha comenzado.

Las implicaciones del Proyecto Genoma Humano son enormes en todos los campos de la medicina. Un primer resultado lo constituye el conocimiento de la secuencia de nucleótidos de nuestro genoma. Pero no menos importante es el conocimiento de las variaciones que de esta secuencia presentan los diferentes individuos de la especie humana. Para conocer esta variabilidad está en marcha el Proyecto HapMap⁴ que, con sus más de 3 millones de variantes genéticas genotipadas en 269 individuos pertenecientes a 4 grupos étnicos diferentes, ofrece con una alta resolución información sobre los patrones de herencia de alelos comunes en todo el genoma.

El estudio y la caracterización de la variabilidad genética humana es, por tanto, el camino que nos ha de conducir al conocimiento más en profundidad de las bases genéticas de enfermedades comunes y determinar su contribución a padecer estas enfermedades en múltiples ambientes. De hecho, los estudios de la variabilidad genética humana a escala genómica han sido considerados por la revista *Science* como el logro científico más destacado del año 2007⁵. Según la prestigiosa revista, éstos representan un nuevo hito en el conocimiento y la comprensión del sustrato genético de las enfermedades complejas.

Evidentemente, el estudio de las bases genéticas de la enfermedad tromboembólica se está beneficiando de todos estos avances en el campo de la genómica que, sin lugar a dudas, cambiarán la práctica médica de estas patologías durante el siglo XXI⁶. El enfoque genómico aplicado a la trombosis continuará identificando factores genéticos y rutas metabólicas implicadas en la predisposición a padecer eventos trombóticos, y mejorará las técnicas y herramientas para el diagnóstico genético. Actualmente, ya tenemos la oportunidad de trasladar este conocimiento genómico a la práctica clínica⁷.

Bases genéticas de la trombofilia

Desde 1965, año en que se reconoció que la trombosis podía ser una enfermedad heredable, cuando Egeberg⁸ describió una familia con trombofilia asociada con una deficiencia en antitrombina, el concepto de trombofilia ha evolucionado considerablemente. Dado que las deficiencias de antitrombina (AT), de proteína C (PC) y de proteína S (PS) y la disfibrinogenemia⁹ seguían un patrón de herencia autosómico dominante, se pensó que la trombofilia familiar era causada por un defecto génico dominante con una reducida penetrancia, que explicaría la variable expresividad clínica de la enfermedad. Esta idea de la trombofilia familiar como una enfermedad monogénica (con un modelo de herencia mendeliana simple) quedó en entredicho a través del estudio sistemático de la deficiencia de PC¹⁰. Como resultado de estas observaciones se hipotetizó que la trombofilia familiar seguía un **modelo poligénico** de herencia, donde la cosegregación de uno o más factores genéticos adicionales incrementaría el riesgo trombótico¹⁰. Esta hipótesis se confirmó después de la identificación de las mutaciones factor V Leiden (FVL)¹¹ y G20210A en la región 3' no traducible del gen de la protrombina¹², como factores de riesgo trombótico adicional en las familias portadoras de deficiencias en PC, PS o AT^{13,14}.

El siguiente paso que ha revolucionado el estudio de la trombofilia es la evolución que ha sufrido el

concepto de enfermedad, que ya no es una variable discreta, dicotómica (individuos sanos frente a individuos enfermos), sino una variable continua de riesgo. En otras palabras, lo que está regulado genéticamente no es la enfermedad en sí misma, sino la mayor o menor predisposición a padecerla.

Por todo lo anteriormente expuesto, la trombofilia hereditaria es actualmente considerada una enfermedad **multifactorial** (interacción de factores genéticos y ambientales) y **compleja**, donde la suma de múltiples genes, y cada uno de ellos con un efecto variable con el ambiente, determinarán en cada individuo el grado de susceptibilidad a la trombosis^{15,16}.

Sin embargo, y pese a los grandes esfuerzos invertidos en la última década en el estudio de la enfermedad trombótica, nuestros conocimientos sobre la base molecular de esta patología son escasos, más si se tiene en cuenta que el 60% de la predisposición a la trombosis es atribuible a factores genéticos¹⁷. Para ilustrar esta situación basta recordar que los factores genéticos de riesgo trombótico conocidos sólo se identifican, en el mejor de los casos y dependiendo de la población estudiada, en el 60% de las familias con trombosis hereditaria. El gran reto en la actualidad es la identificación de los factores genéticos de riesgo trombótico en el 40% de las familias restante.

Genómica de la trombosis

Los diseños experimentales utilizados en la identificación y localización de genes implicados en el riesgo de padecer trombosis incluyen análisis de ligamiento genético y los estudios de asociación.

Los estudios de asociación caso-control analizan la correlación entre fenotipo y genotipo. El fenotipo es usualmente la presencia (casos) o ausencia (controles) de la enfermedad en individuos no relacionados o en familias. El genotipo viene determinado por algún tipo de polimorfismo genético, principalmente variaciones de un solo nucleótido, conocidas como SNP (*single nucleotide polymorphism*). Existe asociación cuando la distribución (frecuencias alélicas) de este marcador es estadísticamente diferente en los casos y los controles. El marcador genético es un polimorfismo dentro o cerca de un gen candidato, definido como un gen específico relacionado biológicamente con el proceso de la enfermedad. Este tipo de diseño fue el usado para identificar el factor V Leiden¹¹ y la mutación G20210A en el gen de la protrombina¹². Más recientemente, también ha permitido la identificación de las mutaciones A384S en el gen de la SERPINAC1¹⁸, que codifica para la antitrombina, y la R67X en el gen SERPINC10, que codifica el inhibidor de la proteína Z¹⁹, asociadas a un incremento del riesgo de padecer eventos trombóticos.

Tabla 1. Resultados de análisis globales del genoma basados en ligamiento genético (*genome-wide linkage studies*) en el ámbito de la enfermedad tromboembólica

Fenotipo	Localización	Gen*	Referencia
Thrombosis	10p12	?	24
Thrombosis	18p11.2	?	24
Thrombosis	11q23	?	24
FII-Thrombosis	11p11	F2	25
FXII-Thrombosis	5q35	F12	20
FXII	10p13	?	20
Free protein S	1q32	C4BP	26
APCR/FVIII-Thrombosis	18p11	?	27
vWF	9p34	ABO	28
Protein C	16q23	NQO 1	29
FVIII	5/11	?	30
Homocisteine	11q23	NNMT	31
Fibrinogen	14q11	?	32

*(?) *gen candidato desconocido*

Por otro lado, el análisis de ligamiento genético difiere de los estudios de asociación en que se basa en la transmisión de los padres a su descendencia (cosegregación) de un marcador genético y una variante genética funcional. La cosegregación de un marcador genético sólo se puede detectar observando cómo se heredan los cromosomas de una generación a otra, lo que implica necesariamente el reclutamiento de individuos emparentados en familias.

Los análisis de ligamiento genético nos han permitido identificar la mutación *C46T* en el gen del F12 como factor de riesgo trombótico²⁰. Este resultado se ha replicado en diversos estudios de asociación casos y control. Por otro lado, aunque se había reportado la posible implicación del grupo sanguíneo ABO como factor de riesgo trombótico, la primera evidencia genética de esta implicación vino de un estudio de ligamiento genético²¹. Posteriormente, diversos estudios de asociación han confirmado este resultado y han determinado que es el A1 el alelo que aumenta el riesgo de eventos trombóticos.

Sin embargo, es en el estudio de los determinantes genéticos de fenotipos intermediarios con la enfermedad tromboembólica donde los estudios de ligamiento genético están generando los resultados más destacables (Tabla 1). Si incorporamos a estos resultados la detallada información generada por el Proyecto HapMap a lo largo de todo el genoma, disponemos de las herramientas necesarias para explorar las regiones de ligamiento genético significativo e identificar los genes que determinan la variabilidad de estos fenotipos y su posible implicación en la trombosis.

Tanto los análisis de ligamiento genético como los estudios de asociación tienen sus ventajas y sus inconvenientes. Los primeros son generalmente buenos para localizar nuevos genes, mientras que los segundos lo son para analizar genes conocidos. Por lo tanto, ambos métodos deben ser complementarios y no antagónicos. La cuestión no es tanto qué diseño utilizar, sino cuándo y cómo debe aplicarse cada método. Este punto constituye uno de los debates más controvertidos que actualmente existe en el campo de la genética de las enfermedades complejas²².

Diagnóstico genético de la trombosis

A pesar de estos progresos, los avances en la investigación de las bases genéticas de la trombosis no tendrán un verdadero impacto hasta que no se trasladen a la práctica clínica del cuidado del paciente. La enfermedad tromboembólica sigue siendo un gran problema de salud pública en los países desarrollados, y todas las previsiones apuntan a que la situación va a empeorar a medida que otros países, como China o la India, se vayan desarrollando. Por lo tanto, uno de los principales retos de la investigación biomédica es la identificación de los factores genéticos de susceptibilidad a padecer estos procesos patológicos y el desarrollo de herramientas eficaces para su detección, con el fin de mejorar el diagnóstico, la prevención y el tratamiento. Para alcanzar este objetivo, tan importante como la identificación de nuevos factores genéticos de riesgo tromboembólico es el disponer de una metodología apropiada para detectar estas mutaciones a gran escala de forma sencilla, rápida, específica y con un coste-beneficio ventajoso. En la actualidad ya están disponibles comercialmente métodos de genotipación para la identificación de varios factores de riesgo de trombosis. Sin embargo, la mayoría de estas metodologías son costosas debido principalmente a que consumen mucho tiempo por la falta de automatización (procesado de las muestras manual y largo). Tampoco son muy eficientes ya que no permiten procesar un alto número de muestras a la vez y resulta técnicamente complicado detectar varias mutaciones en la misma reacción. También pueden presentar problemas de fiabilidad que pueden inducir a errores de detección y, consecuentemente, a un mal diagnóstico.

El desarrollo de DNA chip, a partir de métodos de detección colorimétrico o por fluorescencia, puede representar un avance significativo en el diagnóstico genético de la trombosis a gran escala, aportando un diagnóstico genético más preciso, sensible y eficiente. Sin embargo, a medida que identificamos nuevos factores de riesgo trombótico y los métodos de detección se sofistican, más evidente se hace la necesidad de in-

corporar especialistas en genética que participen en la selección de los análisis más apropiados y en la interpretación de los resultados²³. También hay que profundizar en la formación genética y educación de los especialistas clínicos que se enfrentan a la patología.

Conclusiones

Los rápidos avances en las estrategias y metodologías genómicas están aportando valiosas herramientas para profundizar en la predisposición genética a la trombosis. La identificación de factores genéticos implicados en esta patología mejorará la estrategia preventiva y terapéutica en los pacientes de cara a situaciones de riesgo y episodios tromboembólicos futuros, y la identificación de familiares afectos, la mayoría de ellos asintomáticos, que de otra forma no se beneficiarían de esta prevención.

Sin embargo, para que esta mejora sea efectiva, y a pesar de la sofisticación de los tests de diagnóstico genético, es imprescindible el desarrollo de herramientas eficaces para su detección y uso a gran escala, permitiendo a los laboratorios clínicos ofrecer el test genético a un coste similar a la mayoría de marcadores clásicos. Es de destacar que tanto la traslación de los avances genómicos a la práctica clínica (*from bench to bedside*) como la interpretación de los resultados genéticos del diagnóstico de la enfermedad constituyen un gran reto, que requerirá del esfuerzo colaborativo y la integración del conocimiento de especialistas clínicos y genetistas.

Agradecimientos

El autor agradece la financiación de las siguientes instituciones: Grant No. 2 R01 HL070751-05 NIH (USA), FIS PI-05/1361, y Red Temática de Investigación Cooperativa (RETIC) Cardiovascular (RECAVA: Exp-06/0014/0016RD Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain).

J.M. Soria está adscrito al Programa de Estabilización de investigadores del SNS del Instituto Carlos III en colaboración con la Direcció d'Estratègia i Coordinació del Departament de Salut (Generalitat de Catalunya).

Bibliografía

- Garrod AE. The incidence of alkaptonuria: a study in chemical individuality. *Lancet* 1902; ii: 1616-20.
- International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004; 431: 931-45.
- Watson JD, Crick F. Molecular structure of nucleic acids. *Nature* 1953; 171: 737.
- The International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature* 2005; 37: 1299-300.
- Pennisi E. Breakthrough of the year: human genetic variation. *Science* 2007; 318: 1842-3.
- Soria JM, Fontcuberta J. New approaches and future prospects for evaluating genetic risk of thrombosis. *Haematologica* 2005; 90: 1212-22.
- Lippi G, Franchini M, Montagnana M, Guidi GD. Genomics and proteomics in venous thromboembolism: building a bridge toward a rational personalized medicine framework. *Semin Thromb Hemost* 2007; 33: 759-70.
- Egeberg O. Inherited antithrombin III deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorr* 1967; 13: 516-30.
- Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM, Bochkov NP, Boulyjenkov V, et al. Inherited thrombophilia: part 1. *Thromb Haemost* 1996; 76: 651-62.
- Miletich JP, Prescott SM, White R, Majerus PW, Bovill EG. Inherited predisposition to thrombosis. *Cell* 1993; 72: 477-80.
- Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369: 64-7.
- Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase venous thrombosis. *Blood* 1996; 88: 3698-703.
- Koeleman BPC, Reitsma PH, Allaart CF, Bertina RM. Activated protein C resistance as an additional risk factor for thrombosis in protein C deficient families. *Blood* 1994; 84: 1031-5.
- Zöller B, Berntsdotter A, García de Frutos P, Dahlbäck B. Resistance to activated protein C as an additional genetic risk factor in hereditary deficiency of protein S. *Blood* 1995; 85: 3518-23.
- Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet* 1999; 353: 1167-73.
- Bovill EG, Hasstedt SJ, Leppert MF, Long GL. Hereditary thrombophilia as a model for multigenic disease. *Thromb Haemost* 1999; 82: 662-6.
- Souto JC, Almasy L, Borrell M, Blanco-Vaca F, Mateo J, Soria JM, et al. Genetic susceptibility to thrombosis and its relationship to physiological risk factors: the GAIT Study. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 1452-9.
- Corral J, Hernández-Espinosa D, Soria JM, González-Conejero R, Ordóñez A, González-Porras JR, et al. Antithrombin Cambridge II (Ala384Ser): an underestimated but strong and frequent genetic risk factor for venous thrombosis. *Blood* 2007; 109 (10): 4258-63.
- Corral J, González-Conejero R, Soria JM, González-Porras JR, Pérez-Ceballos E, Lecumberri R, et al. A nonsense polymorphism in the protein Z-dependent protease inhibitor increases the risk for venous thrombosis. *Blood* 2006; 108: 177-83.
- Soria JM, Almasy L, Souto JC, Bacq D, Buil A, Faure A, et al. A quantitative trait locus in human factor XII gene jointly influence plasma factor XII levels and susceptibility to thrombotic disease. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 567-74.
- Souto JC, Almasy L, Muñoz-Díaz E, Soria JM, Borrell M, Bayen L, et al. Functional effects of the ABO locus polymorphism on plasma levels of von Willebrand factor, factor VIII, and activated partial thromboplastin time. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2024-8.
- Gambaro G, Anglani F, D'Angelo A. Association studies of genetic polymorphisms and complex disease. *Lancet* 2000; 355: 308-11.
- Varga E. Inherited thrombophilia: key points for genetic counseling. *J Genet Couns* 2007; 16 (3): 261-77.
- Hasstedt SJ, Scott BT, Callas PW, Vossen CY, Rosendaal FR, Long GL, et al. Genome scan of venous thrombosis in a pedigree with protein C deficiency. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 868-73.
- Soria JM, Almasy L, Souto JC, Tirado I, Borrell M, Mateo J, et al. Linkage analysis demonstrates that the prothrombin

- G20210A mutation jointly influences plasma prothrombin levels and risk of thrombosis. *Blood* 2000; 95: 2780-5.
26. Almasy L, Soria JM, Souto JC, Coll I, Bacq D, Faure A, et al. A genome scan reveals a major quantitative trait locus influencing free plasma protein S levels on human chromosome 1q. *Arterios Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 508-11.
 27. Soria JM, Almasy L, Souto JC, Buil A, Martínez-Sánchez E, Mateo J, et al. A new locus on chromosome 18 that influences normal variation in activated protein C resistance phenotype and factor VIII activity and its relation to thrombosis susceptibility. *Blood* 2003; 101: 163-7.
 28. Souto JC, Almasy L, Soria JM, Buil A, Stone W, Lathrop M, et al. Genome-wide linkage analysis of von Willebrand factor plasma levels: results from the GAIT Project. *Thromb Haemost* 2003; 89: 468-74.
 29. Buil A, Soria JM, Souto JC, Almasy L, Lathrop M, Blangero J, Fontcuberta J. Protein C levels are regulated by a quantitative trait locus on chromosome 16: results from the Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia (GAIT) Project. *Arterios Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1321-5.
 30. Berger M, Mattheisen M, Kulle B, Schmidt H, Oldenburg J, Bickeboller H, et al. High factor VIII levels in venous thromboembolism show linkage to imprinted loci on chromosomes 5 and 11. *Blood* 2005; 105: 638-44.
 31. Souto JC, Blanco-Vaca F, Soria JM, Buil A, Ordóñez-Llanos J, Lathrop M, et al. A genome-wide exploration suggests a new candidate gene at chromosome 11q23 as the major determinant of plasma homocysteine levels: results from the GAIT project. *Am J Hum Genet* 2005; 76: 925-33.
 32. Soria JM, Almasy L, Souto JC, Buil A, Lathrop M, Blangero J, Fontcuberta J. A genome search for genetic determinants that influence fibrinogen plasma levels. *Arterios Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1-6.

TROMBOFILIA Y ETEV: ANÁLISIS DEL REGISTRO RIETE

R. LECUMBERRI¹, V. ROLDÁN²,
J.F. SÁNCHEZ MUÑOZ-TORRERO³, V. VICENTE²,
B. BRENNER⁴, E. ROCHA⁵, M. MONREAL⁶;
LOS INVESTIGADORES DEL RIETE

¹ Servicio de Hematología. Clínica Universitaria de Navarra. Pamplona. ² Servicio de Hematología. Hospital Universitario Morales Meseguer. Murcia. ³ Departamento de Medicina Interna. Hospital San Pedro de Alcántara. Cáceres. ⁴ Departamento de Hematología. Rambam Medical Center. Haifa (Israel). ⁵ Facultad de Medicina. Universidad de Navarra. Pamplona. ⁶ Departamento de Medicina Interna. Hospital Universitario Germans Trias i Pujol. Badalona (Barcelona)

Introducción

La enfermedad tromboembólica venosa (ETEV), con sus dos principales manifestaciones clínicas, trombosis venosa profunda (TVP) y tromboembolismo pulmonar (TEP), es un trastorno de naturaleza multifactorial que surge por la concurrencia en un individuo de uno o más factores desencadenantes (no siempre

evidentes)¹. En su aparición las interacciones gen-ambiente parecen desempeñar un papel protagonista.

La trombofilia se define como una predisposición congénita o adquirida (cáncer, embarazo/puerperio, terapia hormonal) para la trombosis. Desgraciadamente, la detección de una trombofilia hereditaria no es sencilla, ya que se requiere una batería de pruebas complejas y relativamente caras. En la actualidad existe un vivo debate acerca de en qué casos se debe realizar un estudio de trombofilia y qué pruebas deben incluirse en el mismo².

En general, se acepta que debe solicitarse un estudio de trombofilia en caso de ETEV idiopática o recurrente, un primer episodio trombótico en edad joven, trombosis venosas en localizaciones poco frecuentes (cerebral, portal, mesentérica, renal), o una fuerte historia familiar de ETEV.

Asimismo, no existe unanimidad en las pruebas a incluir en el estudio, si bien parece claro que, previa realización de una historia clínica completa, se debería incluir la determinación de inhibidores (antitrombina [AT], proteína C [PC], proteína S [PS]), factor V Leiden (FVL)/resistencia a la proteína C activada, mutación G20210A de la protrombina y anticuerpos antifosfolípido (estos últimos constituirían una causa de trombofilia adquirida)². La determinación del polimorfismo C677T de la metilén-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) no se recomienda en la actualidad³. En los últimos meses se han descrito otros polimorfismos (AT Cambridge, inhibidor dependiente de proteína Z, etc.) cuyo papel en la patogenia de la ETEV debe ser confirmado por nuevos estudios^{4,5}. Quizás merezca ser destacada, por su simplicidad de determinación, la influencia del grupo sanguíneo en el riesgo trombótico, siendo sensiblemente superior en los portadores de grupos no O⁶.

Existe mayor consenso sobre el momento en que se debe realizar el estudio de trombofilia hereditaria. Los polimorfismos genéticos se pueden realizar en cualquier momento, pero para la determinación de inhibidores se deben esperar al menos 6 semanas del episodio trombótico agudo, y hay que tener en cuenta la posibilidad de artefactos en los resultados como consecuencia del tratamiento anticoagulante (las heparinas interfieren en la determinación de la AT, mientras que los antagonistas de la vitamina K lo hacen en la determinación de PC y PS).

El principal motivo para la controversia surge de si la detección de un defecto trombofílico puede implicar cambios en el manejo del paciente o de los familiares portadores de dicha alteración. En este sentido, cada vez resulta más evidente que no todas las trombofilias son iguales. Así, el riesgo de sufrir un primer episodio trombótico o una recurrencia a largo plazo es mayor en caso de déficit de AT, portadores homocigotos del FVL o de la mutación de la protrombina,

o dobles heterocigotos, además de en pacientes con anticuerpos antifosfolípido⁷. No obstante, no existe unanimidad al respecto⁸.

El Registro Informatizado de la Enfermedad Tromboembólica (RIETE) es un registro observacional, multicéntrico de carácter internacional, diseñado para reunir datos acerca de las características clínicas, patrones de tratamiento y evolución de pacientes consecutivos con ETEV sintomática, confirmada mediante métodos objetivos⁹⁻¹¹. Aunque la realización de un estudio de trombofilia no constituye una práctica necesaria para la inclusión de un paciente en RIETE, se ha realizado un análisis en los pacientes en los que se realizó dicha búsqueda, obteniendo una fotografía de las circunstancias en las que se solicitan los estudios, así como las características y evolución de dichos pacientes. Además, se recabaron interesantes datos acerca de la eficiencia de la realización del estudio de trombofilia en distintos grupos de pacientes.

Trombofilia en el registro RIETE

El número de pacientes con al menos un episodio sintomático de ETEV incluidos en RIETE, en el momento de realizar esta revisión, ascendía a 21.367. En 4.494 casos (21,0%) se realizó un estudio de trombofilia, que resultó positivo para al menos un defecto en 1.456 pacientes (32,4% de los estudiados). Las alteraciones encontradas con mayor frecuencia fueron el FVL (376 pacientes), anticuerpos antifosfolípido (289 pacientes) y la mutación G20210A de la protrombina (263 pacientes). En 243 pacientes se observó una deficiencia de inhibidores (54 casos con déficit de AT, 64 déficits de PC, y 125 pacientes con deficiencia de PS).

En nuestra práctica clínica habitual se realizó una búsqueda de trombofilia con mayor frecuencia en caso de individuos jóvenes, historia previa de ETEV, trombosis de carácter idiopático o relacionada con embarazo, consumo de terapia hormonal o viajes de larga duración. En términos de eficiencia del estudio de trombofilia, ésta era marcadamente superior en pacientes con edad < 50 años (45%; IC 95%: 42-48) que en individuos > 50 años (26%; IC 95%: 24-28), con independencia de los posibles factores de riesgo trombótico que pudieran concurrir. La probabilidad de encontrar un defecto era particularmente alta en caso de ETEV asociada a embarazo, con una eficiencia del 51% (IC 95%: 32-51). Por el contrario, la probabilidad de encontrar un defecto trombofílico era significativamente menor en los pacientes con cáncer.

En términos generales no se observaban diferencias en la presentación clínica del episodio trombótico, el tratamiento instaurado y la evolución a los 3 meses entre los pacientes con trombofilia positiva y aquellos sin trombofilia.

En el análisis individualizado según el tipo de trombofilia, merece ser destacada una menor incidencia de EP en pacientes portadores de FVL, lo que supone un argumento adicional a favor de la existencia del fenómeno conocido como “paradoja del factor V Leiden”. Los mecanismos fisiopatológicos que justifiquen este hallazgo no están suficientemente aclarados, pero se especula con que, en portadores del FVL, el trombo inicial resultaría más estable, limitando la posibilidad de suelta de fragmentos hacia el árbol vascular pulmonar¹².

Por otra parte, la positividad para los anticuerpos antifosfolípido se asoció con una mayor incidencia de recurrencia trombótica en los primeros 3 meses (5,7% vs. 2,1% en pacientes con estudio de trombofilia negativo). Este hallazgo puede resultar de interés a la hora de plantear el manejo terapéutico inicial de estos pacientes. Aunque varios estudios no encontraron resultados favorables a largo plazo en términos de eficacia/seguridad al aumentar la intensidad del tratamiento anticoagulante (INR: 3,0-4,0) frente al esquema habitual (INR: 2,0-3,0)¹³, cabe plantearse la hipótesis de que quizás sí se podría plantear una mayor intensidad de tratamiento exclusivamente en el periodo inicial.

Conclusiones

En nuestro medio se solicita un estudio de trombofilia a un pequeño porcentaje de pacientes. En la serie de RIETE, una de las más grandes disponible hasta la fecha, no existen diferencias importantes en cuanto a la presentación clínica, manejo terapéutico y evolución a los 3 meses en función de la presencia o ausencia de una trombofilia primaria.

La detección de una alteración trombofílica puede ser relevante en algunos casos de cara a la prolongación del tratamiento anticoagulante (déficit de AT, defectos combinados, anticuerpos antifosfolípido), así como para plantear profilaxis primaria en caso de exposición a situaciones de riesgo en portadores familiares asintomáticos. En este sentido, la eficiencia de la búsqueda en pacientes con ETEV resulta significativamente superior en pacientes < 50 años, con independencia del carácter idiopático o secundario de la ETEV. Estos resultados pueden ayudar al clínico a la hora de decidir a quién solicitar el estudio.

Bibliografía

1. Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multi-causal disease. *Lancet* 1999; 353: 1167-73.
2. Heit JA. Thrombophilia: common questions on laboratory assessment and management. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007: 127-35.

3. Bezemer ID, Doggen CJ, Vos HL, Rosendaal FR. No association between the common MTHFR 677C->T polymorphism and venous thrombosis: results from the MEGA study. *Arch Intern Med* 2007; 167: 497-501.
4. Corral J, Hernández-Espinosa D, Soria JM, González-Conejero R, Ordóñez A, González-Porras JR, et al. Antithrombin Cambridge II (A384S): an underestimated genetic risk factor for venous thrombosis. *Blood* 2007; 109: 4258-63.
5. Corral J, González-Conejero R, Soria JM, González-Porras JR, Pérez-Ceballos E, Lecumberri R, et al. A nonsense polymorphism in the protein Z-dependent protease inhibitor increases the risk for venous thrombosis. *Blood* 2006; 108: 177-83.
6. Miñano A, Ordóñez A, España F, González-Porras JR, Lecumberri R, Fontcuberta J, et al. ABO blood group and risk of venous or arterial thrombosis in carriers of factor V Leiden or prothrombin G20210A polymorphisms. *Haematologica* 2008; 93: 729-34.
7. De Stefano V, Martinelli I, Mannucci PM, Paciaroni K, Chi-usolo P, Casorelli I, et al. The risk of recurrent deep vein thrombosis among heterozygous carriers of both factor V Leiden and the G20210A prothrombin mutation. *N Engl J Med* 1999; 341: 801-6.
8. Baglin T, Luddington R, Brown K, Baglin C. Incidence of recurrent venous thromboembolism in relation to clinical and thrombophilic risk factors: prospective cohort study. *Lancet* 2003; 362: 523-6.
9. Monreal M, Falgá C, Valle R, Barba R, Bosco J, Beato JL, et al.; RIETE Investigators. Venous thromboembolism in patients with renal insufficiency: findings from the RIETE Registry. *Am J Med* 2006; 119: 1073-9.
10. Monreal M, Falgá C, Valdés M, Suárez C, Gabriel F, Tolosa C, Montes J; Riete Investigators. Fatal pulmonary embolism and fatal bleeding in cancer patients with venous thromboembolism: findings from the RIETE registry. *J Thromb Haemost* 2006; 4 (9): 1950-6.
11. Grau E, Tenías JM, Soto MJ, Gutiérrez MR, Lecumberri R, Pérez JL, et al.; RIETE Investigators. D-dimer levels correlate with mortality in patients with acute pulmonary embolism: findings from the RIETE registry. *Crit Care Med* 2007; 35: 193-41.
12. Martinelli I, Battaglioli T, Razzari C, Mannucci PM. Type and location of venous thromboembolism in patients with factor V Leiden or prothrombin G20210A and in those with no thrombophilia. *J Thromb Haemost* 2006; 5: 98-101.
13. Crowther MA, Ginsberg JS, Julian J, Denburg J, Hirsh J, Douketis J, et al. A comparison of two intensities of warfarin for the prevention of recurrent thrombosis in patients with the antiphospholipid antibody syndrome. *N Engl J Med* 2003; 349: 1133-8.

Diátesis hemorrágicas por trombocitopatías

COORDINADOR: A. CID. *Valencia*

Resumen del simposio

De los tres elementos formes que componen la sangre, la plaqueta fue el último en ser reconocido durante el siglo XIX, señalando ya entonces su papel fundamental en la formación del trombo hemostático. Desde entonces y hasta nuestros días, su estudio ha sido de gran interés en diferentes áreas de investigación, tanto en el campo clínico como el de la biología molecular y la farmacología antitrombótica entre otros, lo que ha supuesto un espectacular avance en el conocimiento de la fisiología plaquetaria.

En este simposio se pretende hacer una revisión actualizada de las alteraciones, congénitas y adquiridas, del funcionamiento plaquetario que producen diátesis hemorrágicas. En las dos primeras ponencias, la Dra. Navarro-Núñez y la Dra. Pujol-Moix analizan las anomalías de base genética, tanto de los receptores de la membrana plaquetaria como de los gránulos intraplaquetarios, de las moléculas reguladoras de la activación plaquetaria o del citoesqueleto. Estas revisiones son una actualización de los conocimientos presentes de la fisiología plaquetaria y de las bases moleculares de su disfunción. La alteración de los receptores plaquetarios causan desde síndromes hemorrágicos de gran relevancia clínica, como el síndrome de Bernard-Soulier y la tromboastenia de Glanzmann (por alteraciones en el complejo GPIb/IX/V y del receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$, respectivamente), hasta trastornos hemorrágicos de menor entidad por alteraciones de los receptores del colágeno y de otros agonistas plaquetarios. Las anomalías intraplaquetarias genéticas son un grupo heterogéneo de trastornos que durante años fueron frecuentemente englobados en una misma entidad. Hoy día, gracias al mayor conocimiento de la etiología de estos defectos y la aplicación de técnicas diagnósticas específicas, éstos pueden ser diferenciados. Como se evidencia en estas ponencias, el mayor conocimiento de la patología plaquetaria permite, no sólo el correcto diagnóstico de estas alteraciones –y, por tanto, un mejor manejo terapéutico–, sino que ha supuesto un gran avance en la búsqueda de nuevos agentes antiagregantes para el tratamiento de la trombosis arterial. En la tercera intervención, el Dr. Cesar nos introducirá en las alteraciones de la función de las plaquetas de carácter adquirido debidas a enfermedades o situaciones clínicas especiales. Entre las enfermedades relacionadas se encuentran los síndromes mieloproliferativos crónicos no leucémicos, en los que, dependiendo de la entidad y situación clínica, pueden predominar los problemas hemorrágicos o los fenómenos trombóticos. Otras patologías asociadas a disfunción plaquetaria son la enfermedad renal crónica, la hepatopatía o situaciones especiales como la cirugía extracorpórea o el enfermo politransfundido. Por último, se revisarán los fármacos antiplaquetarios, desde su mecanismo de acción e indicaciones hasta su monitorización en el laboratorio.

Completan este simposio dos ponencias de gran relevancia por la calidad y la actualidad de los temas. La gran variabilidad en la expresión fenotípica de las alteraciones genéticas asociadas a patología trombótica o hemorrágica ha llevado en los últimos años a la búsqueda de diferentes factores que puedan agravar o atenuar esta expresividad clínica. De este modo, la Dra. Antón nos presentará los resultados de un estudio en el que se analizan diferentes polimorfismos hemostáticos y su papel en el desarrollo de hemorragia mucocutánea. Finalmente, el Dr. Jiménez Yuste nos presentará los resultados de cinco pacientes hemofílicos con inhibidor en los que se realiza profilaxis primaria con factor VII activado recombinante durante el periodo previo a la inmunotolerancia. Se valora no sólo el efecto de esta alternativa terapéutica sobre la disminución de los episodios hemorrágicos sino, además, el coste económico que supone.

TRASTORNOS DE RECEPTORES DE MEMBRANA PLAQUETARIA

L. NAVARRO-NÚÑEZ, M.L. LOZANO, A.I. ANTÓN, V. ROLDÁN, C. MARTÍNEZ, V. VICENTE, J. RIVERA

Centro Regional de Hemodonación.

Unidad de Hematología y Oncología Médica.

Facultad de Medicina. Universidad de Murcia

Introducción

Las plaquetas, pseudocélulas anucleadas derivadas por mecanismos complejos de los megacariocitos, desempeñan un papel crítico en el mantenimiento de la integridad vascular y la prevención del sangrado¹. Por otra parte, está reconocida la participación clave de las plaquetas en la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares², la primera causa de muerte en la sociedad occidental.

La capacidad hemostática de las plaquetas y su implicación en la aterotrombosis dependen en gran medida de la exposición y funcionamiento en su membrana de una batería heterogénea de receptores altamente especializados (Figura 1). Entre ellos se encuentran glicoproteínas (GP) adhesivas no integrinas (complejo GPIIb/IX/V), integrinas ($\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$), receptores de agonistas solubles de la familia de receptores con siete dominios transmembrana (receptores

de trombina: PAR-1 y PAR-4, TxA₂, epinefrina, vasopresina, ADP, serotonina, quimiocinas, PAF), receptores de la superfamilia de inmunoglobulinas (GPVI, receptores Fc, PECAM-1, ICAM-2, JAM-1 y 3, ESAM, etc.), receptores de la familia de lectinas tipo C (selectina P, CD72), receptores tirosincinasa (receptor c-mpl de trombopoyetina, receptor de leptina, de PDGF, de insulina, de efrinas, receptores Gas6) y una miscelánea de otras GP (CD36, CD40L, LAMP-1 y 2; PSGL-1, P2X₁, receptor de TNF, receptores de semaforinas)³.

Las anomalías congénitas en estos receptores comprometen en diferente grado la función plaquetaria, como lo demuestra la distinta gravedad de las manifestaciones de sangrado mostradas por los pacientes con estas anomalías. Comúnmente, estos enfermos manifiestan sangrado espontáneo frecuente de intensidad variable y localización mucocutánea, y hemorragia excesiva ante traumas o cirugías. La investigación profunda de las manifestaciones clínicas, alteraciones funcionales y cambios moleculares en estos pacientes ha sido y es de gran valor para comprender los mecanismos que soportan la función hemostática de las plaquetas.

En esta breve revisión comentaremos las características fenotípicas y alteraciones genéticas de los principales trastornos congénitos de los receptores de membrana plaquetaria. Por la limitación de espacio, haremos especial énfasis en las alteraciones de receptores adhesivos por ser las mejor conocidas y de mayor relevancia clínica.

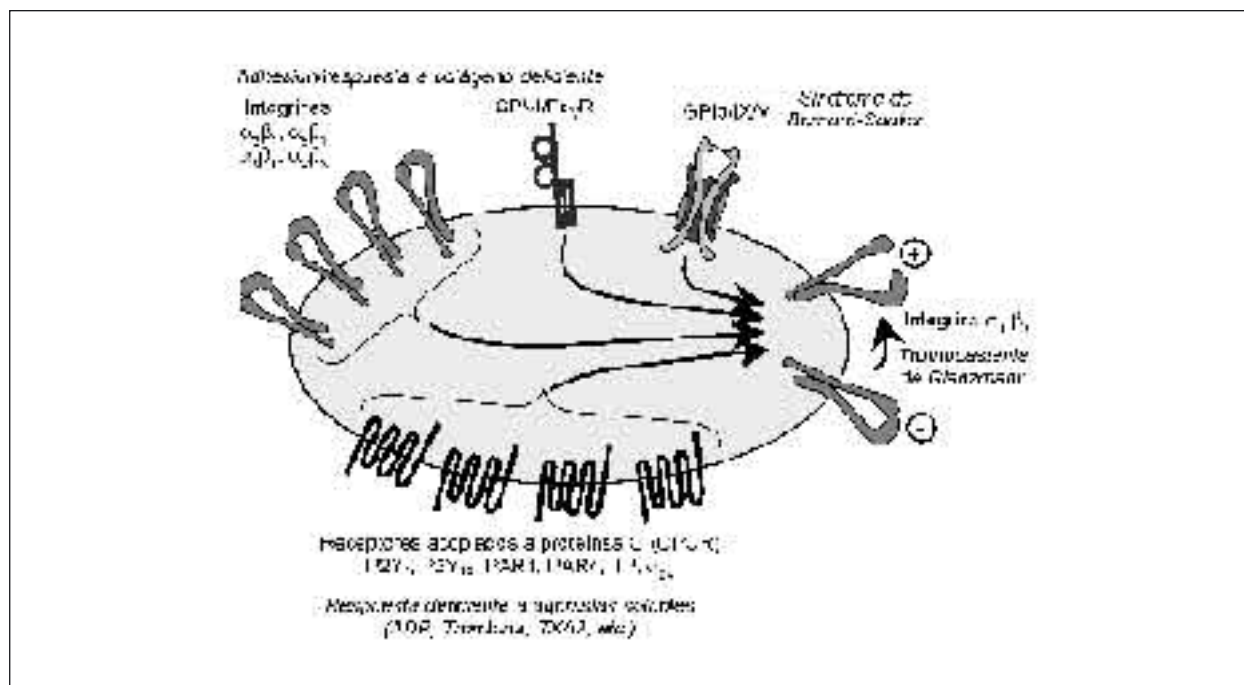


Figura 1. Fisiopatología de los receptores de membrana plaquetaria.

Alteraciones del receptor GPIb/IX/V: síndromes de Bernard-Soulier y enfermedad de Von Willebrand de tipo plaquetario

El receptor GPIb/IX/V es un macrocomplejo formado por las GPs Ib α (143 kDa), Ib β (22 kDa), IX (20 kDa) y V (83 kDa), asociadas en relación estequiométrica 2 α :2 β :2IX:1V. Estas cuatro GP pertenecen a la familia de proteínas con dominios ricos en leucina, y son fruto de la expresión de genes ya identificados en los cromosomas 17p12 (GPIb α), 22q11.2 (GPIb β), 3q29 (GPV) y 3q21 (GPIX). En la membrana plaquetaria existen unas 15.000-25.000 copias del complejo que cumplen funciones críticas para la adecuada participación de las plaquetas en la hemostasia. La primera es la de mediar la adhesión inicial de las plaquetas a las zonas de lesión vascular, actuando como el receptor principal del factor Von Willebrand (FvW) expuesto en el subendotelio. La segunda es la de actuar como receptor de alta afinidad para la trombina, el principal agonista plaquetario, facilitando la activación local de las plaquetas ante dosis bajas de este agonista. En los últimos años, numerosos estudios han mostrado que FvW y trombina no son los únicos ligandos del complejo GPIb/IX/V, sino que este receptor interacciona directamente con otras muchas proteínas del subendotelio, de otras células sanguíneas y de la cascada de la coagulación, incluyendo trombospondina, selectina P, la integrina leucocitaria Mac-1, quinínogeno, FXI y FXII. Asimismo, hay evidencia de la asociación física del complejo con otras proteínas plaquetarias, como GPVI, Fc γ RIIIa o PECAM-1. La relevancia de todas estas interacciones en la hemostasia y la trombosis empieza ahora a desvelarse. Por otra parte, está bien establecido que la adhesión del complejo a sus ligandos, en particular el FvW, no es un proceso inerte, sino que pone en marcha una compleja cascada de transmisión de señales de activación que promueve la secreción y la agregación. Una descripción detallada de las características estructurales y funcionales de este complejo y de la transmisión de señales a su través está fuera del objetivo de esta revisión, pero puede consultarse en otras publicaciones⁴⁻⁶.

Las deficiencias congénitas cuantitativas y/o cualitativas de este complejo dan lugar a dos trastornos hemorrágicos conocidos desde hace tiempo como síndrome de Bernard-Soulier (SBS) y enfermedad de Von Willebrand de tipo plaquetario (EvW-TP).

Síndrome de Bernard-Soulier

El SBS es una diátesis hemorrágica de herencia autosómica recesiva caracterizada por trombocitopenia de intensidad variable (desde 20.000/ μ L hasta cifras normales), plaquetas de gran tamaño y tiempo de hemorragia prolongado⁷⁻⁸. Aunque la causa de la trombo-

citopenia es desconocida, se ha relacionado con una supervivencia plaquetaria disminuida asociada al menor contenido plaquetario de ácido siálico por el déficit de GPIb. No obstante, estudios de supervivencia en plaquetas SBS marcadas con ¹¹¹indio no lograron corroborar esa hipótesis, y sugieren más bien una trombopoyesis ineficaz. El tamaño plaquetario aumentado, que afecta hasta al 80% de plaquetas y puede alcanzar los 20 μ m de diámetro, se identifica fácilmente en un frotis de sangre, y es un reflejo de la relevancia de la interacción del complejo con el citoesqueleto plaquetario. Al microscopio electrónico, las plaquetas suelen mostrar grandes vacuolas citoplasmáticas y áreas anormalmente ricas en complejos de membrana. Estas anomalías morfológicas pueden verse en los megacariocitos SBS, que muestran también hiperploídía. Sin embargo, el examen medular no es obligatorio para el diagnóstico de SBS⁹.

La característica fenotípica principal de las plaquetas SBS es su incapacidad para agregar-aglutinar con ristocetina o botrocetina en presencia de plasma normal. Esta prueba distingue al SBS de la enfermedad de Von Willebrand (EvW), ocasionada por alteraciones en el FvW, y es clave para el diagnóstico. También es típica su menor reactividad frente a bajas dosis de trombina, indicativa del papel del complejo GPIb/IX/V como receptor de trombina. Por el contrario, las plaquetas SBS secretan y agregan normalmente en respuesta a otros agonistas, como ácido araquidónico, ADP, epinefrina o colágeno. Una menor capacidad procoagulante, mostrada por un consumo anormal de protrombina, y la falta de unión al FXI vía GPIb contribuyen al déficit funcional de las plaquetas SBS. La relevancia fisiológica de la pérdida de interacción con otros ligandos potenciales de la GPIb, como selectina P, quinínogeno o Mac-1, está por elucidar⁷⁻⁹. La citometría de flujo es una técnica de uso creciente para confirmar las deficiencias de las proteínas del complejo GPIb/IX/V. Asimismo, los nuevos test de cribado de función plaquetaria, como PFA-100 o Impact, suelen dar un resultado claramente patológico en pacientes con SBS¹⁰.

La transmisión genética del SBS es en general autosómica recesiva, existiendo con frecuencia consanguinidad en las historias familiares de los individuos afectados. La incidencia estimada es de un caso por millón. No obstante, se han descrito casos de transmisión dominante, y puede que este modo de herencia sea más frecuente de lo reconocido¹¹.

La generalización del uso de la tecnología molecular ha facilitado la identificación precisa de las alteraciones moleculares subyacentes en los pacientes afectados de SBS. Se han descrito casi cincuenta mutaciones asociadas a SBS, localizadas en orden de frecuencia en los genes de GPIb α , GPIb β y GPIX (Tabla 1). Hasta la fecha no se han identificado mutaciones en GPV que causen SBS. Se trata de una patología molecular heterogé-

Tabla 1. Alteraciones genéticas subyacentes en el síndrome de Bernard-Soulier

Gen	Defecto genético	Efecto en la proteína
GPIb α	146delA	Cambio en pauta de lectura
	259C>T	L57F
	283T>C	C65R
	317delT	Cambio en pauta de lectura
	476T>C	L129P
	557C>T	A156V
	595_630del	Pérdida aminoácidos 169-180
	625delCTC	Delección L179
	709T>G	W207G
	715T>A	C209S
	805A>G	M239V
	972_975delTGTG	Cambio en pauta de lectura
	994delG	Cambio en pauta de lectura
	1119G>A	W343X
	1418insT	Cambio en pauta de lectura
	1421C>A	S444X
1438_1444delA	Cambio en pauta de lectura	
1564delAT	Cambio en pauta de lectura	
1584G>A	W498X	
GPIb β	-133C>G	Transcripción ineficiente
	14G>A	C5Y
	73_85del	Cambio en pauta de lectura
	146C>T	R17C
	159G>A	W21X
	183C>T	P29L
	288A>C	N64T
	336_337delC	Cambio en pauta de lectura
	360A>G	Y88C
	383C>T	P96S
	419G>C	A108P
443delG	Cambio en pauta de lectura	
462G>C	C122S	
466G>A	W123X	
491C>G	A131G	
GPIX	-14T>C	L-10P (en péptido señal)
	37T>C	C8R
	77A>G	D21G
	148A>G	N45S
	179T>C	F55S
	233G>A	C73Y
	269_277del	D86A + pérdida R87, T88, P89
	305G>A	C97Y
	396G>A	W127X
	433G>A	A140T

nea, que incluye inserciones, deleciones y, con mayor frecuencia, mutaciones puntuales. Estas mutaciones se pueden clasificar en dos grandes grupos: a) mutaciones *missense* o de cambio de sentido, que afectan al tráfico intracelular de las GP del complejo; y b) mutaciones *nonsense* o *stop* que provocan la síntesis de GP carentes del dominio transmembrana, impidiendo su expresión en la membrana. Hace algunos años nosotros caracterizamos funcionalmente un SBS en una familia gitana con un alto grado de consanguinidad, cuya alteración molecular, identificada más tarde por otro grupo, es una mutación Cys5Tyr (14G>A) en el gen de la GPIb β ¹². Asimismo, muy recientemente hemos estudiado una paciente con clínica de sangrado excesivo desde la infancia, diagnosticada y tratada durante años como una púrpura trombocitopénica idiopática (PTI). Sin embargo, el análisis detallado de las características morfológicas y funcionales de sus plaquetas sugería un diagnóstico de SBS. Esto ha sido confirmado en el estudio molecular de los genes del complejo GPIb/IX/V, que ha demostrado la existencia en esta enferma de una mutación Trp71Arg (226T>C) en homocigosis en el gen de GPIX no descrita hasta la fecha (datos no publicados).

Se han descrito también alteraciones moleculares que originan formas variantes de la enfermedad, con expresión parcial de un complejo GPIb/IX/V funcionalmente anormal (SBS cualitativo)¹³. Tal es el caso de la denominada variante Bolzano. En esta variante, una mutación Ala156Val en el último dominio rico en leucina de la GPIb α causa la incapacidad del complejo para interactuar con el FvW, mientras que mantiene otras capacidades funcionales, como la unión a trombina. Otra forma de SBS variante es la causada por la mutación Leu57Phe, que ocasiona plaquetas gigantes que mantienen casi intacta su capacidad de aglutinación con ristocetina, aunque con una GPIb α muy susceptible a proteólisis. La delección de la leucina 179 es responsable de la variante Nancy I, caracterizada por la expresión parcial de una GPIb α incapaz de unir FvW. En la variante Karlstrad, causada por la mutación Trp498Stop, se genera una GPIb α no funcional, truncada en su porción citoplasmática, pero que mantiene parte del dominio transmembrana y los puentes disulfuro que la unen a GPIb β . Existe un registro de libre acceso con información sobre las mutaciones responsables del SBS identificadas hasta la fecha en la web <http://www.bernard-soulier.org>. Como herramienta para entender mejor la relación entre estas alteraciones moleculares y el fenotipo del SBS, así como el papel que desempeñan los diferentes componentes y dominios del complejo GPIb/IX/V, en los últimos años se han desarrollado diferentes modelos animales. Entre los hallazgos más relevantes con estos modelos, se ha mostrado que la carencia de GPV no genera un fenotipo de SBS, lo que puede explicar que no se hayan identificado mutaciones en GPV en pacientes con este síndrome^{13,14}.

La sintomatología característica del SBS incluye episodios de sangrado de localización mucocutánea, que se presentan desde la infancia. No son infrecuentes las equimosis sin trauma, las epistaxis y gingivorragias espontáneas, y tampoco el sangrado gastrointestinal. La intensidad de estos sangrados es variable, pudiendo aumentar o disminuir con la edad, y los casos graves se suelen presentar en asociación a situaciones de riesgo, como intervenciones quirúrgicas, extracciones dentarias o accidentes traumáticos. Normalmente, sólo los pacientes homocigotos para el trastorno molecular subyacente manifiestan tendencia hemorrágica significativa, mientras que los heterocigotos son asintomáticos^{7-9,11}.

La terapéutica de los pacientes SBS se fundamenta en medidas educativas de conducta, a fin de evitar situaciones de riesgo traumático. Así, la higiene dental y la vigilancia odontológica para evitar intervenciones dentales son recomendaciones primarias. Las situaciones de anemia leve-moderada pueden tratarse con aporte farmacológico de hierro. El uso de fármacos antifibrinolíticos, de desmopresina o de FVIIa puede ser útil para controlar sangrados moderados, pero no hay certeza de su eficacia generalizada en todos los pacientes con SBS. El tratamiento de procesos hemorrágicos graves o su prevención ante situaciones de alto riesgo, como cirugías mayores, se realiza con transfusión de concentrados de plaquetas leucodeplecionadas y, si es posible, HLA compatibles para minimizar el riesgo de aloinmunización⁹.

Enfermedad de Von Willebrand de tipo plaquetario

La EvW-TP, o enfermedad de pseudo-Von Willebrand, es otro raro trastorno congénito cualitativo del complejo GPIb/IX/V que, a diferencia del SBS, se caracteriza por una transmisión autosómica dominante y una hiperagregabilidad plaquetaria al antibiótico ristocetina¹⁵. Otras características fenotípicas son trombocitopenia leve con macrocitosis, tiempo de sangrado moderadamente prolongado y pérdida de las formas de alto peso molecular del FvW plasmático en el análisis multimérico. Asimismo, se observa una discordancia muy aparente entre la disminuida actividad funcional del FvW plasmático (muy baja actividad cofactor de ristocetina [FvW:RiCof] y de unión a colágeno [FvW:CB]) y los niveles antigénicos (FvW:Ag, normal o casi normal). Aunque las características clínicas y fenotípicas de la EvW-TP son muy similares a las de la enfermedad de Von Willebrand de tipo 2B (EvW-2B), ambas patologías pueden distinguirse fácilmente con experimentos simples. Así, la adición de plasma de EvW-TP a plaquetas normales no tiene ningún efecto, mientras que el plasma de EvW-2B favorece la agregación, espontánea o inducida con dosis bajas de ristocetina, de

plaquetas o plasma rico en plaquetas normales. Asimismo, la hiperreactividad de las plaquetas de EvW-TP se pone de manifiesto con su agregación espontánea al añadir crioprecipitado, rico en multímeros de FvW de alto peso molecular, mientras que esto no ocurre con las plaquetas de EvW-2B.

La EvW-TP se debe a mutaciones localizadas en el gen que codifica la GPIb α ^{13,14}. En concreto, se han identificado en enfermos los cambios Gly233Val y Met239Val en el dominio funcional N-terminal de la proteína. Estudios de expresión mutante del cambio Met239Val han confirmado que da lugar a una GPIb α que se une espontáneamente al FvW¹⁶. Recientemente, se ha identificado también una delección de 27 pares de bases en la región del macroglicopéptido de GPIb α que también da lugar a EvW-TP¹⁷.

Los pacientes con EvW-TP sufren con frecuencia sangrados mucocutáneos de intensidad leve a moderada y hemorragia excesiva en intervenciones dentales y cirugías. Además, la tendencia al sangrado aumenta de forma importante con la ingesta de antiagregantes. El manejo terapéutico de los pacientes con EvW-TP puede requerir, además de las medidas educativas genéricas, transfusiones de plaquetas para la resolución de eventos hemorrágicos. En algunos enfermos se ha usado con éxito el FVIIa recombinante. Por el contrario, el uso de crioprecipitados y concentrados comerciales de FVIII/FvW y la administración de desmopresina (fármaco que moviliza FvW de alto peso molecular de las células endoteliales) no están recomendados, pues favorecen la aglutinación espontánea de las plaquetas y el empeoramiento de la trombocitopenia¹³.

Alteraciones del receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$: tromboastenia de Glanzmann

Para una hemostasia eficaz, las plaquetas inicialmente adheridas a la zona de la lesión tienen que activarse y unirse a las plaquetas vecinas, formando agregados de creciente tamaño hasta la formación, con la incorporación de una red de fibrina, del trombo estable que sella la fisura. Este proceso de agregación está mediado principalmente por la formación de puentes de fibrinógeno entre complejos $\alpha_{IIb}\beta_3$ de plaquetas vecinas.

El complejo $\alpha_{IIb}\beta_3$ es un heterodímero dependiente de la presencia de calcio formado por las integrinas α_{IIb} (1.008 aminoácidos, 136 kDa) y β_3 (762 aminoácidos, 110 kDa), asociadas de forma no covalente. Ambas subunidades son proteínas transmembrana de tipo I y contienen un corto dominio citosólico. Este receptor es el más abundante en las plaquetas, representando el 3% del total de la proteína plaquetaria y casi el 20% de la masa proteica de la membrana. Existen entre 50.000 y 100.000 copias en la superficie de las plaquetas no activadas y una cantidad similar en el interior plaque-

tario (gránulos alfa y sistema canalicular) que se libera con la activación. Los genes de la integrina α_{IIb} (17 kb, 30 exones) y β_3 (65 kb, 15 exones) están localizados en la región q21-23 del cromosoma 17, y muestran un desequilibrio de unión que explica su expresión coordinada durante la megacariocitopoyesis. El complejo $\alpha_{IIb}\beta_3$ es el principal receptor plaquetario del fibrinógeno, aunque también es capaz de unirse a otras proteínas adhesivas como FvW, fibronectina, vitronectina, o trombospondina 1. Todos estos ligandos contienen una secuencia característica Arg-Gly-Asp (RGD) reconocida por el complejo $\alpha_{IIb}\beta_3$ y otras integrinas. Además, el fibrinógeno contiene en el extremo C-terminal de su cadena γ la secuencia Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val (KQAGDV), que media su unión específica al complejo $\alpha_{IIb}\beta_3$. Las características estructurales y funcionales de este complejo, y en particular los diversos mecanismos que regulan su activación y transmisión bidireccional de señales de activación (*inside-out* y *outside-in*) han sido objeto de intensa investigación¹⁸⁻¹⁹.

Desde hace casi un siglo sabemos que las anomalías congénitas del complejo $\alpha_{IIb}\beta_3$ son responsables del trastorno hemorrágico conocido como tromboastenia de Glanzmann (TG)²⁰⁻²¹. Los pacientes con TG se caracterizan por mostrar un recuento y morfología plaquetaria normal, un tiempo de hemorragia prolongado y un importante defecto de agregación en respuesta a múltiples agonistas plaquetarios (ADP, colágeno, ácido araquidónico y trombina). Por el contrario, la aglutinación con ristocetina es normal, indicando la no afectación del complejo GPIIb/IX/V. Los ensayos de función plaquetaria dan un resultado invariablemente anormal en estos enfermos, y la deficiencia cuantitativa y/o funcional de las proteínas del complejo $\alpha_{IIb}\beta_3$ se suele confirmar fácilmente mediante citometría de flujo¹⁰.

La TG, al igual que el SBS, se transmite de manera autosómica recesiva y su prevalencia también es muy baja (estimada en < 1.000 casos en todo el mundo)⁹. Se han definido tres tipos de TG. El tipo I se caracteriza por la ausencia total (<5%) de $\alpha_{IIb}\beta_3$ en la membrana plaquetaria, la carencia de fibrinógeno acumulado en los gránulos plaquetarios y la falta de retracción del coágulo. Por el contrario, en la TG de tipo II las plaquetas tienen un 10-20% de $\alpha_{IIb}\beta_3$ residual, cierta cantidad de fibrinógeno granular, y ocurre la retracción del coágulo aunque está disminuida. Por último, se han identificado sujetos con un nivel de expresión de $\alpha_{IIb}\beta_3$ normal o casi normal pero con fenotipo de TG. Estos sujetos representan las formas variantes de la TG, en las que la deficiencia de $\alpha_{IIb}\beta_3$ es cualitativa y no cuantitativa.

La patología molecular del complejo $\alpha_{IIb}\beta_3$ que causa TG es muy heterogénea, e incluye pequeñas deleciones, inversiones, defectos de traducción, mutaciones sin sentido y mutaciones puntuales, a lo largo de los genes de ambas integrinas (Figura 2). La mayoría de estas mutaciones están registradas y pueden con-

sultarse en una base de datos accesible en la dirección web <http://sinaicentral.mssm.edu/intranet/research/glanzmann/menu>. Actualmente se han registrado 62 mutaciones en el gen de la integrina α_{IIb} y 41 en el gen de la β_3 . El efecto más frecuente de estas alteraciones genéticas es un anómalo procesamiento postraducciona l o una reducida estabilidad del ARNm, que resulta en una expresión disminuida de las glicoproteínas derivadas (TG de tipos I y II). Tal es el caso de la deleción de 13 bases en el inicio del exón 4 del gen de la integrina α_{IIb} , identificada en un estudio pionero en varias familias árabes, y de la deleción de 11 bases en el exón 13 del gen de la β_3 , el primer defecto identificado en esta integrina, encontrado en seis familias judías de Iraq. El mismo efecto es causado por las numerosas mutaciones sin sentido que originan un codón stop y por algunas mutaciones puntuales en ambos genes. Estudios de mutagénesis dirigida y expresión de glicoproteínas recombinantes en líneas celulares han mostrado que el cambio de un solo aminoácido puede bloquear el tránsito del complejo desde el retículo al Golgi y/o su transporte a la membrana plaquetaria. Este tipo de experimentos también ha puesto de manifiesto cómo el efecto de una mutación puntual depende tanto de la posición del cambio como del tipo de aminoácido sustituido. Aunque la consanguinidad es frecuente en las familias con TG, en su ausencia se han descrito con cierta frecuencia mutaciones en doble heterocigosis en el gen de α_{IIb} que causan TG^{13,20,21}.

Como se citó anteriormente, algunas alteraciones en estos genes no provocan fallos de expresión cuantitativa del complejo $\alpha_{IIb}\beta_3$, sino que dan lugar a formas variantes de TG cuyas plaquetas expresan un receptor no funcional. Estos casos variantes integran un grupo heterogéneo de pacientes, con fenotipo de sangrado muy variable. Su estudio es de gran valor para conocer cómo funciona ésta y otras integrinas. El primero de este tipo de defectos de función en ser descrito fue el cambio 433G>T en el exón 4 de la integrina β_3 . Esta mutación provoca la sustitución Asp119Tyr dentro la secuencia RGD de la proteína, dando lugar a un defecto en la interacción con el fibrinógeno. Así, la identificación de esta mutación fue clave para comprender la relevancia de la secuencia RGD en la función de este receptor. Similarmente, el estudio de tres pacientes no relacionados con forma variante de TG demostró que la mutación de la Arg214 en el gen de la β_3 altera los dominios de unión a cationes divalentes, y subsiguientemente la conformación de la proteína. La caracterización de pacientes con mutaciones en los dominios citoplasmáticos de α_{IIb} y β_3 (Ser752Pro y Arg724Stop en β_3 ; Arg995Gln en α_{IIb}) ha revelado la importancia de estos dominios en la señalización de las integrinas y en el cambio conformacional requerido para la unión a sus ligandos. Finalmente, se ha mostrado que la mutación Cys560Arg en el dominio similar al factor de crecimiento epidérmico de β_3 ge-

nera un receptor activo constitutivamente, a semejanza de las mutaciones que dan lugar a EvW-TP²².

Pese a la rareza de esta patología, en nuestra clínica hemos tenido la oportunidad de diagnosticar dos pacientes con TG. El primero²³ es un varón que diagnosticamos a la edad de siete años en base a su clínica hemorrágica desde el nacimiento y a la caracterización funcional de sus plaquetas. En este paciente se demostró la presencia en homocigosis de una mutación Arg597Stop en el exón 19 de α_{IIb} responsable del fenoti-

po de TG de tipo I. Estudios de transfección en modelos celulares demostraron que esta mutación causa inestabilidad del complejo y/o su rápida degradación²³. El segundo caso, muy reciente y no descrito aún, es una mujer con clínica hemorrágica relevante desde la infancia, diagnosticada y tratada como PTI. Sin embargo, el estudio funcional, bioquímico y citométrico de sus plaquetas nos ha sugerido el diagnóstico de TG. El análisis molecular ha mostrado que esta paciente es portadora de una mutación Leu718Pro en la cola citosólica de la inte-

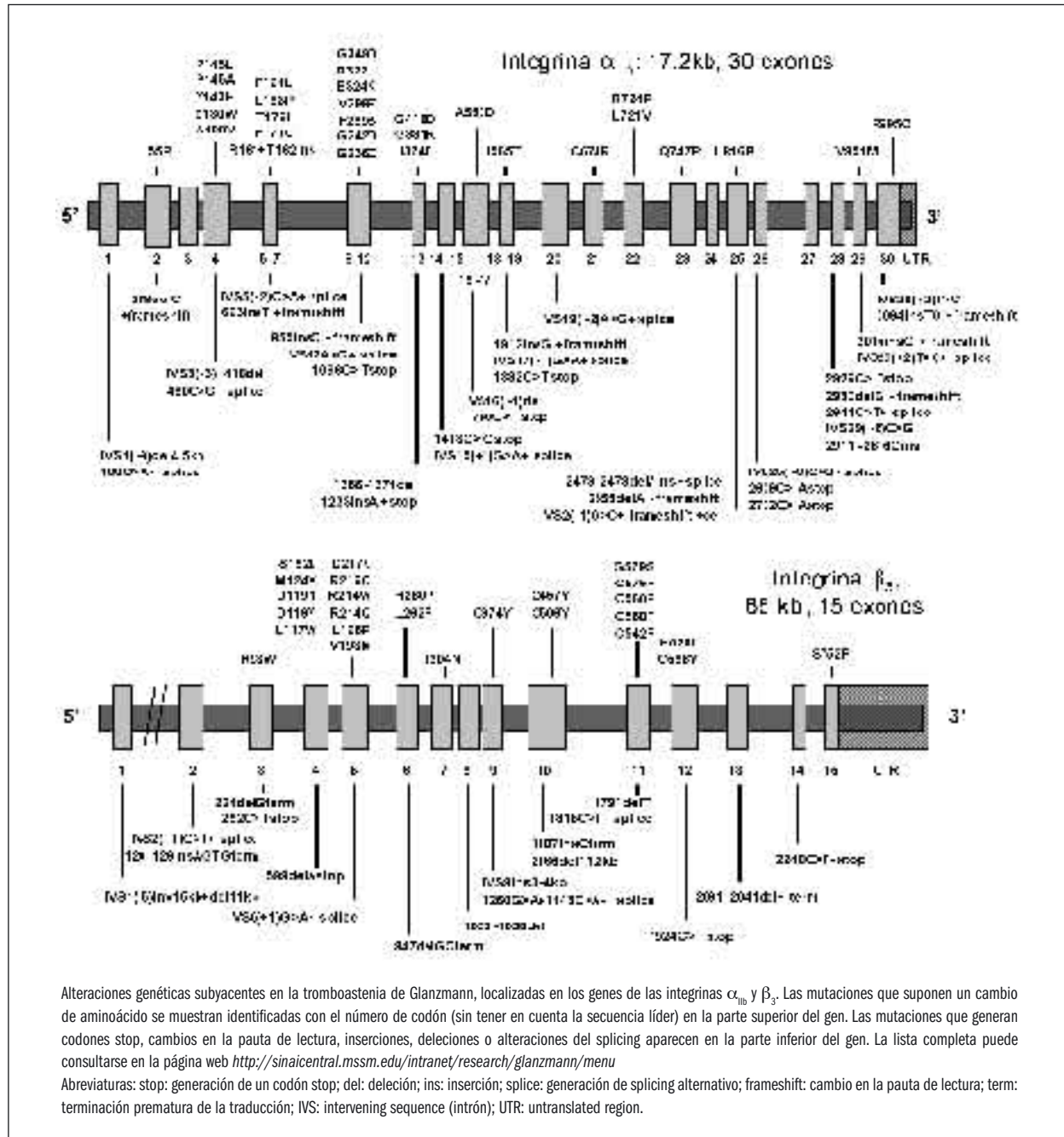


Figura 2. Alteraciones genéticas subyacentes en la tromboastenia de Glanzmann.

grina β_3 . El efecto de esta mutación sobre la expresión del complejo, su estabilidad y/o su funcionalidad está siendo investigado (datos no publicados).

Como en el caso del SBS, en los últimos años se han desarrollado modelos de ratón con TG, con déficit completo de α_{IIb} o β_3 ^{13,14}, que reproducen aspectos típicos del fenotipo de la TG en humanos, como la púrpura y el sangrado gastrointestinal y una agregación y retracción del coágulo deficiente. Estos animales son de gran interés no sólo para conocer mejor la TG y el funcionamiento de las integrinas, sino también como modelos de experimentación de tratamiento y terapias génicas potenciales.

En general, la TG se manifiesta con relevancia clínica tan sólo en los sujetos homocigotos o heterocigotos compuestos. Las manifestaciones clínicas incluyen sangrado cutáneo-mucoso desde el periodo neonatal, frecuentes epistaxis y gingivorragias, petequias, púrpura, menorragias, hematuria, sangrado gastrointestinal y hemorragias postraumáticas. La hemartrosis y los hematomas en vísceras son poco frecuentes. La intensidad de las hemorragias varía considerablemente de unos pacientes a otros, y puede cambiar con la edad. El embarazo y el parto representan un alto riesgo en estos pacientes.

La terapéutica de los enfermos con TG, también a semejanza del SBS, debe incluir en primer lugar medidas educativas de comportamiento genérico (higiene bucal, revisión médica rutinaria, etc.). El uso de ϵ -aminocaproico y DDAVP para la profilaxis del sangrado en las extracciones dentarias puede ser útil, pero su eficacia generalizada no está demostrada. El sangrado activo con compromiso vital se trata con transfusiones de concentrados de plaquetas, si es posible HLA compatibles, y optimizando su uso para minimizar la probabilidad de desarrollo de anticuerpos anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$. Asimismo, datos obtenidos en un número reducido de estos enfermos sugieren que el FVIIa recombinante puede ser una alternativa a las transfusiones de plaquetas, y en Europa ya ha sido autorizado su uso profiláctico y terapéutico en pacientes con TG con anticuerpos antiplaquetarios, contra HLA o $\alpha_{IIb}\beta_3$, y refractarios a las transfusiones de plaquetas⁹. Finalmente, el trasplante de progenitores hematopoyéticos se ha empleado ocasionalmente como opción curativa en pacientes con TG^{9,13}.

Alteraciones de los receptores plaquetarios del colágeno

Colágenos de distintos tipos, particularmente I, III y VI, son componentes principales del subendotelio vascular de alto potencial trombogénico, ya que por un lado soportan la adhesión de las plaquetas a esta estructura y por otro son potentes agonistas plaquetarios que contribuyen y potencian la activación y agrega-

ción de las plaquetas y la formación del trombo. Actualmente sabemos que la interacción de las plaquetas con el colágeno se sustenta principalmente en su unión directa a dos receptores de membrana, la integrina $\alpha_2\beta_1$ y la GPVI. Existe también una interacción indirecta mediada por la unión del colágeno al dominio A3 del FvW, y de éste a la GPIb/IX/V. El papel relativo de cada uno de estos mecanismos es dependiente del flujo; así, la unión vía FvW-GPIb es esencial a alta velocidad de flujo, mientras que la integrina $\alpha_2\beta_1$ es crítica a flujo intermedio y bajo. Por su parte, la GPVI es considerada el receptor fundamental en la transmisión de las señales de activación del colágeno que aumentan la afinidad de $\alpha_2\beta_1$ y activan las plaquetas²⁴.

El complejo $\alpha_2\beta_1$ es un heterodímero formado por asociación no covalente de las integrinas adhesivas α_2 y β_1 que se corresponde con el heterodímero VLA-2 de los linfocitos. Existen entre 2.000 y 4.000 copias por plaqueta, estando este número regulado por polimorfismos silentes, como el cambio 807C>T en la región promotora del gen de α_2 . En los últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento de la interacción molecular de esta integrina con el colágeno, desvelándose la importancia de pequeñas secuencias, como GFOGER, presentes en la cadenas α de los distintos colágenos fibrilares²⁴.

La GPVI es una proteína de 62 kDa perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas. El gen de la GPVI, localizado en la región cromosómica 19q13.4, contiene 8 exones y diferentes polimorfismos, en particular el cambio 13254T>C, que modifican el nivel de expresión proteica hasta en un orden de magnitud. El receptor GPVI contiene dos dominios Ig, un dominio rico en mucina y un dominio citosólico de 51 aminoácidos. Está físicamente asociada en la membrana plaquetaria a un homodímero del receptor Fc γ (Fc γ R), siendo esta asociación crítica en el mecanismo de transmisión de señales. La región citosólica de GPVI contiene secuencias de unión a calmodulina y a los dominios SH3 de las cinasas de la familia Src. Por su parte, las cadenas asociadas de Fc γ R contienen dominios ITAM que se fosforilan por la cinasas Src unidas a GPVI, y esa fosforilación promueve la activación de la cinasa Syk y otras, disparando la cascada de señalización intracelular²⁵.

Los modelos animales deficientes en $\alpha_2\beta_1$, GPVI o Fc γ R muestran una deficiente adhesión plaquetaria a colágeno y ausencia de complicaciones hemorrágicas importantes. Se ha sugerido que la deficiencia funcional de la interacción con colágeno en esos modelos podría estar compensada por la acción de la trombina generada. En cualquier caso, la falta de sangrado intenso en ratones deficientes en $\alpha_2\beta_1$ o GPVI concuerda en parte con la moderada tendencia hemorrágica en los pacientes con deficiencias de estos receptores.

Hasta la fecha se han descrito muy pocos pacientes con anomalías específicas de adhesión y activación

por colágeno y deficiencias de los receptores $\alpha_2\beta_1$ o GPVI^{26,27}. Además, en algunos de estos pacientes no se ha identificado la alteración molecular subyacente, y no está claro si la deficiencia es congénita o secundaria a trastornos adquiridos como síndrome mieloproliferativo o trombocitopenia inmune y anticuerpos contra $\alpha_2\beta_1$ o GPVI. Así, antes de establecer el diagnóstico de déficit congénito de receptores de colágeno en un paciente con aparente hiporreactividad selectiva a este ligando, es preciso considerar el efecto que los polimorfismos en $\alpha_2\beta_1$ y GPVI tienen en la expresión de estos receptores. Además, es necesario investigar la presencia de condiciones adquiridas, en particular la presencia de autoanticuerpos cuya unión a GPVI favorece la proteólisis de este receptor por metaloproteasas^{26,27}.

Además de $\alpha_2\beta_1$ y GPVI, se ha sugerido²⁴ que otras proteínas plaquetarias podrían actuar como receptores de colágeno, como p65 para colágeno I o CD36 (GPV o GPIIb; 88 kDa). No hay consenso acerca de si estos potenciales receptores de colágeno desempeñan un papel accesorio o relevante, pero los estudios *in vitro* de Díaz-Ricart *et al.*²⁸ mostraron que CD36 media la adhesión de las plaquetas a superficies recubiertas de colágeno y que esta interacción desencadena la transmisión de señales de activación con la participación de proteínas especializadas de la familia de las src-fosforilasas (pp^{60^{lyn}}, pp^{62^{yes}}, pp^{54/58^{lyn}}). Además, se ha observado que los individuos con expresión deficiente de CD36 (aproximadamente el 5% de la población japonesa y africana y un 0,3% de los caucásicos) muestran *in vitro* una menor adhesión de las plaquetas a superficies de colágeno fibrilar. No obstante, estos sujetos no suelen manifestar episodios de sangrado.

Como ya hemos mencionado, la incidencia de trastornos de receptores de colágeno es muy baja (menos de diez casos descritos), y no está claro su origen congénito o adquirido. En general, los pacientes afectados muestran escasas y moderadas manifestaciones hemorrágicas, con la típica localización mucocutánea de las alteraciones de la hemostasia primaria. El manejo clínico de estos enfermos se aborda como el de otros trastornos plaquetarios moderados, y en caso necesario el tratamiento profiláctico con antifibrinolíticos o desmopresina suele ser suficiente⁹.

Alteraciones en receptores de agonistas plaquetarios

En la respuesta hemostática, la superficie trombogénica del subendotelio promueve la adhesión inicial de las plaquetas circulantes sobre ella, pero la propagación de la activación plaquetaria necesaria para el crecimiento y fijación del trombo depende en gran medida de la unión de los agonistas plaquetarios acumulados localmente a sus receptores específicos en la

membrana plaquetaria. El ADP, el TxA₂, la epinefrina y la trombina son particularmente importantes en el proceso de activación de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, que permite su unión al fibrinógeno. Muy posiblemente todos estos agonistas, que pueden alcanzar una concentración alta en la vecindad de las plaquetas adheridas a la zona vascular lesionada, actúan sinérgicamente.

Las plaquetas disponen en su membrana de dos tipos de receptores purinérgicos (receptores P2) para el ADP: a) los metabotrópicos P2Y₁ y P2Y₁₂, pertenecientes a la familia de receptores con siete dominios transmembrana ligados funcionalmente a proteínas G (GPCR); y b) los ionotrópicos P2X (en concreto P2X₁), ligados a canales iónicos^{29,30}.

Las plaquetas expresan en su membrana unas 150 copias del receptor P2Y₁, una cantidad muy baja comparada con las GP adhesivas u otros receptores como los de trombina y TxA₂. El gen que codifica el receptor P2Y₁ se localiza en la región 3q21-q25. Está bien establecido que P2Y₁, acoplado a la proteína G_q, media la movilización de calcio intracelular y la activación de múltiples cinasas de señalización, como Rac. Adicionalmente, hay alguna evidencia del acoplamiento de P2Y₁ con G_{12/13}, proteínas G claves en el proceso de cambio de forma plaquetario. El receptor P2Y₁ es crucial para el cambio de forma y la agregación inicial reversible inducida por ADP. Asimismo, juega un papel relevante en la respuesta plaquetaria al colágeno cuando la generación de TxA₂ está inhibida y en la activación inducida por quimiocinas como Rantes. Estudios *in vivo* con ratones deficientes en P2Y₁ y ratones tratados con inhibidores P2Y₁, a los que se les provocó un tromboembolismo sistémico por infusión de agonistas o lesiones vasculares con láser o FeCl₃, han demostrado la relevancia de P2Y₁ en la formación del trombo *in vivo*.

El receptor P2Y₁₂ fue identificado en 2001, y en estos pocos años se ha convertido en diana clave del tratamiento antiagregante, en particular en pacientes sometidos a perfusión coronaria y colocación de *stents*³⁰. Su gen responsable se localiza también en 3q21-q25 y codifica una proteína de 342 aminoácidos, con la estructura típica de los receptores GPCR. Las plaquetas expresan en su membrana unas 600 copias de P2Y₁₂. A diferencia de P2Y₁, el receptor P2Y₁₂ está acoplado a G₁₂, que causa la inhibición de la adenilato ciclasa y la subsiguiente limitación de la generación de AMP_c, un potente controlador de la activación plaquetaria. Otros aspectos de la señalización vía P2Y₁₂-G₁₂ son defosforilación de la proteína VASP y la activación de PI3K y sus proteínas dianas aguas abajo: la cinasa PKB/Akt y la GTPasa Rap1. Asimismo, P2Y₁₂, directa o indirectamente, amplifica la movilización de calcio mediada por P2Y₁ y por otros receptores plaquetarios. P2Y₁₂ es responsable de completar la agregación por ADP que inicia el receptor P2Y₁. Asimismo, participa en la se-

creción granular y desempeña un papel central como amplificador de la agregación inducida por otros muchos agonistas, incluyendo colágeno, trombina, TxA₂, complejos inmunes, serotonina o adrenalina, pese a que éstos usen mecanismos de señalización diferentes. Probablemente, este efecto potenciador de P2Y₁₂ está mediado por su activación de PI3K. Así, P2Y₁₂ parece ser un elemento crucial en el sostenimiento de la agregación plaquetaria y en el crecimiento y estabilización del trombo, de acuerdo con los estudios *in vivo* con ratones tratados con antagonistas de P2Y₁₂ y con ratones deficientes en este receptor. Por otra parte, no hay actualmente duda alguna de la eficacia antitrombótica de los inhibidores de P2Y₁₂, si bien hay considerable heterogeneidad en la respuesta de los pacientes tratados en función del fármaco utilizado²⁹⁻³⁰.

El tercer tipo de receptor P2 plaquetario es P2X₁, un canal iónico ligado a agonistas responsable de la entrada de calcio mediada por ATP. Su gen codificante se localiza en el cromosoma 17p13.2 y contiene 12 exones. P2X₁ no induce agregación plaquetaria por sí sólo, pero causa cambio de forma transitorio y potencia la acción de agonistas como colágeno, epinefrina o tromboxano. Se ha descrito también que P2X₁ sinergiza con P2Y₁ y P2Y₁₂ en la movilización de calcio. Su papel fisiológico más relevante se da en el contexto de la agregación y formación del trombo bajo condiciones de alta velocidad de flujo. Por eso es una atractiva diana de nuevos fármacos antiagregantes, cuya acción se restringiría potencialmente a la estenosis grave, donde la velocidad de flujo es muy alta, sin afectar a la hemostasia normal.

Hasta la fecha no se han descrito pacientes con deficiencias congénitas de P2Y₁ o P2X₁ bien establecidas. Ouri *et al.*³¹ comunicaron preliminarmente el caso de un paciente con un déficit del 75% en los niveles de ARNm de P2Y₁, extensivo a otros miembros de su familia, y una movilización de calcio disminuida en respuesta a ADP. Sin embargo, este caso no se ha descrito en una publicación formal. El mismo grupo describió un paciente con diátesis hemorrágica grave asociada a una forma mutante de P2X₁. Sin embargo, el paciente mostraba un grave defecto de agregación con ADP inexplicable por un único defecto en el receptor P2X₁³². Estos datos indican que las deficiencias congénitas de P2Y₁ o P2X₁ o bien son extremadamente raras o no incrementan la tendencia al sangrado, pasando así inadvertidas.

Se han descrito siete pacientes no relacionados con diátesis hemorrágica asociada a defectos en los receptores P2Y₁₂^{14,26}. Las características de estos pacientes incluyen una agregación muy disminuida con ADP incluso a dosis altas (10 µM), ausencia de inhibición con ADP de la estimulación de la adenilato ciclasa mediada por PGE₁, cambio de forma y movilización de calcio normal en respuesta a ADP, y cuantificación de un

número reducido de sitios de unión en ensayos con ligandos marcados (³²P-2MeS-ADP o ³H-ADP). En tres pacientes el defecto molecular común es una deleción de dos pares de bases en la posición 294, que inserta un codón stop en la secuencia de P2Y₁₂ y causa la terminación prematura de la traducción. En otro caso, se encontró en homocigosis una mutación puntual en el codón de iniciación de la lectura (ATG>AGG). Un paciente francés mostró en heterocigosis una deleción de dos bases en la posición 240, que también origina un codón stop. A diferencia de estos casos, se han descrito dos pacientes con alteraciones moleculares que causan una deficiencia funcional de P2Y₁₂ y no su déficit cuantitativo. Uno presentaba en doble heterocigosis las mutaciones Arg256Gln y Arg265Trp en el tercer dominio extracelular del receptor. Estas mutaciones no afectan a la expresión del receptor, como demostraron los ensayos de unión con ³²P-2MeS-ADP, pero sí a su función, ya que en las plaquetas del paciente el ADP no inhibía la generación de AMP_c estimulada con PGE₁. Además, el ADP no inhibe la formación de AMP_c inducida con forskolina en células transfectadas con estas mutaciones, pero sí en células no transfectadas. El otro paciente con una forma variante de P2Y₁₂ presentaba en heterocigosis una mutación Pro258Thr en el exón 3, revelando la importancia de esta región del receptor en el proceso de señalización^{14,29}.

Las plaquetas estimuladas liberan, por la acción de la fosfolipasa A₂ sobre los fosfolípidos de la membrana, ácido araquidónico que la ciclooxigenasa 1 (COX-1) y la tromboxano sintetasa convierten en TxA₂, potente agente vasoconstrictor y agonista plaquetario. Una vez formado, el TxA₂ difunde a través de la membrana y activa autocrina y paracrinamente a las plaquetas mediante la interacción específica con sus receptores de membrana. Los receptores de TxA₂ (TP) pertenecen a la superfamilia GPCR. Existen dos isoformas originadas por procesamiento alternativo de un único gen: TPα y TPβ, que difieren únicamente en su extremo C-terminal intracitoplasmático³³. Las plaquetas expresan mayoritariamente TPα con una densidad de 1.000-2.000 copias por plaqueta. El TP plaquetario está acoplado a diversas proteínas G (G_q, G_{12/13} y quizás G₁₂) que median la activación de varias vías de señalización³⁴, causando cambio de forma, agregación y secreción. La activación vía TP-G_q se vincula a la activación de fosfolipasa C_β y a la generación de diacilglicerol (activador de la proteincinasa C) y de inositol trifosfato (que moviliza el calcio intracelular). Estas señales facilitan la agregación. La señalización vía G_{12/13} regula la activación de la cinasa rho y la fosforilación de la cadena ligera de la miosina, proceso implicado en el cambio de la morfología plaquetaria inducida por agonistas. Además, estas vías de señalización son comunes para otros agonistas (ADP, trombina), sustentando así el efecto amplificador del TxA₂. La pérdida

de la señalización vía TxA_2 causa disfunción plaquetaria moderada. Prueba de ello es el fenotipo de sangrado moderado y agregación disminuida, con TxA_2 y otros agonistas, de los ratones deficientes en TP. Pero sin duda la evidencia más clara del relevante papel del eje TxA_2 -TP en la hemostasia es la demostrada eficacia antitrombótica del ácido acetilsalicílico³⁵, fármaco inhibidor de la COX-1 que bloquea la generación de TxA_2 por las plaquetas.

Se han descrito algunos pacientes japoneses con diátesis hemorrágica desde la infancia asociada a una deficiente respuesta plaquetaria al TxA_2 , que se evidencia en agregación disminuida e infraactivación de la fosfolipasa C_β con análogos de TxA_2 . En estos pacientes se demostró la presencia en homocigosis o heterocigosis de una mutación Arg60Leu en el gen del TP¹⁴. La sintomatología hemorrágica de estos enfermos era moderada, y se demostró que la desmopresina normalizaba su tiempo de hemorragia.

La epinefrina es otro agonista plaquetario débil por sí solo y que, sin embargo, potencia sinérgicamente la acción de otros agonistas. Su acción está mediada por el receptor GPCR específico α_{2A} . Su señalización está acoplada a la proteína G_z , causando inhibición de la adenilato ciclasa y de la formación de AMP_c , de manera similar al eje $P2Y_{12}$ - G_{i2} .

Una ausencia selectiva de agregación plaquetaria en respuesta a epinefrina, asociada a una reducida expresión de receptores α_{2A} se describió hace años en tres pacientes, pero no se ha caracterizado la posible alteración molecular^{36,37}.

La trombina, el principal y más potente agonista plaquetario, causa activación y agregación a través de su interacción con el complejo GPIb/IX/V y con dos receptores GPCR denominados PAR-1 y PAR-4. Hasta la fecha no se han descrito en humanos patologías congénitas de estos receptores, quizás porque su ausencia es incompatible con el desarrollo fetal.

Como mencionamos al principio de este resumen, las plaquetas expresan en su superficie otros muchos receptores. La posible carencia congénita de estos otros receptores y el subsiguiente efecto funcional está por aclarar.

En general, las alteraciones de receptores de agonistas solubles representan trastornos plaquetarios leves, y como tales se recomienda su manejo y tratamiento⁹.

Conclusiones

Los defectos genéticos de los receptores de membrana plaquetaria pueden dar lugar a síndromes hemorrágicos de distinta gravedad. El síndrome de Bernard-Soulier (deficiencia congénita del principal receptor de FvW, el complejo GPIb/IX/V) y la tromboastenia de Glanzmann (defecto del complejo $\alpha_{IIb}\beta_3$, receptor cru-

cial del fibrinógeno) son los trastornos de receptores plaquetarios de mayor relevancia clínica. Por el contrario, los trastornos de receptores de colágeno y agonistas solubles (ADP, TxA_2 , epinefrina) son cuadros que cursan con sangrados moderados. En muchos casos, la caracterización de las alteraciones moleculares en estos receptores ha sido y es de enorme valor para mejorar nuestro conocimiento sobre la fisiopatología de estas proteínas y de la fisiología plaquetaria global.

Agradecimientos

Grupo de investigación financiado por el Ministerio de Educación, Ciencia y Tecnología & FEDER (SAF 2004-07535, SAF 2006-06212), Fundación Séneca (04515/GERM/06, 03116/PI/05) y Red RECAVA (RD06/0014/0004). Leyre Navarro-Núñez es becaria del Ministerio de Educación y Ciencia (BES-2005-7496). Constantino Martínez es un investigador contratado por la Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia.

Bibliografía

- George JN. Platelets. Lancet 2000; 355: 1531-9.
- Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. Nat Med 2002; 8: 1227-34.
- Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet receptors. En: Michelson AD, editor. Platelets. 2nd ed. San Diego, CA: Elsevier; 2007. p. 117-43.
- López JA. The platelet glycoprotein Ib/IX/V complex. Blood Coag Fibrinol 1994; 5: 97-119.
- Rivera J, Lozano ML, Corral J, González Conejero R, Martínez C, Vicente V. The platelet GP Ib/IX/V complex: Physiological role. J Physiol Biochem 2000; 56: 355-65.
- Du X. Signalling and regulation of the glycoprotein Ib/IX/V complex. Curr Opin Hematol 2007; 14: 262-9.
- López JA, Andrews RK, Afshar-Kharghan V, Berndt MC. Bernard-Soulier Syndrome. Blood 1998; 91: 4397-418.
- Pham A, Wang J. Bernard-Soulier Syndrome. An inherited platelet disorder. Arch Pathol Lab Med 2007; 131: 1834-6.
- Bolton-Maggs PH, Chalmers EA, Collins PW, Harrison P, Kitchen S, Liesner RJ, et al. A review of inherited platelet disorders with guidelines for their management on behalf of the UKHCDO. Br J Haematol 2006; 135: 603-33.
- Rivera J, Navarro-Núñez L, Lozano ML, Martínez C, Corral J, González Conejero R, et al. Valor diagnóstico de las pruebas de función plaquetaria. Haematologica 2007; 92(extra):48-62.
- Savoia A, Balduini CL, Savino M, Noris P, Del Vecchio M, Perrotta S, et al. Autosomal dominant macrothrombocytopenia in Italy is most frequently a type of heterozygous Bernard-Soulier syndrome. Blood 2001; 97: 1330-5.
- González-Manchón C, Butta N, Iruín G, Alonso S, Ayuso MS, Parrilla R. Disruption of the Cys5-Cys7 disulfide bridge in the platelet glycoprotein Ibbeta prevents the normal maturation and surface exposure of GPIb-IX complexes. Thromb Haemost 2003; 90: 456-64.
- Nurden AT, Nurden P. Inherited disorders of platelet function. En: Michelson AD, ed. Platelets. 2nd ed. San Diego, CA: Elsevier; 2007. p. 1029-50.
- Salles II, Feys HB, Iserbyt BF, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Deckmy H. Inherited traits affecting platelet function. Blood Rev 2008; 22: 155-72.

15. Miller JL, Castella A. Platelet-type von Willebrand's disease: characterization of a new bleeding disorder. *Blood* 1982; 60: 790-4.
16. Moriki T, Murata M, Kitaguchi T, Anbo H, Handa M, Watanabe K, et al. Expression and functional characterization of an abnormal platelet membrane glycoprotein Ib alpha (Met239→Val) reported in patients with platelet-type von Willebrand disease. *Blood* 1997; 90: 698-705.
17. Othman M, Notley C, Lavender FL, White H, Byrne CD, Lillcrap D, et al. Identification and functional characterization of a novel 27-bp deletion in the macroglycopeptide-coding region of the GPIBA gene resulting in platelet-type von Willebrand disease. *Blood* 2005; 105: 4330-6.
18. Bennett JS. Structure and function of the platelet integrin alphaIIb beta3. *J Clin Invest* 2005; 115: 3363-9.
19. Ma YQ, Qin J, Plow EF. Platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$: activation mechanisms. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 1345-52.
20. Belluci S, Caen J. Molecular basis of Glanzmann's thrombasthenia and current strategies in treatment. *Blood Rev* 2002; 16: 193-202.
21. Nurden AT. Glanzmann thrombasthenia. *Orphanet J Rare Dis* 2006; 1: 10.
22. Ruiz C, Liu CY, Sun QH, Sigaud-Fiks M, Fressinaud E, Muller JY, et al. A point mutation in the cysteine-rich domain of glycoprotein (GP) IIIa results in the expression of a GPIIb-IIIa (alphaIIb beta3) integrin receptor locked in a high-affinity state and a Glanzmann thrombasthenia-like phenotype. *Blood* 2001; 98: 2432-41.
23. Arias-Salgado EG, Tao J, González-Manchón C, Butta N, Vicente V, Ayuso MS, et al. Nonsense mutation in exon-19 of GPIIb associated with thrombasthenic phenotype. Failure of GPIIb (delta597-1008) to form stable complexes with GPIIIa. *Thromb Haemost* 2002; 87: 684-91.
24. Farndale RW, Slatter DA, Siljander PR, Jarvis GE. Platelet receptor recognition and cross-talk in collagen induced activation of platelets. *J Thromb Haemost* 2007; 5 (Suppl 1): P220-9.
25. Watson SP, Auger JM, McCarty OJ, Pearce AC. GVI and integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ signaling in platelets. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1752-62.
26. Nurden AT, Nurden P. Inherited disorders of platelets: An update. *Curr Opin Hematol* 2006; 13: 157-62.
27. Nurden P, Nurden AT. Congenital disorders associated with platelet dysfunctions. *Thromb Haemost* 2008; 99: 253-63.
28. Díaz-Ricart M, Tandon NN, Gómez-Ortiz G, Carretero M, Escolar G, Ordinas A, et al. Antibodies to CD36 (GPIV) inhibit platelet adhesion to subendothelial surfaces under flow conditions. *Arterioscler Thromb Vas Biol* 1996; 16: 883-8.
29. Cattaneo M. The platelet P2 receptors and congenital platelet function defects. *Semin Thromb Hemost* 2005; 31: 168-73.
30. Gachet C. P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. *Thromb Haemost* 2008; 99: 466-72.
31. Oury C, Lenaerts T, Peerlinck K, Vermylen J, Hoylaerts MF. Congenital deficiency of the phospholipase C coupled platelet P2Y1 receptor leads to a mild bleeding disorder [abstract]. *Thromb Haemost* 1999; 85 (suppl): 20.
32. Oury C, Toth-Zsamboki E, Van Geet C, Thys C, Wei L, Nilius B. A natural dominant negative P2X1 receptor due to deletion of a single amino acid residue. *J Biol Chem* 2000; 275: 22611-4.
33. Miggin SM, Kinsella BT. Expression and tissue distribution of the mRNAs encoding the human thromboxane A2 receptor (TP) alpha and beta isoforms. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1425: 543-59.
34. Huang JS, Ramamurthy SK, Lin X, Le Breton GC. Cell signaling through thromboxane A2 receptors. *Cell Signal*. 2004; 16: 521-33.
35. Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* 2002; 324: 71-86.
36. Tamponi G, Pannocchia A, Arduino C, Bazzan M, Della Dora N, Schinco P, et al. Congenital deficiency of alpha-2-adrenoceptors on human platelets: description of two cases. *Thromb Haemost* 1987; 58: 1012-6.
37. Rao AK, Willis J, Kowalska MA, Wachtfogel YT, Colman RW. Differential requirements for platelet aggregation and inhibition of adenylate cyclase by epinephrine. Studies of a familial platelet alpha 2-adrenergic receptor defect. *Blood* 1988; 71: 494-501.

PATOLOGÍA INTRAPLAQUETARIA DE BASE GENÉTICA

N. PUJOL-MOIX

*Unidad de Patología Plaquetaria.
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.
Departamento de Medicina.
Universitat Autònoma. Barcelona*

La ocupación de un receptor plaquetario por un ligando específico inicia una serie de reacciones en cadena, de activación o transducción de la señal, que tienen como consecuencia final la adhesión, agregación y secreción de las plaquetas, funciones imprescindibles para la hemostasia. La activación de las plaquetas tiene asimismo un papel fundamental en la coagulación –por exposición de una superficie procoagulante–, en la reparación del tejido lesionado –por la secreción de factores de crecimiento– y en la inflamación –por la exteriorización de moléculas de adhesión y sustancias mediadoras–. Para conseguir estos efectos, durante la activación tienen que haber ocurrido una serie de fenómenos, que incluyen: reorganización del citoesqueleto con cambio de forma y contracción interna de la plaqueta, activación del principal receptor del fibrinógeno para la agregación, la integrina $\alpha_2\beta_3$, y exposición de los fosfolípidos aniónicos de la membrana a la capa exterior de la misma. Por otra parte, la secreción al medio de algunas sustancias de los gránulos, como ADP, y de algunos productos de la activación, como tromboxano A_2 (TxA_2), por su capacidad activadora de nuevas plaquetas, actúa como un sistema de amplificación de la respuesta plaquetaria.

La existencia anomalías genéticas en proteínas estructurales de los gránulos intraplaquetarios o del citoesqueleto o en moléculas reguladoras de la activación da lugar a trombocitopatías genéticas de diversos tipos, con grados variables de diátesis hemorrágica¹⁻³.

Anomalías de los gránulos plaquetarios y de la secreción

Las plaquetas normales contienen estructuras corpusculares inespecíficas, como lisosomas y mitocondrias, y dos tipos de gránulos específicos, α y densos, de for-

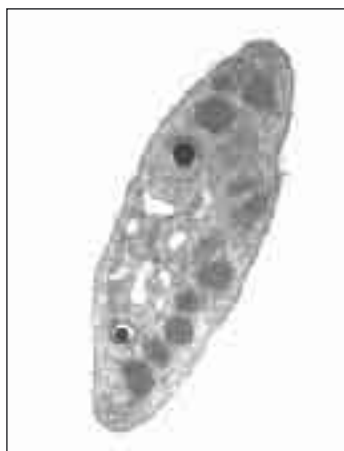


Figura 1. Plaqueta normal observada al microscopio electrónico de transmisión (MET). Se aprecian abundantes gránulos α y dos gránulos densos con un nucleóide muy electrondenso.

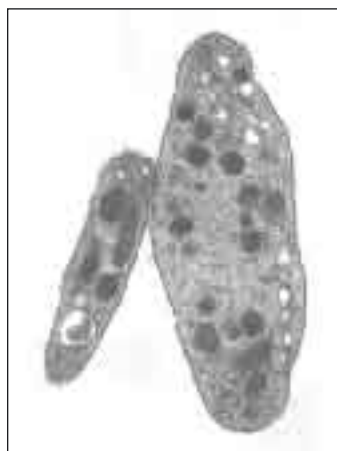


Figura 2. Plaquetas pertenecientes a un paciente con déficit de gránulos densos observadas al MET. Se aprecian gránulos α de aspecto y en número normal, y ningún gránulo denso.

ma más o menos esférica y rodeados por una membrana simple^{4,5}. Los **gránulos densos**, unos 5-6 por plaqueta, miden 200-300 nm y muestran un núcleo electrondenso muy característico al microscopio electrónico de transmisión (Figura 1). Contienen diversas sustancias, entre las que destacan Ca^{2+} , ADP y serotonina, que participan en la activación plaquetaria y en el sistema de amplificación de la respuesta plaquetaria activando a otras plaquetas. Los **gránulos α** , alrededor de 50 por plaqueta, miden 300-500 nm y presentan un aspecto ultraestructural relativamente homogéneo, aunque muestran una zona excéntrica de mayor densidad, por lo que se los ha comparado a un ojo de buey (Figura 1). Entre las sustancias que albergan se encuentran factores que participan en la coagulación y fibrinólisis y factores de crecimiento. Por otra parte, en la membrana de los gránulos α existen algunas moléculas de adhesión, como P-selectina, que van a expresarse en la superficie celular cuando las plaquetas se activan.

En las plaquetas activadas, el ensamblaje y contracción del sistema actina-miosina del citoesqueleto lleva los gránulos hacia el centro celular y provoca la labilización de su membrana, la unión del gránulo con el sistema canalicular abierto y, finalmente, la **secreción** de las sustancias granulares al exterior a través de los canales. La secreción plaquetaria depende de un complejo sistema de regulación integrado por un grupo de moléculas proteicas, relacionadas estructuralmente, denominadas SNARE (receptores de proteínas SNAP)⁴. Las proteínas SNARE tienen la capacidad de formar complejos que, en su forma *cis*, bloquean la secreción en las plaquetas no activadas. En las plaquetas activadas, la interacción de NSF (factor N-etilmaleimida-sensible), una ATPasa dependiente de Mg^{2+} , con proteínas SNAP (proteínas de unión a NSF solubles) pasa el complejo SNARE a su forma *trans*, lo cual permite la fusión de los gránulos a la membrana y la exocitosis de su contenido. La acción de la PKC (proteín-cinasa C), inducida durante la transducción, cataliza

la fosforilación de diversas proteínas (Munc-18c, syntaxina-4, SNAP-23) que regulan positivamente la forma *trans* del complejo SNARE y, por tanto, la secreción. Algunas proteínas Rab y GTPasas de bajo peso molecular, aparte de intervenir en la generación de los gránulos en el megacariocito, juegan también un importante papel en la regulación de la secreción una vez fosforiladas durante la activación plaquetaria. Finalmente, el incremento de Ca^{2+} citosólico originado actúa también positivamente sobre la secreción por mecanismos no bien conocidos.

El **déficit de gránulos densos** o *β -storage-pool disease* (Figura 2) se hereda de forma autosómica dominante y se considera causado por un fallo en el empaquetamiento de sustancias en las vesículas precursoras de los gránulos⁶ (Tabla 1). En ocasiones, existe un déficit parcial asociado de gránulos α o *β -storage-pool disease*. Ambos procesos se manifiestan clínicamente en forma de diátesis hemorrágica moderada, como expresión de la disminución de la amplificación de la respuesta plaquetaria. Por el contrario, cuando el déficit de gránulos densos es debido a la ausencia de las vesículas precursoras en los megacariocitos, suele asociarse a anomalías de los melanosomas y de los lisosomas de otros tejidos. Las deficiencias asociadas son de herencia autosómica recesiva y cursan con manifestaciones clínicas graves en los homocigotos. Entre éstas caben destacar los síndromes de **Hermansky-Pudlak**⁷, **Chediak-Higashi**² y **Griscelli tipo 2**⁸, relacionados con mutaciones diversas en genes involucrados en el transporte intracelular de proteínas granulares (entre membrana, Golgi y gránulos), en la fusión y traslación de vesículas granulares y en los mecanismos de secreción.

El **déficit de gránulos α** , **síndrome de las plaquetas grises** o *α -storage-pool disease* (Figura 3) es una rara anomalía genética, con patrón de herencia variable, que cursa con diátesis hemorrágica moderada y trombocitopenia^{9,10} (Tabla 2). Las plaquetas son de color gris homogéneo vistas al microscopio óptico, mediante la coloración de May-Grünwald-Giemsa, por falta

Tabla 1. Déficit de gránulos densos

Síndrome	Fenotipo	Gen alterado y localización	OMIM
Déficit de gránulos densos aislado = β -storage-pool disease	↓ gránulos densos, ↓ secreción, DH	—	%185050
Déficit de gránulos densos asociado a déficit parcial de gránulos α = $\alpha\beta$ -storage-pool disease	↓ gránulos densos y α , ↓ secreción, DH	—	%185050
Hermansky-Pudlak tipos 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8	↓ gránulos densos, ↓ secreción, DH; albinismo oculocutáneo tirosinasa+; pigmento ceroides en macrófagos	<i>HPS1</i> 10q23.1-q23.2, <i>HPS3</i> 3q24, <i>HPS4</i> 22q11.2-q12.2, <i>HPS5</i> 11p15-p13, <i>HPS6</i> 10q24.32, <i>HPS7/DTNBP1</i> 6p22.3, <i>HPS8/BLOC1S3</i> 19q13	#203300
Hermansky-Pudlak tipo 2 ↓ subunidad β_1 del complejo AP3 ↓ traslación proteínas de Golgi a lisosomas	↓ gránulos densos, ↓ secreción, DH; ↓ presentación antígenos, inmunodeficiencia; ↓ neutrófilos y disfagocitosis; infecciones recurrentes; albinismo oculocutáneo	<i>HPS2/AP3B1</i> 5q14.1	#608233
Chediak-Higashi ↓ transporte de proteínas lisosómicas a membrana celular	↓ gránulos densos, ↓ secreción, DH; lisosomas gigantes en leucocitos y melanocitos; infecciones; evolución a SLP especial; albinismo oculocutáneo; neuropatía compleja	<i>CHS1/LYST</i> 1q42.1-q42.2	#214500
Griscelli tipo 2 Anomalía de la GTPasa RAB27A ↓ fusión y tráfico de vesículas, ↓ exocitosis	↓ gránulos densos, ↓ secreción, DH; hipopigmentación piel y cabello; inmunodeficiencia; activación linfocitos T y macrófagos; síndrome hemofagocítico	<i>RAB27A</i> 15q21	#607624

DH: diátesis hemorrágica; SLP: síndrome linfoproliferativo

del tono rojizo que normalmente les confieren los gránulos α (Figura 4). Algunos pacientes desarrollan fibrosis medular no evolutiva generada por la liberación excesiva de factores de crecimiento, debido a que no han sido retenidos en el interior de los gránulos. De forma comparable al déficit de gránulos densos, en ocasiones, el déficit de gránulos α proviene de un fallo en su biogénesis en el megacariocito y se asocia a diversas anomalías extraplaquetarias. Algunas mutaciones en el gen *GATA1* dan lugar a déficit parcial de gránulos α ,

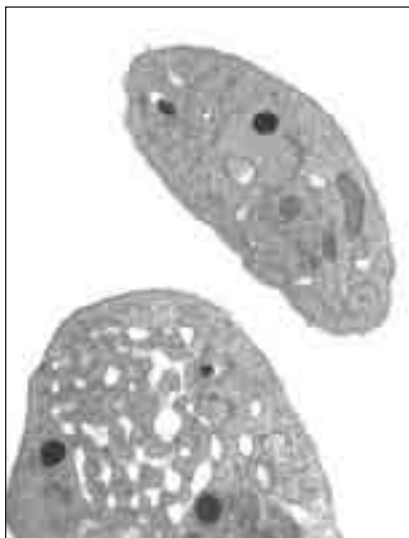


Figura 3. Plaquetas pertenecientes a un paciente con déficit de gránulos α observadas al MET. Aparecen escasos gránulos α , algunos de tamaño muy pequeño, y se aprecian gránulos densos en cantidad relativamente abundante.

trombocitopenia, plaquetas gigantes y dismegacariocitopenia; se han observado casos asociados a β -talasemia¹¹ y a diseritropoyesis¹². Se ha descrito también falta de generación de gránulos α en el síndrome ARC debido a una anomalía en una proteína reguladora del transporte de vesículas, esencial para el desarrollo de

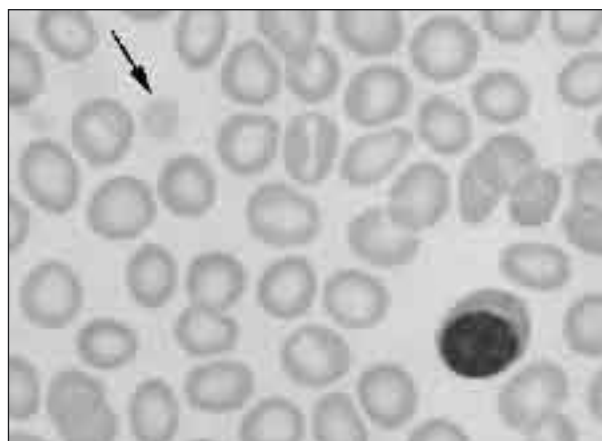


Figura 4. Frotis de sangre, perteneciente a un paciente con síndrome de las plaquetas grises, teñido con May-Grünwald-Giemsa y observado al microscopio óptico a gran aumento. Se aprecian hematocitos, un linfocito de aspecto normal y una plaqueta completamente gris (flecha) por estar desprovista de gránulos α .

Tabla 2. Anomalías de los gránulos α

Síndrome	Fenotipo	Gen alterado y localización	OMIM
Déficit de gránulos α aislado = síndrome de las plaquetas grises = α -storage-pool-disease	↓ gránulos α , trombocitopenia, DH; mielofibrosis no evolutiva	—	%139090
Déficit de gránulos α ligado a X asociado a mutaciones del gen <i>GATA1</i>	↓ gránulos α parcial, trombocitopenia, DH; dismegacariocitopoyesis, plaquetas gigantes; diseritropoyesis/ β -talasemia	<i>GATA1</i> Xp11.23	#300367 #314050
ARC ↓ proteína reguladora de la fusión granular dependiente de proteínas SNARE, ↓ biogénesis gránulos α	↓ gránulos α , ↑ gránulos densos, DH; artrogrifosis multiplex; disfunción renal; ictericia	<i>VPS33B</i> 15q26.1	#208085
París-Trousseau/Jacobsen ↓ factor de transcripción <i>FLI1</i>	↓ gránulos α , trombocitopenia, DH; dismegacariocitopoyesis, gránulos α gigantes; facies anormal, retraso mental, malformaciones	Deleción de la banda 11q23 (incluye el gen <i>FLI1</i>)	#188025
Quebec = factor V Quebec ↑ urocinasa en gránulos α , ↑ proteólisis local, ↑ degradación factor V	Trombocitopenia, disfunción plaquetaria, DH; gránulos α normales en número y morfología	—	%601709
Déficit aislados de factores de los gránulos α asociados al mismo déficit en plasma	Factor V, fibrinógeno, factor Von Willebrand, PAI-1	—	—

DH = diátesis hemorrágica

los gránulos α ¹³. En los síndromes de Jacobsen y París-Trousseau, originados por una deleción de la banda 11q23, la afectación del gen del factor de transcripción *FLI-1* se relaciona con la existencia de rasgos mielodisplásicos con presencia de micromegacariocitos, trombocitopenia y disminución de los gránulos α en las plaquetas¹. Además, tanto por microscopía óptica como electrónica, se observan algunos gránulos α de tamaño gigante, a veces con el aspecto de estar formados por gránulos más pequeños fusionados.

Por otra parte, los gránulos α pueden presentar anomalías genéticas de tipo bioquímico, sin que se altere su número o morfología, como en el síndrome de Quebec¹⁴, en el cual un aumento de urocinasa en el interior de los gránulos aumenta la proteólisis local y, en consecuencia, la degradación del factor V y de otros factores. Finalmente, se han descrito déficit de factores de los gránulos α como factor V, fibrinógeno, factor Von Willebrand o PAI-1, en general asociados a niveles plasmáticos reducidos de los mismos factores¹ (Tabla 2).

Anomalías intraplaquetarias de la activación y del citoesqueleto

En las plaquetas existen diferentes caminos o vías de activación que transmiten la señal desde los receptores ocupados por ligandos hasta las moléculas responsables de las funciones efectoras³. Algunos receptores de membrana se unen a proteínas G de diferentes ti-

pos, y éstas activan vías específicas para cada una de ellas. Así, la proteína G_q, asociada a los receptores PAR4, TP y P2Y1 (para trombina, TxA₂ y ADP respectivamente), activa a la fosfolipasa C, y la acción de ésta sobre el PIP₂ (fosfatidilinositol-[3,4]bifosfato) deriva en los segundos mensajeros IP₃ (inositol-trifosfato) y diacilglicerol. El primero moviliza el Ca²⁺ desde el sistema tubular denso hacia el citoplasma, aumentando su concentración y provocando la activación *inside-out* de la integrina $\alpha_2\beta_3$ para su función como receptor del fibrinógeno. La elevación en la concentración de Ca²⁺ citoplasmático, a la cual contribuye la entrada desde el exterior mediada por el receptor de ATP P2X1, también activa a la fosfolipasa A₂. Ésta, y también el diacilglicerol, genera ácido araquidónico (AA) a partir de los fosfolípidos de membrana. El AA es después metabolizado por la ciclooxigenasa, dando lugar a endoperóxidos cíclicos y TxA₂, un importante producto de la activación que amplifica la respuesta plaquetaria al unirse a su receptor específico en nuevas plaquetas. Al mismo tiempo, el diacilglicerol activa a la PKC, y ésta actúa en la reorganización del citoesqueleto y la secreción mediante su capacidad de fosforilación de proteínas, especialmente pleckstrina. El receptor de ADP P2Y2 se asocia a la proteína G_i, y la subunidad $\beta\gamma$ de ésta activa a la IP3K γ (fosfatidilinositol-3-cinasa γ) para que actúe sobre PIP₂ y PIP₃ (fosfatidilinositol-[3,4,5]trifosfato), iniciando las vías que van a movilizar el Ca²⁺ y a estimular la PKC y la fosforilación de proteínas; como resultado, se van a activar el receptor del fibrinógeno y la secreción¹⁵. La subunidad α de G_i produce

Tabla 3. Anomalías de la activación y del citoesqueleto

Síndrome	Fenotipo	Gen alterado y localización	OMIM
Déficit de proteína Gq, subunidad α	Déficit de secreción primario, DH	<i>GNAQ</i> 9q21	#600998
Déficit de fosfolipasa $\text{C}\beta_2$	Déficit de secreción primario, DH	<i>PLCB2</i> 15q15	*604114
Déficit de proteína Gi, subunidad α	Déficit de secreción primario, DH	<i>GNAI1</i> 7q21	#139310
Déficit de proteincinasa $\text{C}\theta$ asociado a mutaciones de <i>RUNX1</i>	Déficit de secreción primario, DH; trombocitopenia; predisposición a leucemia	<i>PRKCZ</i> 1p36/ <i>RUNX1</i> 21q22.3	*176982/#601399
Déficit de liberación de ácido araquidónico	Déficit de secreción primario, DH	<i>PLA2G4A</i> 1q25	*600522
Déficit de ciclooxigenasa 1 = anomalía <i>aspirin-like</i>	Déficit de secreción primario, DH	<i>COX1</i> 9q32-q33.3	*176805
Déficit de tromboxano-sintetasa	Déficit de secreción primario, DH	<i>TBXAS1</i> 7q34	+274180
Wiskott-Aldrich/trombocitopenia ligada a X ↓ proteína WASP, remodelación anómala del citoesqueleto de actina	Trombocitopenia, ↓ gránulos densos, DH; inmunodeficiencia; eccema	<i>WAS</i> Xp11.23-p11.22	#301000 #313900
Enfermedad relacionada con el gen <i>MYH9</i> Cadena pesada de la miosina no muscular II anómala	Trombocitopenia, plaquetas gigantes, DH mínima Inclusiones ribosómicas en leucocitos; nefropatía; hipoacusia; cataratas	<i>MYH9</i> 22q11.2	#155100 #153650 #153640 #605249
Síndrome de las plaquetas esféricas ↓ microtúbulos	Trombocitopenia, plaquetas esféricas, déficit de filopodia, DH	—	—

DH = diátesis hemorrágica

activación plaquetaria de forma indirecta, anulando la vía inhibidora adenilciclasa-AMPC; ésta es estimulada normalmente por el regulador negativo PGI_2 (prostaglandina- I_2 o prostaciclina) a través del receptor IP conectado a la proteína Gs.

Al margen de su función directa en los movimientos celulares, el citoesqueleto juega un papel central en la coordinación de la activación plaquetaria, adaptando las respuestas efectoras a los distintos estímulos externos². El citoesqueleto contiene moléculas con la capacidad de conectarse a diversas vías de señalización, tras la ocupación de determinados receptores, e iniciar la polimerización de la actina y su unión a la miosina. La contracción del sistema actina-miosina provoca el cambio de forma de la plaqueta, la cual se torna más redondeada, emite pseudópodos y filopodia, y facilita las funciones de adhesión, agregación y secreción. Los microtúbulos plaquetarios que, en situación de reposo, mantienen la forma discoide de las plaquetas, cuando éstas se activan contribuyen a guiar a los gránulos hacia el centro celular para favorecer la secreción.

Entre las numerosas moléculas implicadas en la activación o transducción plaquetaria y en el citoesqueleto, tan sólo se han descrito anomalías genéticas en algunas de ellas³. Dado que el déficit de secreción es la manifestación funcional más evidente en la mayoría de estas patologías, se las ha designado como déficit de secreción primarios, en contraposición a

los déficit por disminución de gránulos. Las múltiples interacciones entre los mecanismos de activación, secreción y reorganización del citoesqueleto dificultan la clasificación de las diferentes trombocitopatías intraplaquetarias y, por ello, se exponen conjuntamente en la Tabla 3.

El déficit de proteína Gq, subunidad α , induce una disfunción plaquetaria compleja, por afectación de diversas vías de señalización, que incluye fallos en la movilización del Ca^{2+} , en la generación de AA y en la fosforilación inducida por PKC; en consecuencia, disminuye la secreción. Asimismo, también afecta a la agregación por alterar la activación *inside-out* de la integrina $\alpha_2\beta_3$ ³. El déficit de fosfolipasa $\text{C}\beta_2$ da lugar a una trombocitopatía similar a la anterior, puesto que se encuentra en el mismo camino de señalización³. El déficit de proteína Gi, subunidad α , disminuye el bloqueo de la vía inhibidora adenilciclasa-AMPC y, por tanto, prevalece el efecto activador de esta vía procedente de la proteína Gs³. En las mutaciones del gen *RUNX1* (*CFBA2* o *AML1*), asociado a trombocitopenia y predisposición a leucemia, se ha observado déficit de PKC θ con disminución de la fosforilación de proteínas y de la activación de la integrina $\alpha_2\beta_3$ ^{1,3}. En la vía del AA se han descrito diferentes anomalías genéticas³. En el déficit de liberación de ácido araquidónico, desde los fosfolípidos de membrana no se genera este ácido y, por tanto, tampoco su producto final, el TxA_2 . En el déficit de ciclooxigenasa 1 (*COX-1*,

PTGS1, PGSH1) o anomalía *aspirin-like*, ya sea por ausencia de la enzima o por un defecto funcional, el AA no se convierte en TxA_2 y, por tanto, decrece la amplificación de la respuesta plaquetaria¹⁶. En el déficit de tromboxano-sintetasa, la reorientación de los endoperóxidos cíclicos hacia la producción de PGI_2 y la subsiguiente activación de la vía del AMPc redundan en un defecto funcional añadido que provoca mayor diátesis hemorrágica¹⁷.

En el síndrome de Wiskott-Aldrich y su forma parcial, la trombocitopenia ligada a X, el déficit de proteína WASP subyacente impide la interacción de esta proteína con el PIP_2 y con la Rho-like GTPasa CDC42. En consecuencia, no se activa correctamente el complejo nucleador de actina ARP2/3, y la remodelación anormal de la actina es la responsable de las manifestaciones multisistémicas de la enfermedad incluyendo trombocitopenia, déficit de gránulos densos, anomalía de la secreción, diátesis hemorrágica, inmunodeficiencia y eccema². En otros casos, la afectación genética del citoesqueleto da lugar a alteraciones plaquetarias con leve o nula disfunción, como en la enfermedad relacionada con el gen *MYH9*, que cursa con trombocitopenia y plaquetas gigantes, conservando inalterada la masa global de plaquetas. Por ello, no suele haber diátesis hemorrágica o, en todo caso, es poco importante. Dentro de esta denominación se incluyen diversos síndromes descritos previamente –May-Hegglin, Epstein, Fechtner, Sebastian– que tienen en común la existencia de mutaciones en el gen *MYH9* de la cadena pesada IIA de la miosina no muscular. La localización de las mutaciones a lo largo del gen determina los diferentes fenotipos descritos, que incluyen combinaciones de las siguientes anomalías asociadas a las plaquetas gigantes: inclusiones ribosómicas en el citoplasma de los leucocitos, nefropatía, hipoacusia y cataratas¹⁸. Otra anomalía del citoesqueleto descrita, en este caso en los microtúbulos, es el síndrome de las plaquetas esféricas¹⁹. Los pacientes presentan diátesis hemorrágica y trombocitopenia, y las plaquetas, como única anomalía estructural, muestran una deficiencia casi total de microtúbulos con pérdida de la forma discoide y transformación de las plaquetas en formas esféricas, que, además, no tienen la capacidad de formar filopodia.

Aspectos clínicos, diagnósticos y terapéuticos

Las anomalías intraplaquetarias genéticas que derivan en déficit de los mecanismos de amplificación de la respuesta plaquetaria –patología de la activación, déficit de secreción de los gránulos densos– cursan con un cuadro clínico similar: diátesis hemorrágica moderada de predominio cutáneo-mucoso, cifras de plaquetas en general normales o ligeramen-

te bajas y función plaquetaria global (test de sangría, PFA-100[®]) prácticamente normal o discretamente alterada. El análisis agregométrico presenta deficiencias variables con agonistas débiles, incluyendo ausencia de segunda onda, y suele mostrar alteraciones mínimas o nulas con agonistas fuertes¹⁻³. El diagnóstico diferencial entre un déficit de gránulos densos y un déficit de secreción primario, o anomalía de la activación, requiere la aplicación de técnicas específicas, como el estudio de la liberación de ATP o el examen ultraestructural de las plaquetas^{5,6} (Figura 2). En algunos casos, la anomalía de la activación produce una alteración secundaria del receptor del fibrinógeno, por activación *inside-out* deficiente, y en consecuencia un fenotipo *tromboastenia-like*. El déficit de gránulos α es fácil de reconocer con la simple observación del frotis sanguíneo por técnicas convencionales (Figura 4). Además, las pruebas de función plaquetaria global están alteradas, en la agregometría se encuentran anomalías variables, y la determinación de las sustancias propias de los gránulos α en lisados plaquetarios (β -tromboglobulina, factor plaquetario 4) está disminuida. La observación de las plaquetas al microscopio electrónico permite cuantificar el déficit de gránulos α , especialmente en los casos en que la anomalía es parcial¹⁰ (Figura 3). Cuando la trombocitopatía se asocia a trombocitopenia, ésta puede ser más evidente que la primera y no es raro confundir la alteración plaquetaria genética con una trombocitopenia autoinmune. La historia clínica detallada, la aplicación rigurosa de los métodos diagnósticos, el estudio familiar y, sobre todo, el pensar en la posible existencia de un proceso genético, son claves para establecer el diagnóstico¹.

A diferencia de las anomalías de la adhesión y agregación, en que puede haber diátesis hemorrágica importante, en las deficiencias de secreción, por déficit de gránulos o primarias, el manejo clínico del paciente suele limitarse a la prevención de las hemorragias con antifibrinolíticos o desmopresina, y rara vez es preciso utilizar concentrados de plaquetas^{1-3,20}. La hipermenorrea, un problema frecuente en las mujeres con disfunción plaquetaria moderada, suele controlarse bastante bien con antifibrinolíticos por vía oral y, si es persistente, con anovulatorios. En estos casos es muy importante controlar regularmente los parámetros del hierro y, si es preciso, efectuar ferroterapia; una vez comprobado que los depósitos de hierro ya están correctos, es recomendable instaurar ferroterapia intermitente, unos 7-10 días al mes. Los antifibrinolíticos aplicados localmente son muy eficaces en el control de las epistaxis y sangrados cutáneos, así como en las intervenciones sencillas en la cavidad oral como exodoncias. Para la prevención del sangrado quirúrgico suele funcionar bien la administración de desmopresina intraveno-

sa. Dado que este fármaco actúa aumentando los niveles sanguíneos de factor Von Willebrand, por su movilización desde los depósitos, puede compensar el déficit funcional. No obstante, al no constituir un tratamiento causal del déficit de secreción, es aconsejable realizar previamente, en cada caso, un test de eficiencia terapéutica del fármaco²⁰.

Los déficit de secreción por anomalías en la biogénesis de los gránulos, normalmente asociados a patologías lisosómicas, inmunodeficiencia u otras manifestaciones clínicas graves, suelen evolucionar de forma fatal a corto plazo y, por tanto, precisan tratamientos agresivos como **trasplante de progenitores hematopoyéticos**. Esto es también válido para las formas graves de síndrome de Wiskott-Aldrich^{1,2}.

Bibliografía

- Nurden P, Nurden AT. Congenital disorders associated with platelet dysfunctions. *Thromb Haemost* 2008; 99: 253-63.
- Gunay-Aygun M, Huizing M, Gahl WA. Molecular defects that affect platelet dense granules. *Semin Thromb Hemost* 2004; 30: 537-47.
- Rao AK, Jalagadugula G, Sun L. Inherited defects in platelet signaling mechanisms. *Semin Thromb Hemost* 2004; 30: 525-35.
- Reed GL. Platelet secretory mechanisms. *Semin Thromb Hemost* 2004; 30: 441-50.
- White JG. Use of the electron microscope for diagnosis of platelet disorders. *Semin Thromb Hemost* 1998; 24: 163-8.
- Pujol-Moix N, Hernández A, Escolar G, Español I, Martínez-Brotóns F, Mateo J. Platelet ultrastructural morphometry for diagnosis of partial δ -sotrage pool disease in patients with mild platelet dysfunction and/or thrombocytopenia of unknown origin. Study of 24 cases. *Haematologica* 2000; 85: 620-7.
- Wei ML. Hermansky-Pudlak syndrome: a disease of protein trafficking and organelle function. *Pigment Cell Res* 2006; 19: 19-42.
- Ménasché G, Pastural E, Feldmann J, Certain S, Ersoy F, Dupuis S, Wulffraat N, Bianchi D, Fischer A, Le Deist F, de Saint Basile G. Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat Genet* 2000; 25: 173-6.
- Nurden AT, Nurden P. The gray platelet syndrome: clinical spectrum of the disease. *Blood Rev* 2007; 21: 21-36.
- Español I, Hernández A, Pujol-Moix N. The magic of immersion oil: gray platelet syndrome. *Haematologica* 1998; 83: 474-5.
- Balduini CL, Pecci A, Loffredo G, Izzo P, Noris P, Grosso M, Bergamaschi G, Rosti V, Magrini U, Ceresa IF, Conti V, Poggi V, Savoia A. Effects of the R216Q mutation of GATA-1 on erythropoiesis and megakaryocytopoiesis. *Thromb Haemost* 2004; 91: 129-40.
- Dvorak AM, Neufeld EJ, Fleming MD. X-linked gray platelet syndrome due to a GATA1 Arg216Gln mutation. *Blood* 2007; 109: 3297-9.
- Lo B, Li L, Gissen P, Christensen H, McKiernan PJ, Ye C, Abdelhaleem M, Hayes JA, Williams MD, Chitayat D, Kahr WH. Requirement of VPS33B, a member of the Sec1/Munc18 protein family, in megakaryocyte and platelet alpha-granule biogenesis. *Blood* 2005; 106: 4159-66.
- Diamandis M, Veljkovic DK, Maurer-Spurej E, Rivard GE, Hayward CP. Quebec platelet disorder: features, pathogenesis and treatment. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2008; 19: 109-19.
- Schoenwaelder SM, Ono A, Sturgeon S, Chan SM, Mangin P, Maxwell MJ, Turnbull S, Mulchandani M, Anderson K, Kauffenstein G, Rewcastle GW, Kendall J, Gachet C, Salem HH, Jackson SP. Identification of a unique co-operative phosphoinositide 3-kinase signaling mechanism regulating integrin alpha IIb beta 3 adhesive function in platelets. *J Biol Chem* 2007; 282: 28648-58.
- Matijevic-Aleksic N, McPhedran P, Wu KK. Bleeding disorder due to platelet prostaglandin H synthase-1 (PGHS-1) deficiency. *Br J Haematol* 1996; 92: 212-7.
- Defreyn G, Machin SJ, Carreras LO, Dauden MV, Chamone DA, Vermynen J. Familial bleeding tendency with partial platelet thromboxane synthetase deficiency: reorientation of cyclic endoperoxide metabolism. *Br J Haematol* 1981; 49: 29-41.
- Pecci A, Panza E, Pujol-Moix N, Klersy C, Di Bari F, Bozzi V, Gresle P, Lethagen S, Fabris F, Dufour C, Granata A, Doubek M, Pecoraro C, Koivisto PA, Heller PG, Iolascon A, Alvisi P, Schwabe D, De Candia E, Rocca B, Russo U, Ramenghi U, Noris P, Seri M, Balduini CL, Savoia A. Position of nonmuscle myosin heavy chain IIA (NMMHC-IIA) mutations predicts the natural history of MYH9-related disease. *Hum Mutat* 2007; 29: 409-17.
- White JG, de Alarcon PA. Platelet spherocytosis: a new bleeding disorder. *Am J Hematol* 2002; 70: 158-66.
- Hanebutt FL, Rolf N, Loesel A, Kuhlisch E, Siegert G, Knoefler R. Evaluation of desmopressin effects on haemostasis in children with congenital bleeding disorders. *Haemophilia* 2008; 14: 524-30.

TROMBOCITOPATÍAS ADQUIRIDAS

J.M. CESAR, I. DELGADO, J.V. GARCÍA, Á.G. AVELLO

Servicio de Hematología.

Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid

Introducción

Las plaquetas inician su función hemostática detectando zonas vasculares desendotelizadas mediante diferentes integrinas localizadas en su membrana. Estas glicoproteínas están diseñadas para reconocer el factor Von Willebrand inmovilizado en el subendotelio, así como estructuras propias de esta zona de la pared vascular como el colágeno, consiguiendo un anclaje plaquetario que se denomina adhesión. Este primer evento es responsable de la activación plaquetaria que va a mediar la secreción de componentes almacenados en los gránulos plaquetarios y de la generación de una señal intracelular que promoverá cambios críticos en la superficie de las plaquetas. La secreción cooperará en la estimulación de otras plaquetas y aportará proteínas de la coagulación. Uno de los cambios que afecta a la membrana modificará la estructura de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, capacitándola para unir fibrinógeno. Estas uniones $\alpha_{IIb}\beta_3$ -fibrinógeno posibilitan la agregación de nuevas plaquetas a las ya adheridas, produciendo un aglome-

Tabla 1. Alteraciones asociadas a la disfunción plaquetaria en los síndromes mieloproliferativos crónicos

Estructurales	Anisotropía, plaquetas gigantes, agregados, hipertrofia del sistema tubular denso, reducción de gránulos α y densos
Membrana	Defecto de glicoproteína Ia-IIa Incremento de glicoproteína IV Disminución de receptores β -adrenérgicos Disminución de receptores de la prostaglandina D ₂ Defecto de actividad procoagulante
Funcionales	Ausencia de agregación plaquetaria a epinefrina Defecto o ausencia de agregación plaquetaria a colágeno Defecto de agregación plaquetaria a ADP Prolongación de los tiempos de obturación con PFA-100
Metabolismo del ácido araquidónico	Aumento de la actividad de fosfolipasas Incrementada producción de tromboxano Actividad de lipooxigenasa reducida

rado que sellará la fisura del vaso y coartará la hemorragia. Otra modificación de la membrana favorecerá la externalización de fosfolípidos, especialmente fosfatidilserina, que reclutarán sobre la membrana plaquetaria diferentes factores de la coagulación, especialmente aquellos con residuos GLA dependientes de la vitamina K, promoviendo la generación de trombina. Esta actividad procoagulante es imprescindible para favorecer y localizar la generación de fibrina en la zona de la lesión vascular y consolidar el agregado plaquetario.

Alteraciones en la función de las plaquetas son responsables de enfermedades hemorrágicas de variable intensidad, y pueden ser constitucionales o adquiridas. Las primeras suelen ser más graves; las segundas, más frecuentes; y entre ellas, las más reconocidas son las que resultan de los síndromes mieloproliferativos, la enfermedad renal crónica, el desgaste funcional plaquetario en los circuitos de la cirugía extracorpórea y las medicaciones con fármacos antiplaquetarios¹.

Síndromes mieloproliferativos crónicos no leucémicos

Los síndromes mieloproliferativos crónicos no leucémicos (SMPCNL) agrupan a entidades como policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (TE) y metaplasia mieloide-mielofibrosis (MMM). Estas entidades tienen en común diferentes alteraciones, entre ellas la presencia de una disfunción plaquetaria de características muy similares (Tabla 1).

La disfunción plaquetaria y la hemorragia

La TE fue considerada hasta hace unas décadas como una enfermedad fundamentalmente hemorrágica. El tipo de diátesis sugiere un defecto en la hemostasia pri-

maria, afecta a piel y mucosas, e incide especialmente en presencia de altos recuentos plaquetarios (superiores al millón/ μ L) y en sujetos sometidos a intervenciones quirúrgicas. Los estudios básicos encontraron que las plaquetas de estos pacientes eran deficientes en diferentes aspectos que afectan fundamentalmente a receptores, actividad procoagulante y al almacenamiento y secreción de compuestos proagregantes y agregación² (Tabla 1).

El defecto de actividad procoagulante de las plaquetas en pacientes con TE fue una de las primeras alteraciones reconocidas, y se confirmó con posterioridad, demostrando que la captación de factor Xa sobre las membranas de plaquetas activadas estaba disminuida. Estudios de microscopía electrónica detectaron una disminución de los gránulos que se correspondía con defectos de secreción del contenido de estas estructuras, como serotonina y ADP². Pero, sin duda, el defecto funcional más característico y conocido de las plaquetas en estos enfermos es la disminución de agregación en respuesta a diferentes agonistas³, como ADP, colágeno y epinefrina (Figura 1). El defecto de agregación afecta al 70% de los enfermos y no se observa en trombocitosis reactivas⁴. Sin embargo, a diferencia de los defectos de agregación que caracterizan las trombopatías congénitas, en los pacientes con TE esta alteración no se correlaciona con la diátesis hemorrágica de los enfermos, que tiene una incidencia mucho más baja (5-10%). Esta circunstancia podría explicarse en base a diferentes hechos. Por una parte, la principal alteración es la ausencia de respuesta a la epinefrina, un defecto que es secundario a la ausencia de receptores β -adrenérgicos y que no parece crítico desde el punto de vista clínico. Así, se ha observado en diferentes familias occidentales y en un porcentaje importante de sujetos orientales que no padecen ningún tipo de clínica hemorrágica⁵. Por otra parte, los defectos de secreción, segundos en frecuencia, pueden cursar con una diátesis hemorrágica muy leve

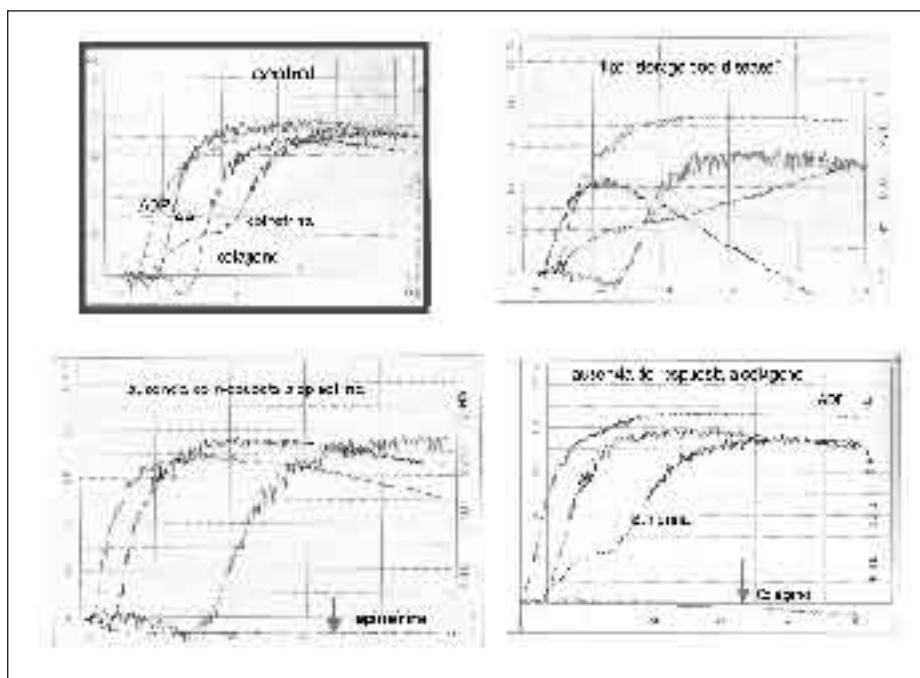


Figura 1. Principales patrones de agregación defectuosa en pacientes con trombocitemia esencial.

en aquellos pacientes que los padecen como un cuadro congénito, incluso mejorando en la edad adulta⁶. Finalmente, los defectos de agregación al colágeno por disminución de receptores a este agonista son inusuales. Las principales explicaciones alternativas son la coexistencia de una enfermedad de Von Willebrand adquirida y la presencia de un defecto de actividad procoagulante. Este último defecto nunca se ha correlacionado con clínica hemorrágica. Respecto a los defectos del factor Von Willebrand, son leves, pueden ser condicionados por proteasas plaquetarias y también se han detectado en pacientes con trombocitosis reactivas, sin que se apreciase en ellos una tendencia hemorrágica⁷. Es posible que la asociación de estos defectos pueda justificar el sangrado, especialmente en cirugía.

La afectación de la agregación plaquetaria es muy específica de los SMPCNL, pero no ha sido considerada de ayuda en el diagnóstico diferencial por la falta de reproducibilidad interlaboratorios de la técnica. El PFA-100, mucho más sencillo y reproducible, tiene la misma sensibilidad y especificidad que la agregación convencional⁸. Esto podría ser de interés para el diagnóstico del 50-60% de los pacientes con TE que carecen de la mutación de la V617F de la JAK2 cinasa, patognomónica de un cuadro mieloproliferativo⁹.

La disfunción plaquetaria y la trombosis

La alteración más relacionada con la trombosis en los SMPCNL es probablemente un hematocrito elevado. Esto define especialmente a la PV. La relación entre elevación del hematocrito y trombosis venosa ha sido de-

mostrada hace más de cuatro décadas. Las trombosis afectan a cualquier territorio, pero algunas localizaciones están especialmente asociadas a estas patologías, como son las venas suprahepáticas (síndrome de Budd-Chiari) y el territorio portal¹⁰. Como en cualquier otra etiología de riesgo trombotico, los pacientes sometidos a procedimientos quirúrgicos deben seguir profilaxis antitrombótica, pero además es aconsejable que los niveles de hematocrito estén controlados, bien con medicación citorreductora o con sangrías. Aunque los niveles de hematocrito elevados, cualquiera que sea su causa, pueden predisponer a la enfermedad tromboembólica venosa (ETEV), la incidencia de esta complicación en los pacientes con SMPCNL es comparativamente más alta. Existen estudios básicos que sugieren que otros componentes de la sangre, tanto leucocitos como plaquetas, contribuyen a los eventos tromboticos. Éste es un tema con un gran interés práctico en cuanto a la consideración de terapias citorreductoras globales, como la hidroxiurea (HU), frente a otras más específicas como la anagrelida (AN). Otros factores de riesgo, como tabaquismo y HTA, deben de ser considerados en el desarrollo de trombosis arteriales.

La posibilidad de una hiperactividad plaquetaria fue sugerida hace décadas por observaciones *in vitro*, especialmente agregación espontánea y mayor generación de tromboxano. La realidad es que, incluso en plaquetas que responden deficientemente a algunos agonistas como epinefrina o colágeno, las vías metabólicas a partir de que la señal pasa la membrana plaquetaria son hiperactivas. En estos enfermos la agregación con ácido araquidónico que difunde la membrana sin precisar receptor es siempre normal, y la generación

del principal derivado, el tromboxano, es mayor que en plaquetas normales. Más importante aún es el hecho de que la adición de trombina, el principal agonista plaquetario, resulta en una actividad de fosfolipasas que está incrementada en un 40% respecto a plaquetas normales¹¹. El principal metabolito derivado de estas vías es el tromboxano, un compuesto con actividades que favorecen la trombosis, ya que es un potente proagregante y vasoconstrictor. Este comportamiento de las plaquetas puede ser especialmente relevante en la microcirculación, condicionando síntomas tan típicos de estos enfermos como la eritromelalgia y la acrocianosis, que responden al ácido acetilsalicílico (AAS), un fármaco que inhibe la formación de tromboxano⁷.

Las causas de los defectos hemostáticos mencionados antes no están clarificados. El defecto de contenido granular plaquetario se corrige parcialmente cuando se trata a los pacientes con AAS, por lo que al menos en parte podría ser consecuencia de una desgranulación por una hiperagregabilidad *in vivo*. Esta circunstancia está bien documentada, no sólo por las observaciones clínicas ya mencionadas, sino también por hallazgos biológicos como el incremento de los niveles de 2-dinor-tromboxano B2 (un metabolito estable del tromboxano) en orina, así como la observación de una disminución de la vida media de las plaquetas circulantes y su corrección después de administrar AAS⁷. Aunque las plaquetas estimuladas se vuelven refractarias a diferentes agonistas, incluyendo epinefrina, la morfología aberrante, la disminución de diferentes receptores y la hiperactividad ya mencionada son difíciles de justificar, salvo por la existencia de plaquetas anómalas en su origen. Además, diferentes estudios básicos han aportado conocimientos sobre la influencia de los leucocitos en la excitabilidad plaquetaria¹², y un estudio clínico ha identificado la leucocitosis como un factor de riesgo trombótico¹³. Los mediadores de estas interacciones leucocito-plaqueta no han sido identificados. Interacciones de otros elementos como los hematíes son bien conocidas en otras situaciones. En los pacientes con SMPCNL se ha detectado una mayor frecuencia de hiperagregabilidad plaquetaria en sangre total con respecto al plasma rico en plaquetas, quizás mediada por liberación de nucleótidos de adenina de los hematíes.

Las alteraciones en otros SMPCNL son similares a la ET. La mayor diferencia es la magnitud de los recuentos plaquetarios, máximos en TE y mínimos en mielofibrosis, aunque curiosamente ambas circunstancias condicionan una situación prona al sangrado.

Insuficiencia renal crónica

La incidencia de hemorragias en pacientes con insuficiencia renal crónica (IRC) ha disminuido notablemente desde la aplicación de la diálisis. En la actua-

lidad, aproximadamente un 6% de los pacientes con IRC sufren esta complicación, siendo las hemorragias gastrointestinales las más comunes, aunque pueden afectar a piel, mucosas y serosas¹⁴. La causa es multifactorial, incluyendo afectaciones de las mucosas, la heparinización durante el proceso de hemodiálisis, anemia cuando el valor del hematocrito es inferior a 30% y una función plaquetaria anormal. El tiempo de hemorragia valorado por los métodos clásicos como el SimPlate[®] suele ser prolongado, pero también se observa cuando se realiza el PFA-100 tanto con el cartucho COL-ADP como con el COL-EPIN, pudiendo corregir al normalizar el hematocrito *in vitro*¹⁵. Ambas técnicas ponen de manifiesto una alteración de la adhesividad y de la agregación de las plaquetas bien reconocida. Respecto a la disminución de la adhesividad, parece un defecto atribuible a las plaquetas, ya que los niveles de factor Von Willebrand (FvW), tanto antigénicos como cofactor de ristocetina, son generalmente elevados en estos pacientes. A pesar de ello, el defecto corrige cuando se administra desmopresina, que eleva el FvW endógeno o crioprecipitado, que aporta FvW exógeno, circunstancias que abren la posibilidad que el FvW circulante sea funcionalmente anormal. Las alteraciones de la agregación dependen del grado de IRC, pudiendo afectar al 70% de los pacientes. Las respuestas al colágeno y al ADP fueron en nuestros estudios las más afectadas y los hallazgos más frecuentes. Se ha descrito una deficiente metabolización del ácido araquidónico a tromboxano. Nosotros hemos encontrado esa actividad normal en plaquetas lavadas, sugiriendo que el defecto podría ser la consecuencia de alguno de los metabolitos acumulables por el fallo renal. Esta hipótesis está en línea con otros estudios que han descrito que el plasma de los pacientes incubado con plaquetas normales las hace defectuosas, y que muchas de las alteraciones plaquetarias revierten cuando se estudian después de la diálisis¹⁴. Además, la actividad de las plaquetas para promover la coagulación (factor plaquetario 3) está disminuida, probablemente como consecuencia de una deficiente agregación. Al igual que algunas pruebas de laboratorio ya comentadas, las hemorragias responden clínicamente a la administración de crioprecipitados o desmopresina, ocasionalmente a estrógenos; pero la transfusión de hematíes debe considerarse cuando el hematocrito es inferior a 30%.

Cirugía extracorpórea. Hepatopatía crónica. Politransfusión

Los pacientes sometidos a cirugía cardiopulmonar con circulación extracorpórea sufren una disfunción plaquetaria condicionada por la continua interacción de las plaquetas sobre una superficie extraña, aun cuando ésta intente simular lo más posible el endo-



Figura 2. Autorradiografía que muestra la ausencia de síntesis de tromboxano por plaquetas incubadas con ácido araquidónico radiactivo (C-14) en presencia de ácido acetilsalicílico. PL: fosfolípidos; PA: ácido fosfatídico; TxB2: tromboxano B2; HHT: ácido hidroxihexadecatrienoico; HETE: ácido hidroxiicosatetraenoico; AA: ácido araquidónico; TG: triglicéridos.

telo vascular. El resultado es la circulación de plaquetas desgranuladas o exhaustas. Además, las plaquetas dañadas son retiradas de la circulación, lo que produce trombopenia que se agrava por la hemodilución secundaria a la transfusión de sangre. Una médula ósea normal repone 35.000 plaquetas/ $\mu\text{L}/\text{día}$, y puede ser más eficaz ante un problema hemorrágico, por lo que la alteración funcional es efímera. La gravedad de la hemorragia está relacionada con la duración de la intervención, y es independiente del tipo de oxigenador empleado. La transfusión de plaquetas debe considerarse ante un sangrado activo inmediato a la cirugía con pruebas de coagulación convencionales normales y sin causa aparente.

Los pacientes con hepatopatías crónicas usualmente desarrollan una trombopenia y trombopatía moderadas. La administración de desmopresina se ha encontrado de utilidad clínica para disminuir el riesgo de sangrado ante intervenciones de cirugía menor.

En el paciente politransfundido, a la trombopenia por hemodilución puede asociarse una trombopatía por hipotermia y acidosis.

Fármacos antiplaquetarios

Además de su efecto analgésico y antiinflamatorio, el AAS es ampliamente administrado por su acción an-

tiagregante plaquetaria. Extensos estudios han confirmado que su uso en dosis de 100-325 mg/día reduce la incidencia de infarto de miocardio, y es una terapia eficaz en la prevención de trombosis arteriales. Su acción sobre las plaquetas consiste en acetilar de forma irreversible la ciclooxigenasa. Esta enzima transforma el ácido araquidónico (AA) –liberado de los fosfolípidos tras la activación de las plaquetas– en prostaglandinas, constituyendo el primer paso para la posterior conversión del AA en tromboxano A_2 ¹⁶. Este compuesto es un potente proagregante y vasoconstrictor, y no se sintetiza en presencia de AAS (Figura 2). La ingesta diaria de AAS prolonga el tiempo de hemorragia y causa un defecto de agregación caracterizado por la ausencia de respuesta plaquetaria al AA, y disminución del ADP, epinefrina y bajas concentraciones de colágeno. Cuando se valora la función plaquetaria con el PFA-100, la ingesta de AAS se manifiesta por una prolongación del tiempo de obturación con el cartucho COLÁGENO-EPINEFRINA, mientras que los resultados con el cartucho COLÁGENO-ADP son normales¹⁷. Ya que las plaquetas no pueden renovar la carga enzimática, el efecto del AAS se mantiene mientras dura la circulación de estas células, de 5 a 6 días, por lo que se recomienda discontinuarlo antes de maniobras invasivas, incluyendo cirugía menor. Un reciente metaanálisis sugiere que, aunque esta práctica puede reducir los episodios de sangrado, existe una mayor incidencia de eventos tromboembólicos¹⁸. Un 15% de los pacientes en tratamiento con AAS a 100 mg/día tienen una refractariedad biológica, definida como una respuesta de agregación normal al AA. Su identificación es de interés, ya que el AAS es el antitrombótico de elección en la trombosis arterial (incluyendo ictus e infarto agudo de miocardio), así como en la enfermedad aterosclerótica. El incremento de la dosis a 325 mg/día suele revertir la refractariedad¹⁹.

Respecto a los antagonistas de $P2Y_{12}$, el clopidogrel es el fármaco más empleado tras desplazar a la ticlopidina. El más reciente (prasugrel) parece más activo, pero tiene un mayor riesgo de hemorragia. Todos ellos son tienopiridinas que se metabolizan por el citocromo P450, dando lugar a metabolitos activos que funcionan como antagonistas del $P2Y_{12}$, un receptor de membrana para el ADP que estabiliza la secreción y agregación de las plaquetas a este agonista. Diferentes ensayos clínicos demostraron que el clopidogrel es eficaz asociado a AAS en angina inestable (CURE), angioplastia percutánea (EPI-CURE) o infarto de miocardio con elevación del segmento ST²⁰. La monitorización en el laboratorio es compleja, la agregación con ADP es deficiente e irreversible, y los estudios con PFA-100 no tienen sensibilidad¹⁷, por lo que es complicado discernir entre ineficacia e incumplimiento terapéutico. Nuevos antagonistas de $P2Y_{12}$, que no son tienopiridinas, están en desarrollo. Otros fármacos

antiplaquetarios, como eptifibatide, tirofiban y abciximab son de uso exclusivo en cirugía coronaria percutánea. Todos ellos prolongan el tiempo de obturación medido con el PFA-100¹⁷.

Bibliografía

1. Nurden AT. Qualitative disorders of platelets and megakaryocytes. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1773-82.
2. Murphy S. Thrombocytosis and thrombocythaemia. *Clinics in Haematol* 1983: 89-106.
3. Spaet TH, Gaynor E, Goldstein ML. Defective platelets in essential thrombocythemia. *Arch Intern Med* 1969; 124: 135-41.
4. Ginsburg AD. Platelet function in patients with high platelet counts. *Ann Intern Med* 1975; 82: 506-11.
5. Kambayashi J, Shinoki N, Nakamura T, Ariyoshi H, Kawasaki T, Sakon M, Mondem M. Prevalence of impaired responsiveness to epinephrine in platelets among Japanese. *Throm Res* 1996; 81: 85-90.
6. Rao AK. Inherited defects in platelet signaling mechanisms. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 671-81.
7. Michiels JJ, Berneman Z, Van Bockstaele D, Van der Planken M, De Raeve H, Schroyens W. Clinical and laboratory features, pathobiology of platelet-mediated thrombosis and bleeding complications, and the molecular etiology of essential thrombocythemia and polycythemia vera: therapeutic implications. *Seminars Thromb Hemostas* 2006; 32: 174-207.
8. Cesar JM, De Miguel D, Avello AG, Burgaleta C. Platelet dysfunction in primary thrombocythemia using the Platelet Function Analyzer (PFA-100). *Am J Clin Pathol* 2005; 123: 772-7.
9. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Soon-Siong T, Tiedt R, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005; 352: 1779-90.
10. Current diagnostic criteria for the chronic myeloproliferative disorders (MPD) essential thrombocythemia (ET) polycythemia vera (PV) and chronic idiopathic myelofibrosis (CIMF). Michiels JJ, Bernema Z, Van Bockstaele D, De Raeve H, Schroyens W. *Pathologie Biologie* 2007; 55: 92-104.
11. Mayordomo O, Carcamo C, Vecino AM, Navarro JL, Cesar JM. Arachidonic acid metabolism in platelets of patients with essential thrombocythaemia. *Thromb Res* 1995; 78: 315-21.
12. Arellano-Rodrigo E, Álvarez-Larran A, Reverter JC, Villamor N, Colomer D, Cervantes F. Increased platelet and leucocyte activation as contributing mechanisms for thrombosis in essential thrombocythemia and correlation with the JAK2 mutational status. *Haematologica* 2006; 91: 169-75.
13. De Stefano V, Za T, Rossi E, et al. Recurrent thrombosis in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia: incidence, risk factors and effect of treatments. *Haematologica* 2008; 93: 372-80.
14. Kaw D, Malhotra D. Platelet dysfunction and end-stage renal disease. *Seminars in Dialysis* 2006; 19: 317-22.
15. Escolar G, Cases A, Viñas M, et al. Evaluation of acquired platelet dysfunction in uremic and cirrhotic patients using the platelet function analyzer (PFA-100): influence of hematocrit elevation. *Haematologica* 1999; 84: 614-9.
16. Weiss HJ. The discovery of the platelet effect of aspirin: a personal reminiscence. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1869-75.
17. Hayward CPM, Harrison P, Cattaneo M, et al. Platelet Function Analyzer (PFA)-100 closure time in the evaluation of platelet disorders and platelet function. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 312-9.
18. Burger W, Chemnitz JM, Kneissl GD, Rucker G. Low-dose aspirin for secondary cardiovascular prevention –cardiovascular risks after its perioperative withdrawal versus bleeding risks with its continuation– review and meta-analysis. *J Inter Med* 2005;257:399-414.
19. Dalen JE. Aspirin resistance: is it real? Is it clinically significant? *Am J Med* 2007; 120: 1-4.
20. Michelson AD. P2Y₁₂ antagonism: promises and challenges. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 33-8.

Terapia celular en trasplante

COORDINADOR: C. REGIDOR. *Madrid*

Resumen del simposio

La terapia celular se utiliza como parte del tratamiento de diversas enfermedades malignas o no, mediante el empleo de determinadas poblaciones que pueden servir como agentes inmunoterápicos o reparadores tisulares. En el trasplante hematopoyético el injerto se utilizó inicialmente como un rescate autólogo o alogénico tras los tratamientos mieloablativos. La evaluación cuidadosa de los beneficios y complicaciones derivados del mismo ha dado lugar al concepto actual del trasplante como una plataforma de inmunoterapia celular. Las características del injerto, junto a otros factores, juegan un papel muy importante en los resultados obtenidos. Como ejemplo bien conocido, la depleción de células T en trasplantes alogénicos para disminuir la incidencia de la EICH se puede acompañar de un incremento de recidiva, rechazo y complicaciones infecciosas, entre otras. Sin embargo, en determinadas circunstancias da lugar a la obtención de resultados equiparables a los de situaciones de pronóstico más favorable. En los últimos años, la investigación básica en biología celular y molecular ha permitido un conocimiento más profundo de diferentes componentes del sistema inmune y de la capacidad inmunomoduladora de otras células. De forma paralela, el desarrollo tecnológico va permitiendo obtener poblaciones celulares en condiciones de uso clínico que pueden proporcionar efectos inmunoterápicos, con un balance positivo respecto a posibles efectos secundarios.

En este simposio hemos dirigido la atención hacia la terapia celular en relación con las complicaciones principales del trasplante, EICH, recidiva e infecciones. En primer lugar he revisado la situación actual en cuanto a la profilaxis y tratamiento de la EICH mediante el empleo de células mesenquimales estromales y T reguladoras. En el caso de las primeras, además de los aspectos biológicos y técnicos, he resumido la mayoría de los resultados publicados, entre los que se encuentran los obtenidos por nuestro equipo en el Hospital Universitario Puerta de Hierro de Madrid, y que son de probada eficacia en el caso de la EICH aguda refractaria. La Dra. Ruggeri que pertenece al Departamento de Hematología e Inmunología Clínica del Policlinico Monteluce de Perugia (Italia) presenta su amplia experiencia en el estudio de la alorreactividad NK desde la biología humana, los resultados de los trasplantes haploidénticos en ratón que han permitido conocer la actuación de las células NK, la evidencia de mejores resultados de los trasplantes realizados a partir de donantes NK alorreactivos en los 112 trasplantes haploidénticos de pacientes con LMA de alto riesgo realizados por su grupo y la revisión en trasplantes no emparentados. Por último, el Dr. Einsele del Departamento de Medicina Interna II de Würzburg presentará su amplia experiencia en la obtención y utilización clínica de células T específicas como inmunoterapia adoptiva para complicaciones infecciosas, como la producida por CMV.

Los trabajos elegidos para presentación oral corresponden, en el caso del Dr. Sánchez García del Hospital Reina Sofía de Córdoba, un estudio prospectivo sobre el análisis de poblaciones T inmunorreguladoras derivadas del donante en 61 trasplantes, la influencia de la profilaxis de la EICH sobre su cuantificación y la relación con la existencia de EICH aguda y crónica. El Dr. Gallardo presenta por parte del Subcomité de EICH/Inmunoterapia del GETH el análisis comparativo retrospectivo de 410 trasplantes de sangre periférica con 410 trasplantes de médula ósea respecto a la supervivencia global, incidencia de EICH aguda y crónica y calidad de vida.

PROFILAXIS Y TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DEL INJERTO CONTRA EL HUÉSPED: CÉLULAS MESENQUIMALES Y CÉLULAS T REGULADORAS

C. REGIDOR, R. GONZALO-DAGANZO,
G. BAUTISTA, T. MARTÍN-DONAIRE,
R. CABRERA, M. NICOLÁS FERNÁNDEZ
*Servicio de Hematología y Hemoterapia.
Hospital Universitario Puerta de Hierro. Madrid*

La enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) es una de las complicaciones más severas del trasplante hematopoyético. Para su prevención y tratamiento se utilizan fármacos inmunosupresores, modificaciones en la composición del injerto, anticuerpos monoclonales, terapia fotodinámica y células con potencial inmunosupresor como las células mesenquimales, y en un nivel incipiente de aplicación clínica, las células T reguladoras.

Células mesenquimales estromales

Las células mesenquimales estromales (CME), caracterizadas por Friedenstein en la médula ósea (MO) adulta, se han aislado de diferentes tejidos: adiposo, sangre de cordón umbilical (SCU) e hígado fetal, pulmón, líquido amniótico y tejido periodontal. Son células multipotentes con capacidad de migración, diferenciación y regeneración de tejidos de origen mesenquimal y de otras capas embrionarias^{1,2}. En MO su frecuencia es pequeña (0,001-0,01%) y disminuye con la edad. Se encuentran en fase quiescente, formando parte del nicho hematopoyético, donde juegan un papel crucial en el desarrollo y la diferenciación del sistema linfohematopoyético a través de la secreción de factores de crecimiento como GM-CSF, SCF, HGF (*hepatic growth factor*), citoquinas, entre las que se encuentran IL-1, IL-6, IL-7, IL-15, SDF-1 y por la promoción de interacciones célula-célula. Al carecer de marcadores específicos, se definen por una combinación de características fenotípicas y funcionales.

Características fenotípicas

Las CME son negativas para marcadores típicos hematopoyéticos y endoteliales tales como CD34, CD45, CD14, CD11b, CD31, CD33, CD133 y HLA-DR, y positivas para un gran número de moléculas de adhesión, receptores de componentes de la matriz extracelular, citoquinas y factores de crecimiento: CD73, CD90, CD105, CD106, CD166, CD29, CD117, ICAM 1 y 2,

LFA-3 y L-selectina^{3,4}. Se han intentado aislar poblaciones puras de CME a partir de algunos antígenos como CD105, CD73, CD166, STRO-1, anticuerpos anti-receptores para *platelet derived growth factor* y *epithelial growth factor* (PDGF y EGF) y recientemente con anti-CD271 y anti-ZUC3.

Expansión, capacidad de diferenciación y migración

Las CME adultas se pueden aislar por adherencia al plástico y expandirse con facilidad *in vitro*, dando lugar a colonias (CFU-F) con células de aspecto fusiforme. La población que se obtiene es heterogénea. En el caso de la MO hay al menos tres tipos de células con morfología, fenotipo y potencial proliferativo diferentes. La adherencia o la proliferación pueden inducir cambios, por lo que se desconoce si las CME *in vivo* difieren de las expandidas. Las CME humanas proliferan mejor sembradas a baja densidad. Una vez que se alcanza la confluencia de las áreas de crecimiento, las células se triplican y resiembran hasta alcanzar la cifra deseada, lo que en los protocolos para uso en trasplante suele ocurrir en unas 4 semanas. Después de la expansión retienen la capacidad de diferenciación a hueso, cartílago y grasa, definitivas de CME, aunque hay diferencias entre células de distintos orígenes y de especies diferentes. También se mantiene la capacidad de proliferación y diferenciación después de la criopreservación. Factores potenciadores del crecimiento serían PDGF, *fibroblast growth factor* (FGF-2), EGF, *heparin binding epidermal growth factor* (HB-EGF) y factores inhibidores IFN- α e IL-4. La permanencia de la CME indiferenciada multipotente en estado quiescente o su diferenciación parecen reguladas por genes de la familia Wnt y por sus inhibidores, aunque pueden estar implicados otros sistemas⁵. En respuesta a estímulos, las CME pueden abandonar el nicho, anidar en otro lugar y diferenciarse o permanecer en los tejidos dañados durante la reparación, favoreciendo el desarrollo de las células preexistentes. Relacionados con la capacidad de migración y el *homing* están el CXCR4, receptor de SDF-1, y factores como el PDGF-BB. En modelos animales y en humanos se ha demostrado su capacidad de prendimiento en diferentes tejidos, ya sea implantadas o infundidas. En ratón neonato las CME infundidas están al 7.º día por todo el organismo, a los 18 días en pulmones e hígado, y a los 35 en hueso⁴. En el trasplante hematopoyético se han detectado en MO en pacientes pediátricos y en adultos con acondicionamientos reducidos.

Características inmunológicas

Las CME poseen propiedades inmunosupresoras y antiinflamatorias y poca capacidad inmunogénica, que

se han revisado recientemente^{4,6}. Comparten marcadores con el epitelio tímico, y las adultas expresan niveles intermedios de MHC de clase I y no expresan moléculas MHC de clase II, aunque pueden aumentar o detectarse por la acción del IFN- γ . No expresan moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, ni siquiera después de la estimulación con IFN- γ . Ni las CME inmaduras o estimuladas, ni las diferenciadas activan las células T *in vitro* en presencia de células presentadoras de antígeno (CPA). En la estimulación con mitógenos disminuyen la expresión de marcadores linfocitarios de activación como CD25 (receptor de IL-2 cadena α), CD38 y CD69. Escapan a la lisis por linfocitos citotóxicos (CTL) CD8 y también a la de las células NK, aunque pueden ser lisadas por células NK activadas por IL-2. Son bien toleradas en humanos cuando se infunden a través de las barreras de histocompatibilidad, aunque se ha detectado rechazo de CME humanas en ratas inmunocompetentes.

Las CME inhiben la alorreactividad de células T *naïve* y de memoria en cultivo mixto linfocitario (CML) y en respuesta a mitógenos como la fitohemaglutinina (PHA) con un efecto dosis-dependiente. Un número elevado de CME respecto a los linfocitos (proporción 1:10) produce una marcada inhibición de la proliferación linfocitaria y, por el contrario, una menor proporción (1:100 o 1:10.000) a menudo aumenta la proliferación en CML y en activación con mitógenos. Este mecanismo es HLA-independiente y posiblemente diferente en CML y en estimulación por PHA. El efecto supresor se mantiene después de la diferenciación y aumenta por el IFN- γ . Al actuar sobre las células T *helper*, disminuye la producción de IFN- γ e IL-12 y aumenta la de IL-4. Las CME suprimen la lisis mediada por CD8+ en CML, pero sólo inhiben la fase aferente y no tienen efecto en la fase citotóxica. En comparación con el efecto sobre las células T alorreactivas, el efecto inmunosupresor sobre la respuesta T-específica frente a CMV, EBV, adenovirus y otros agentes infecciosos es mucho menor. Las CME murinas requieren contacto célula-célula, mientras que las humanas funcionan en presencia de membranas permeables y no inducen tolerancia, anergia o apoptosis, por lo que los linfocitos pueden ser reestimulados si las CME se retiran del cultivo. El efecto sobre la proliferación se produce por inhibición de la división celular. Como inductores de la supresión de las células T *in vitro* se han sugerido varios factores solubles como el HGF, TGF- β 1, IL-2, indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO), que induce el catabolismo del triptófano, factor esencial para la proliferación linfocitaria, óxido nítrico, prostaglandina E2 (PGE2) e IL-10. Algunos datos se han obtenido con cantidades elevadas de CME y no se puede descartar por completo un mecanismo de contacto. En CML, con una proporción CME:célula respondedora de 1:1, aumenta la población de células T reguladoras CD4+CD25+ y re-

cientemente se han generado células CD4+ y CD8+ con fenotipo diferente al de las ya descritas, con una capacidad supresora 100 veces mayor. Las CME reducen la secreción de IFN- γ de las células NK estimuladas por IL-2, pero no inhiben la lisis de células K562 mediada por NK. Para inhibir la actividad citotóxica de CTL y NK habría que utilizar grandes proporciones (1:10) y son dosis celulares que no se pueden emplear *in vivo*. Las CME inhiben la formación, diferenciación y función de las células dendríticas, alterando el patrón de secreción de citoquinas. Respecto las células B, hay datos contradictorios, aunque parece que inhiben la proliferación.

Seguridad biológica

La posibilidad de transformación tumoral de las CME en cultivo se ha descrito para las células de MO murinas, células humanas de tejido adiposo, de MO en cultivos de larga duración y de SCU. Es importante la detección de posibles anomalías, dado que se utilizan en muchas ocasiones en pacientes inmunodeprimidos. Recientemente se ha investigado exhaustivamente la posibilidad de transformación de CME de MO con varias técnicas en diferentes momentos, hasta 12 semanas después de que el cultivo alcanzara la senescencia, sin detectar anomalías. En cualquier caso, es recomendable utilizar células generadas en periodos cortos de cultivo y realizar los controles pertinentes³. Normalmente las CME se cultivan con suero bovino fetal (SBF), que se considera crucial para la expansión y que debe seleccionarse para garantizar el crecimiento óptimo y la seguridad biológica del producto. Aun así, además del riesgo de la transmisión de zoonosis, existe el problema de la captación por las CME de proteínas y péptidos bovinos que pueden causar reacciones alérgicas, en especial tras administraciones repetidas. Recientemente se ha demostrado que la sustitución del SBF por suero humano AB, o por lisado plaquetario, genera células comparables a las obtenidas con SBF en cuanto a su capacidad de inmunosupresión y de diferenciación, con mayor grado de expansión⁷. Las CME son susceptibles de infección *in vitro* por CMV y HSV-1 pero no por EBV, aunque no se ha obtenido ADN viral en las células de donantes con serología positiva para CMV. Por otro lado, aunque las CME produzcan poca supresión de la proliferación linfocitaria frente a patógenos, habría que contemplar la posibilidad de que las células se infecten en pacientes con CMV y el posible compromiso de la respuesta frente a infecciones a la hora de la indicación terapéutica. La respuesta anti-CMV no se ha visto afectada en pacientes tratados por EICH⁸. Las CME expresan el antígeno P y se pueden infectar por parvovirus B19 y transmitir la

Tabla 1. Uso clínico de CME. Prendimiento y prevención de EICH

Diagnóstico	Tipo de trasplante	N.º casos	CME (origen, dosis/kg)	Resultado	Referencia
LMA	HLA-haplo	1	HLA-haplo MO	Buen prendimiento, no EICH	Lee Br Jour Hematol 2002; 118: 1128
Hemopatías malignas	HLA-id MO, SP	31	HLA-id MO $1-2 \times 10^6$	Respecto a controles históricos < EICHa grado II-IV < EICHc > supervivencia no ↑ recidiva	Frassoni EBMT 2002 (Abst 75)
Hemopatías malignas	HLA-id MO, SP	46 (adultos)	HLA-id MO $1-5 \times 10^6$	EICHa grado II-IV 28% EICHc 61%	Lazarus Biol Blood Marrow Transplant 2005; 11: 389
LA, SCID, AA	HLA-id, NE, SCU	7 (adultos y niños)	HLA-haplo MO 1×10^6	EICHa grado II→2, uno desarrolló EICHc Pocas infecciones bacterianas y CMV	Le Blanc Leukemia 2007; 21: 1733
Hemopatías malignas ¹¹ y otras	HLA-haplo SP	14 (niños)	HLA-haplo MO $1-5 \times 10^6$	Respecto a controles históricos EICHa I-II: 14% vs. 26% EICHa III-IV: 0% vs. 4% EICHc: 7% vs. 13% No recidiva, > supervivencia	Ball Blood 2007; 110: 2764
Hemopatías malignas Aleatorizado	HLA-id MO, SP	10 + CME 15 sin CME (adultos)	HLA-id MO $0,03-1,53 \times 10^6$	Prendimiento igual EICHa II-IV: 11,1% vs. 53,3% Recaída: 60% vs. 20%	Ning Leukemia 2008; 22: 593
β-talasemia	Hla-id MO, SP	10	HLA-id, MO $1-2,24 \times 10^6$	No diferencia en EICHa respecto a controles históricos	Ghavamzadeh EBMT 2008 (Abst 657)
Hemopatías malignas	HLA-id, HLA-haplo NE, MO, SP	8	Donante y origen no especificado (¿MO?) ("Trans-Technology") 2×10^6	No EICHa II-IV	Stankevich EBMT 2008 (Abst 1029)
Hemopatías malignas ⁵ y otros	SCU	9 (niños)	HLA-haplo $1-3,3 \times 10^6$	Respecto a controles, no mejor prendimiento No EICHa II-IV vs. 30% No EICHc vs. 5%	Bernardo EBMT 2008 (comunicación oral)
Hemopatías malignas	SCU + c. CD34+ de donante auxiliar (trasplante dual)	9 (adultos)	Donante auxiliar HLA-haplo o incompatible MO $1-2,15 \times 10^6$	Respecto a controles, no mejor prendimiento de la SCU ni < incidencia de EICHa	Gonzalo-Daganzo EBMT 2008 (Abst 1009)

AA: anemia aplásica; LA: leucemia aguda; NE: no emparentados; SCID: síndrome de inmunodeficiencia severa combinada

infección al constituir un reservorio natural. Dos pacientes trasplantados y severamente inmunodeprimidos que recibieron células B19 positivas no desarrollaron viremia ni síntomas de infección. Por último, y debido a su capacidad inmunosupresora, sería importante constatar la ausencia de efectos negativos sobre el efecto antileucemia.

Uso clínico en el trasplante hematopoyético

Prendimiento y prevención de la EICH

Los resultados de varias series se resumen en la Tabla 1. Los primeros ensayos exploraron la seguridad

de la administración de CME autólogas expandidas y los efectos sobre el prendimiento hematopoyético. Actualmente las CME autólogas se utilizan en algunos trasplantes realizados con dosis bajas de progenitores. En un trasplante haploidéntico deplecionado de células T se infundieron CME alogénicas del donante. El prendimiento fue rápido, con buena reconstitución inmune, sin desarrollo de EICH. En 31 trasplantes alogénicos HLA idénticos, $1-2 \times 10^6$ CME/kg de sus donantes acortaron el prendimiento, con baja incidencia de EICH y mejoría de la supervivencia sin aumento de recidivas. La seguridad de la infusión de dosis progresivas de 1 a 5×10^6 CME/kg se exploró en 46 trasplantes de MO y SP. La recuperación hematopoyética fue temprana, sin efectos secundarios, y hubo EICHa mo-

derada severo en un 28%. Se han utilizado CME haploideénticas en 4 de 7 trasplantes familiares y no emparentados (NE) con diagnósticos diversos, con buen prendimiento y poca incidencia de EICH e infecciones, y en una serie pediátrica de 14 trasplantes haploideénticos deplecionados de células T, con una media de $1,6 \times 10^6$ CME/kg generadas con los protocolos desarrollados por el consorcio para la expansión clínica de las CME (Developmental Committee, EBMT). La recuperación leucocitaria fue rápida, sin fallos de prendimiento, frente al 15% en los controles, y sin aumento de la incidencia de infecciones ni efectos adversos, aunque con un seguimiento corto⁹.

En trasplantes de SCU, con los protocolos desarrollados por el consorcio, en 9 pacientes pediátricos con $1,9 \times 10^6$ CME haploideénticas/kg, no hubo efecto sobre el prendimiento ni EICHa de grado II-IV, frente al 30% en los controles, y no aumentaron el rechazo ni las infecciones fatales en el periodo postrasplante precoz. Utilizando también estos protocolos en 9 pacientes adultos, en nuestro modelo de trasplante de SCU "dual" con progenitores hematopoyéticos seleccionados de un donante auxiliar, $1-2 \times 10^6$ CME/kg de estos donantes no han tenido repercusión sobre el prendimiento granulocitario ni plaquetario de la SCU, ni sobre la incidencia de EICHa, sin diferencias en recidiva, supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global con 46 controles.

De especial relevancia por sus resultados es la reciente publicación de un ensayo aleatorizado en hemopatías malignas. Diez pacientes recibieron dosis de CME HLA-idénticas, inferiores a las utilizadas en otros estudios ($0,3-15,3 \times 10^5$ /kg), y 15 no. La incidencia de EICHa de grado II-IV fue del 11,8 y el 53,3% en cada grupo, y la de EICHc, del 14,3 y el 28,6%, respectivamente. El hallazgo más destacable fue la recaída en el 60% de los pacientes en el grupo tratado con CME y en un 20% en los otros pacientes, hecho que obligó a la suspensión del ensayo¹⁰.

Tratamiento de la EICH

Desde el caso publicado por Le Blanc *et al.* de un paciente pediátrico con EICH aguda intestinal y hepática, refractario a diversas líneas de tratamiento, que se resolvió con la administración de dos dosis de CME haploideénticas, hay datos de diversas series, con un número variable de pacientes tratados por EICHa de grado II-IV refractario, con buenos resultados y que se resumen en la Tabla 2. En 8 pacientes con EICHa de grado III-IV y un EICHc, $0,9-9 \times 10^6$ CME/kg de donantes familiares y no relacionados produjeron remisión completa en 6 EICHa, de los que viven 5, y el EICHc mejoró transitoriamente, pero desarrolló un linfoma asociado a EBV. Un paciente con afectación intestinal que falleció 9 días después de la última in-

fusión tenía ADN de sus dos donantes de CME en un ganglio linfático y en el intestino. De 32 pacientes con EICHa resistente a esteroides de grado II-IV, aleatorizados para recibir 2 dosis diferentes de 2 y 8×10^6 CME/kg de un *pool* de donantes no relacionados, obtuvieron respuesta 28 (90%), completa en 21, sin efectos adversos. CME de estas características se han utilizado en 12 niños, con un 50% de respuestas completas. Los datos de 55 pacientes del ensayo interinstitucional en fase II del consorcio del EBMT, tratados con una mediana de $1,4 \times 10^6$ CME/kg obtenidas de 23 donantes familiares idénticos o haploideénticos y de 69 no relacionados HLA-incompatibles, con 1 dosis en 27 casos, 2 en 22, y el resto con 3-5 dosis, han dado 30 respuestas completas y 8 parciales. La respuesta total fue del 69% (80% en niños y 60% en adultos). Hay 3 recidivas y 1 leucemia *de novo*. En las respuestas completas, la tasa de mortalidad al año fue del 37% frente a un 72% en los casos sin respuesta, y la supervivencia global a los 2 años, del 52% frente al 16%. Viven 21 pacientes, 9 con EICHc. Utilizando estos mismos protocolos de generación de CME hemos tratado 4 casos de EICH agudo refractario de grado II-III, 3 en trasplantes no emparentados, 2 SCU y 1 adulto, y 1 trasplante de familiar deplecionado de células T con infusión posterior de una dosis de linfocitos, con respuesta completa en todos los casos con 1-4 dosis y un total de $1,1-4,3 \times 10^6$ CME/kg. También se han obtenido buenos resultados con CME de MO generadas con lisado plaquetario y con CME de tejido adiposo (Tabla 2).

Las CME se han empleado para tratar toxicidad tisular desarrollada durante el acondicionamiento, cistitis hemorrágica, neumomediastino y perforación intestinal, con resolución o mejoría de los síntomas en todos los casos⁴.

Células T reguladoras

Las células T reguladoras (Treg) producen inhibición de la respuesta inmune, con un papel importante en la inducción y el mantenimiento de tolerancia hacia antígenos propios y extraños, incluidos los aloantígenos, mientras que se mantiene una respuesta eficaz frente a infecciones y tumores. Se han caracterizado diversos tipos. Las más relevantes y sobre las que existe más información son las CD4+, denominadas Treg naturales o nTreg, y las Tr1, que forman parte de la respuesta adaptativa inmune. Otras células Treg son las CD4+ Th3, CD8+, dobles negativas CD4 y CD8, y $\gamma\delta$ T.

Células nTreg

Expresan constitutivamente CD25+ y la mayoría se desarrollan en el timo en respuesta a autoantígenos

Tabla 2. Uso clínico de CME. Tratamiento de la EICH

Diagnóstico	Tipo de trasplante/Afectación	Nº casos	CME (origen, dosis/kg)	Resultado	Referencia
LLA	HLA donante, NE, EICHa IV, intestino, hepático	1 (niño)	HLA-haplo MO 1 y 2 × 10 ⁶	Respuesta completa	Le Blanc Lancet 2004; 363: 1439
Hemopatías malignas y Ca próstata	HLA-id, NE compatible; SP y SCU EICHa II-IV, 2 post-ILD y 1 EICHc	9 (adultos y niños)	HLA-id y donantes auxiliares incompatibles, MO 0,7-9 × 10 ⁶	EICHa respuesta completa 6/8 > supervivencia respecto a controles históricos EICHc respuesta transitoria (linfoma EBV)	Ringdén Transplantation 2006; 81: 1390
Ensayo multicéntrico	Donantes familiares y NE; ILD EICHa II-IV intestinal 13, piel 11, ambos 4, hígado e intestino 2	30 (adultos)	CME de donantes auxiliares NE, MO (Prochymal, Osiris) Aleatorizado 2 y 8 × 10 ⁶ ; 2 infusiones	Respuesta global 90%, completa 21 pacientes, parcial en 7 1 recidiva	Kebriaei ASH 2006 (Abst 3231)
Hemopatías malignas	HLA-id familiar y NE EICHa III-IV	6 (adultos)	CME de tejido adiposo, donantes HLA-haplo y NE 1 × 10 ⁶	Respuesta completa 5/6 4 pacientes vivos 1 recidiva	Fang Transplantation Proceedings 2007; 39: 3358
Ensayo multicéntrico	SCU y donantes NE EICHa III-IV todos piel, 6 intestinal + hígado	12 (niños)	CME de donantes auxiliares NE, MO (Prochymal, Osiris) 2 y 8 × 10 ⁶ 3-21 dosis	Respuesta global 100%; completa 6 pacientes Único efecto secundario lesiones ectópicas sin ADN de CME en 1 caso de osteopetrosis	Vinod ASH 2007 (Abst 2971)
Ensayo multicéntrico Consorcio EBMT	EICHa II-IV (III y IV: 50 casos)	55 (adultos y niños)	HLA-id, haplo y donante auxiliar incompatible 0,4-9 × 10 ⁶	Respuesta completa 55% Respuesta global 69%, adultos 60%, niños 80% 3 recidivas y una LMA nueva (receptor)	Le Blanc EBMT 2008 (Abst 750)
Hemopatías malignas	EICHa III-IV	10	CME generadas con lisado plaquetario 0,55-1,1 × 10 ⁶ 2-5 infusiones	Respuesta 7/10 5/7 con afectación hepática 4/9 con afectación intestinal	von Bonin EBMT 2008 (Abst 797)
Hemopatías malignas	HLA-id, haplo y NE MO y SP EICHa y EICHc	9	Donante y origen no especificado (¿MO?) ("Trans-Technology") 2 × 10 ⁶ 1-3 dosis	Respuesta global 85%, completa 3, parcial 3 EICHa, 1 EICHc No efectos adversos	Stankevich EBMT 2008 (Abst 1029)

ILD: infusión de linfocitos de donante; LLA: leucemia aguda linfoblástica; NE: no emparentados

nos. También se pueden generar periféricamente a partir de células CD4+CD25⁻. Ejercen un mecanismo activo o dominante de tolerancia periférica¹¹. En humanos, las nTreg están preferentemente en la fracción CD25^{high}, mientras que en la población con expresión intermedia de CD25 hay además células de memoria y células activadas recientemente. El 96% de las células CD4+CD25^{high} humanas expresan el factor de transcripción específico de la familia Forkhead FOXP3, que se ha relacionado con su desarrollo y función supresora y que también se expresa en el 42% de las CD4+CD25^{dim}¹². En humanos se puede inducir la expresión de FOXP3 en células CD4+CD25⁻ y CD8+CD25⁻ por activación del receptor T, aunque estas células no son

anérgicas ni supresoras *in vitro*. El receptor de IL-7, CD127, tiene una expresión baja o ausente en las nTreg, al igual que en la fase temprana de activación de las células T.

En situación de normalidad representan menos del 5% del *pool* CD4, y los resultados de la cuantificación dependen del tipo de medición (citometría, PCR, etc.) y de la población analizada (linfocitos, CD4). En pacientes con EICH suele detectarse un balance positivo para las células efectoras respecto a las Treg, en comparación con los pacientes sin enfermedad, con actividad funcional normal. La EICH crónica podría relacionarse con una pérdida progresiva de Treg, que se inicia en el EICHa, dando lugar a la expansión de células con fenotipo Th1 y Th17

secretoras de citoquinas. La reducción en la actividad tímica se acompaña de EICHc por reconstitución inadecuada de Treg¹².

Hay muchos trabajos en modelos murinos en los que, además de constatar la relación entre la eliminación de las Treg del injerto y la EICH, se han obtenido resultados variables sobre el control de la misma y datos que pueden ser importantes para su aplicación futura. Las Treg del donante no expandidas previenen la EICH cuando se usan en la misma proporción que las células T del inóculo y en otros casos sólo hay control con la subpoblación CD62L+. Se ha atribuido a las Treg expandidas un efecto supresor mayor, y a las Treg antígeno-específicas, ventajas sobre las policlonales, en la intensidad y duración de la supresión y, al producir menor supresión generalizada, en la reconstitución inmune y el efecto antileucemia. No obstante, en la fase de activación son antígeno-dependientes, pero en la fase efectora-supresora actuarían de forma antígeno-independiente y podrían comprometer algunas respuestas inmunes. Se ha demostrado en ratones que el efecto supresor sobre la EICH respeta el efecto antileucemia y antilinfoma, aunque no en otros modelos de tumor sólido. El momento idóneo de la infusión varía según el modelo experimental. La prevención se ha conseguido con células preactivadas e infundidas en los primeros 2 días postrasplante^{13,14}.

Las nTreg actuarían suprimiendo la proliferación de CD4 y CD8, después de estimulación policlonal y alogénica, de forma contacto-dependiente citoquina-independiente. También suprimen respuestas de células B y dendríticas. No se conocen bien los mecanismos moleculares de la actividad supresora que, *in vitro*, no se modifica con el uso de anti-IL-10 o anti-TGF- β . Sin embargo, se han descrito resultados en modelos animales a favor del mecanismo mediado por citoquinas, así como una posible destrucción directa vía perforina de células T, monocitos y células dendríticas. Hay datos a favor y en contra de la cooperación de estas últimas^{15,16}. En modelos sin linfopenia, las células Treg autoespecíficas proliferan en los órganos linfoides secundarios en interacción con células presentadoras de autoantígenos derivados de tejidos y, una vez activadas, inhiben linfocitos T autoespecíficos de forma antígeno-específica, por mecanismos mediados, al menos en parte, por la unión de CD80 o CD86 y CTLA4 expresado por las Treg. Esta interacción produceIDO con el efecto ya comentado sobre la proliferación de células T. Se han descrito diferencias en la supresión de células CD4 y CD8 que favorecerían la eliminación de líneas leucémicas y una mejor reconstitución inmune si las Treg preactivadas con APC receptoras se interectarán con el injerto¹¹.

Aislamiento y expansión

A partir de los resultados experimentales se ha sugerido la posibilidad de realizar inmunoterapia adoptiva con Treg para profilaxis y tratamiento de EICH. Teóricamente se podrían aislar células antígeno-específicas y expandirlas, o realizar una activación policlonal *ex vivo*, asumiendo la presencia de dichas células en la población basal. En general, las Treg son células anérgicas que necesitan 3 o 4 días de cultivo antes de entrar en fase S y no secretan IL-2, factor esencial para su crecimiento y quizá para su supervivencia. Dada su frecuencia, si la eficacia depende de la utilización de tantas Treg como T efectoras, sería necesario expandirlas, lo que se ha conseguido en algunos sistemas experimentales hasta 3-4 log, siendo importantes las características de la población inicial^{15,17}. La depleción B inmunomagnética de SP humana seguida de selección CD25 bajo normas GMP (*good manufacturing practices*) enriquece 25 veces la fracción CD25^{high}, con una recuperación del 46,5% y valores absolutos de $3 \text{ a } 262 \times 10^6$ células, que expresan intensamente FOXP3 y CTLA-4¹⁸.

La expansión policlonal de los nTreg murinos y humanos se ha realizado con anti-CD3 e IL-2 o con microesferas recubiertas de anti-CD3/CD28 y altas dosis de IL-2 (reactivos de calificación GMP) a partir de una población inicial CD4+CD25+ y a veces CD62L+. Partiendo de células humanas CD4+CD25^{high}, se ha visto que sólo la subpoblación CD45RA+ da lugar a células con expresión homogénea de CD62L, CTLA-4, CCR7 y FOXP3, que no producen citoquinas inflamatorias y mantienen una fuerte actividad supresora. En este trabajo se detectan en la SP de donantes un 42% de células *naïve* dentro de la población CD4+CD25^{high}¹⁹. Si se expanden células CD4+CD25^{high}CD127-, sólo la población CD45RA+CD127- tiene un comportamiento similar al descrito. Por lo tanto, la expansión de células CD45RA+ podría dar lugar a células Treg con características adecuadas para la aplicación clínica, como ya se ha sugerido respecto a la posibilidad de utilizar SCU donde las Treg son en su mayoría de fenotipo *naïve*²⁰. También se ha realizado expansión policlonal utilizando células dendríticas¹⁵ y con IL-4 o IL-15. La estimulación de células CD4+ en presencia de rapamicina enriquece la población CD4+CD25+FOXP3+ por bloqueo de la expansión de las células efectoras¹⁶.

A pesar de su baja frecuencia, se ha conseguido la expansión de Treg antígeno-específicas a partir de poblaciones policlonales, reemplazando el anti-CD3 por péptidos MHC de clase II, con anti-CD28 e IL-2 y con CPA alogénicas irradiadas e IL-2. Si las CPA son del receptor, las Treg serían alorreactivas específicas, y el efecto supresor afectaría a las células alorreac-

vas del donante. A partir de células CD4+CD25- estimuladas con anti-CD3 en presencia de CPA pulsadas con péptido se han obtenido células CD4+CD25+FOXP3+, de las que se pueden aislar Treg específicas mediante tetrámeros HLA de clase II¹⁵. Otras posibilidades de expansión, que incluyen modificaciones genéticas, se han revisado en detalle¹⁷, así como posibles estrategias de modulación *in vivo*, que pueden aumentar o disminuir la cifra de Treg¹².

Células Tr1

Estas células son inducidas a partir de células *naïve* en la periferia *in vivo* y también *in vitro* por un proceso IL-10 dependiente. Tienen un patrón único de secreción de citoquinas, niveles altos de IL-10, TGF- β e IL-5, bajo nivel de IFN- γ e IL-2 y no secretan IL-4, aunque el perfil puede variar con las condiciones experimentales. Constitutivamente no expresan CD25 ni FOXP3, y tampoco los expresan en niveles altos las generadas *in vitro*¹⁶. Hay trabajos que relacionan una menor incidencia de EICH con niveles altos de IL-10 en el plasma de pacientes con donantes HLA incompatibles y detectan células T del donante específicas para antígenos del receptor secretoras de IL-10.

Las células Tr1 regulan la respuesta inmune mediante la secreción de citoquinas inmunosupresoras IL-10 y TGF- β y suprimen las células T *naïve* y de memoria *in vivo* e *in vitro*, así como las células dendríticas, disminuyendo la expresión de moléculas coestimuladoras y la producción de citoquinas. Al igual que las células nTreg, las células Tr1 específicas activadas vía TRC pueden ejercer su acción frente a otros antígenos. También se han descrito mecanismos de actuación vía granzima B/perforina para células Tr1 generadas *in vitro*¹⁶. Lo más probable es que *in vivo* existan diversas formas de actuación, que dependerían de si se trata de controlar el inicio de una respuesta o a células T ya activadas, de las citoquinas ambientales o de la patología de base. También puede ser que el momento de actuación sea precoz para las células nTreg y más tardío para las Tr1.

Expansión y generación

Se han descrito diferentes métodos de diferenciación y generación *in vitro* de células Tr1 específicas mediante la estimulación del TCR en presencia de altas dosis de IL-10, con vitamina D₃ y dexametasona, que inducirían producción autocrina de IL-10, en CML en presencia de IL-10 y TGF- β y CPA artificiales con expresión de CD58 y CD80 en presencia de TNF- α , entre otros. Se han generado células Tr1 aloantígeno-específicas estimulando con CD inmaduras, con monocitos alogénicos irradiados en presencia de IL-

10 y utilizando CD tolerogénicas mieloides obtenidas por tratamiento con citoquinas inmunomoduladoras (IL-10, TGF- β , TNF- α , IFN- α) en presencia de IL-2 y también empleando CD plasmocitoides. En modelos murinos se pueden inducir *in vivo* por la administración conjunta de IL-10 y rapamicina¹⁶.

Protocolos clínicos

Los datos publicados sobre protocolos clínicos con células Treg son aislados. En un ensayo en fase I del que no se han publicado resultados, se están utilizando nTreg frescas no expandidas para la prevención de EICH, siguiendo los sistemas de selección inmunomagnética mencionados. Otro ensayo en trasplantes haploidenticos emplea células Tr1 del donante tolerizadas tras incubación con células de SP del receptor irradiadas en presencia de IL-10. Se infunden 15 días después de alcanzar el prendimiento, comenzando por dosis de 1×10^5 /kg. Los resultados preliminares no han mostrado efectos adversos; de 6 pacientes sólo 2 desarrollaron EICH de grado > II, los cuales respondieron al tratamiento inmunosupresor. El mismo grupo tiene otros protocolos en fase de diseño para generar Tr1 con células del donante incubadas con células dendríticas del receptor tolerizadas con IL-10 o para generar nTreg con anti-CD3/CD28, rapamicina e IL-2 y utilizarlas también en trasplante haploidentico^{16,18}.

Conclusiones

Los resultados de la inmunoterapia celular para prevenir y tratar la EICH son esperanzadores, sobre todo en el tratamiento de la EICHa refractaria. Sin embargo, aún quedan por resolver muchas cuestiones de orden técnico y práctico para lograr poblaciones celulares eficaces y biológicamente seguras. Un aspecto muy importante y pendiente de aclaración es si existe repercusión sobre la respuesta inmune antileucémica y antiinfecciosa. Para ello es necesario trabajar con protocolos estandarizados y dentro de ensayos diseñados por los grupos de trabajo de organizaciones e instituciones científicas, teniendo en cuenta los datos que aporta la investigación básica y el rigor que debe caracterizar a la investigación y a la práctica clínicas.

Bibliografía

1. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-7.
2. Giordano A, Galderisi U, Marino IR. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials

- with mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2007; 211: 27-35.
3. Locatelli F, Maccario R, Frassoni F. Mesenchymal stromal cells, from indifferent spectators to principal actors. Are we going to witness a revolution in the scenario of allograft and immune-mediated disorders? *Haematologica* 2007; 92: 872-7.
 4. Le Blanc K, Ringdén O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Int Med* 2007; 262: 509-25.
 5. Satija NK, Gurudutta GU, Sharma S, Afrin F, Gupta P, Verma YK, et al. Mesenchymal stem cells: molecular targets for tissue engineering. *Stem Cells Dev* 2007; 16: 7-23.
 6. Barry FP, Murphy JM, English K, Mahon BP. Immunogenicity of adult mesenchymal stem cells: lessons from the fetal allograft. *Stem Cells Dev* 2005; 14: 252-65.
 7. Bernardo ME, Avanzini MA, Perotti C, Cometa AM, Moretta, Lenta E, et al. Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-therapy approaches: further insights in the search for a fetal calf serum substitute. *J Cell Physiol* 2007; 211: 121-30.
 8. Sundin M, Örvell C, Rasmusson I, Sundberg B, Ringdén O, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells are susceptible to human herpesviruses, but viral DNA cannot be detected in the healthy seropositive individual. *Bone Marrow Transplant* 2006; 37: 1051-9.
 9. Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H, Lankester A, Cometa A, Egeler RM, et al. Cotransplantation of ex vivo-expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2007; 110: 2764-7.
 10. Ning H, Yang F, Jiang M, Hu L, Feng K, Zhang J, et al. The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study. *Leukemia* 2008; 22: 593-9.
 11. Joffre O, van Meerwijk JPM. CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes in bone marrow transplantation. *Sem Immunol* 2006; 18: 128-35.
 12. Zorn E. CD4+CD25+ regulatory T cells in human hematopoietic cell transplantation. *Sem Cancer Biol* 2006; 16: 150-9.
 13. Salomon BL, Sudres M, Cohen JL. Regulatory T cells in graft-versus host disease. *Springer Semin Immunol* 2006; 28: 25-9.
 14. Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, Drago K, Fathman CG, Strober S, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med* 2003; 9: 1144-50.
 15. Masteller EL, Tang Q, Bluestone A. Antigen specific regulatory T cells ex vivo expansion and therapeutic potential. *Sem Immunol* 2006; 18: 103-10.
 16. Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bachetta R, Fleischhauer K, Levings MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 2006; 212: 28-50.
 17. June CH, Blazar BR. Clinical application of expanded CD4+CD25+ cell. *Sem Immunol* 2006; 18: 78-88.
 18. Hoffmann P, Boeld TJ, Eder R, Albrecht J, Doser K, Piseshka B, et al. Isolation of CD4+CD25+ regulatory T cells for clinical trials. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12: 267-74.
 19. Hoffmann P, Eder R, Boeld TJ, Doser K, Piseshka B, Andreesen R, et al. Only the CD45RA+ subpopulation of CD4+CD25high cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines upon in vitro expansion. *Blood* 2006; 108: 4260-7.
 20. Fritzsching B, Oberle N, Pauly E, Geffers R, Buer J, Poschi J, et al. Naive regulatory T cells: a novel subpopulation defined by resistance toward CD95L-mediated cell death. *Blood* 2006; 108: 3371-8.

DONOR NATURAL KILLER CELL ALLORECOGNITION OF MISSING SELF IN MISMATCHED HEMATOPOIETIC TRANSPLANTATION: FROM EXPERIMENTAL MODELS TO CLINICAL TRANSPLANTS

L. RUGGERI, A. MANCUSI, M. CAPANNI, E. BURCHIELLI, E. URBANI, F. AVERSA, M.F. MARTELLI, A. VELARDI

Hematology and Clinical Immunology. Department of Clinical and Experimental Medicine. University of Perugia, Italy

Abstract

Although transplantation from HLA-identical siblings is the treatment of choice for patients with acute leukemia, 75% of patients do not have such a brother or sister. Consequently, other sources of hematopoietic stem cells today include matched unrelated volunteers, unrelated umbilical cord blood units and full-haplotype mismatched (haploidentical) family members.

Until the early 1990s, transplantation across the HLA barrier was unsuccessful because T cell mediated alloreactions in the host-versus-graft (HvG) direction caused rejection and in the graft-versus-host (GvH) direction caused fatal GvHD because alloreactive donor T cells recognize HLA antigens on recipient.

In acute leukemia patients, rejection and lethal GvHD after haploidentical transplantation were successfully overcome by means of a highly immunosuppressive and myeloablative conditioning regimen and a 'megadose' of extensively T cell depleted granulocyte-colony stimulating factor mobilized peripheral blood progenitor cells.

Since haploidentical transplants relies for its success on extensive T cell depletion, T cell alloreactivity plays a minimal role for engraftment and the graft versus leukaemia (GVL) effect, but natural killer cell alloreactivity is triggered and has been associated with beneficial effects.

Recent studies using pre-clinical murine models of haploidentical transplantation demonstrated infusion of alloreactive NK cells as part of the conditioning regimen ablates the recipient immune system and leukemia cells. In the clinical setting of mismatched haematopoietic stem cell transplantation, donor-vs-recipient NK cell alloreactivity has been associated with reduction of leukemia relapse and improvement of survival, particularly in patients with acute myeloid leukemia who are transplanted in remission.

Introduction

Allogeneic HLA-matched haematopoietic cell transplantation cures leukemia through alloreactions mediated by donor T cells in the graft which result in rapid engraftment, a relatively low risk of fatal GVHD, and successful development of immune tolerance and immune reconstitution¹. Although transplantation from HLA-identical siblings is treatment of choice, 75% of patients do not have such a brother or sister. Consequently, other sources of haematopoietic stem cells today include matched unrelated volunteers, unrelated umbilical cord blood units and full-haplotype mismatched (haploidentical) family members².

Haploidentical transplants, which have been developed in the past decade, exploit the principle that nearly every patient has a family member (parent, child, sibling, cousin, aunt, uncle), who is identical for one HLA haplotype (haploidentical) and fully mismatched for the other, and who could immediately serve as donor. The major obstacles to haploidentical transplantation are T cell mediated alloreactions in the host-versus-graft (HvG) direction, which cause rejection, and in the graft-versus-host (GvH) direction, which cause GvHD. Until the early 1990s, transplantation across the HLA barrier was unsuccessful because alloreactive donor T cells recognizing HLA antigens on recipient cells caused a high incidence of fatal GvHD. However, in patients with severe combined immunodeficiency (SCID) who received transplants from haploidentical family members several clinical trials demonstrated that extensive *ex vivo* T cell depletion of bone marrow to a maximum of $2-4 \times 10^4$ T cells/kg body weight prevents acute and chronic GVHD without any post-transplant immunosuppressive prophylaxis³. Unfortunately, when tested in leukemia patients, haploidentical T cell-depleted bone marrow transplantation was associated with a high incidence of rejection because the balance between competing recipient and donor T cells shifted in favor of the unopposed host vs graft reaction.

In acute leukemia patients a highly immunosuppressive and myeloablative conditioning regimen and a “megadose” of extensively T cell depleted G-CSF mobilized peripheral blood progenitor cells successfully overcame the obstacles of rejection and lethal GvHD. Already in the earliest series primary sustained engraftment was achieved in >90% of end-stage patients and acute (> grade I) GVHD occurred in <10%^{4,6}. These excellent results were subsequently confirmed in later reports⁷.

Since T cells must be removed from the graft, haploidentical transplants do not rely on T cell alloreactivity for engraftment and the graft vs leukaemia

(GVL) effect. Mismatched transplantation triggers alloreactivity mediated by NK cells which has been associated with beneficial effects⁸. In haploidentical transplants that are KIR ligand mismatched in the GvH direction, donor NK cells that express, as their sole inhibitory receptor, a KIR for the self HLA class I group which is absent in the recipient, sense the missing expression of the self class I ligand and mediate alloreactions (“missing self” recognition)⁹. This paper will explore NK cell alloreactivity in murine transplant models and in clinical stem cell transplantation for acute leukaemia.

Biology of human NK cell alloreactivity

Signals delivered through several different activating receptors prime natural killer cells to kill^{10,11}. However, autologous killing is prevented because each natural killer cell co-expresses at least one inhibitory receptor for self-HLA class I molecules. Several years ago an inverse correlation between expression of surface HLA class I molecules on target cells and susceptibility to natural killer cell-mediated lysis suggested HLA molecules protect self cells from natural killer cell-mediated lysis. Lack of expression of self HLA molecules on target cells results in susceptibility to natural killer cell-mediated lysis (“missing self” recognition).

Human NK cells discriminate between allelic forms of HLA molecules via inhibitory Killer cell Ig-like Receptors (KIRs). KIRs are specific for epitopes that are shared by HLA class I alleles, i.e. group 1 and group 2 HLA-C alleles, and HLA-Bw4 alleles (Table 1)¹⁰⁻¹¹.

Although HLA and KIR genes are inherited independently, most individuals possess KIR genes for receptors that inhibit NK killing when they recognize the 3 major class I ligands¹².

In the 198 individuals screened for KIR genotyping in Perugia Centre, 97% bore KIR2DL1, which is the receptor for HLA-C group 2 alleles; 100% expressed KIR2DL2/3 receptors, which are specific for HLA-C group 1 alleles, and 90% bore KIR3DL1, which is the receptor for HLA-Bw4 alleles¹², and A. Mancusi (unpublished observations).

During development of the NK-cell receptor repertoire the HLA class I genotype imposes selection by dictating which KIRs are to be used as inhibitory receptors for self HLA class I. The HLA class I genotype on the NK-cell KIR repertoire also determines the frequencies of cells expressing a given KIR¹³. NK cells that do not express an inhibitory KIR for self HLA class I express the CD94-NKG2A inhibitory receptor complex, which fills the gaps in the KIR repertoire. Alloreactive NK cells are not found among CD94-NKG2A positive NK cells because HLA-E, the

Table 1. Inhibitory KIRs and their ligands

KIR	KIR ligands
KIR2DL1	HLA-C group 2 (-Cw2, -Cw4, -Cw5, -Cw6, etc.) (Lys80)
KIR2DL2/3	HLA-C group 1 (-Cw1, -Cw3, -Cw7, -Cw8, etc.) (Asn80)
KIR3DL1	HLA-Bw4 alleles

ligand for this receptor, is expressed on cells from all individuals¹⁰⁻¹¹.

Thus, in every individual NK cell gene expression of CD94/NKG2 receptors and KIRs generates the NK cell repertoire. As KIRs are clonally distributed, each cell in the repertoire bears a different receptor or, less frequently, two or more receptors, and every functional NK cell expresses at least one receptor that is specific for self HLA class I molecules (because the individual's HLA selects the self-tolerant repertoire). Consequently, when faced with mismatched allogeneic targets, NK cells in the repertoire sense the missing expression of self HLA class I alleles and mediate alloreactions.

In haploidentical transplants that are killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) ligand mismatched in the GvH direction, donor natural killer cells that express, as their sole inhibitory receptor, a KIR for the self HLA class I group which is absent in the recipient, sense the missing expression of the self class I ligand and mediate alloreactions ("missing self" recognition). Triggering of NK cell effector functions depends upon engagement of activating receptors, NKG2D and natural cytotoxicity receptors (NCRs)¹⁴⁻¹⁷.

Finally, NK cell activation can be mediated by activating KIR variants¹⁸.

Pre-clinical data: NK cell alloreactivity and haploidentical transplantation

In mice also a fine balance between inhibitory and activating signals regulates NK cell killing. The hybrid resistance transplant model illustrated that NK cell alloreactions in the HvG direction use inhibitory Ly49 molecules which bind primarily MHC class I ligands¹⁹ to mediate rejection of bone marrow grafts and to recognize allogeneic lympho-hematopoietic cells *in vivo*. As the hybrid recipient mouse tolerates skin and organ allografts, NK cell alloreactivity appears to be restricted to lympho-hematopoietic targets²⁰⁻²³.

When the hybrid resistance partners are reversed the *in vivo* effects of NK cell alloreactivity hold true in

the graft versus host direction⁸. In F1 H-2d/b→parent H-2b transplants, donor T cells are tolerant of recipient MHC. Donor NK cells that do not express the H-2b-specific Ly49C/I inhibitory receptor but bear H-2d-specific Ly49A/G2 receptors, are activated to kill recipient targets.

In haploidentical transplant mouse models after host immune suppression, pre-transplant infusion of donor-vs-recipient alloreactive NK cells home to all lympho-hematopoietic sites and ablate recipient-type lympho-hematopoietic cells within 48 hours⁸. Lack of NK-mediated attack on normal tissues indicates that healthy organ tissues, unlike lympho-hematopoietic cells, do not express ligands at a sufficient level to engage activating NK cell receptors and so alloreactive NK cells do not cause GvHD. Alloreactive NK cells kill recipient T cells which mediate rejection, improving engraftment with low-intensity conditioning regimen, they eliminate recipient dendritic cells, which initiate GvHD by presenting host alloantigens to donor T cells²⁴ and prevent T cell-mediated GvHD^{8,25} and, in fact, these mice can be given mismatched bone marrow grafts containing up to 30 times the lethal dose of allogeneic T cells without clinical or histological evidence of GvHD⁸.

Transfer of NK cells into non-obese diabetic (NOD/SCID) mice eradicated transplanted human AML provided that the NK cells were alloreactive⁸ (Figure 1).

Clinical data: donor-vs-recipient NK cell alloreactivity in haploidentical transplants

In HLA (KIR ligand) mismatches donor NK cell clones killed cryopreserved hematopoietic recipient cells, including leukemic cells and in blood samples from transplant recipients engrafted stem cells from NK alloreactive donors gave rise to an NK cell repertoire which included donor-vs-recipient alloreactive NK clones. These killed cryopreserved leukemic cells from the recipient²⁴.

In 57 acute myeloid leukemia (AML) patients at high risk of relapse, donor-vs-recipient NK cell alloreactivity reduced the risk of leukemia relapse, improved engraftment and protected against GvHD⁸.

An updated analysis of 112 haploidentical transplants for high-risk AML performed at the Perugia Bone Marrow Transplant Centre provided definitive evidence that transplantation from NK alloreactive donors controlled acute myeloid leukemia relapse and improved event-free survival. It was associated with a significantly lower relapse rate in patients transplanted in complete remission (3% vs 47%) ($p > 0.003$), better event-free survival in patients transplanted in relapse (34% vs 6%; $p = 0.04$) and in remission (67% vs 18%; $p = 0.02$) (Figure 2)²⁶.

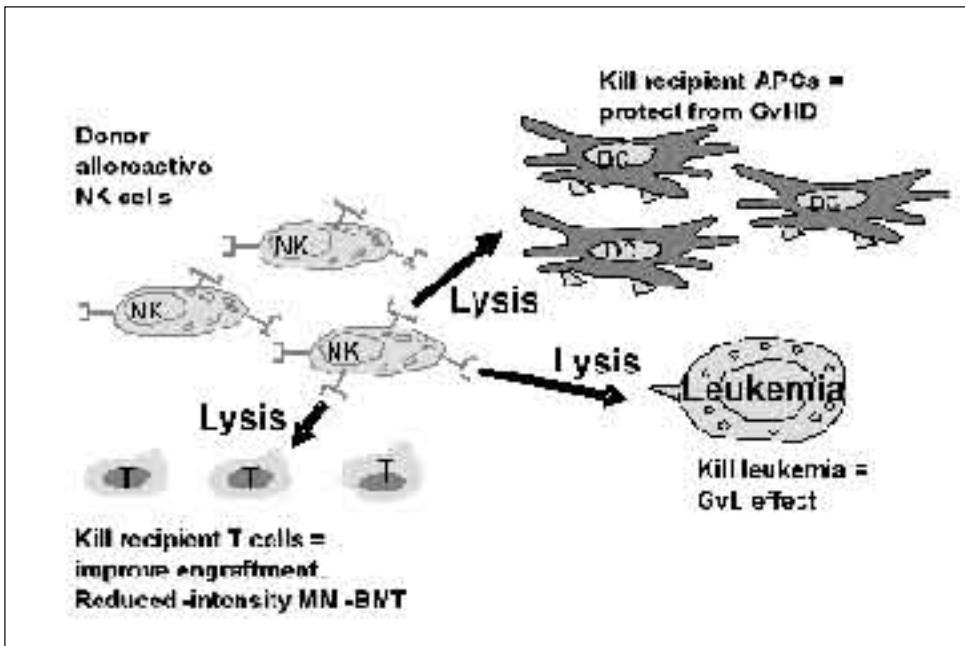


Figure 1. Mouse models: *in vivo* immune-ablation due to pre-transplant infusion of donor-vs-recipient alloreactive NK cells after host immune suppression. Alloreactive NK cells home to all lympho-hematopoietic sites in the recipient mouse and quickly ablate lympho-hematopoietic cells: residual leukemic cells, recipient T and antigen presenting cells.

In multivariate analyses, transplantation from an NK alloreactive donor was a strong independent factor predicting survival (transplantation from NK alloreactive versus non-NK alloreactive donor: hazard ratio = 0.44; 95% confidence interval = 0.25-0.77; $p = 0.004$)²⁶.

One consequence of the haploidentical transplant studies is revision of current criteria for donor selection to include the candidate who is able to mount donor-vs-recipient NK cell alloreactivity. The search for NK alloreactive donors raises the random 30% chance of finding an NK alloreactive donor to > 60%, which is practically the maximum as about

30% of the population are resistant to alloreactive NK killing²⁷.

Clinical data: donor-vs-recipient NK cell alloreactivity in unrelated-donor transplants

NK cell alloreactivity may occur in unrelated-donor transplants because approximately 50% have one or more HLA allele-level mismatches. Although several retrospective studies show controversial results about transplantation from donors with potential to exert NK cell alloreactivity²⁸⁻³² differences in pro-

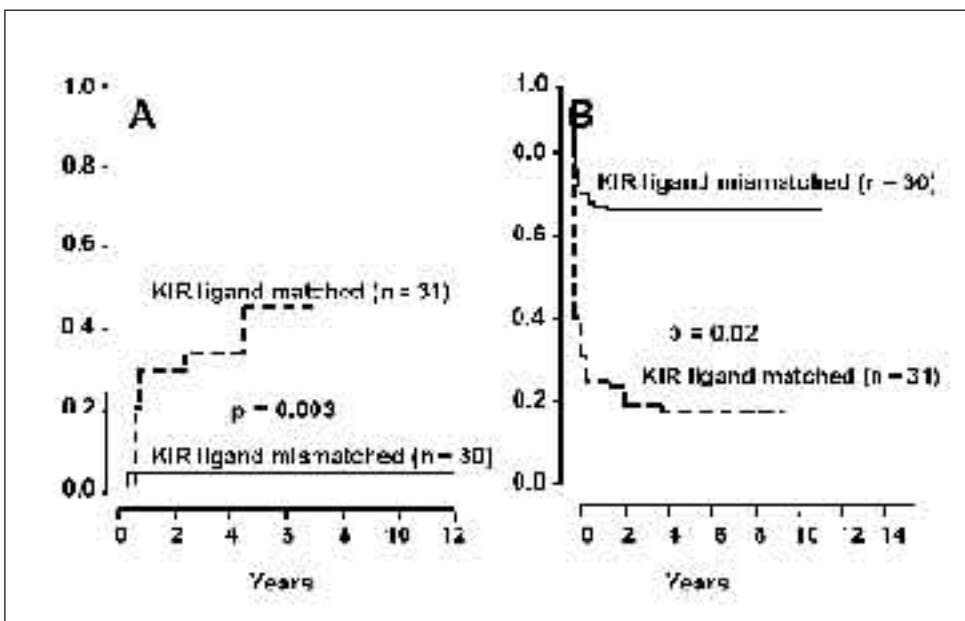


Figure 2. Clinical haploidentical transplantation: high-risk patients with AML were transplanted in remission from haploidentical donors who were able ("allo NK") or unable ("non-allo NK") to generate donor-vs-recipient NK alloreactions. Probability of relapse (panel A) and of event-free survival (panel B) were significantly better in the allo-NK group.

protocols, patient populations, underlying diseases (including ALL which is resistant to alloreactive NK killing), conditioning regimens, graft composition, and post-transplant immunosuppressive regimens probably account for the discrepancies. Furthermore, none of these reports assessed donor-vs-recipient NK cell alloreactivity in cytotoxicity assays or KIR genotyped the donors.

Unrelated-donor transplants generally use heterogeneous transplant protocols, which differ from the haploidentical. Unmanipulated bone marrow harvests (or, less frequently, peripheral blood progenitors) often contain ~4 log more than T cells and up to 1 log fewer stem cells than haploidentical grafts. As unrelated donor transplants are not usually T-depleted, they depend on post-transplant immune suppression to help prevent and/or control GvHD. The relatively few transplanted stem cells combined with post-transplant immune suppression adversely affect NK cell maturation from their bone marrow precursors.

Interestingly, an NK alloreactivity-related survival advantage was observed in patients who received ATG pre-transplant (which provided *in vivo* T cell depletion) and a graft containing 2-3-fold more nucleated cells than usual in unrelated-donor transplants³³.

Conclusions

The role of NK cell alloreactivity is being explored *in vivo* in the haploidentical transplant setting where it has already been associated with a strong GvL effect, no increase in the incidence of GvHD and better survival. As donors who are able to exert NK alloreactions in the GvH direction can be found for over half of the patients requiring haploidentical transplantation, it is expected that the benefits of NK cell alloreactivity will encourage greater use of haploidentical transplants for the large numbers of leukemia patients without matched donors. Findings about NK cell alloreactivity in haploidentical transplants have already encouraged applying it beyond the field of transplantation and preliminary studies indicate donor alloreactive NK cells may successfully be given as adoptive immunotherapy for cancer.

Acknowledgements

This presentation is based on studies supported by grants from the Italian Association for Cancer Research, the Italian Ministry of Further Education and the Italian Ministry of Health, by a Translational Research Grant from the Leukemia and Lymphoma Society, by the European Community "Allostem" Project (Contract number: 503349) and by the National Institutes for Health of the USA (Project Number 1 PO1 CA 100265-01A1). L.R. is the re-

ipient of a Leukemia and Lymphoma Society Special Fellowship in Clinical Research. The authors would like to thank Dr. Geraldine A. Boyd for help in editing the manuscript.

References

1. Blume KG, Forman SJ, Appelbaum FR. Hematopoietic cell transplantation. 3rd ed. Malden, MA: Blackwell Science; 2004.
2. Atkinson K, Fibbe W, Champlin R, Ritz J, Ljungman P, Brenner MK (eds.). Clinical bone marrow and blood stem cell transplantation. 3rd ed. Cambridge University Press; 2004.
3. Buckley RH, Schiff SE, Schiff RI, Markert L, Williams LW, Roberts JL, et al. Hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of severe combined immunodeficiency. *New Engl J Med* 1999; 340: 508-16. [This paper summarizes results in haploidentical transplants.]
4. Aversa F, Tabilio A, Terenzi A, Velardi A, Falzetti F, Giannoni C, et al. Successful engraftment of T-cell-depleted haploidentical "three-loci" incompatible transplants in leukemia patients by addition of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells to bone marrow inoculum. *Blood* 1994; 84: 3948-55.
5. Aversa F, Tabilio A, Velardi A, Cunningham I, Terenzi A, Falzetti F, et al. Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *New Engl J Med* 1998; 339: 1186-93.
6. Anasetti C, Velardi A. Hematopoietic cell transplantation from HLA partially matched related donors. In: Blume KG, Forman SJ, Appelbaum FR (eds.). Hematopoietic Cell Transplantation. 3rd ed. Malden, MA: Blackwell Science; 2004.
7. Aversa F, Terenzi A, Tabilio A, Falzetti F, Carotti A, Ballanti S, et al. Full haplotype-mismatched hematopoietic stem-cell transplantation: a phase II study in patients with acute leukemia at high risk of relapse. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3447-54.
8. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002; 295: 2097-100.
9. Ljunggren HG, Kärre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990; 11: 237-44.
10. Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* 2002; 100: 1935-47.
11. Velardi A, Ruggeri L, Moretta A, Moretta L. NK-cells: a lesson from mismatched haematopoietic transplantation. *Trends Immunol* 2002; 23: 438-44.
12. Ruggeri L, Capanni M, Mancusi A, et al. Impact of NK cell alloreactivity on mismatched haematopoietic transplantation: an update on donor selection criteria and on transplantation outcomes. *Bone Marrow Transpl* 2004; 33: S68.
13. Shilling HG, Young N, Guethlein LA, Cheng NW, Gardiner CM, Tyan D, Parham P. Genetic control of human NK cell repertoire. *J Immunol* 2002; 169: 239-47.
14. Moretta A, Biassoni R, Bottino C, Mingari MC, Moretta L. Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK cell-mediated cytotoxicity. *Immunol Today* 2000; 21: 228-34.
15. Wu J, Song Y, Bakker AB, Bauer S, Spies T, Lanier LL, Phillips JH. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 1999; 285: 730-2.
16. Jamieson AM, Diefenbach A, McMahon CW, Xiong N, Carlyle JR, Raulet DH. The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity* 2002; 17: 19-29.

17. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, et al. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 197-223.
18. Moretta A, Sivori S, Vitale M, Pende D, Morelli L, Augugliaro R, et al. Existence of both inhibitory (p58) and activating (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells. *J Exp Med* 1995; 182: 875-84.
19. Dimasi N, Moretta L, Biassoni R. Structure of the Ly49 family of natural killer (NK) cell receptors and their interaction with MHC class I molecules. *Immunol Res* 2004; 30 (1): 95-104.
20. Cudkovic G, Bennett M. Peculiar immunobiology of bone marrow allografts. II. Rejection of parental grafts by resistant F1 hybrid mice. *J Exp Med* 1972; 135: 1028-36.
21. Murphy WJ, Kumar V, Bennett M. Rejection of bone marrow allografts by mice with severe combined immune deficiency (SCID). Evidence that natural killer cells can mediate the specificity of marrow graft rejection. *J Exp Med* 1987; 165: 1212-7.
22. Yu YY, George T, Dorfman JR, Roland J, Kumar V, Bennett M. The role of Ly49A and 5E6(Ly49C) molecules in hybrid resistance mediated by murine natural killer cells against normal T cell blasts. *Immunity* 1996; 4: 67-76.
23. Ogasawara K, Benjamin J, Takaki R, Phillips JH, Lanier LL. Function of NKG2D in natural killer cell-mediated rejection of mouse bone marrow grafts. *Nature Immunol* 2005; 6: 938-45.
24. Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, McNiff J, Robert ME, Liu J, et al. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* 1999; 285: 412-5.
25. Mackall CL, Hakim FT, Velardi A. The immune system in graft-vs.-host disease: target and effector organ. In: Ferrara JLM, Cooke KR, Deeg J (eds.). *Graft vs. Host Disease*. 3rd ed. Marcel Dekker; 2004: 195-227.
26. Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, Volpi I, Tosti A, Perruccio K, et al. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 1999; 94: 333-9.
27. Caligiuri MA, Velardi A, Scheinberg DA, Borrello IM. Immunotherapeutic approaches for haematological malignancies. In: *Hematology 2004, ASH Education Program Book*. Washington, WA: American Society of Hematology; 2004. p. 337-53.
28. Davies SM, Ruggieri L, DeFor T, Wagner JE, Weisdorf DJ, Miller JS, et al. Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. Killer immunoglobulin-like receptor. *Blood* 2002; 100: 3825-7.
29. Lowe EJ, Turner V, Handgretinger R, Horwitz EM, Benaim E, Hale GA, et al. T-cell alloreactivity dominates natural killer cell alloreactivity in minimally T-cell-depleted HLA-non-identical paediatric bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 2003; 123: 323-6.
30. Morishima Y, Yabe T, Inoko H. Clinical significance of killer Ig-like receptor (KIR) on acute GvHD, rejection and leukemia relapse in patients transplanted non-T cell depleted marrow from unrelated donors; roles of inhibitory KIR epitope matching and activating KIR genotype. *Blood* 2003; 102: 526a.
31. Elmaagacli AH, Ottinger H, Koldehoff M. Reduced risk of molecular and haematological relapse in patients with CML after KIR-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33: S59.
32. Bornhäuser M, Schwerdtfeger R, Martin H, Frank KH, Theusser C, Ehninger G. Role of KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation using unrelated donors. *Blood* 2004; 103: 2860-1.
33. Giebel S, Locatelli F, Lamparelli T, Velardi A, Davies S, Frumento G, et al. Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood* 2003; 102: 814-9.

ADOPTIVE IMMUNOTHERAPY AFTER ALLO-SCT

H. EINSELE
Würzburg, Germany

MANUSCRITO NO RECIBIDO

Síndromes mieloproliferativos poco frecuentes

COORDINADOR: J.C. HERNÁNDEZ BOLUDA. *Valencia*

Resumen del simposio

En los últimos años se han producido importantes avances en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la patogenia de los síndromes mieloproliferativos crónicos (SMPC). Dichos avances se han acompañado de la incorporación de nuevos agentes terapéuticos que, en algunos casos, han modificado por completo el curso natural de la enfermedad, como en la leucemia mieloide crónica o en las eosinofalias asociadas al reordenamiento del receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR).

El presente simposio tiene como objetivo repasar los aspectos más novedosos de los SMPC “atípicos o poco frecuentes”, tanto en sus vertientes del diagnóstico molecular como de su tratamiento. En primer lugar, el Dr. Cross realizará una revisión general del papel que tiene la desregulación de las tirosincinasas en la patogenia de los SMPC cromosoma Filadelfia (Ph) negativos, analizando asimismo la relación de las distintas alteraciones con los fenotipos clínicos de la enfermedad y su potencial aproximación terapéutica. Por otro lado, el Dr. Reiter expondrá el estado actual de los síndromes hipereosinofílicos, detallando el abordaje diagnóstico de estas entidades y los resultados obtenidos con imatinib y diversos anticuerpos monoclonales. Por su parte, el Dr. Escribano, en representación de la Red Española de Mastocitosis (REMA), resumirá el manejo actual de las mastocitosis, repasando su clasificación y criterios diagnósticos, así como su pronóstico y tratamiento.

Por último, se han incluido en el simposio dos comunicaciones al congreso que tratan de profundizar en el conocimiento de la patogenia de los SMPC Ph-negativos. En una de ellas, presentada por el Dr. Martínez-López, del Hospital 12 de Octubre (Madrid), se investigan los mecanismos moleculares implicados en la trombocitemia esencial con gen JAK2 germinal, a partir de un análisis de microarrays de oligonucleótidos. Para acabar, el Dr. Martín-Cabrera, del Hospital Dr. Negrín de Gran Canaria, expondrá los resultados obtenidos del estudio de expresión del gen EVI-1 en una serie de pacientes con SMPC Ph-negativos.

DEREGULATED TYROSINE KINASES AS THERAPEUTIC TARGETS IN *BCR-ABL* NEGATIVE ATYPICAL CHRONIC MYELOPROLIFERATIVE DISORDERS

N.C.P. CROSS¹, A. REITER²

¹Wessex Regional Genetics Laboratory, University of Southampton, Salisbury, UK.

²III. Medizinische Universitätsklinik, Medizinische Fakultät der Universität Heidelberg, Mannheim, Germany

polycythaemia vera (PV) or primary myelofibrosis (PMF). Atypical MPDs are highly heterogeneous and span the current WHO subgroups of chronic MPDs and myelodysplastic/myeloproliferative disorders (MDS/MPD)¹. Specific WHO-defined entities within the umbrella term of atypical MPDs include atypical CML (aCML), chronic neutrophilic leukaemia (CNL), chronic eosinophilic leukaemia (CEL), chronic myelomonocytic leukaemia (CMML), CMPD-unclassified and MDS/MPD-unclassified. Many people would also include systemic mastocytosis (SM) under the same category.

Introduction

“Atypical myeloproliferative disorders (MPD)” is an umbrella term for a spectrum of myeloproliferative disorders that cannot be categorised as one of the four “classic” MPDs: chronic myeloid leukaemia (CML), essential thrombocythaemia (ET),

Chromosomes and fusion genes

The vast majority of patients with atypical MPDs present with a normal or aneuploid karyotype, i.e. gains or losses of whole chromosomes. However a small subset of patients (perhaps 1%) harbour reciprocal chromosomal translocations, some of which

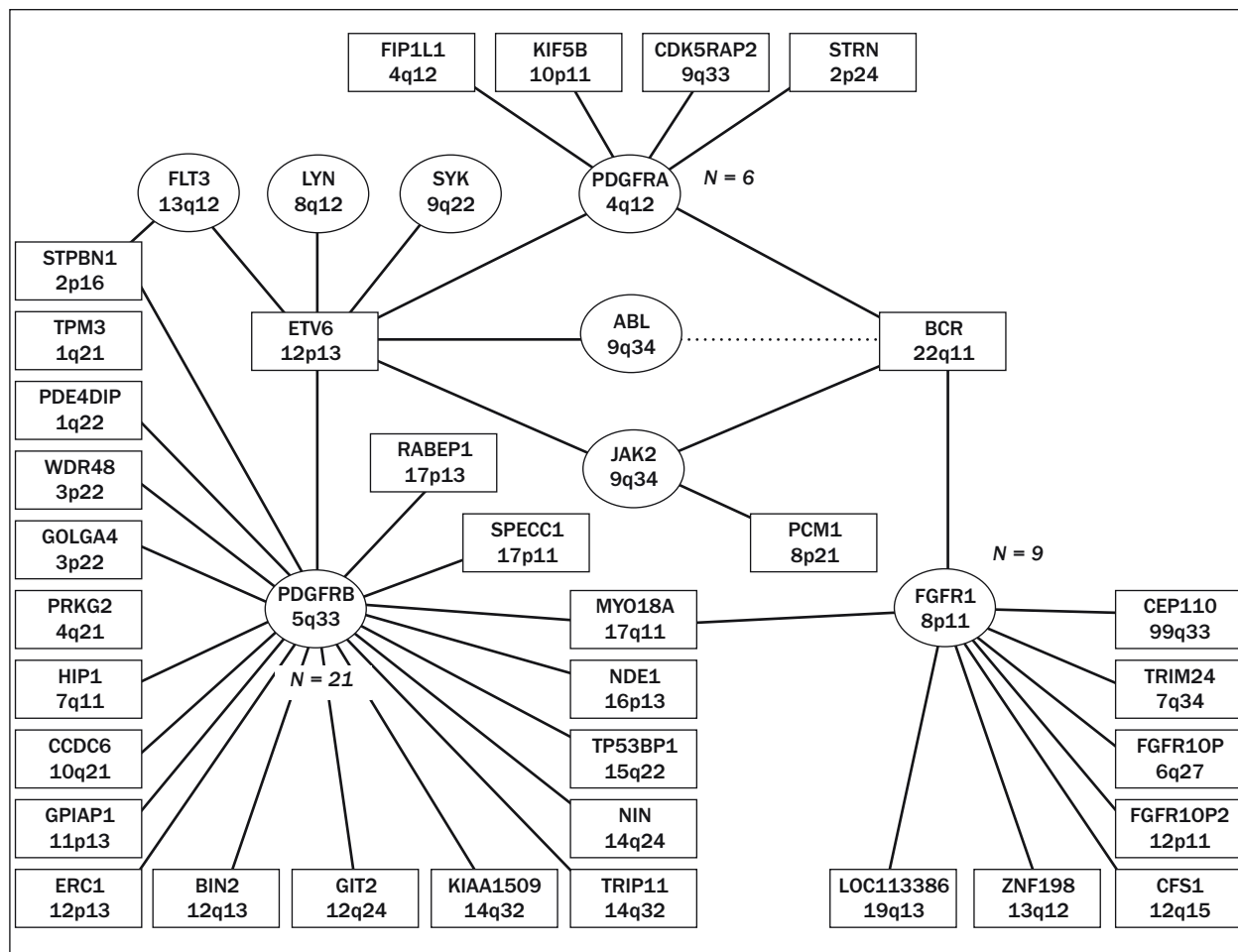


Figura 1. Network of tyrosine kinase fusion genes in MPDs. Tyrosine kinases are shown in ellipses and partner genes in rectangles. By far the most common fusion is *BCR-ABL* in CML. In atypical MPDs the most common abnormality is *FIP1L1-PDGFRB*.

are recurrent. Molecular investigation has revealed that the predominant consequence of these translocations is the fusion of a gene encoding a tyrosine kinase to another gene (so called partner gene). To date, more than 40 fusions have been identified that involve the tyrosine kinases *ABL*, *FGFR1*, *FLT3*, *JAK2*, *LYN*, *PDGFRA*, *PDGFRB* or *SYK* (Figure 1). Some kinases are highly promiscuous, e.g. 21 fusion partners have been reported for *PDGFRB* and some partners may fuse to several different kinases.

Structure and function of tyrosine kinase fusions

In general, the chimaeric proteins encoded by these fusion genes follow the paradigm of BCR-ABL: (i) the entire catalytic domain of the kinase is fused to part of an N-terminal partner protein, (ii) the fusion proteins are constitutively activate, transform growth factor dependent cell lines to growth factor independence and induce aggressive, CML-like myeloproliferative disorders in murine models (iii) the transforming ability and constitutive enzymatic activity is dependent on one or more dimerisation or oligomerisation domain within the partner proteins².

Activation of tyrosine kinases and downstream signalling components by point mutations

Tyrosine kinases can also be activated by a variety of point mutations. Mutations of *KIT* are seen in the great majority of patients with SM, with >80% of cases reported to be positive for the D816V mutation³. Since the malignant clone may be highly focal in the bone marrow and apparently absent in the peripheral blood, sensitive molecular techniques and/or stringent sample selection (e.g. flow sorting or laser microdissection) are required to detect all positive cases⁴. In other atypical MPDs the most commonly mutated tyrosine kinase is *JAK2* with the V617F mutation seen in 3-20% of cases with aCML/CMML. Activating internal tandem duplications or point mutations of *FLT3* have been also described in 5%-13% of atypical MPDs⁵.

Tyrosine kinases communicate with cellular processes through multiple signal transduction pathways, of which one of the most prominent is RAS/MAPK. Activating RAS mutations are common in malignancy and around 13% of BCR-ABL negative CML cases have activating *NRAS* mutations⁶. Older reports have suggested that RAS mutations are more common in CMML⁷. Activating kinase mutations, kinase fusion genes and *NRAS* mutations are almost al-

ways mutually exclusive, presumably because they are functionally redundant.

Diagnostic detection of molecular abnormalities

Although chromosomal abnormalities are uncommon in atypical MPDs, conventional cytogenetics is critical as a pointer towards the presence the fusions described above. It is important to stress that all fusions thus far reported are associated with visible karyotypic abnormalities apart from *FIP1L1-PDGFRB*⁸ and thus cytogenetics is typically performed as a prelude to further molecular analysis. Due to the large number of possible fusions and the fact that individual fusions may show variability in the positions of breakpoints, it is very expensive to perform a comprehensive RT-PCR screen to exclude, for example, rearrangement of *PDGFRB*. Such an analysis can however usually be performed readily by FISH with breakapart probes. For genes that are not normally strongly expressed in haematopoietic cells, e.g. *PDGFRA*, semiquantitative or quantitative RT-PCR analysis may be a useful indicator of an underlying fusion. Previously described fusions that are suspected to be present on the basis of karyotype can be tested for by RT-PCR or FISH, and this confirmation is particularly important if targeted therapy is being considered since cytogenetics alone is insufficient to determine the presence of a specific molecular abnormality.

For patients with a normal or unknown karyotype, we consider that the only fusion gene apart from BCR-ABL that should be screened for is *FIP1L1-PDGFRB*, but only in cases with blood and/or marrow eosinophilia. Detection of this fusion can be something of a challenge. The deletion breakpoints are widely distributed within *FIP1L1* and therefore a number of different exons can become fused to *PDGFRA*. In addition to breakpoint variability, detection is aggravated by complex alternative splicing which can lead to the presence of multiple mRNA fusions in individual patients and highly variable levels of expression of the fusion mRNA between patients. Consequently, amplification of *FIP1L1-PDGFRB* mRNA with standard primer sets is difficult and nested RT-PCR is often required⁹. Even then, occasional cases with variant breakpoints may be missed and therefore comprehensive screening should include an additional approach. This can include *PDGFRA* expression or breakpoint analysis, but is most commonly achieved by FISH to detect deletion of the *CHIC2* gene as a surrogate marker. However deletion FISH has an intrinsically high false positive rate and so this technique may miss cases in which the size of the clone is relatively small.

Clinical phenotypes associated with tyrosine kinase fusions

Whilst there are no specific clinical features that unambiguously suggest involvement of a particular tyrosine kinase, it is possible to distinguish phenotypes that are associated with the molecular findings. Patients with *FGFR1* fusions have been defined as an entity named “8p11 myeloproliferative syndrome (EMS)” as they show chromosomal breakpoints at 8p11-12⁹. Many EMS cases are characterized by a CML/CMML-like picture: leukocytosis, a hypercellular bone marrow and splenomegaly. Others may present with diverse features that are suggestive of a range of disorders from PV to lymphoma. Eosinophilia in the peripheral blood and/or bone marrow is usually but not always present. Lymphadenopathy can occur either at the time of diagnosis or during the course of the disease and is typically non-Hodgkin lymphoma (NHL) either of B or, more commonly, T-cell phenotype. Published case reports have indicated that EMS transforms to AML or occasionally B-ALL in a median of only 6 to 9 months, however it is possible the literature is biased towards rather more aggressive cases.

Patients with fusions involving *PDGFRA* or *PDGFRB* typically present with peripheral blood eosinophilia and splenomegaly¹⁰. In particular, eosinophilia is usually present although because of the broader underlying clinical and laboratory findings patients are typically diagnosed initially as having aCML, CEL, CMML or MDS/MPD-U. Strikingly, there is a pronounced male excess with a 10:1 ratio of men:women for both *PDGFRA* and *PDGFRB* fusions. *FIP1L1-PDGFRA* deserves a special mention: it is the most common abnormality after *BCR-ABL* and the only fusion that is not usually associated with a karyotypic abnormality which is apparent by conventional cytogenetics. *FIP1L1-PDGFRA* is associated with CEL, presenting as hypereosinophilic syndrome (HES) or SM with eosinophilia and current data indicate that 4-12% of patients with HES or persistent unexplained eosinophilia are *FIP1L1-PDGFRA* positive^{8,11}.

A male excess is also apparent for patients with *JAK2* fusions. *PCM1-JAK2*-positive patients often present clinically as having a MPD, frequently with peripheral eosinophilia and/or myelofibrosis of the bone marrow. Alternatively, patients may present as *de novo* acute leukemia of lymphoid or myeloid origin¹².

Targeted therapy

The paradigm of CML has demonstrated that tyrosine kinases are excellent targets for therapeutic intervention and naturally there was interest in using the same

approach for the treatment of atypical MPDs. Fusion genes involving *PDGFRA* and *PDGFRB* are particularly important to recognise as they encode proteins that are highly sensitive to treatment with imatinib and other tyrosine kinase inhibitors^{8,13}. The great majority of imatinib-sensitive atypical MPDs are positive for the cytogenetically cryptic *FIP1L1-PDGFRA* fusion; all other rearrangements of *PDGFRA* and *PDGFRB* are exceedingly uncommon and all are associated with visible rearrangements at 4q12 or 5q31-33. Targeted therapy will expand to include other molecularly defined subgroups, and a proof of principle for the treatment of very rare cases with *FLT3* fusions has been described. Imatinib is not active against *JAK2* or *FGFR1*, however we anticipate that inhibitors will be available to target patients with abnormalities of these genes in the near future^{14,15}.

Molecular pathogenesis: future directions

Overall, the abnormalities described above are found in approximately one third of atypical MPD cases. The molecular pathogenesis of the remaining cases remains unknown. Several approaches are being undertaken to identify novel abnormalities, particularly those that impact on tyrosine kinase signalling. Some of these approaches are:

- High resolution array genomic hybridisation (CGH) can detect amplifications and deletions, some of which may be associated with cryptic fusion genes. However using custom designed tiling arrays, no novel recurrent tyrosine kinase fusion genes have thus far been identified in atypical MPDs.
- Single nucleotide polymorphisms (SNP) arrays are an alternative technique for detecting copy number changes but can also identify cytogenetically cryptic acquired uniparental disomy (aUPD) resulting from mitotic recombination and selection for homozygosity of genomic segments or large chromosomal regions. This phenomenon was first described in PV at chromosome 9p, and provided an important pointer towards the finding of the V617F *JAK2* mutation¹⁶. Other regions of aUPD have been shown to mark the presence of activated oncogenes or inactivated tumour suppressor genes in a range of malignancies¹⁷. Preliminary studies have indicated that aUPD is uncommon in V617F negative classic MPDs but frequent in atypical MPDs. Several different chromosomes are affected indicating substantial genetic heterogeneity in these diseases.
- High throughput sequencing or mutation scanning is becoming more widely applied as the cost of sequencing falls. However it has become

apparent that the majority of sequence changes identified by sequencing are in fact unimportant “passenger” mutations that happened to be present in a cell that acquired other oncogenic changes. Identification of the relatively small number of pathogenetic “driver” mutations generally requires functional proof of their activity¹⁸.

- Proteomic analysis has been used to identify activated tyrosine kinases in cell lines, but remains challenging in primary material¹⁹.
- Systematic shRNA screens may be used to individually knock down the expression of target genes, e.g. the tyrosine kinome, and consequent effects on proliferation or survival measured²⁰.

These combined approaches are likely to make significant inroads into our understanding of both classic and atypical MPDs in the near future and will impact on both disease classification as well as treatment.

References

- Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002; 100: 2292-302.
- Krause DS, Van Etten RA. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med* 2005; 353: 172-87.
- Nagata H, Worobec AS, Oh CK, et al. Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 10560-4.
- Valent P. Diagnostic evaluation and classification of mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am* 2006; 26: 515-34.
- Grand FH, Iqbal S, Zhang L, et al. A constitutively active SPTBN1-FLT3 fusion in atypical chronic myeloid leukemia is sensitive to tyrosine kinase inhibitors and immunotherapy. *Exp Hematol* 2007; 35: 1723-7.
- Jones AV, Kreil S, Zoi K, et al. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005; 106: 2162-8.
- Hirsch-Ginsberg C, LeMaistre AC, Kantarjian H, et al. RAS mutations are rare events in Philadelphia chromosome-negative/bcr gene rearrangement-negative chronic myelogenous leukemia, but are prevalent in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 1990; 76: 1214-9.
- Cools J, DeAngelo DJ, Gotlib J, et al. A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *N Engl J Med* 2003; 348: 1201-14.
- Macdonald D, Reiter A, Cross NCP. The 8p11 myeloproliferative syndrome: a distinct clinical entity caused by constitutive activation of FGFR1. *Acta Haematol* 2002; 107: 101-7.
- Gotlib J, Cross NCP, Gilliland DG. Eosinophilic disorders: molecular pathogenesis, new classification, and modern therapy. *Best Pract Res Clin Haematol* 2006; 19: 535-69.
- Jovanovic JV, Score J, Waghorn K, et al. Low-dose imatinib mesylate leads to rapid induction of major molecular responses and achievement of complete molecular remission in FIP1L1-PDGFR α -positive chronic eosinophilic leukemia. *Blood* 2007; 109: 4635-40.
- Reiter A, Walz C, Watmore A, et al. The t(8;9)(p22;p24) is a recurrent abnormality in chronic and acute leukemia that fuses PCM1 to JAK2. *Cancer Res* 2005; 65: 2662-7.
- David M, Cross NCP, Burgstaller S, et al. Durable responses to imatinib in patients with PDGFRB fusion gene-positive and BCR-ABL-negative chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2007; 109: 61-4.
- Chase A, Grand FH, Cross NCP. Activity of TKI258 against primary cells and cell lines with FGFR1 fusion genes associated with the 8p11 myeloproliferative syndrome. *Blood* 2007; 110: 3729-34.
- Wernig G, Kharas MG, Okabe R, et al. Efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in treatment of a murine model of JAK2V617F-induced polycythemia vera. *Cancer Cell* 2008; 13: 311-20.
- Kralovics R, Guan Y, Pichal JT. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp Hematol* 2002; 30: 229-36.
- Fitzgibbon J, Smith LL, Raghavan M, et al. Association between acquired uniparental disomy and homozygous gene mutation in acute myeloid leukemias. *Cancer Res* 2005; 65: 9152-4.
- Frohling S, Scholl C, Levine RL et al. Identification of driver and passenger mutations of FLT3 by high-throughput DNA sequence analysis and functional assessment of candidate alleles. *Cancer Cell* 2007; 12: 501-13.
- Gu TL, Goss VL, Reeves C, et al. Phosphotyrosine profiling identifies the KG-1 cell line as a model for the study of FGFR1 fusions in acute myeloid leukemia. *Blood* 2006; 108: 4202-4.
- Tyner JW, Walters DK, Willis SG, et al. RNAi screening of the tyrosine kinome identifies therapeutic targets in acute myeloid leukemia. *Blood* 2008; 111: 2238-45.

DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LAS MASTOCITOSIS

L. ESCRIBANO¹, I. ÁLVAREZ-TWOSE¹,
L. SÁNCHEZ-MUÑOZ¹, M.J. ACEVEDO²,
C. TEODOSIO², I. SÁNCHEZ-MATAS¹,
A. GARCÍA-MONTERO², A. ORFAO^{2,*}

¹Centro de Estudios de Mastocitosis de Castilla-La Mancha. Hospital Virgen del Valle. Complejo Hospitalario de Toledo. ²Departamento de Medicina y Servicio de Citometría. Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC-Universidad de Salamanca/CSIC)

*En representación de la Red Española de Mastocitosis (REMA)

Introducción

Las mastocitosis (MS) son un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizadas por una expansión y acumulación de mastocitos (MC) en diferentes tejidos. Se puede establecer su carácter clonal por la demostración de mutaciones del *KIT* (habitualmente D816V), en la médula ósea u otros tejidos, que afectan al dominio tirosina quinasa. Nuestro grupo, en un estudio prospectivo en 113 pacientes diagnosticados de diversas formas de mastocitosis, ha demostrado que la frecuencia de las mutaciones activantes del *KIT* es superior al 95% en las formas de

buen pronóstico, salvo en las mastocitosis bien diferenciadas, y próxima al 100% en las mastocitosis agresivas^{1,2}. Más importante, sin duda, es la demostración de que la mutación del *KIT* está presente en otras líneas hematopoyéticas en el 81% de las formas de mal pronóstico y en el 27% de las formas de buen pronóstico^{1,2}. Cuando la mutación del *KIT* está presente en los linfocitos es habitual detectarla también en las células de la mucosa oral (García Montero, Jara Accedo *et al.*, datos no publicados), lo que les confiere un carácter germinal. En resumen, es evidente que en un cierto porcentaje de mastocitosis la afectación clonal está presente en una célula *stem* primitiva, y este hecho las aproxima a los síndromes mieloproliferativos.

En esta revisión se hará una puesta al día de los criterios diagnósticos, la clasificación, el tratamiento y el pronóstico de la enfermedad. Todo ello desde un punto de vista práctico y sobre la base de los datos de la literatura y la experiencia acumulada por la Red Española de Mastocitosis desde el año 1981.

Diagnóstico básico de las mastocitosis del adulto

Según nuestra experiencia, aproximadamente el 90% de los pacientes adultos referidos a la Red Española de Mastocitosis (REMA) son formas de buen pronóstico; y de ellos, alrededor del 10% no tienen afectación cutánea. Cerca del 6% corresponde a mastocitosis sistémicas agresivas (MSA), un 3% a mastocitosis asociadas a otra hemopatía clonal (MS-AHNMD) y los casos restantes a leucemias de mastocitos (MCL).

Protocolo diagnóstico de la REMA en mastocitosis del adulto

Formas clínicas de presentación

Formas de buen pronóstico

- Lesión cutánea sugestiva con o sin síntomas de liberación de mediadores del MC.
- Pacientes sin lesión cutánea con anafilaxia de causa conocida o desconocida, con o sin IgE específica frente al agente causal y elevación persistente –en la mayoría de los casos pero no en todos– de la triptasa basal (>11 ng/mL), no justificable por otras causas (enfermedad alérgica grave, hemopatías mieloides, síndromes hipereosinofílicos, entre otros)³⁻⁷.
- Pacientes sin lesión cutánea con anafilaxia idiopática independientemente del valor de la triptasa basal.

Formas de mal pronóstico y de pronóstico variable

- Lesión cutánea generalmente ausente con hepatomegalia, esplenomegalia y adenomegalias (puede existir ascitis y derrame pleural), malabsorción, frecuente dolor abdominal, cólico y diarrea, mal estado general, pérdida de peso y febrícula.
- Hallazgo casual de MC anormales en la médula ósea durante el estudio de una hemopatía clonal.
- En las leucemias de mastocitosis el síntoma inicial puede ser un cuadro de liberación masiva de mediadores del MC con hipotensión y riesgo vital.

Métodos diagnósticos

A lo largo de los últimos años se han producido avances significativos relacionados con el diagnóstico de las mastocitosis sistémicas y se han establecido una serie de criterios diagnósticos (mayores y menores), así como una clasificación de consenso de la enfermedad (Tablas 1 y 2) y una serie de criterios de gravedad clínica (Tabla 3)⁸⁻¹⁰.

Criterios diagnósticos

Los criterios diagnósticos actualmente aceptados en la clasificación de consenso no están basados, en su mayoría, en estudios prospectivos que incluyan un número suficiente de casos y un seguimiento adecuado. Por ello la REMA utiliza modificaciones basadas en estudios prospectivos, que incluyen más de 600 pacientes adultos con mastocitosis y 1.000 controles, entre ellas considerar como un criterio mayor para el diagnóstico de afectación sistémica la expresión del antígeno CD25¹¹⁻¹³ como patognomónica de la enfermedad, excepto en las mastocitosis bien diferenciadas¹⁴. En el mismo sentido, la demostración de la mutación de *KIT* localizada en el exón 17 tiene un valor diagnóstico de primer orden, ya que hasta el presente las mutaciones del *KIT* en el *loop* de activación están restringidas a las mastocitosis, aunque pueden detectarse con una frecuencia variable en leucemias agudas mieloblásticas –especialmente con t(8;21) o inv(16)–; linfoma T/NK y seminomas^{1,2}, lo que confiere a este marcador un valor diagnóstico de una gran relevancia. Tanto el inmunofenotipo aberrante como la presencia de la mutación del *KIT* D816V constituyen marcadores más sensibles y precoces que la detección de agregados de MC que aparecen de forma tardía en la evolución de las mastocitosis de buen pronóstico, incluso más de 10 años después del inicio de la enfermedad (REMA, datos no publicados); considerar un dato anatómico, específico pero poco sensible, dada la baja carga mastocitaria de las formas indolentes, como único criterio mayor significa retrasar el diagnóstico de certeza durante años. Por otra parte, una cifra de triptasa superior a 20 ng/mL como criterio menor tampoco

Tabla 1. Criterios para el diagnóstico de mastocitosis sistémica (la OMS considera que para el diagnóstico de mastocitosis sistémica se requiere un criterio mayor + un criterio menor o tres criterios menores)

Mayor ⁽¹⁾⁽²⁾ (OMS)	· Infiltrados mastocitarios multifocales (>15 MC) en la médula ósea u otros órganos extracutáneos en cortes de tejido teñidos para triptasa
Menores:	· >25% de MC con morfología anormal · Presencia de la mutación del KIT en el codón 816 en órganos extracutáneos ⁽³⁾⁽⁴⁾ · Expresión de CD2 y/o CD25 en los MC de MO ⁽⁵⁾⁽⁶⁾ · Triptasa sérica >20 ng/mL (no aplicable si existe hemopatía mieloide asociada) ⁽⁷⁾ · Presencia de afectación cutánea demostrada histológicamente ⁽⁸⁾

MC: mastocitos; MO: médula ósea

Tomado de las referencias 1, 2, 11-13, 15-17

⁽¹⁾En las formas indolentes, los agregados aparecen varios años después del inicio de la enfermedad, lo que representa un retraso en el diagnóstico y clasificación e impide dar una información correcta a los pacientes que les permita "planear" su futuro. MODIFICACIONES UTILIZADAS ACTUALMENTE POR LA REMA.

⁽²⁾La presencia de agregados en las extensiones del aspirado de MO (teñidas con MGG y azul de toluidina) también se considera criterio diagnóstico por la REMA.

⁽³⁾El estudio debe realizarse en MC purificados. Los estudios en MO total o células mononucleares o muestra enriquecida con anti-CD25 pueden contener un bajo porcentaje de MC y el ADN para KIT estar por debajo del límite de detección de la técnica.

⁽⁴⁾Cuando la mutación está presente en el MC, debe estudiarse en todas las líneas hematopoyéticas purificadas incluyendo los linfocitos y, si está presente en todas ellas, en las células de la mucosa oral.

⁽⁵⁾La expresión de CD2 debe excluirse como criterio diagnóstico aislado, ya que esta molécula puede estar presente en MC normales (REMA, datos no publicados).

⁽⁶⁾La expresión de CD25 se considera un criterio diagnóstico mayor por la REMA.

⁽⁷⁾Consideramos como criterio menor la existencia de un nivel de triptasa superior a 11 ng/mL de forma persistente. Se excluye en casos con hemopatía mieloide asociada (leucemia aguda mieloide, síndromes mielodisplásicos), síndromes hipereosinofílicos, anafilaxia, enfermedad alérgica grave o pacientes en programa de hemodiálisis crónica.

⁽⁸⁾La afectación cutánea está considerado por la REMA un criterio diagnóstico menor sobre la base de que en el 96% de adultos con lesión cutánea se demostró afectación de MO.

se apoya en estudios prospectivos; en nuestra opinión, en relación con el diagnóstico, la triptasa tiene un valor de primer orden, pero debe ser considerada desde un punto de vista dinámico; es decir, lo importante es estudiar la evolución de esta proteasa a lo largo del tiempo. En resumen, la aproximación diagnóstica correcta a las mastocitosis de buen pronóstico debe estar basada en el empleo racional de todos los métodos diagnósticos a nuestro alcance, que deben llevarse a cabo cumpliendo de forma estricta todos los controles de calidad establecidos para cada técnica^{1,2,11-13,15-17}.

Clasificación

En la Tabla 2 puede verse la clasificación de las mastocitosis actualmente aceptada por la OMS, y que incluye la mastocitosis cutánea con afectación exclusiva de la piel (MC) y las mastocitosis sistémicas⁸⁻¹⁰. La REMA considera otras dos formas de mastocitosis, ambas dentro de las formas de buen pronóstico, con características clínicas, biológicas, inmunofenotípicas y moleculares específicas: 1) la mastocitosis sistémica bien diferenciada (MSBD), caracterizada por lesión cutánea generalmente difusa, proliferación de MC con morfología madura e inmunofenotipo similar al de los MC normales y baja frecuencia de la mutación D816V¹⁸; 2) la mastocitosis sistémica sin lesión cutánea asociada a anafilaxia recurrente (MS-ana)^{19,20}.

Los estudios prospectivos de la REMA, en un elevado número de pacientes y con un seguimiento superior a los 25 años en las formas de buen pronóstico,

nos permitirán poner a punto una nueva clasificación adaptada al pronóstico y que incluya datos moleculares e inmunofenotípicos.

Pronóstico

Las mastocitosis sistémicas indolentes se consideran formas de buen pronóstico, pero no existen estudios prospectivos que permitan establecer de forma exacta el pronóstico a largo plazo de estas categorías de la enfermedad. Nuestra experiencia sugiere que la esperanza de vida a 25 años es similar a la de la población sin mastocitosis; sin embargo, la existencia de una muta-

Tabla 2. Clasificación de las mastocitosis (OMS)^{8,9}

Mastocitosis cutánea (MC)
Mastocitosis sistémica
· Mastocitosis sistémica indolente (con lesión cutánea) (MSI)
· Mastocitosis asociada a otra hemopatía clonal (MS-AHNMD)
· Mastocitosis sistémica agresiva (MSA)
· Leucemia de mastocitos y sarcoma de mastocitos (MCL)
Mastocitoma extracutáneo

La REMA incluye otros dos grupos de mastocitosis sistémicas indolentes:

1) La mastocitosis sistémica bien diferenciada -MSBD- (Jara Acevedo M, et al. *Clinical and biological characterization of well-differentiated systemic mastocytosis, a novel form of mastocytosis. XXIst International Symposium on Technological Innovations in Laboratory Hematology, ISLH 2008. Sydney, Australia, 28 abril-1 de mayo. Clin Lab Hematol 2008; 30 [Suppl 1]. Oral presentation #64.*)

2) La mastocitosis sistémica sin lesión cutánea asociada a anafilaxia recurrente (MS-ana)^{19,20}.

Tabla 3. Criterios de gravedad clínica B y C según la OMS^{8,9}

Síntomas B*	Síntomas C**	Fallo orgánico
1) Carga MC elevada: > 30% infiltración MC en MO por histología y triptasa > 200 ng/mL		
2) Dismielopoyesis: MO proliferativa o rasgos displásicos con recuentos normales y estables	1) Organopatía (MO): citopenia(s): leuc < 1.000/ μ L y/o Hb < 10 g/dL y/o plaq < 100.000/ μ L	Pancitopenia progresiva: leuc < 500/ μ L + infecciones; necesidad de transfusiones; plaq < 20.000/ μ L con síndrome hemorrágico
3) Organomegalia: hepatomegalia sin ascitis u otros signos de afectación orgánica, adenomegalias (>2 cm) y/o esplenomegalia palpable sin hiperesplenismo	2) Organopatía (hígado): hepatomegalia con ascitis, test hepáticos anormales y/o hipertensión portal	Deterioro progresivo con hipoproteïnemia, coagulopatía grave, fallo hepático
	3) Organopatía (bazo): esplenomegalia palpable hiperesplenismo	
	4) Organopatía (digestivo): malabsorción con hipoalbuminemia y pérdida de peso	
	5) Organopatía (esqueleto)***: lesiones óseas tipo osteólisis y/o defectos focales con fracturas patológicas	

MO: médula ósea; leuc: leucocitos; plaq: plaquetas; un solo síntoma C es suficiente para el diagnóstico de mastocitosis sistémica agresiva.

*Sin alteración de la función orgánica

**Función orgánica comprometida debida a infiltración por MC

***La REMA no considera criterio de gravedad clínica C las osteólisis secundarias a osteoporosis grave ni siquiera en casos con fracturas patológicas. Sólo las osteólisis secundarias a infiltración masiva por MC se consideran criterio C

ción del c-kit multilíneal o germinal parece aumentar la probabilidad de progresar a una forma más agresiva (MSA o MCL) o de desarrollar hemopatía mieloides a largo plazo, como leucemia aguda o síndrome mielodisplásico, lo que refuerza la importancia de realizar el estudio de dicha mutación en todas las líneas hematopoyéticas. El pronóstico de las formas agresivas es desfavorable a medio plazo. En las formas asociadas a hemopatías el pronóstico depende básicamente de la hemopatía acompañante. En la leucemia de mastocitos el pronóstico suele ser infausto a corto plazo.

Tratamiento

En las formas de buen pronóstico debe estar basado en una información exhaustiva sobre la enfermedad; además, se debe disponer de protocolos específicos para ser aplicados en situaciones de riesgo, como son la anestesia general o los estudios radiológicos con contraste.

En principio, todos los síntomas relacionados con la liberación de mediadores del MC pueden controlarse siempre que se utilicen los fármacos adecuados. El uso de tratamientos citorreductores en las formas no agresivas está contraindicado, salvo en un mínimo porcentaje de casos (<0,5% en nuestra serie) que presenten

fracturas patológicas secundarias a osteoporosis grave o anafilaxia de repetición sin respuesta al tratamiento anti-mediador intensivo. En las MSA²¹, el interferón α_{2b} , junto con prednisona durante un tiempo variable, sigue siendo el tratamiento de primera línea; asimismo, el uso de hidroxiurea debe ser considerado, si bien con ninguno de los dos tratamientos es de esperar una remisión completa de la enfermedad. Se han obtenido resultados positivos en alrededor del 30% de los casos con 2-clorodesoxiadenosina (Cladribina[®]). El inhibidor de tirosina quinasas Glivec[®] está indicado únicamente en formas agresivas en las que no se demuestra la mutación D816V (<1% de los casos) y en mastocitosis bien diferenciadas D816 negativas que hagan una transformación (<2% de los casos, REMA, datos no publicados). En la presentación se discutirá el posible papel de otros inhibidores de tirosina quinasas en el tratamiento de las mastocitosis de mal pronóstico. Asimismo, se proporcionarán datos sobre el pronóstico tanto de las formas indolentes como de las agresivas y leucemias de mastocitos.

Agradecimientos

Los trabajos en los que se basa esta revisión han sido posibles gracias a las siguientes ayudas de investigación: Ministe-

rio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III (REMA G03/007, FIS050769, FIS060529, FIS061377 y RETICS RD06/0020/0035-FEDER), Comunidad Autónoma de Madrid (GR/ SAL/0133/2004), Junta de Comunidades de Castilla La Mancha (FISCAM 2007/36), Junta de Castilla y León (Grant SAN196/SA10/07) y Fundación Mutua Madrileña. Andrés García-Montero, contrato FIS/ FEDER (CP03/00035); Cristina Teodosio, contrato FCT Portugal (SFRH/BD/17545/2004); e Isabel Sánchez Matas, contrato FIS posformación continuada.

Bibliografía

- García-Montero AC, Jara-Acevedo M, Teodosio C, et al. KIT mutation in mast cells and other bone marrow haematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders. A prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood* 2006.
- Orfao A, García-Montero AC, Sánchez L, Escribano L. Recent advances in the understanding of mastocytosis: the role of KIT mutations. *Br J Haematol* 2007; 138: 12-30.
- Sperr WR, Jordan JH, Baghestanian M, et al. Expression of mast cell tryptase by myeloblasts in a group of patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2001; 98: 2200-9.
- Sperr WR, Stehberger B, Wimazal F, et al. Serum tryptase measurements in patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma* 2002; 43: 1097-105.
- Sperr WR, Hauswirth AW, Valent P. Tryptase a novel biochemical marker of acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2002; 43: 2257-61.
- Kushnir-Sukhov NM, Brittain E, Reynolds JC, Akin C, Metcalfe DD. Elevated tryptase levels are associated with greater bone density in a cohort of patients with mastocytosis. *Int Arch Allergy Immunol* 2006; 139: 265-70.
- Klion AD, Noel P, Akin C, et al. Elevated serum tryptase levels identify a subset of patients with a myeloproliferative variant of idiopathic hypereosinophilic syndrome associated with tissue fibrosis, poor prognosis, and imatinib responsiveness. *Blood* 2003.
- Valent P, Horny H-P, Escribano L, et al. Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal. *Leuk Res* 2001; 25: 603-25.
- Valent P, Horny H-P, Li CY, et al. Mastocytosis (mast cell disease). In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. *World Health Organization (WHO) Classification of Tumours. Pathology & Genetics. Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Vol 1. Lyon, France: IARC Press; 2001: 291-302.*
- Valent P, Akin C, Escribano L, et al. Standards and standardization in mastocytosis: consensus statements on diagnostics, treatment recommendations and response criteria. *Eur J Clin Invest* 2007; 37: 435-53.
- Escribano L, Orfao A, Díaz Agustín B, et al. Indolent systemic mast cell disease in adults: immunophenotypic characterization of bone marrow mast cells and its diagnostic implications. *Blood* 1998; 91: 2731-6.
- Escribano L, Navalón R, Núñez R, Díaz Agustín B, Bravo P. Flow cytometry immunophenotypic analysis of human mast cells. In: Robinson JP, Darzynkiewicz Z, Dean P, Orfao A, Rabinovitch P, Wheeless L, eds. *Current Protocols in Cytometry*. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 2000: 6.6.1-6.6.18.
- Escribano L, Díaz Agustín B, López A, 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.
- Akin C, Fumo G, Yavuz AS, et al. A novel form of mastocytosis associated with a transmembrane c-Kit mutation and response to imatinib. *Blood* 2003.
- Orfao A, Escribano L, Villarrubia J, et al. Flow cytometric analysis of mast cells from normal and pathological human bone marrow samples. Identification and enumeration. *Am J Pathol* 1996; 149: 1493-9.
- Horny HP, Sillaber C, Menke D, et al. Diagnostic value of immunostaining for tryptase in patients with mastocytosis. *Am J Surg Pathol* 1998; 22: 1132-40.
- Sperr W, Escribano L, Jordan JH, 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.
- Akin C. Multilineage hematopoietic involvement in systemic mastocytosis. *Leuk Res* 2003; 27: 877-8.
- Akin C, Scott LM, Kocabas CN, et al. Demonstration of an aberrant mast cell population with clonal markers in a subset of patients with "idiopathic" anaphylaxis. *Blood* 2007.
- González de Olano D, De la Hoz CB, Núñez LR, et al. Prevalence of allergy and anaphylactic symptoms in 210 adult and pediatric patients with mastocytosis in Spain: a study of the Spanish network on mastocytosis (REMA). *Clin Exp Allergy* 2007; 37: 1547-5.
- Valent P, Akin C, Sperr W, et al. Aggressive systemic mastocytosis and related mast cell disorders: current treatment options and proposed response criteria. *Leuk Res* 2003; 27: 635-41.

THE HYPEREOSINOPHILIC SYNDROMES

A. REITER¹, N.C.P. CROSS²

¹III. Medizinische Universitätsklinik.

Medizinische Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg. Mannheim, Germany.

²Wessex Regional Genetics Laboratory. University of Southampton. Salisbury District Hospital. Salisbury, UK.

Classification of hypereosinophilic syndromes

Eosinophilia is commonly observed in a wide range of disparate reactive and clonal disorders^{1,2}. Reactive eosinophilia is most frequently associated with atopia, autoimmune disorders or malignancies. Hypereosinophilic syndrome (HES) is diagnosed when the blood eosinophil count is persistently greater than 1,500/ μ l for at least 6 months with no evidence for a reactive condition or clonality and dysfunction of end-organs due to infiltrating eosinophils. In the lymphocytic variant (L-HES), clonal T-lymphocytes induce non-clonal eosinophil proliferation through overproduction of eosinophilopoietic cytokines such as IL-3, IL-5 or GM-CSF. Clonal eosinophilia is most frequently associated with chronic myeloproliferative disorders (Eos-MPDs) including atypical chronic myeloid leukaemia (aCML), myeloproliferative variant of HES (M-HES), chronic myelomonocytic leukaemia (CMML), unclassifiable overlap syndromes of myelodysplastic syndrome/myeloproliferative disorders (MDS/MPD) and

systemic mastocytosis (SM). Chronic eosinophilic leukaemia (CEL) is diagnosed in the presence of increased numbers of blasts and/or proof of clonality through cytogenetic or molecular analyses.

Diagnostic procedures

“Exclusion of reactive eosinophilia” is commonly described as first step in the diagnostic work-up of unexplained and persistent eosinophilia but daily clinical practice repeatedly demonstrates that this goal is not easily to achieve because of the heterogeneity of potentially causal disorders. Noteworthy, helminthic infections are rare in the Western World although the most common cause of reactive eosinophilia worldwide. There is considerable overlap between the diagnostic criteria for HES and autoimmune disorders, e.g. atypical Churg-Strauss syndrome. It should be pointed out that type and dimension of organ infiltration and dysfunction is different within the various subtypes and may be absent in Eos-MPDs³. In addition, the terms “clonal” and “non-clonal” eosinophilia are widely used in the literature but of limited use in practice since only a minority of cases have clonal cytogenetic or molecular aberrations and there are no generally available tools to prove “non-clonal” disease.

We therefore suggest as a first step to work out the potential presence or absence of typical clinical (male gender, hepato- and splenomegaly), other morphological (precursors of the myeloid and erythroid lineage, basophils, monocytes and blasts) and chemical (elevated serum levels of tryptase and vitamin B₁₂) signs of an Eos-MPD or myelodysplastic syndrome (Eos-MDS). In addition to conventional cytology and histology, a bone marrow biopsy should include reticulin staining because of frequent presence of myelofibrosis in *FIP1L1-PDGFR*A positive disease or related Eos-MPDs and immunohistochemistry for mast cells (tryptase, CD117, CD25, CD2). If positive, a diagnostic test for the presence of a *FIP1L1-PDGFR*A fusion gene from peripheral blood and potentially also for the mastocytosis-associated KIT D816V mutation from bone marrow should be performed early. Of note, the JAK2 V617F mutation is uncommon but occasionally found in Eos-MPDs⁴. Cytogenetic analysis should be performed if *FIP1L1-PDGFR*A is not detected since this is the best indicator of alternative fusion genes associated with sensitivity to imatinib, e.g. rearrangements of 4q12 (*PDGFR*A) or 5q31-33 (*PDGFRB*). Involvement of 8p11 (*FGFR*1), 9p24 (*JAK*2) or 13q12 (*FLT*3) predicts a poor clinical response to imatinib (see review^{2,5}). In our own experience, approximately 10% of patients with unexplained eosinophilia are positive for variable tyrosine kinase fusion genes, more than 90% of whom are males.

In a significant proportion of patients, the clinical phenotype of cases with normal karyotype and negative for *FIP1L1-PDGFR*A is frequently indistinguishable from those in whom tyrosine kinase fusion genes are present, suggesting the likely presence of as yet uncharacterized activating mutations or rearrangements in genes encoding tyrosine kinases or unknown molecular mechanisms which remain to be identified. The response to imatinib or alternative tyrosine kinase inhibitors (TKIs) may lead to the identification of these unknown molecular abnormalities as seen in *FIP1L1-PDGFR*A positive disease³.

Eosinophilia in association with co-existing non-Hodgkin's lymphoma/lymphoblastic leukaemias, particularly of T-cell phenotype, is frequently suspected as being reactive, however this is not the case in the presence of a rearrangement of *FGFR*1 (most commonly *ZNF198-FGFR*1), *PDGFR*A (*FIP1L1-PDGFR*A) or *JAK*2 (*PCM1-JAK*2). Noteworthy, patients with eosinophilia-associated AML (Eos-AML) that are negative for common core binding factor fusion genes, e.g. *MYH11-CBFB* or *AML1-ETO*, should be checked for the presence of tyrosine kinase fusion genes such as *FIP1L1-PDGFR*A or others as indicated by karyotype.

Involvement of skin, lung, gastrointestinal tract or muscles in addition to increased levels of IL-5 and IgE in the absence of allergies is suggestive of the lymphoproliferative variant of HES (L-HES). Attention should however be paid to the fact that there is a clear overlap in the diagnostic criteria, e.g. lung involvement, elevated IgE levels, neuropathies and other symptoms between HES and autoimmune disorders, e.g. atypical Churg-Strauss syndrome. FACS analysis may be useful for the identification of T-cells with unusual phenotype, e.g. CD3⁻/CD4⁺ or less frequently CD3⁺/CD4⁻/CD8⁻, whereas PCR assays are available for the proof of T-cell clonality by T-cell receptor gene rearrangement analysis. In our own experience, the limitations of FACS analysis include the relatively low proportion of patients with an atypical phenotype whereas clonal T-cells can be often identified in a heterogenous range of conditions including L-HES, autoimmune disorders and even Eos-MPDs such as *FIP1L1-PDGFR*A positive CEL⁶.

Treatment options

Tyrosine kinase inhibitors

No primary resistance to imatinib has yet been reported in imatinib-treated *FIP1L1-PDGFR*A positive patients who rapidly achieve complete haematological and complete molecular remission as determined by nested RT-PCR. The issue of optimal dose and dura-

tion of treatment remains however controversial. A lower IC₅₀ as compared to *BCR-ABL* and the practical reasons of achievement of responses indicated a dose of 100 mg/d. Baccarani *et al.* reported the initial use of 400 mg/d with dose adaptation as indicated by response and toxicity with the majority of patients treated with 100-200 mg/d in the long-term⁷. In our own series, 100 mg/d imatinib is sufficient to induce and maintain durable complete haematological and molecular remissions at low toxicity in the vast majority of patients³. Other studies have shown that sustained use of even lower doses of imatinib may be sufficient^{8,9}. Treatment with imatinib as monotherapy or as maintenance after intensive chemotherapy was also highly effective in *FIP1L1-PDGFR*A positive secondary AML with 7 of 7 patients disease-free and in complete haematological and molecular remission after a median of 20 months (range 9-36) on imatinib¹⁰.

Discontinuation of imatinib generally leads to rapid molecular relapse, with all patients achieving a second complete molecular remission following reinstatement of imatinib^{7,11,12}. Possible alternative TKIs for effective treatment of *FIP1L1-PDGFR*A positive disease include nilotinib, dasatinib, sorafenib and midostaurin (formerly PKC412). Thus far, amongst patients maintained on imatinib, relapse has only been reported in two cases, both of whom had the appearance of a T674I mutation in *PDGFR*A which was shown to confer resistance to imatinib^{13,14}. This mutation is analogous to the T315I mutation in the *ABL* kinase in imatinib-resistant CML. It was shown recently that the T674I mutant is *in vitro* effectively inhibited by midostaurin, sorafenib and nilotinib¹⁵⁻¹⁷.

Excellent clinical responses to imatinib have also been reported in cases with other *PDGFR*A (see review^{2,5}) and *PDGFR*B fusion genes with rapid achievement of complete haematologic and cytogenetic responses^{18,19}. Similar to *FIP1L1-PDGFR*A, a substantial proportion of patients also achieve complete molecular remission¹⁸. Because these diseases are very rare, the optimal dose of imatinib was never formally estimated in controlled trials. Similar to *BCR-ABL* positive CML, *PDGFR*B-rearranged patients have been treated with 400 mg/d imatinib although the *in vitro* activity of imatinib is generally better against *PDGFR*B than against *ABL*. This may explain why rapid and sustained responses to lower doses have also been seen.

Results are different for imatinib-treated HES/CEL patients without known chromosomal or molecular aberrations. Baccarani *et al.*⁷ reported partial and complete haematological remissions in 5 of 36 (14%) patients but these were transient in all patients (1-15 months) suggesting a relatively non-specific mode of disease suppression. In our own series, we observed CHR in 40% (6/15) of patients with haematologic relapse in two cases after 4.8 and 24.5 months³. The re-

maining four cases continued in CHR with a median follow up of 21 months (range 10-39). This suggests that a minority of HES/CEL patients without known chromosomal or molecular aberrations might carry novel, cryptic imatinib-sensitive fusion genes or point mutations.

Eos-MPDs with involvement of *FGFR1* ("8p11 myeloproliferative syndrome") and *JAK2* (*PCM1-JAK2*) are frequently associated with an aggressive clinical course and poor prognosis with a median survival time of less than 2 years^{20,21}. Both these kinases are unaffected by imatinib, nilotinib or dasatinib but *in vitro* and *in vivo* activity of several promising new TKIs, e.g. PKC412 and TKI258 towards *FGFR1*, is currently being explored²². Several *JAK2* inhibitors for MPDs associated with point and length mutations of *JAK2* are also in development that may be of use for the treatment of *PCM1-JAK2* positive cases but thus far there are no data to support this contention. Until TKIs are available in clinical practice, allogeneic stem cell transplantation (SCT) should be considered at an early stage for eligible patients with a HLA-matched donor who present with an aggressive clinical course^{20,21}. PKC412 had some activity in a patient with *ZNF198-FGFR1* positive EMS in advanced phase but we are unaware of any case who has achieved a significant chromosomal response after treatment with this compound.

Mepolizumab

Mepolizumab is a fully humanized anti-interleukin-5 monoclonal antibody that binds free IL-5 with high affinity and specificity. After preliminary studies have shown clinical activity of mepolizumab in HES patients, a randomised double-blind, placebo-controlled trial was initiated in HES patients, negative for *FIP1L1-PDGFR*A²³. The aim was to evaluate the effects of mepolizumab on steroid sparing and the maintenance of clinical stability in steroid-dependent disease (20-60 mg/d). The primary endpoint was the reduction of the steroid dose to 10 mg/d or less per day for 8 or more consecutive days which was achieved by 84% of patients in the mepolizumab group, as compared with 43% of patients in the placebo group ($p < 0,001$). For the same time period, a blood eosinophil count of less than 600/ μ l was achieved in 96% vs. 45% of patients ($p < 0,001$) as secondary endpoint. Treatment with steroids was able to be stopped during the study in almost 50% of patients receiving mepolizumab. Best results were achieved in patients with respiratory, cardiac and gastrointestinal disorders and only to a lesser extent in patients with skin or subcutaneous manifestations. Because treatment with steroids is associated with a range of undesirable side effects, mepolizum-

ab has not only potential to reduce disease-related but also treatment-related morbidity. Adverse effects were found and serious in 7 patients, although some of them may have resulted from steroid withdrawal rather than use of mepolizumab. An ongoing open-label extension trial will provide additional information on optimal dosing and long-term efficacy and safety.

Alemtuzumab

The remarkable clinical activity of the anti-CD52 antibody alemtuzumab was first demonstrated in two patients who were refractory to imatinib and allogeneic SCT. In a subsequent pilot trial with 9 extensively pretreated patients and weekly cycles at doses of predominantly 30 mg, complete normalization of peripheral blood eosinophils was seen in 8 patients within 4 weeks²⁴. Rapid relapse after withdrawal of alemtuzumab occurred in 5 patients. Three patients remain on alemtuzumab while in complete (n = 2) or partial remission (n = 1).

Conclusions

The key on-going challenge for a better understanding of the pathogenesis of the broad spectrum of HES remains the characterization of the underlying causal molecular aberrations. The identification of more than 40 TK fusion genes in heterogenous variants of Eos-MPDs, Eos-MDS and Eos-AML highlights the potential role of deregulated tyrosine kinases in this subtype but apart from *FIP1L1-PDGFRα*, these abnormalities are extremely rare. The clinical course of L-HES, which may progress to T-NHL, suggests that there may be a close molecular relationship between L-HES and “true” NHL. The significant overlap of the diagnostic criteria between supposed HES with involvement of the respiratory tract and autoimmune disorders with reactive eosinophilia, e.g. Churg-Strauss syndrome, clearly indicates that a significant proportion of ‘HES’ patients may actually have an eosinophilia-associated autoimmune disorder. In addition to distinct clinical, chemical, morphological and cytogenetic characteristics, the response to treatment including steroid-based immunosuppression, TKIs and monoclonal antibodies may help to unravel the remaining mysteries of HES.

References

1. Tefferi A, Patnaik MM, Pardanani A. Eosinophilia: secondary, clonal and idiopathic. *Br J Haematol* 2006; 133: 468-92.
2. Gotlib J, Cross NC, Gilliland DG. Eosinophilic disorders: molecular pathogenesis, new classification, and modern therapy. *Best Pract Res Clin Haematol* 2006; 19: 535-69.
3. Metzgeroth G, Walz P, Erben P, Popp H, Schmitt-Graeff A, Haferlach C, et al. Safety and efficacy of imatinib in chronic eosinophilic leukemia and hypereosinophilic syndrome – a phase-II study. *British Journal of Haematology* 2008; in press.
4. Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, et al. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005; 106: 2162-8.
5. Reiter A, Walz C, Cross NCP. Tyrosine kinases as therapeutic targets in BCR-ABL negative chronic myeloproliferative disorders. *Current Drug Targets* 2007; 8: 205-16.
6. Galimberti S, Ciabatti E, Ottimo F, Rossi A, Trombi L, Carulli G, et al. Cell clonality in hypereosinophilic syndrome: what pathogenetic role? *Clin Exp Rheumatol* 2007; 25: 17-22.
7. Bacarani M, Cilloni D, Rondoni M, Ottaviani F, Messa F, Merante S, et al. Imatinib mesylate induces complete and durable responses in all patients with the FIP1L1-PDGFRα positive hypereosinophilic syndrome. Results of a multicenter study. *Haematologica* 2007; 92: 1173-9.
8. Pardanani A, Ketterling RP, Li CY, Patnaik MM, Wolanskyj AP, Elliott MA, et al. FIP1L1-PDGFRα in eosinophilic disorders: Prevalence in routine clinical practice, long-term experience with imatinib therapy, and a critical review of the literature. *Leuk Res* 2006; 30: 965-70.
9. Helbig G, Stella-Holowiecka B, Majewski M, Calbecka M, Gajkowska J, Klimkiewicz R, et al. A single weekly dose of imatinib is sufficient to induce and maintain remission of chronic eosinophilic leukaemia in FIP1L1-PDGFRα-expressing patients. *Br J Haematol* 2008; 141:200-4.
10. Metzgeroth G, Walz C, Score J, Siebert R, Schnittger S, Haferlach C, et al. Recurrent finding of the FIP1L1-PDGFRα fusion gene in eosinophilia-associated acute myeloid leukemia and lymphoblastic T-cell lymphoma. *Leukemia* 2007; 21: 1183-8.
11. Jovanovic JV, Score J, Waghorn K, Cilloni D, Gottardi E, Metzgeroth G, et al. Low-dose imatinib mesylate leads to rapid induction of major molecular responses and achievement of complete molecular remission in FIP1L1-PDGFRα positive chronic eosinophilic leukemia. *Blood* 2007; 109: 4635-40.
12. Klion AD, Robyn J, Maric I, Fu W, Schmid L, Lemery S, et al. Relapse following discontinuation of imatinib mesylate therapy for FIP1L1/PDGFRα-positive chronic eosinophilic leukemia: implications for optimal dosing. *Blood* 2007; 110: 3552-6.
13. Cools J, DeAngelo DJ, Gotlib J, Stover EH, Legare RD, Cortes J, et al. A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRα and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *N Engl J Med* 2003; 348: 1201-14.
14. von Bubnoff N, Sandherr M, Schlimok G, Andreesen R, Peschel C, Duyster J. Myeloid blast crisis evolving during imatinib treatment of an FIP1L1-PDGFRα-positive chronic myeloproliferative disease with prominent eosinophilia. *Leukemia* 2005; 19: 286-7.
15. Cools J, Stover EH, Boulton CL, Gotlib J, Legare RD, Amaral SM, et al. PKC412 overcomes resistance to imatinib in a murine model of FIP1L1-PDGFRα-induced myeloproliferative disease. *Cancer Cell* 2003; 3: 459-69.
16. Lierman E, Folens C, Stover EH, Mentens N, Van MH, Scheers W, et al. Sorafenib is a potent inhibitor of FIP1L1-PDGFRα and the imatinib-resistant FIP1L1-PDGFRα T674I mutant. *Blood* 2006; 108: 1374-6.
17. von Bubnoff N, Gorantla SP, Thone S, Peschel C, Duyster J. The FIP1L1-PDGFRα T674I mutation can be inhibited

- by the tyrosine kinase inhibitor AMN107 (nilotinib). *Blood* 2006; 107:4970-1.
18. David M, Cross NC, Burgstaller S, Chase A, Curtis C, Dang R, et al. Durable responses to imatinib in patients with PDGFRB fusion gene-positive and BCR-ABL-negative chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2007; 109: 61-4.
 19. Walz C, Metzgeroth G, Haferlach C, Schmitt-Graff A, Fabarius A, Haferlach T, et al. Characterization of three new imatinib-responsive fusion genes in chronic myeloproliferative disorders generated by disruption of the platelet-derived growth factor receptor beta gene. *Haematologica* 2007; 91: 163-9.
 20. Macdonald D, Reiter A, Cross NCP. The 8p11 myeloproliferative syndrome: a distinct clinical entity caused by constitutive activation of FGFR1. *Acta Haematol* 2002; 107: 101-7.
 21. Reiter A, Walz C, Watmore A, Schoch C, Blau I, Schlegelberger B, et al. The t(8;9)(p22;p24) is a recurrent abnormality in chronic and acute leukemia that fuses PCM1 to JAK2. *Cancer Res* 2005; 65: 2662-7.
 22. Chase A, Grand FH, Cross NC. Activity of TKI258 against primary cells and cell lines with FGFR1 fusion genes associated with the 8p11 myeloproliferative syndrome. *Blood* 2007; 110: 3729-34.
 23. Rothenberg ME, Klion AD, Roufosse FE, Kahn JE, Weller PF, Simon HU, et al. Treatment of patients with the hypereosinophilic syndrome with mepolizumab. *N Engl J Med* 2008; 358: 1215-28.
 24. Quintas-Cardama A, Tefferi A, Cortes J, et al. Alemtuzumab (CAMPATH-1H™) is effective therapy for hypereosinophilic syndrome (HES). *Blood* 2006; 108.

Aspectos psicosociales de los pacientes afectos de hemopatías malignas (niños y adultos) y su entorno

COORDINADOR: A. FERNÁNDEZ JURADO. *Huelva*

Resumen del simposio

Quisiera, en primer lugar, hacer patente mi agradecimiento por haber sido designado para coordinar y moderar esta mesa de debate como, también, manifestar mi reconocimiento al Dr. Ángel León Lara, promotor de mi designación y artífice, entre otros, de la elección del tema.

Somos o deberíamos ser conscientes de los desafíos que cada día se nos plantean a los clínicos en nuestro ejercicio cotidiano y la debida respuesta que, según se nos demanda, debemos dar a los mismos y que suelen estar enmarcados en el ámbito de una sociedad cada vez más informada, más exigente, más cambiante, al tiempo que más necesitada de ver cubiertas “sus” expectativas. Todo ello configura un escenario que, si no dominamos –o si no contamos con los colaboradores precisos para dominarlo–, pueden llevarnos a situaciones de desencuentro y quiebra de la confianza que, por el bien de los pacientes, a toda costa debemos intentar evitar. Así pues, tenemos el compromiso ético no sólo de velar por la situación clínica sino por la mejora continua del entramado asistencial; un compromiso que trasciende, por superación, los aspectos etiológicos, diagnósticos, terapéuticos y rehabilitadores de los pacientes, y especialmente en una especialidad con la impronta de carga humanística que tiene la nuestra.

Por eso, desde esta percepción y desde esa evidente exigencia social, se plantea nuestro debate. Lo haremos desde criterios compartidos de la multidisciplinariedad que cada día se impone más en nuestro ejercicio y desde la convicción rotunda de la necesidad de comprensión, apoyo anímico e informativo que han de tener los pacientes y su entorno. Para ello, contamos con la Dra. Mercedes Hernández Núñez-Polo, del Área Psicosocial de la Unidad de Oncohematología y Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos del Hospital Niño Jesús (Madrid), que nos ilustrará sobre el espectro de emociones y alteraciones afectivas junto con las necesidades y problemas de adaptación del niño ante el diagnóstico de una enfermedad tumoral y el impacto en su entorno. En segundo lugar, nos hablará el Dr. Javier Barbero Gutiérrez, Psicólogo Adjunto del Servicio de Hematología del Hospital La Paz (Madrid), que nos aportará su visión sobre el sufrimiento, las variables que intervienen y los elementos que pueden ayudar a afrontarlo, así como el manejo de situaciones terminales y la importancia del trabajo en equipo y la acción preventiva.

Por último, la Dra. Antonia García Nieto, psicóloga de la Fundación Hospital Puerta del Mar (Cádiz), nos contará como manejar la información sobre la sexualidad en los pacientes oncológicos, con toda la carga de vulnerabilidad que supone para muchos enfermos, por su temprana edad y hará recomendaciones muy útiles, teniendo en cuenta nuestro privilegio de acceder a aspectos íntimos de la vida de los pacientes que nos solicitan opinión, resolución u orientación en esa parcela tan importante para su vida afectiva.

Tenemos, además, dos comunicaciones orales seleccionadas sobre el tema y referidas a: “Relevancia de la atención psicológica sobre el estado de ánimo de los pacientes oncohematológicos ingresados en un servicio de hematología” y “Variables psicológicas mediadoras en el trasplante autólogo de médula ósea” de D.^a Elena Pliego y D. Pedro González, en representación de la Fundación Leucemia y Linfoma, del Hospital de La Princesa y de la Universidad y Hospital de Jaén, respectivamente.

Todo ello viene a enriquecer los contenidos de la mesa y ayudará a propiciar un debate que esperamos intenso, fructífero y, ciertamente, novedoso.

EL NIÑO ANTE LA ENFERMEDAD ONCOHEMATOLÓGICA

M. HERNÁNDEZ NÚÑEZ-POLO,
R. LORENZO GONZÁLEZ

Psicólogas. Área Psicosocial. Unidad de Onco-Hematología y Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos. Hospital Infantil Universitario Niño Jesús. Madrid

El niño al que se le diagnóstica una enfermedad tumoral se enfrenta a un amplio espectro de emociones y alteraciones afectivas que no pueden ignorarse: miedo, ira, soledad, depresión, ansiedad...¹ Por un lado, el hecho de conocer el diagnóstico rompe de una manera radical con la dinámica y el estilo de vida que anteriormente llevaba. Por otro lado, la incertidumbre frente a un lugar y un ambiente desconocido, como es el hospital y el personal sanitario y no sanitario, condiciona un difícil proceso de adaptación².

Estos niños presentan una serie de **necesidades**¹ que no debemos obviar:

- **Necesidades emocionales** (comunes a todos los niños) como la necesidad de sentirse queridos, necesidad de pertenencia, sensaciones de logro, de seguridad, de respeto o de autoconocimiento. Necesidades que pueden no ser satisfechas, en este caso, por la situación de enfermedad.
- **Necesidades que surgen de la reacción del niño ante la enfermedad, la hospitalización y los tratamientos.** Estas necesidades requieren: cariño, comprensión, empatía, aprobación, amistad, seguridad y disciplina.
- **Necesidades de información** acerca de lo que ocurre a lo largo de todo el proceso de enfermedad. Esto va a relacionarse con el control de síntomas, reducción de molestias ante los procedimientos y manejo de la ansiedad.

Impacto del diagnóstico

En el niño el impacto del diagnóstico provoca un desajuste en su equilibrio personal, de tal forma que es importante tener en cuenta la prevención de las posibles respuestas psicopatológicas, la reducción, en la medida de lo posible, de los efectos negativos y la preparación ante los posibles efectos psicológicos secundarios al tratamiento y a la enfermedad, consiguiendo una mejor adaptación posterior.

Al no existir una única forma de afrontar el cáncer infantil, la adaptación debe ser considerada como un proceso dinámico y flexible que depende de distintas variables². Entre otras, podemos señalar:

- **Variables personales:**
 - a) *La edad del niño.* La etapa evolutiva en la que se encuentre y su madurez cognitiva van a determinar

la percepción que va a tener de su propia enfermedad. En los niños menores de 5 años, la mayor preocupación va a ser la angustia de separación de los padres, el miedo al abandono. A partir de los 6 años, temen el dolor físico y el daño corporal. Comprenden que padecen una enfermedad grave y amenazante y necesitan saber que conseguir su curación llevará un tiempo considerable. A partir de los 11 años, el impacto de la enfermedad va más allá. Los adolescentes entienden el diagnóstico y el tratamiento con sus efectos secundarios. Éste será un obstáculo para un adecuado desarrollo en su identidad, autoimagen y autoestima a través de la socialización. Entienden que el cáncer puede llegar a ser sinónimo de muerte.

- b) *Su desarrollo psicoevolutivo:* el nivel de desarrollo va a determinar la naturaleza del impacto emocional y de las estrategias que empleará para afrontar la enfermedad¹.
 - c) *Su personalidad:* va a ser determinante, ya que, según evolucione la enfermedad y repercuta en el tratamiento, el niño puede responder con una amplia gama de recursos defensivos o puede optar por evitar o negar la situación. Debemos saber valorar sus mecanismos de defensa y potenciar sus capacidades tanto de comunicación y expresión de sentimientos como su sentido del humor para facilitar las peticiones de ayuda y la distracción ante los procedimientos.
 - d) Conocer el *grado de comprensión de la enfermedad* y su actitud ante el diagnóstico es también primordial para el posterior trabajo². Podríamos describir múltiples formas de luchar contra la enfermedad por parte de los niños. Así, los *controladores* buscan información porque les beneficia y les disminuye la ansiedad. Por el contrario, los *evitadores* rehuyen la información, prefieren no saber, y esto les mantiene en un estado de equilibrio. Se defienden a través de la negación. Ambas posturas pueden ser adecuadas siempre y cuando no se lleven a los extremos.
- **Variables familiares.** Cuando hablamos de cáncer infantil, hablamos de enfermedad familiar, ya que el mayor y más importante soporte que va a tener el niño va a ser su familia. La capacidad de afrontamiento de la *familia* ante el evento va a ser crucial para el bienestar del niño.
 - **Variables ambientales.** Otro papel importante, dentro de estas variables, lo juega la *red social* de apoyo como la familia, equipo sanitario, lugar de procedencia, contexto educativo, ocio... Si se pretende que el niño viva una "normalidad", es necesario ofrecer continuidad académica, posibilidad de relacionarse con su grupo de iguales, y facilitar la realización, en la medida de lo posible, de las mismas actividades previas a la enfermedad.

Tabla 1. Los Efectos psicológicos secundarios a la enfermedad y al tratamiento

Miedo	El nuevo entorno, la hospitalización
Angustia	Pruebas invasivas
Vergüenza	Cambios en el esquema corporal, caída de pelo, falta de intimidad, sobre todo en los adolescentes
Aislamiento social	Por la susceptibilidad a infecciones
Reducción de la motivación	Por la fatiga que produce el tratamiento
Alteraciones afectivas	Ataques de rabia, irritabilidad, por la enfermedad o el tratamiento.
Estados de ansiedad	La intensidad del dolor, la separación de los padres, la falta de control sobre su cuerpo...
Comportamientos regresivos	Demanda de atención, enuresis secundaria...
Alteraciones cognitivas	Dificultades de aprendizaje, dificultades de atención, concentración...
Estados depresivos	Largos periodos de hospitalización, intensidad de los síntomas físicos, y por el nivel de depresión de la madre

En este sentido, debemos tener en cuenta la dificultad de algunas minorías para integrarse adecuadamente en el entramado social. Una de ellas, que desde hace unos años ha aumentado llamativamente en nuestro país, la constituyen los inmigrantes. Así, por ejemplo, en el Servicio de Onco-Hematología del Hospital Niño Jesús, se constató que la proporción de inmigrantes en el año 2005 duplicaba la del periodo 1995-1999 o, visto de otro modo, la proporción en sólo ese año superaba la del periodo 2000-2004. Al analizar los resultados del tratamiento, no sólo se demostraron diferencias en los factores psicosociales, sino que además se observaron diferencias en la mortalidad, sus causas y en la supervivencia de la población estudiada. La supervivencia de la población inmigrante fue del 61% frente a un 73% del resto de pacientes, siendo la supervivencia del registro nacional de un 74%. La causa fundamental del fallecimiento fue en los inmigrantes la progresión de la enfermedad oncológica.

Respecto a las variables psicosociales, sólo el 20% de los inmigrantes tenían una situación económica favorable frente al 62% de los no inmigrantes, y el 10% de los inmigrantes tenían una buena estructura familiar frente al 60% del grupo control. Las alteraciones del comportamiento difieren significativamente en el niño inmigrante respecto al grupo control (un 42% de los niños inmigrantes reflejaban alteraciones de la conducta frente al 8% del grupo control)³.

Una persona gravemente enferma se vuelve vulnerable y débil. Si el paciente es extranjero, con independencia del *país de procedencia*, va a tener una serie de diferencias idiomáticas, culturales y sociales que puede provocarle problemas más allá de la misma enfermedad.

- **Variables propias de la enfermedad**, como el tipo de cáncer, pronóstico y fase de la enfermedad:

Tras el diagnóstico, los padres se plantean si deben o no **informar** a su hijo. Es importante ser sincero con el niño y sensible a sus demandas. La información que se les proporciona depende de su capacidad de comprensión y de su edad⁴; asimismo, hay niños que requieren información para reducir su ansiedad, y otros que la rechazan, evitando preguntar y mostrando ansiedad cuando se les explican los procedimientos médicos. Es importante respetar su voluntad e ir dando respuesta a medida que el niño lo vaya pidiendo.

En ocasiones, el propio niño deja de preguntar como una forma de proteger a sus padres, ya que percibe la ansiedad y el miedo que representa para ellos el tener que contestar; sin embargo, otras veces es la familia la que utiliza la fragilidad del niño, su temprana edad, la dificultad que supone debatir o explicar el diagnóstico y el pronóstico, para guardar esto en un secreto que nunca debe ser revelado al niño; por ambas partes se crea lo que llamamos “conspiración de silencio”. Poder llegar a valorar si la demanda de información está anulada por decisión propia o por protección a su familia es tarea difícil, pero imprescindible. Los padres que afrontan mejor estas situaciones son los que dan al niño la información y el apoyo emocional que el niño va necesitando.

Impacto del tratamiento

El periodo del **tratamiento** genera una serie de efectos secundarios que repercuten en su fisiología y vienen acompañados de sensaciones y malestar emocional (Tabla 1), pero quizás el principal efecto secundario, que cobra vital importancia tanto a lo largo de la enfermedad como en el tratamiento, es el **dolor**. En pacientes con cáncer, el dolor es muy frecuente y perturba el bienestar. La propia enfermedad y al-

gunos procedimientos pueden causar dolor, hasta el punto de que muchos niños consideran que estas intervenciones son incluso peores que la misma enfermedad^{2,4}. Esto plantea un problema importante en la adaptación al cáncer en la niñez. El dolor en los niños se puede manifestar con síntomas diferentes, como pesadillas, insomnio, anorexia y retraimiento.

El desajuste psicológico es claro. La descripción de trastornos psiquiátricos y psicológicos reactivos al cáncer es un hecho. Muchos autores afirman que determinados trastornos de ansiedad, depresión o adaptativos están vinculados al cáncer. Una buena evaluación va a facilitar el manejo de herramientas con las que luego poder realizar una adecuada y adaptada intervención, que ofrezca al niño un mayor control de su cuerpo.

El uso de instrumentos sencillos, como la “Escala de Caritas Feliz-Triste” de McGrath, permite evaluar este tipo de reacciones en los más pequeños². La intervención que se propone en la mayoría de la bibliografía va enfocada al control de la respiración, relajación guiada, y un buen entrenamiento previo a los procedimientos.

En nuestra unidad, se utiliza la Escala Flacc para la valoración del dolor, junto con la Escala de Caritas. De forma adicional introducimos una valoración cognitivo-conductual, en la cual se pueden valorar y trabajar aspectos cognitivos de la vivencia del dolor y de su manejo (qué pienso, qué siento, qué hago).

Otro de los efectos a resaltar es el **cambio en la imagen física**. Éste es un recordatorio constante para el niño con cáncer que le indica que “es diferente a otros niños”. Suelen experimentar una serie de cambios corporales, que en algunos casos son reversibles, tales como la ganancia o pérdida de peso, pérdida de pelo, mucositis... En otros casos, se mantienen de forma permanente, como las amputaciones, esterilidad, secuelas neuropsicológicas y anomalías esqueléticas. Estos cambios inciden sobre la autoestima. La falta de confianza en algunos casos lleva a un comportamiento regresivo, retraimiento social, miedo a ir al colegio..., lo que afecta de forma integral en su desarrollo como persona.

El **trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH)** se ha convertido en uno de los procedimientos, y en muchos casos, en la única opción curativa. A pesar de ser una terapia invasiva, es una esperanzadora línea de tratamiento, con una implicación de cambio de pronóstico importante dentro de la onco-hematología.

Estas terapias agresivas han mejorado la supervivencia, pero también han despertado un interés especial en el impacto del tratamiento sobre la calidad de vida y el ajuste conductual⁵. Los niños y adolescentes sometidos a un TCPH son más vulnerables a

sufrir alteraciones cognitivas, problemas en el rendimiento académico y aislamiento social^{6,7}, es decir, el TCPH supone una significativa amenaza al bienestar, a su desarrollo personal y social. La primera fase postrasplante es el momento en el que surgen más complicaciones⁸. En este periodo los niños pueden volverse retraídos, demandantes de atención y con un comportamiento difícil. Síntomas como la ansiedad, la depresión, la irritabilidad y la hipervigilancia alcanzan su punto máximo en el periodo de hospitalización⁹.

Hay factores como la enfermedad injerto contra huésped (EICH), las hospitalizaciones prolongadas, las infecciones, la edad, o el tipo de trasplante (autólogo o alogénico) que son claves para el aumento del estrés¹⁰. La Sociedad Americana de Hematología y Trasplante de Médula Ósea¹¹ (ASBMT) propone una serie de recomendaciones para los supervivientes a largo plazo. Los pacientes pediátricos pueden experimentar cambios en su comportamiento, cambios en sus hábitos sociales y cambios en el rendimiento académico. Como mínimo, sería bueno realizar a los 6 y 12 meses después del trasplante revisiones para valorar síntomas depresivos y el grado de bienestar del paciente. En nuestro centro, dentro del protocolo de trasplante, se realizan valoraciones en el pretrasplante, y a los 3, 6 y 12 meses postrasplante. Se valoran aspectos comportamentales, de calidad de vida, y síntomas de ansiedad y estrés. Esto nos ha permitido analizar de modo prospectivo en el periodo 2006-2007 a 43 pacientes pediátricos sometidos a un TCPH. Los niños de entre 6 y 18 años presentan una ansiedad significativamente mayor en el pretrasplante que a los 3 y 6 meses postrasplante. Probablemente se debe a la incertidumbre acerca del tratamiento y de su estado físico y clínico futuro. En niños de 1 a 5 años de edad los problemas del sueño son significativamente mayores 6 meses después del trasplante que en el pretrasplante. Si el niño no está entonces hospitalizado, aparentemente muestra síntomas postraumáticos como miedo y pesadillas. Si continúa hospitalizado, ello puede ser signo de complicaciones serias postrasplante que imposibilitan un sueño prolongado. El sufrimiento emocional en ambos casos está relacionado con las quejas somáticas y problemas emocionales causados por los efectos colaterales del trasplante (EICH, aislamiento, bajo tono muscular, altas dosis de medicación, incertidumbre, recaída...). Es decir, conocer datos acerca de, en este caso, la calidad de vida de estos niños y cómo ésta evoluciona a lo largo del tiempo permite establecer una línea base que nos proporciona información en cuanto a los déficits y problemas que surgen en las distintas etapas de este proceso, con el fin de establecer posibles pautas para una intervención tanto preventiva como terapéutica.

Tabla 2. Concepto de muerte según etapa evolutiva del niño de la American Academy of Pediatrics⁸

0-2 años	La muerte no es un concepto real ni formal, se percibe como separación o abandono. Hay protesta y desesperación ante la interrupción en el cuidado
2-6 años	El niño desarrolla su pensamiento prelógico: creencias mágicas y egocéntricas. La muerte es reversible o temporal. Es percibida como castigo. El niño puede sentirse responsable de ella
6-11 años	El niño desarrolla un pensamiento lógico. El concepto de muerte va tomando una gradual conciencia de irreversibilidad y de final. La muerte en sí misma, específica de él mismo o de un ser querido, es difícil de comprender. Ya existe un razonamiento concreto y habilidad de establecer relaciones "causa-efecto" (¿qué pasa con el cuerpo?)
11+ años	El niño ya tiene un pensamiento abstracto con un razonamiento filosófico de la muerte. Comprende que es irreversible, universal e inevitable. Todo el mundo, incluso uno mismo, va a morir, tarde o temprano, aunque la propia muerte se percibe muy lejana. Hay un periodo crítico de aceptación. Se tiene miedo a lo que puede pasar antes de la muerte (dolor y sufrimiento)

Necesidades de los pacientes en remisión

Con la obtención de tasas de supervivencia más altas, se han puesto en evidencia las secuelas derivadas de la enfermedad y de su tratamiento. Por este motivo, la Sociedad Internacional de Oncología Pediátrica (SIOP), en 1996, creó un documento en el que se exponían las "Recomendaciones para la atención de sobrevivientes a largo plazo"⁴.

En general, se puede decir que alrededor de un 50% de los supervivientes vuelven a la normalidad anterior a la enfermedad; un 25% se enriquece de la experiencia sin presentar ningún tipo de secuelas, y el otro 25% restante tiene secuelas físicas, psíquicas, emocionales y sociales. Es clara la repercusión de determinados tratamientos y procedimientos en estas secuelas. Además, las experiencias traumáticas pueden llegar a repercutir en la futura normalidad de los niños.

Debemos aquí resaltar, por ejemplo, los trabajos del grupo de Valencia, interesados en los avances neuropsicológicos y su utilidad en la evaluación y rehabilitación de las posibles secuelas¹².

Los estudios cada vez se centran más en conseguir una adecuada valoración y consiguiente intervención para los supervivientes. Anne Kazak, especialista en supervivientes de cáncer, propone un modelo para el estrés producido por experiencias médicas en pediatría (Pediatric Medical Traumatic Stress, PMTS)¹³.

Cuidados paliativos

¿Pero qué pasa cuando la enfermedad no remite? El niño en esta situación va a tener diferentes sensaciones, las cuales sirven de indicadores subjetivos sobre cómo evoluciona su enfermedad. La última fase se va a caracterizar por el adiós y la despedida¹⁴.

Una vez más la información recobra especial importancia. Los niños, según la etapa de desarrollo

evolutivo en que se encuentren, tienen un concepto y una forma de expresar la idea de muerte diferente (Tabla 2)¹⁵. En otro estudio pendiente de publicación realizado en el Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, retrospectivamente entre los años 2006 y 2007, observamos que antes de fallecer un 55% de los niños sabe que se va a morir, un 24% saben que "las cosas van mal", pero un 22% tan sólo sabe "que está enfermo".

Manejar la comunicación y ofrecer herramientas para abordar la aceptación de la fase final de la vida de un hijo puede ayudar a disminuir el temor y la ansiedad que tan frecuentemente rodean al niño y su familia. La posibilidad de expresar los sentimientos puede ayudar al niño a enfrentarse a su situación y proporcionarle seguridad.

Para abordar el concepto de muerte en el niño es necesario tener en cuenta las características individuales de cada niño, y los factores personales, religiosos, culturales y vivenciales.

Las reacciones más comunes son:

- *Miedo al abandono y la separación.*
- *Miedo al dolor y al sufrimiento.*
- *El permiso para irse.* Los niños perciben el sufrimiento de los familiares más allegados. Perciben cómo les "agarran" a la vida. Saben que irse supondrá un profundo dolor en aquellos que más aman. Y siguen protegiéndoles, como lo han hecho desde el principio de la enfermedad.
- *Depresión.* La pena y la tristeza se establecen desde el principio casi de la enfermedad. El niño va pasando por una serie de pérdidas y va elaborando diversos duelos (pérdida de su socialización, pérdida de su escolarización, pérdida en algunos casos de un miembro, pérdida de movilidad...) ¹⁶.
- *Ansiedad.* El miedo se acentúa debido a la conciencia del dolor y sufrimiento previo por el que se tiene que pasar antes de morir.
- *Rabia y furia.* Sentimiento muy común, en especial en los adolescentes. La rebeldía y la no aceptación de aquello que es inevitable. Los sentimientos de

frustración aparecen, en cierta manera, por su falta de autonomía e intimidad¹⁶.

- *Esperanza*. Frecuentemente buscan esperanza, confort o consuelo. Buscan respuestas positivas para creer que no todo va tan mal. Además, saben a quién deben preguntar y a quién no.
- *Fatiga*. El agotamiento de la propia enfermedad, la lucha por la que han estado pasando, los tratamientos, el sufrimiento, el dolor, la falta de una vida con normalidad son factores que agotan a los niños.

Conclusiones

La repercusión de la enfermedad onco-hematológica en la infancia es claramente devastadora. Una intervención multidisciplinar debe ofrecer una mayor calidad de vida tanto al niño como a su familia. Los aspectos somáticos son la base del tratamiento. No obstante, para conseguir una buena adherencia y adaptación, es necesario contar con el soporte de un equipo integrado por médicos, enfermeras, auxiliares, maestros, trabajadores sociales, psicólogos, voluntarios... que abarque de forma global tanto los aspectos físicos y biológicos como el resto de aspectos (emocionales, sociales y de cuidados). El objetivo es facilitar el proceso y la adaptación a la enfermedad, al tratamiento y a la vuelta a la normalidad, e incluso facilitar una buena despedida de estos niños cuando sea necesario.

Bibliografía

- Méndez X, Orgilés M, López-Roig S, Espada JP. Atención psicológica en el cáncer infantil. *Psicooncología* 2004; 1 (1): 139-54.
- Méndez Venegas J. Intervención emocional y conductual para el niño con cáncer y su familia. *Gamo* 2005; 4 (3): 60-64.
- Catá del Palacio E, Hernández Núñez-Polo M, Blumenfeld Olivares J, Pérez Martínez A, Madero López L. El niño inmigrante con cáncer: un paciente más que vulnerable. Ediciones Témpora, Obra Social Caja Madrid; 2006.
- Salas M, Gabaldón O, Mayoral JL, Arce M, Amayra I. Evaluación y control de síntomas en oncología pediátrica: una necesidad que cubrir y un mundo por descubrir. *Psicooncología* 2004; 1 (2-3): 231-50.
- Kreitler S, Krivoy E. Psychological intervention with the dying child. En: Kreitler S, Ben Arush MW. (eds.). *Psychological Aspects of Pediatric Oncology*. Wiley; 2004. p. 389-414.
- Lorane CCh. A model of health behavior to guide studies of childhood cancer survivors. *Oncology Nursing Forum* 2003; 30 (5): 93-9.
- Barrera M, Atenafu E. Cognitive, educational, psychosocial adjustment and quality of life of children who survive hematopoietic SCT and their siblings. *Bone Marrow Transplant* 2008; 42 (1): 15-21.
- Michel G, Bordigoni P, Simeoni M-C, Curtillet C, Hoxha S, Robitail S, et al. Health status and quality of life in long-term survivors of childhood leukaemia: the impact of haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2007; 40 (9): 897-904.
- Barrera M, Boyd Pringle L-A, Sumbler K, Saunders F. Quality of life and behavioural adjustment after pediatric bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26: 427-35.
- Lee SJ, Loberiza FR, Antin JH, Kirkpatrick T, Prokop L, Alyea EP, et al. Routing screening for psychosocial distress following hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2005; 35: 77-83.
- Rizzo JD, Wingard JR, Tichelli A, Lee SJ, Van Lint MT, Burns LJ, et al. Recommended screening and preventive practices for long-term survivors after hematopoietic cell transplantation: joint recommendations of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, the Center for International Blood and Marrow Transplant Research, and the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12 (2): 138-51.
- Recomendaciones para la atención de sobrevivientes a largo plazo. Recomendaciones sobre aspectos psicosociales en oncología pediátrica. Sociedad Internacional de Oncología pediátrica (SIOP). *Medical and Pediatric Oncology* 1996; 27: 1-2.
- Bernabéu J, Cañete A, Fournier C, López B, Barahona T, Grau C, et al. Evaluación y rehabilitación neuropsicológica en oncología pediátrica. *Psicooncología* 2002; 0 (1): 117-34.
- Kazak A, Kassam-Adams N, Schneider S, Zelikovsky N, Adlerfer MA, Rourke M. An integrative model of Pediatric Medical Traumatic Stress. *Journal of Pediatric Psychology* 2006; 31 (4): 343-55.
- Hernández Núñez-Polo M, Pérez Martínez A, Madero López L. Agonía en el niño. En: Navarro Campoamor J (ed.). *Qué más podemos hacer. Cómo aliviar el dolor*. Papalaguinda; 2005. p. 114-36.
- Wolfe J, Tournay A, Zeltzer LR. Palliative care for children with advanced cancer. En: Kreitler S, Ben Arush MW (eds.). *Psychological Aspects of Pediatric Oncology*. Wiley; 2004. p. 45-70.

EL ADULTO CON HEMOPATÍA MALIGNA: ASPECTOS PSICOTERAPÉUTICOS

J. BARBERO GUTIÉRREZ

Psicólogo Adjunto del Servicio de Hematología. Hospital Universitario La Paz. Madrid

Hemopatía maligna y experiencia de sufrimiento

No cabe ninguna duda de que la mala noticia de padecer una hemopatía maligna supone una fuente de amenaza para los afectados, en especial para el paciente, pero también para la familia. Cuántas veces hemos visto a una persona recién ingresada en planta, por primera vez, con una enorme sensación de perplejidad y desconcierto. En ocasiones, sin clínica importante –al menos desde su experiencia subjetiva–, pero con unos indicadores analíticos hematológicos más que preocupantes, motivo de ingreso. El paciente, que probablemente días antes seguía trabajando con normalidad, se encuentra de manera brus-

ca ingresado, en un contexto nuevo y desconocido, en un lugar donde muchos de sus compañeros (los otros pacientes) le empiezan a contar las dificultades y penurias de sus padecimientos y de los tratamientos concurrentes. Al principio, no entiende casi nada, está impactado por las primeras informaciones y aproximaciones terapéuticas que hacemos los clínicos y, sobre todo, sufre...

Pero ¿qué variables intervienen en esa experiencia de sufrimiento? La obviedad de que la hemopatía maligna genera sufrimiento, de por sí, no nos aclara cuáles son las variables que lo construyen ni las vías de intervención. Comencemos comentando dos premisas importantes. En primer lugar, los clínicos sabemos que sólo se diagnostica aquello en lo que se piensa. El hematólogo, como es obvio, centra su diagnóstico diferencial en los indicadores de la sangre alterados y allí centra sus esfuerzos. Sabe de la experiencia de sufrimiento de sus pacientes, pero esto no aparece en el foco de su atención. Es un proceso lógico de atención selectiva. Sin embargo, otros profesionales –entre ellos, y de manera muy significativa, el psicólogo– saben que esa experiencia es central en el primer diagnóstico y en la primera intervención.

En segundo lugar, cualquier diagnóstico ha de haber investigado las distintas variables intervinientes. También en el caso de la valoración del sufrimiento. El hecho de que el ser humano –de por sí– conozca la experiencia de sufrimiento y el hecho de que la supongamos en los pacientes hematológicos no nos ayuda, en sí mismo, a diagnosticar e intervenir. Quizás porque el sufrimiento escapa a nuestra libertad, no se elige, sino que se padece y además de manera personalizada, distinta e intransferible, con lo que se hace mucho más difícil definirlo de una manera universal. Por otra parte, solemos equiparar sufrimiento a su expresión emocional más habitual: la angustia, definiendo el todo simplemente por una de sus partes. Un estado emocional negativo no define necesariamente el sufrimiento, pues aunque todo sufrimiento supone malestar, no todo malestar alcanza necesariamente la categoría de sufrimiento.

La impresión es que no se sabe muy bien qué hacer ante la poliédrica experiencia de sufrimiento y en la base de ello, probablemente, está la compleja conceptualización del mismo. ¿Cómo poder intervenir, entonces, ante algo que ni siquiera sabemos definir en sus componentes? La experiencia dice, además, que el contacto con algo percibido como temible –el sufrimiento de un paciente joven con leucemia, por ejemplo, puede impactar negativamente– y de difícil manejo, por su condición de *intangible* y su difícil operativización como problema, puede conducir a muchas conductas de evitación y de escape.

En torno a la conceptualización del sufrimiento en el ámbito clínico encontramos una importante confu-

sión¹, con interesantes aportaciones teóricas²⁻⁴, pero sin propuestas conocidas de intervención basadas en el análisis y las relaciones de las variables intervinientes. A partir de esta constatación, considerando los trabajos de Chapman y Gravin⁵ y ciñéndonos al ámbito de los cuidados paliativos, venimos desarrollando un modelo⁶ que entendemos como generalizable, en el que afirmamos que una persona *sufre* cuando acontece algo que percibe como una **amenaza importante para su existencia, personal u orgánica, y al mismo tiempo cree que carece de recursos para hacerle frente**. Como vemos, se trata de un *equilibrio* en el que no sólo cuenta la existencia de una amenaza (aparición de un linfoma, abandono de la pareja...) o su percepción misma, sino también la capacidad de afrontamiento ante esa amenaza, es decir, su controlabilidad que, en el extremo opuesto, puede ser definida como indefensión o impotencia. También habrá que considerar la presencia de moduladores añadidos, en especial, el estado de ánimo habitual –puede ser de tipo depresivo, ansioso, agresivo...– y los factores contextuales-ambientales.

Este análisis del sufrimiento humano es útil para poder delimitar sobre qué variable podemos intervenir. Al ser una experiencia separable en distintos componentes, nos permite objetivar mejor dónde puede estar el foco del problema y en qué elementos será más efectiva la intervención. En el ámbito de los enfermos con hemopatías malignas, a modo de ejemplo, podríamos incidir en:

1. La reducción o desaparición de la *estimulación psicossocial* desagradable: por ejemplo, asesorando a la familia acerca de pautas interrelacionales que eviten los reproches al paciente por haberse saltado alguno de los enjuagues de prevención de la mucositis o fomentando la presencia de voluntarios...
2. La reducción o desaparición de la *estimulación biológica* desagradable, que interacciona con la estimulación anterior: por ejemplo, aplicando la escala analgésica de la Organización Mundial de la Salud...
3. La disminución de la *percepción de amenaza*: por ejemplo, con una buena reestructuración cognitiva acerca del *realismo* de la misma... (como bien sabemos, no todos los linfomas tienen los mismos pronósticos, ni la misma enfermedad sigue los mismos procesos en todos los pacientes, etc.).
4. El incremento del *sentimiento de controlabilidad* frente al de indefensión: por ejemplo, fomentando la toma de decisiones con respecto a las visitas por parte del paciente...
5. Enseñar estrategias para reducir el *estado de ánimo* ansioso con medicación, visualización, relajación rápida y diferencial...
6. Fomentar un *contexto* más agradable y estimulante, más variado, menos depresógeno, que favorez-

ca la presencia de objetos personales y significativos, etc.

Estamos, por tanto, ante una parte de la experiencia de sufrimiento que podemos categorizar como problema; se están investigando instrumentos diagnósticos que ayuden a detectarlo⁷ y evaluarlo; se proponen modelos de intervención... ¿Podemos empezar a hablar ya, por tanto, de parte de la experiencia de sufrimiento como de un “síndrome”, de etiología y expresión multiaxial, con su correspondiente categoría diagnóstica? A mi entender, el abordaje del sufrimiento, al menos de aquella parte que tiene de evitable, habría de considerarse como una prestación básica del sistema sanitario, aunque la experiencia nos diga que suele figurar en la *cartera de servicios* de muchos servicios de hematología.

Con este planteamiento no estamos apartando, ni mucho menos, la intervención psicoterapéutica ante los síntomas constitutivos de trastorno mental, en el ámbito de la hemopatía maligna⁸. Entre otras cosas, por su importante prevalencia. En los casos de enfermedad avanzada, la mitad de los pacientes padecen estos síntomas⁹, que pueden aparecer con cuadros de ansiedad¹⁰, depresión¹¹, insomnio¹², etc., etc. Estos cuadros ya están expresando, de por sí, experiencia de sufrimiento, pero ésta es mucho más generalizable y omnipresente.

Supervivencia biológica y supervivencia biográfica. Los procesos de adaptación

Afortunadamente, hoy ya son muchos los pacientes con hemopatías malignas graves que sobreviven a sus patologías. Por citar sólo un ejemplo, el trasplante de médula ósea (TMO) ha supuesto una esperanza real para muchos enfermos oncológicos por su capacidad de disminuir el riesgo de recaída, prolongar la supervivencia y posibilitar la curación en un gran número de casos. En los últimos años un tipo especial de TMO, el trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH), se ha generalizado como tratamiento de elección en muchos pacientes hemato-oncológicos o con tumores sólidos quimiosensibles¹³.

Sin embargo, el proceso es largo y difícil, tanto desde el punto de vista biológico como desde el biográfico. Como muchos pacientes, de un modo u otro, nos dicen, hay un antes y un después de la hemopatía maligna. Se percibe un cambio en los intereses, en los afectos, en los vínculos y en los valores.

Para poder sobrevivir biográficamente, se necesita ir realizando, de forma paulatina, un determinado proceso de adaptación, jalonado por una amplísima muestra de reacciones emocionales, que incluyen síntomas depresivos, ansiosos, vivencia de culpa, rabia y un largo etcétera, pero también por el uso de

distintas estrategias de afrontamiento (bloqueo-inhibición, negación, racionalismo, etc.).

Para los supervivientes, no siempre es fácil ni posible resituarse de manera adecuada en su realidad cotidiana. Van a necesitar apoyo explícito, en muchas ocasiones, para hacerlo posible. A veces será suficiente con los apoyos formales e informales de tipo sociofamiliar. En otros momentos, la intervención profesional va a ser necesaria.

Intervención al final de la vida

Los servicios de hematología están situados –con toda lógica– en hospitales de agudos. Nuestro primer objetivo va a ser curar y, en el caso de enfermedades crónicas, controlar la patología. Los hospitales de agudos no están diseñados, ni en su estructura, ni en sus procesos asistenciales, para atender específicamente los procesos avanzado-terminales que conducen al final de la vida. Sin embargo, la presencia de la muerte es habitual en nuestras unidades.

De todos es sabido que la fase avanzado-terminal de nuestros pacientes tiene diferencias significativas¹⁴ con los pacientes oncológicos de tumores sólidos, al menos –y esto es muy importante– desde la perspectiva de la temporalidad. Una vez que se cambia a una actitud de limitación del esfuerzo terapéutico, disponemos de muy poco tiempo para intervenir: suele ser días, tiempo realmente escaso para asumir objetivos que tienen más que ver con cuidar que con curar. De ahí la importancia de ubicar de manera integrada la perspectiva paliativa, con el desarrollo de protocolos específicos¹⁵ que, desde una perspectiva psicoterapéutica, puedan aliviar y sostener al paciente y a su familia en esos momentos tan duros como especiales.

El duelo de los familiares y allegados

Otra de las dificultades de la intervención psicoterapéutica estriba en la dificultad de llevar a cabo el seguimiento de los familiares una vez fallecido el paciente, desde los dispositivos hospitalarios. La vivencia de la pérdida de un ser querido es lo que llamamos “duelo” o “proceso de duelo”, y podríamos definirlo como la **respuesta emocional por la pérdida y separación, total e irreversible, de alguien o de algo significativos.**

Respuesta emocional: aparecen sobre todo, pero no sólo, una intensa experiencia de sufrimiento (“me duele el alma”, dicen algunos) y de vacío, que puede ir variando a lo largo del proceso.

Por la pérdida: no sólo de la persona, sino también de lo que representaba (el que se hacía cargo de las

gestiones en el banco, quien organizaba lo cotidiano de la casa...).

Y separación: se trata de una desvinculación, y los vínculos suelen aportar la sensación de seguridad, protección y de afecto.

Total e irreversible: es total en el sentido de que afecta a las esferas más significativas del ser humano (los afectos, el contacto físico, los planes de futuro, etc.) y, además, es una pérdida sin retorno, sin vuelta atrás.

De alguien o de algo significativos: si el vínculo no es significativo, no hay experiencia de duelo, aunque haya pérdida. En estas reflexiones nos vamos a centrar en el duelo por la muerte de un ser querido, aunque es conocido que el duelo puede experimentarse por la pérdida de un trabajo, por emigrar a un país lejano, etc.

El problema surge cuando hay indicadores de riesgo de duelo complicado. Según la mayor parte de los estudiosos de estas cuestiones, aproximadamente un 10-20% de los dolientes tendrán importantes dificultades en su proceso de adaptación a la pérdida¹⁶. Es lo que conocemos como duelo complicado (para otros, categorizado como duelo anormal, atípico, patológico, etc.). Algunas circunstancias pueden convertirse en factores de riesgo para su aparición¹⁷:

1. La modalidad de la muerte: cuando es súbita y, en este sentido, inesperada.
2. La relación ambivalente (es imposible de aclarar) o de dependencia (no se puede entender el mundo sin él, se necesita una nueva razón para vivir) con la persona fallecida.
3. Apoyo social deficitario: familia no cohesionada o que no facilite la expresión de la tristeza.
4. Sentimientos de inutilidad durante el proceso de enfermar del difunto.

La intervención psicoterapéutica, que incluye a pacientes y familiares, no puede olvidarse, desde su perspectiva sanitaria, de la posible presencia de estas complicaciones. De hecho, parte del trabajo psicoterapéutico, mientras el paciente vive, se encuentra en la dinámica preventiva de duelo complicado.

Dos claves necesarias: trabajo preventivo y trabajo en equipo

El apoyo emocional, una parte de la intervención psicoterapéutica, es responsabilidad de todo el equipo, aunque seamos los psicólogos –desde nuestras estrategias profesionales– quienes han de liderar los procesos que posibiliten ese apoyo. Sin trabajo en equipo, no hay posibilidades de desarrollarlo adecuadamente. En muchos servicios de hematología el trabajo en equipo es más una ficción que una realidad. Los objetivos asistenciales han de ser los mismos, y las in-

tervenciones, claramente complementarias, lo cual no se consigue con la suma de disciplinas implicadas, sino con el suficiente consenso interno¹⁸ y externo en el funcionamiento.

Por otro lado, parece fundamental el trabajo psicoterapéutico en dinámica preventiva. Conociendo los procesos de la experiencia de sufrimiento y los factores amenazantes de la hemopatía maligna, la intervención preventiva es de obligado cumplimiento. Por ello, la intervención psicoterapéutica no puede ser a demanda, sino con un plan concreto, adecuadamente diseñado y sistemático, claramente programado. La intervención psicoterapéutica es un elemento crucial para la mejora de la calidad de vida de las personas con afectación hemopatológica maligna.

Consideraciones finales

La intervención psicoterapéutica en el ámbito de la hemopatía maligna está claramente indicada¹⁹. Parece una enorme responsabilidad moral dotar de ella a los servicios de recursos adecuados para que pueda ofertarse a los pacientes y familiares de manera sistemática e integrada.

Bibliografía

1. Kaasa S. Suffering. A multidimensional concept in clinical practice. *TPCC Bulletin* 1995; 12: 3.
2. Cassell EJ. The nature of suffering: physical, psychological, social and spiritual aspects. En: Stark P, McGovern J (ed.). *The hidden dimension of illness: human suffering*. New York: National League for Nursing Press; 1992. p. 1-10.
3. Saunders C. The philosophy of terminal care. En: Saunders C (ed.). *The management of terminal malignant disease*. Londres: Arnold; 1984. p. 232-41.
4. Loese JD, Melzack R. Pain: an overview. *Lancet* 1999; 353: 1607-9.
5. Chapman CR, Gravin J. Suffering and its relationship to pain. *J Palliat Care* 1993; 9 (2): 5-13.
6. Bayés R, Arranz P, Barbero J, Barreto P. Propuesta de un modelo integral para una intervención terapéutica paliativa. *Medicina Paliativa* 1996; 3 (3): 114-21.
7. Bayés R. Una estrategia para la detección del sufrimiento en la práctica clínica. *Rev Soc Esp Dolor* 2000; 7: 70-4.
8. Arranz P, Coca C. Intervención psicológica con pacientes oncohematológicos. En: Remor E, Arranz P, Ulla S. *El psicólogo en el ámbito hospitalario*. Bilbao: Desclée de Brower; 2003. p. 641-78.
9. Breitbart W, Chochinov HM, Passik SD. Psychiatric symptoms in palliative medicine. En: Doyle D, Hanks G, Chrenney N, Calman K (eds.). *Oxford Textbook of Palliative Medicine*. 3rd. ed. Oxford University Press; 2004.
10. Grov EK, Dahl AA, Moum T, Fosså SD. Anxiety, depression, and quality of life in caregivers of patients with cancer in late palliative phase. *Ann Oncol* 2005; 16 (7): 1185-91.
11. Solano JP, Gomes B, Higginson IJ. A comparison of symptoms prevalence in far advanced cancer, AIDS, heart disease, chronic obstructive pulmonary disease and renal disease. *J Pain Symptom Manage* 2006; 31 (1): 58-69.

12. Santaella MJ, Santuri RB. Sleep in palliative care. En: Doyle D, Hanks G, Chrenney N, Calman K (eds.). Oxford Textbook of Palliative Medicine. 3rd. ed. Oxford University Press; 2004.
13. Devetten M, Armitage JO. Hematopoietic cell transplantation: progress and obstacles. *Annals of Oncology*, disponible online 12 de marzo de 2007, en: <http://www.revistatog.com/num6/pdfs/original3.pdf>.
14. Altés A. Medidas paliativas en pacientes con tumores hematológicos. En: Gómez-Sancho M (ed.). *Avances en Cuidados Paliativos*. Las Palmas de Gran Canaria: GAFOS; 2003. p. 307-13.
15. Arranz P, Barbero J, Barreto P, Bayés R. Intervención emocional en cuidados paliativos. Modelo y protocolos. 3.ª ed. Barcelona: Ariel; 2008.
16. Kristjanson L, Lobb E, Aoun S. A systematic review of the literature on complicated grief. www.health.gov.au. Australia; 2006.
17. Sanders CM. Risk factors in bereavement outcome. En: Stroebe MS, Stroebe W, Hansson RO (eds.). *Handbook of bereavement: theory, research and intervention*. Cambridge: Cambridge University Press; 1999. p. 255-67.
18. Gorchs N, Roca J. Equipos interdisciplinarios. En: Gómez-Batiste X, Planas J, Roca J, Viladiu P (eds.). *Cuidados paliativos en oncología*. Barcelona: JIMS; 1996. p. 355-63.
19. Arranz P, Ulla S, Coca C. Leucemias, linfomas y mielomas. En: Die Trill M (ed.). *Psico-oncología*. Madrid: Ades; 2003. p. 225-38.

SEXUALIDAD Y FERTILIDAD: UN RETO TRAS EL CÁNCER

A. GARCÍA NIETO

Psicóloga. Fundación Hospital Puerta del Mar. Cádiz

Introducción

Desde que cada vez más pacientes consiguen sobrevivir después de sufrir un cáncer, la disfunción sexual y la infertilidad están reconociéndose como la consecuencia negativa de los tratamientos que está teniendo mayor impacto sobre la calidad de vida. Y aunque las necesidades y los aspectos psicológicos relacionados con la sexualidad en estos enfermos no han constituido una preocupación de la práctica habitual por parte de los profesionales, excluyendo algunos aspectos de los tumores genitourinarios, es una preocupación cada vez más importante de los pacientes y sus cuidadores.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la sexualidad como el resultado de la interacción de factores biológicos, psicológicos, socioeconómicos, culturales, éticos, religiosos y espirituales. Aunque puede abarcar todos estos aspectos, no es necesario que se experimenten ni se expresen simultáneamente, pero tal diversidad de condicionantes confiere a la sexualidad de cada persona un marcado carácter personal y específico que se manifiesta en lo que somos,

sentimos, pensamos y hacemos. La sexualidad la define cada paciente y su pareja de acuerdo con la edad, el sexo, las actitudes personales y los valores religiosos y culturales.

Master y Jonson desarrollaron el estudio más importante sobre respuesta al estímulo sexual, distinguiendo 4 etapas sucesivas: excitación, meseta, orgasmo y resolución; otros modelos representan estas fases de diferente forma. Es preciso tener en cuenta conceptos que forman parte de la satisfacción y el interés por la sexualidad, y no sólo del funcionamiento sexual, tales como la libido, la imagen corporal y las emociones¹.

El *DSM-IV* considera cuatro categorías principales de disfunción:

1. Trastornos del deseo sexual, que incluyen el deseo sexual inhibido (o hipoactivo) y el trastorno por aversión al sexo.
2. Trastornos de la excitación sexual, diferenciándolo en el hombre (trastorno de erección) y en la mujer.
3. Trastornos del orgasmo, diferenciando también entre disfunción orgásmica femenina y masculina, e incluyendo además una categoría específica para el diagnóstico de la eyaculación precoz.
4. Trastornos sexuales por dolor, que comprenden la dispareunia y el vaginismo.

Prevalencia

No se conoce con exactitud la prevalencia de las disfunciones sexuales en la población general aunque, a pesar de que existen importantes variaciones según los estudios, los datos existentes apuntan que un porcentaje elevado de hombres y mujeres padecen a lo largo de su vida alguna disfunción sexual. En un estudio en que participaron 1.749 mujeres y 1.410 hombres de entre 18 y 59 años, la disfunción sexual fue más prevalente en la mujer (43%) que en el hombre (31%)². En otro estudio sobre 3.005 adultos de entre 57 y 85 años, la actividad sexual bajó con la edad: 73% entre 57 y 64 años de edad, 53% entre 65 y 74 años, y 26% entre los 75 y los 85 años. Aunque muchos hombres y mujeres son activos sexualmente en su madurez, sólo el 38% de los hombres y el 22% de las mujeres habían hablado de sexualidad con sus médicos desde los 50 años³.

La disfunción sexual se cita como la mayor fuente de distrés para los supervivientes de cáncer⁴. El estudio *MALES* confirma la alta prevalencia de disfunción eréctil y su asociación con enfermedades médicas, que en España es del 10%⁵. En pacientes con linfoma un estudio mostró disfunción eréctil en el 16,3% y una disminución del deseo sexual en el 20,4%⁶. En otro estudio realizado sobre pacientes oncohematológicos el 60% mostró problemas en la

fase de deseo, el 75% en la de excitación y el 75% en la de orgasmo⁷.

Sexualidad y cáncer

La causa de las alteraciones sexuales en estos pacientes es multifactorial, abarcando tanto factores físicos como psicológicos. Los problemas que aparecen se relacionan con cada una de las fases del ciclo de la respuesta sexual y pueden ser también diferentes dependiendo del momento de la enfermedad: el diagnóstico altera dramáticamente las relaciones íntimas de los afectados, pueden existir trastornos previos o presentarse efectos tardíos debidos, por ejemplo, al trasplante de médula ósea.

La disfunción eréctil en el hombre, y la seducción y el deseo en la mujer son las causas fundamentales de producción de distrés; la edad, la pareja y su dinámica, así como la personalidad del paciente también ejercen una influencia importante.

La propia enfermedad y algunos medicamentos pueden producir deterioro del estado general y cambios en la imagen corporal (cambios de peso y masa muscular, alopecia, *cushing*), sequedad en la secreción vaginal o alteración hormonal (menopausia precoz, disminución de testosterona), neuropatía (cisplatino o vincristina) que pueden mermar el deseo y la capacidad sexual. Muchos tipos de cáncer y sus tratamientos pueden causar disfunción sexual debido al daño directo de sus órganos sexuales. La mitad de las mujeres que han sido tratadas por cáncer ginecológico y cáncer de mama padecen de disfunción sexual a largo plazo. Muchos hombres que han sido tratados de cáncer de próstata o testículo tienen problemas de disfunción eréctil, que varía dependiendo del tipo de tratamiento recibido. Los pacientes hematológicos con patología oncológica sólo son sometidos a cirugía o tratamientos locoregionales ocasionalmente, y es el tratamiento quimioterápico el causante fundamental de los trastornos. Algunos efectos secundarios comunes que se padecen después de la quimioterapia incluyen astenia, alteraciones digestivas y de los sentidos. La pérdida del cabello y el pelo púbico es uno de los efectos secundarios más angustiosos que se asocian con los cambios en la imagen corporal, y producen en ocasiones sentimientos de asexualidad. La medicación analgésica con opioides o antidepresivos, frecuentemente utilizados en pacientes con mieloma múltiple y linfoma, puede reducir el deseo sexual por distintas vías. El miedo al embarazo o a las infecciones durante los tiempos de quimioterapia también produce importantes alteraciones. Muchos pacientes sienten temor o ansiedad cuando se enfrentan a sus primeras experiencias sexuales después de los tratamientos onco-

lógicos, lo que hace que se desarrollen conductas de evitación de las relaciones.

Pero, además de todo esto, son los factores psicológicos los que van a tener mayor relevancia en una proporción muy elevada de pacientes con cáncer. Hasta el 60% muestra alteración de la imagen corporal que afecta tanto al funcionamiento sexual como a la forma de expresión de su sexualidad. El impacto emocional de la enfermedad y la frecuente aparición de ansiedad o depresión pueden producir disminución o incluso pérdida del deseo y la actividad sexual⁸.

En el caso particular de los adolescentes y adultos jóvenes, el cáncer y los cambios en la imagen corporal que produce suponen un obstáculo para las relaciones interpersonales, el desarrollo de la propia sexualidad y el de la autoestima⁹.

También hay que tener en cuenta que muchas de las enfermedades oncohematológicas son más frecuentes en pacientes de edad, y que existe poca información a este respecto.

A diferencia de muchos otros efectos secundarios fisiológicos del tratamiento del cáncer, los problemas sexuales no tienden a resolverse durante el primer o segundo año de supervivencia sin enfermedad. A pesar de que no está claro cuánto pueden influir en la calidad de vida relacionada con la salud del paciente, estos problemas son claramente molestos en muchos pacientes, e interfieren con el proceso de éstos de reintegrarse a la rutina diaria después del tratamiento. En el mayor estudio sobre sexualidad en pacientes trasplantados, realizado por el grupo de Seattle, el 80% de las mujeres y el 46% de los hombres presentaron problemas sexuales a los 5 años del trasplante, lo que demuestra que la disfunción sexual es una de las complicaciones tardías más frecuentes que ocurren después del trasplante¹⁰. En la fase terminal de la enfermedad, la necesidad de placer, de compañía, de amor, de relajación, de afirmación o de expresar la cólera induce a una gran variedad de formas de relación. Ciertas parejas abandonan totalmente el sexo, algunas se satisfacen con tocamientos, y otras se lanzan a relaciones sexuales activas, desesperadas e incluso violentas¹¹. Se deben evitar propuestas que puedan no ser deseadas por el paciente o que contradigan los principios de los cuidados paliativos.

A menudo, las parejas superan con éxito el estrés que producen el aumento de los gastos y el cambio de responsabilidades, pero su relación se ve gravemente amenazada por los problemas sexuales. La enfermedad invade zonas muy privadas de la relación de pareja, y es común que éstas tengan ansiedad e importantes dudas sobre la sexualidad durante el tratamiento. El 10-20% de los pacientes experimentan tensión en sus relaciones de pareja, muchas de las veces debido a su cambio de rol (cuidado-cuidador) y

entre el 25 y el 50% de los cónyuges o parejas sufren algún tipo de alteración (cefalea, pérdida de apetito, ansiedad, depresión, trastornos del sueño, etc.). Por el contrario, en un número importante de parejas sus relaciones se intensifican. Una inquietud primordial de las personas es si el cáncer es contagioso y si cualquier disfunción sexual que surja a raíz del tratamiento será permanente.

Algunos trabajos señalan la importancia de incluir la atención referida a estos temas a los cuidadores de los pacientes con cáncer, y la bibliografía sugiere que los cuidadores sufren mayor estrés incluso que los pacientes¹².

Hay pocos datos sobre la sexualidad de los pacientes homosexuales con cáncer.

Información

Las necesidades no satisfechas de información sobre estos temas son elevadas: fertilidad (42,8%), sexualidad (82,2%) y tratamiento de fertilidad (62,4%)¹³. En un estudio realizado por nosotros en 80 pacientes con enfermedades oncohematológicas, el 67,5% no recibió información del personal sanitario sobre sexualidad, aunque el 76,3% afirma considerar necesaria la información y el apoyo continuado en estos temas¹⁴.

Los resultados de un estudio muestran insatisfacción con referencia a la información y el soporte concernientes a la sexualidad en pacientes con linfoma, por lo que debe mejorar el tema de la sexualidad en el planteamiento terapéutico de estos pacientes¹⁵. Tampoco las necesidades de información están definidas en pacientes con otros tipos de cáncer.

Recomendaciones

Los profesionales sanitarios tienen un privilegiado acceso a aspectos íntimos de la vida de los pacientes, por lo que el abordaje de estos temas y la incorporación a la historia clínica, desde el inicio de la enfermedad y a lo largo de la evolución, permitiría mejorar algunos aspectos de la sexualidad de los pacientes, a la vez que detectar los casos que necesitan de una consulta especializada (conflictos matrimoniales importantes, disfunción no transitoria).

Consideramos fundamental la indagación e intervención sobre problemas de imagen corporal, baja autoestima, ansiedad, depresión, sentimientos de la pareja y cambio de roles, disminución del impulso sexual, disfunción eréctil y dispareunia. Son modelos a utilizar el PLISSIT (*P: permission; LI: limited information; SS: specific suggestion; IT: intensive therapy*) o el BETTER (*B: bringing; E: explaining; T: tell; T: timing; E: educated; R: record*).

En la terapéutica será aconsejable la intervención sobre la pareja. Se deberá utilizar tratamiento médico adecuado (antidepresivos, hormonoterapia, inhibidores de la fosfodiesterasa) y técnicas de terapia sexual combinadas con técnicas de reestructuración cognitiva y de entrenamiento en nuevas habilidades de afrontamiento. También es importante identificar y estimular conductas sexuales alternativas, y concebir la sexualidad como algo abierto y flexible.

Fertilidad y cáncer

La infertilidad se define como la incapacidad para concebir después de 1 año de relaciones sin uso de anticoncepción. Un 4% aproximadamente de los pacientes con cáncer tiene menos de 35 años. Se estima que cada año 76.600 americanos tratados por cáncer puedan sufrir infertilidad. Los linfomas no Hodgkin y las leucemias se sitúan entre los 5 tipos de cáncer más frecuentes en pacientes menores de 40 años.

La tasa de infertilidad permanente o temporal después del tratamiento del cáncer varía y depende de muchos factores. Los efectos del tratamiento dependen del fármaco y de las dosis. El uso de quimioterapia con alquilantes tiene un efecto importante sobre la fertilidad, aunque otros tratamientos muy frecuentemente utilizados no parecen afectar de forma importante esta función de forma permanente¹⁶. En mujeres el tratamiento anticanceroso puede provocar fallo ovárico. La infertilidad en el hombre puede resultar de la propia enfermedad (Hodgkin), de insuficiencia hormonal secundaria, o más frecuentemente del daño de las células germinales¹⁷. Además de la infertilidad producida directamente por los fármacos, existe una "infertilidad impuesta" por la obligatoriedad de no procrear durante los tratamientos. La fertilidad puede verse afectada transitoria o permanentemente después del tratamiento oncológico o manifestarse más tardíamente como resultado del fallo ovárico. La normalidad de la menstruación no garantiza una fertilidad normal. Incluso en casos en que la fertilidad se conserva inicialmente después del tratamiento, puede acortarse por la aparición de una menopausia precoz. La recuperación después del trasplante en los pacientes con síndromes linfoproliferativos es un largo proceso que debe contar con una adecuada intervención y soporte¹⁸.

La infertilidad puede ser emocionalmente muy dolorosa. No es infrecuente que determinados hombres o mujeres puedan vivirla como una pérdida de su masculinidad o feminidad, lo que les produce un importante estrés. Algunas mujeres jóvenes la refieren tan traumática como la propia experiencia del cáncer. También ser padre o madre después de los tratamientos constituye un desafío no sólo médico

sino también psicológico de relevancia, debido a los miedos que suscitan el riesgo de transmisión genética del cáncer, la recurrencia de la enfermedad, la incertidumbre de no saber si verán crecer a sus hijos o por los métodos de reproducción asistida o adopción empleados a veces¹⁹.

Recomendaciones

Antes del tratamiento los pacientes deberían recibir información sobre las probabilidades de que se produzca infertilidad así como de sus opciones de preservación. La información debe ser de calidad y tener en consideración la vulnerabilidad de muchos de estos pacientes debido a su temprana edad. Además, es necesario que cuando exista distrés moderado o severo relacionado con estas cuestiones los pacientes sean derivados para recibir atención psicológica²⁰.

Bibliografía

- Lucas M, Cabello F. Introducción a la sexología clínica. Madrid: Elsevier España; 2007.
- Laumann EO, Paik A, Rosen RC. Sexual dysfunction in the United States. Prevalence and predictors. *JAMA* 1999; 281 (6): 537-44.
- Lindau ST, Schumm LP, Laumann EO, Levinson W, O'Muircheartaigh CA, Waite LJ. A study of sexuality and health among older adults in the United States. *N Engl J Med* 2007; 357 (8): 762-74.
- Grau JA, Llantá MC, Chacón M, Fleites G. La sexualidad en pacientes con cáncer: algunas consideraciones sobre su evaluación y tratamiento. *Rev Cubana Oncol* 1999; 15 (1): 49-65.
- Rosen RC, Fisher WA, Eardley I, Niederberger C, Nadel A, Sand M. The multinational Men's Attitudes to Life Events and Sexuality (MALES) study: I. Prevalence of erectile dysfunction and related health concerns in the general population. *Curr Med Res Opin* 2004; 20 (5): 604-17.
- Jonker-Pool G, Hoekstra HJ, van Imhoff GW, Sonneveld DJ, Sleijfer DT, van Driel MF, et al. Male sexuality after cancer treatment--needs for information and support: testicular cancer compared to malignant lymphoma. *Patient Educ Couns* 2004; 52 (2): 143-50.
- Melo Ade S, Carvalho EC, Pelá NT. The sexuality of patients with onco-hematological diseases. *Rev Lat Am Enfermagem* 2006; 14 (2): 227-32.
- Schover LR. Sexuality and fertility after cancer. *Hematology* 2005: 523-7.
- Evan EE, Kaufman M, Cook AB, Zeltzer LK. Sexual health and self-esteem in adolescents and young adults with cancer. *Cancer* 2006; 107 (7 Suppl): 1672-9.
- Syrjala KL, Kurland BF, Abrams JR, Sanders JE, Heiman JR. Sexual function changes during the 5 years after high-dose treatment and hematopoietic cell transplantation for malignancy, with case-matched controls at 5 years. *Blood* 2008; 111 (3): 989-96.
- Gianotten MD. Sexuality in the palliative-terminal phase of cancer. *Sexologies* 2007; 16: 299-303.
- Bishop MM, Beaumont JL, Hahn EA, Cella D, Andrykowski MA, Brady MJ, et al. Late effects of cancer and hematopoietic stem-cell transplantation on spouses or partners compared with survivors and survivor-matched controls. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1403-11.
- Hordern AJ, Street AE. Communicating about patient sexuality and intimacy after cancer: mismatched expectations and unmet needs. *MJA* 2007; 185 (5): 224-7.
- García-Nieto A, Capote FJ. Sexualidad y fertilidad en pacientes con neoplasias hematológicas. Valoración de sus necesidades de información. *AAHH*; 2008.
- Zebrack B. Information and service needs for young adult cancer patients. *Support Care Cancer* 2008 Apr 2; [epub ahead of print].
- van der Kaaij MA, Heutte N, Le Stang N, Raemaekers JM, Simons AH, Carde P, et al. Gonadal function in males after chemotherapy for early-stage Hodgkin's lymphoma treated in four subsequent trials by the European Organisation for Research and Treatment of Cancer: EORTC Lymphoma Group and the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol* 2007; 25 (19): 2825-32.
- Magelssen H, Brydøy M, Fosså SD. The effects of cancer and cancer treatments on male reproductive function. *Nat Clin Pract Urol* 2006; 3 (6): 312-22.
- Syrjala KL, Langer SL, Abrams JR, Storer B, Sanders JE, Flowers ME, et al. Recovery and long-term function after hematopoietic cell transplantation for leukemia or lymphoma. *JAMA* 2004; 291 (19): 2335-43.
- Schover LR. Psychosocial aspects of infertility and decisions about reproduction in young cancer survivors: a review. *Med Pediatr Oncol* 1999; 33 (1): 53-9.
- Lee SJ, Schover LR, Partridge AH, Patrizio P, Wallace WH, Hagerty K, et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. *J Clin Oncol* 2006; 24: 2917-31.

Novedades en el diagnóstico y tratamiento de alteraciones hemostáticas

COORDINADOR: V. ROLDÁN. *Murcia*

Resumen del simposio

En los próximos años vamos a asistir a una auténtica revolución en el campo de la hemostasia, si bien más terapéutica que diagnóstica. Los nuevos anticoagulantes orales, diseñados para obviar la monitorización del laboratorio, con una amplia ventana terapéutica y pocas interacciones tanto farmacológicas como dietéticas, ofrecen la posibilidad de ampliar el número de pacientes que acceden al tratamiento antitrombótico y el de indicaciones, así como la duración del mismo. Por otra parte, nunca hasta la fecha hemos podido disponer de la posibilidad de elegir una diana terapéutica específica, ya sea inhibiendo directamente la actividad de la trombina como atenuando la generación de la misma. En este sentido, el Dr. Mateo nos aportará información acerca del desarrollo científico de estos fármacos y nos relatará los primeros resultados conseguidos con ellos.

De forma paralela, y siguiendo en el campo de la terapéutica, también tenemos novedades en el grupo de los fármacos antiagregantes. Si bien nadie discute el valor terapéutico de la aspirina –al que luego se sumarían los inhibidores de las tienopiridinas–, seguimos teniendo casos de pacientes que se escapan a su protección. Los nuevos fármacos antiagregantes parecen proporcionar mayor rapidez de inicio de acción (véase el prasugrel), lo que podría sugerir que son más eficaces; por otra parte, la reversibilidad de otros (AZD6140, cangrelor) los podría hacer quizá más seguros. Finalmente, el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas, como el bloqueo del receptor de trombina, ofrece la posibilidad de inhibir la función plaquetaria por otro mecanismo. El Dr. Fernández-Ortiz y sus colaboradores nos ofrecen una puesta al día sobre la terapia antiagregante.

Finalmente, a pesar de los notables avances que ha experimentado el laboratorio de hemostasia con la automatización del mismo, el desarrollo de la biología molecular aplicada a la hemostasia, los anticuerpos monoclonales y la informatización, seguimos sin tener pruebas lo suficientemente rápidas y sencillas, así como precisas, que evalúen exactamente el riesgo hemorrágico de los pacientes. Todos conocemos las limitaciones de los tiempos de coagulación (tiempo de protrombina [TP] y de tromboplastina parcial activada [TTPA]) a la hora de evaluar y poder predecir el riesgo de sangrado periquirúrgico. Aunque están surgiendo diferentes sistemas para evaluar la hemostasia de forma global, en un intento de reproducirla lo más fielmente posible, sigue siendo la historia clínica una de las mejores armas que tenemos a la hora del cribado general de los trastornos hemorrágicos. La Dra. Lozano hace una puesta al día de las pruebas diagnósticas de utilidad en la exploración del sistema hemostático.

Por último, la inclusión en este simposio de dos comunicaciones permite abordar otros aspectos novedosos en el campo de la hemostasia. No sólo es importante mejorar las dianas terapéuticas, sino que también tenemos que ser capaces de predecir las respuestas terapéuticas. En ese sentido, el desarrollo de la farmacogenética va a permitir elegir el fármaco más conveniente, así como ajustar la dosis para afinar al máximo en su eficacia y seguridad y para prevenir toxicidades. Así, en una de las comunicaciones la Dra. Pérez Andreu, busca el perfil genético que determine la necesidad de dosis extremas para alcanzar el nivel anticoagulante con los fármacos antivitaminas K, ya que son estos pacientes los que tienen mayor riesgo trombótico y hemorrágico. La otra comunicación nos adentra en el mundo de la bioinformática, demostrando cómo las alertas electrónicas mejoran la prevención de enfermedad tromboembólica en pacientes hospitalizados. Tras su implantación en el año 2005, el Dr. Lecumberri nos presentará sus resultados a 2008, que muestran una excelente tasa de eficacia.

PRUEBAS DIAGNÓSTICAS DEL SISTEMA HEMOSTÁTICO: ¿TRADUCEN LA REALIDAD?

M.L. LOZANO, J. RIVERA,
L. NAVARRO-NÚÑEZ, V. VICENTE
*Unidad de Hematología y Oncología Médica.
Hospital General Universitario Morales Meseguer.
Centro Regional de Hemodonación
y Universidad de Murcia*

Históricamente, la evaluación médica del sistema de la hemostasia comenzó con la observación visual macroscópica del proceso de coagulación. En la época de los grecorromanos y bizantinos, durante la realización de las flebotomías, el tamaño del coágulo en un barril (retracción del coágulo) se empleaba para determinar cuándo debía interrumpirse la sangría¹. Al principio del siglo XX, la determinación manual de los tiempos de coagulación en sangre total y, posteriormente, del plasma en tubos de cristal permitió una evaluación más exacta del proceso. Avances posteriores en hemostasia en los años treinta y cuarenta llevó a disponer de ensayos más sofisticados, incluyendo el tiempo de protrombina (TP), tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) y tests específicos de función plaquetaria y fibrinólisis. Con el desarrollo de los anticuerpos monoclonales, análisis molecular y los sistemas informatizados, a partir de los años ochenta hemos asistido a una explosión en el conocimiento de la hemostasia y en su evaluación, que continúa hasta la actualidad. En el laboratorio de hemostasia, los ensayos automatizados han reemplazado a los procedimientos manuales del pasado, y existe un interés creciente en disponer de tests rápidos, sensibles y eficaces para valorar la función hemostática perioperatoria, en enfermos con problemas hemorrágicos, en pacientes con tratamientos antitrombóticos, así como en estados de hipercoagulabilidad. Es llamativo que la medición de la formación y retracción del coágulo es aún el foco de atención de varias de estas técnicas, un hecho que probablemente apreciarían los primeros médicos. Este manuscrito presenta una visión general de las técnicas que en la actualidad pueden emplearse en el laboratorio de hemostasia clínica, si bien es posible que rápidamente algunas de ellas puedan ser reemplazadas, o sufrir modificaciones en su utilidad, de acuerdo con la información que se desprende de los estudios que se llevan a cabo.

Antecedentes

In vivo, la hemostasia y la trombosis son resultado de una interacción compleja entre el endotelio activado o lesionado, y mecanismos dependientes de la acti-

vación plaquetaria y de factores de coagulación. Las deficiencias congénitas o adquiridas en estas respuestas pueden conllevar complicaciones hemorrágicas o eventos trombóticos. El ensayo ideal en este sentido debería incorporar los tres determinantes de trombosis y hemostasia descritos por Virchow: componentes de la sangre, pared vascular y flujo sanguíneo. Además, si estos ensayos reflejaran los resultados de la hemostasia *in vivo*, idealmente deberían: 1) posibilitar la monitorización de la formación de trombo mediada por las plaquetas y la coagulación de forma rápida y a tiempo real; 2) emplear varias velocidades de flujo reproducibles sobre superficies trombogénicas; y 3) ser sensibles a diversas clases (y combinaciones) de fármacos y a variaciones intra- e interindividuales.

Evaluación en el laboratorio

Ensayos de cribado globales

La evaluación en el laboratorio se orienta exclusivamente hacia el análisis del riesgo de sangrado. El riesgo trombótico, hasta ahora, se basaba en la información clínica y en la exploración de estados trombofílicos. La evaluación de la hemostasia, excluyendo los casos de monitorización específica de los pacientes bajo terapias antitrombóticas o procoagulantes, se suele llevar a cabo con la realización de una serie de ensayos sucesivos.

En un primer paso, la aproximación tradicional para la evaluación en el laboratorio de pacientes en los que se sospecha sangrado anormal ha sido el empleo de una batería de tests de cribado que incluía TP, TTPA y recuento de plaquetas. El recuento de plaquetas es un ensayo que se solicita de rutina: son conocidos los frecuentes errores en el recuento automatizado, generalmente en el sentido de infraestimación por la formación *in vitro* de microagregados, secundarios a una extracción defectuosa, o por aglutinación debida al ácido etilendiaminotetracético (EDTA). La trombopenia reciente debería controlarse por microscopía y, si se considera necesario, en muestras de sangre citratada.

Desafortunadamente, los ensayos que analizan la coagulación, TP y TTPA, adolecen de poca sensibilidad, especificidad, y valor predictivo positivo y negativo²⁻³. Cuando se interpretan los tests de cribado, hay que tener en cuenta diversas consideraciones: 1) los tiempos de coagulación pueden verse influidos por variables preanalíticas, como una extracción dificultosa, contaminación por heparina, una estasia venosa prolongada, o llenado del tubo o centrifugación incorrecta⁴; y 2) los rangos de normalidad se establecen usando el valor medio y dos desviaciones estándar de mues-

tras de una población representativa. Como resultado, el 2,5% de muestras normales tendrán tiempos de coagulación prolongados. Estas consideraciones son de particular importancia en relación con el empleo de estos ensayos de coagulación antes de intervenciones quirúrgicas para predecir el riesgo en pacientes no seleccionados. La evidencia actual no apoya que se lleven a cabo este tipo de estudios⁵. Así, hasta el 95% de anomalías de la coagulación o de hemostasia con potencial significación clínica en pacientes médicos y quirúrgicos pueden ser detectadas simplemente con el empleo de una historia clínica adecuada y la realización de un examen físico. Además, se puede reducir en un 25-55% el número de ensayos preoperatorios con la introducción de guías clínicas y protocolos, sin efectos perjudiciales sobre los pacientes. Por ello, el uso de escalas de sangrado con orientación clínica representa una buena práctica clínica y conlleva un importante ahorro económico.

Tras la realización de los exámenes de cribado, en base a los resultados de éstos y de las circunstancias clínicas de los pacientes, se solicitan ensayos para explorar específicamente defectos en la hemostasia primaria, secundaria, o fibrinólisis, identificar el mecanismo responsable del sangrado y adoptar las medidas correctoras apropiadas.

Ensayos globales de hemostasia primaria

El tiempo de sangrado tiene varias limitaciones. Es dependiente del operador, pobremente reproducible, invasivo, y no predice el riesgo de sangrado quirúrgico. No es suficientemente sensible para detectar trastornos moderados de la hemostasia primaria. Así, el 50% de pacientes con enfermedad de Von Willebrand (EvW) de tipo 1⁶, y cerca del 33% de pacientes tratados con dosis repetidas de aspirina no muestran prolongaciones del tiempo de sangrado respecto al control⁷, y tampoco predice el sangrado quirúrgico⁸.

Recientemente, se ha desarrollado un sistema sencillo que puede llevarse a cabo como sistema de diagnóstico cercano al paciente (*point of care testing*). El PFA-100 (Dade Behring Inc., Deerfield [Illinois], Estados Unidos) simula la hemostasia primaria a alto flujo. Pequeñas cantidades de sangre citratada se aspiran a un flujo de 5.000-6.000 s⁻¹ a través de un capilar. La sangre llega a una membrana con una apertura central de 150 µm recubierta con colágeno-epinefrina o con colágeno-adenosín difosfato (ADP). La adhesión y agregación plaquetaria causan la oclusión de la apertura. Los resultados se informan como tiempos de oclusión en segundos. El tiempo de oclusión está influenciado por variables preanalíticas, que deben ser estandarizadas, y de la presencia de anemia y trombopenia. Es altamente dependiente de concentraciones de factor de

Von Willebrand (FvW). Numerosos estudios han examinado los tiempos de oclusión en trastornos congénitos y adquiridos de función plaquetaria, y estos datos han sido extensivamente revisados por un grupo de trabajo del Subcomité de Fisiología Plaquetaria de la ISTH-SSC⁹. Aunque el test es adecuado para la detección de la EvW, su sensibilidad es variable en relación con trombotopatías congénitas. El grupo de trabajo concluyó que “un tiempo de oclusión normal puede ayudar a excluir ciertos defectos plaquetarios severos y EvW moderada-severa; pero, si la sospecha clínica es fuerte, es obligado realizar ensayos adicionales”. Por tanto, el ensayo carece de la sensibilidad y especificidad requeridas para su uso rutinario como test de cribado. Tampoco tiene un papel definitivo ni establecido en la evaluación del riesgo de sangrado en relación con la terapia antiplaquetaria, ya que la aspirina puede prolongar el tiempo de oclusión con colágeno-epinefrina, pero el ensayo es insensible a las tienopiridinas¹⁰. En relación con el sangrado perioperatorio, algunos estudios han mostrado correlación con el tiempo de obturación¹¹, aunque no otros^{12,13}. En la actualidad no hay suficiente evidencia para adoptar de forma rutinaria el PFA-100 como método de cribado para los trastornos de sangrado. Además, se reconoce que su uso puede asociarse a un diagnóstico de “falsas alteraciones hemostáticas”¹⁴. En la actualidad, son necesarios más estudios para el empleo de este ensayo en la exclusión de diátesis hemorrágicas, aunque sí se puede concluir que supone una alternativa al tiempo de sangrado en la investigación de un posible trastorno hemorrágico.

Ensayos específicos de hemostasia primaria

El estudio de la agregación plaquetaria es el método de referencia y el más empleado en la identificación y diagnóstico de la disfunción plaquetaria. El anticoagulante usado, los agonistas y sus concentraciones, la concentración de plaquetas y el tipo de agregómetro son variables que tienen influencia sobre la prueba, como también los objetivos finales (porcentaje de agregación máxima, tiempo de inicio o *lag-phase*, o la pendiente o velocidad de agregación). Entre otras limitaciones de la agregación plaquetaria cabe destacar que la medición de las respuestas se lleva a cabo bajo condiciones no fisiológicas, con plasma rico en plaquetas (PRP) sometido a una agitación moderada equivalente a una baja velocidad de turbulencia, y tras la adición de un(os) agonista(s) a dosis arbitrarias. Además, se trata de un procedimiento caro, laborioso y relativamente complejo que requiere personal entrenado en su realización. Desde hace tiempo se conoce la influencia del tiempo desde la extracción hasta el desarrollo de la medición: Warlow *et al.* midieron las respuestas plaquetarias de 30 a 120 minutos posveni-

punción, y mostraron que la agregación a epinefrina se incrementó en más de 200%, mientras que las de ADP y colágeno decrecieron ambas aproximadamente un 50% durante ese intervalo de tiempo¹⁵. El volumen de sangre es grande cuando se requiere ensayar múltiples agonistas y concentraciones, y su uso está limitado en caso de trombopenias. Por ello, el empleo de este tipo de ensayos no puede considerarse como indicado en cribado, sino limitado a laboratorios de hemostasia. Para solventar estos problemas, se han desarrollado métodos de *point of care*, más estandarizados y sencillos, que se correlacionan en determinadas circunstancias con la agregación plaquetaria.

El ensayo rápido de funcionalidad plaquetaria (RPFA; **Verify Now** Accumetrics, San Diego [California] Estados Unidos) es un test que valora la agregación en sangre total de pequeñas esferas de poliestireno recubiertas de fibrinógeno en respuesta a un agonista, TRAP o ADP. Este ensayo está automatizado, requiere un pequeño volumen de sangre, y correlaciona bien con la agregación convencional. Una desventaja teórica es que no se realiza en condiciones de flujo. Además, hay dificultades en obtener lecturas basales, con márgenes de error del 15%, y el aparato sólo procesa una muestra cada vez. Se comercializa como método de detección de resistencia a la aspirina y al clopidogrel, correlacionando bien con los ensayos de agregación y es sensible en la determinación de los efectos del bloqueo de glucoproteína IIb/IIIa (GP IIb/IIIa)¹⁶, pero no puede emplearse para valorar otros aspectos de la hemostasia primaria. En general, es un test cuyo empleo todavía no está difundido en nuestro medio.

Platelet Works (Helena Laboratories, Beaumont [Texas] Estados Unidos) también es un ensayo que analiza la agregación plaquetaria en sangre total comparando los recuentos plaquetarios antes y tras agregación con ADP o con colágeno. También existe una buena correlación entre **Platelet Works** y la agregación convencional¹⁷. Ha sido empleado para la detección de resistencia a la terapia antiplaquetaria¹⁸, aunque no ha sido validado como método fiable de evaluación de resistencia a los tratamientos o peor evolución de los pacientes. Tampoco es un método con una aplicación extensa en laboratorios.

El ensayo **Impact Cone and Plate(let) Analyzer** (CPA) (DiaMed, Israel) emplea sangre total que se expone a un flujo uniforme en una cubeta sobre la que gira un cono a gran velocidad, analizándose la adhesión plaquetaria a la superficie de la cubeta y la altura de los trombos. Este ensayo es sencillo de usar, y emplea condiciones de flujo fisiológicamente relevantes, siendo capaz de monitorizar el antagonismo de GP IIb/IIIa, al igual que aspirina y clopidogrel¹⁹. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales que determinen su papel en el seguimiento de la terapia antiplaquetaria.

Tiempos de coagulación

La generación de trombina es un evento central en la hemostasia. Globalmente, cuando la sangre total *in vitro* se activa por factor tisular, aproximadamente el 60% de protrombina se convierte en trombina, de la cual tan sólo se requiere un 3% de la producida durante la fase de iniciación para inducir la formación del coágulo. Así, tras la formación del coágulo, el 97% de la trombina se generará durante la fase de propagación. Los tiempos de coagulación, TP y TTPA tan sólo reflejan la formación inicial de trombina (ese 3% descrito) en base a la aparición del coágulo, mientras que otros eventos que ocurren posteriormente y que son críticos, como cambios en el ensamblaje de la fibrina, activación plaquetaria, fibrinólisis, no se evalúan con este tipo de ensayos. También aportan poca o nula información acerca de la cuantificación de la generación de trombina, polimerización de fibrina o estabilidad del coágulo. Puesto que la prolongación del TP y TTPA requiere deficiencias del 70% de los niveles de factores de coagulación, los déficit menos severos pueden pasar inadvertidos. Deficiencias moderadas de fibrinógeno, disfibrinogenemias, o trastornos como deficiencias en factor XIII o de inhibidores de activador de plasminógeno PAI 1 (*plasminogen activator inhibitor*) no serán reconocidos por estos ensayos. Además, el déficit de factores de la fase de contacto, de factor XII, o anticoagulante lúpico puede inducir a prolongaciones del TTPA que no tienen significación clínica hemorrágica.

Una concentración de fibrinógeno por debajo de 1 g·L⁻¹ prolonga el TTPA de forma moderada. El TTPA se usa para el ajuste de dosis de inhibidores de trombina (fundamentalmente, heparina no fraccionada, con ratios terapéuticos de 2 a 3). Además, la mayor parte de los anticoagulantes lúpicos prolongan el TTPA. Para el cribado preoperatorio, es mejor emplear un reactivo que detecte hemofilia moderada y EvW que uno que revele inhibidores de trombina o anticoagulante lúpico.

El TP se puede considerar adecuado como aproximación diagnóstica a deficiencias severas aisladas de algún factor, o deficiencias combinadas por fallo hepático, déficit de vitamina K, coagulopatía dilucional o de consumo. Una concentración de fibrinógeno por debajo de 0,5 g·L⁻¹, e inhibidores de trombina como heparina, hirudina, o péptidos sintéticos en el rango alto terapéutico también prolongan el TP.

Puesto que, como hemos dicho, el TP y el TTPA son poco sensibles a alteraciones moderadas de factores, el **tiempo de trombina y el fibrinógeno de Von Clauss** constituyen los primeros parámetros complementarios a considerar en caso de sospecha clínica de coagulopatía. La cuantificación de factores individuales se realiza con ensayos derivados del TP o TTPA, con plasmas deficitarios en factores únicos y curvas de

calibración apropiadas para cada factor. Todos los factores de coagulación pueden cuantificarse según este principio, aunque unos pocos pueden ser más informativos, por ejemplo, de factor V como indicador de función hepática.

La exploración de la fibrinólisis en la práctica habitual es muy limitada. En caso de sospecha de coagulación intravascular diseminada, los **productos de degradación de fibrina y dímero D son de utilidad**. Los verdaderos ensayos cuantitativos son preferibles a los semicuantitativos. La fibrinólisis aguda puede ser explorada con el tiempo de lisis de euglobinas, que se reduce a menos de 90 minutos (normal: > 180 min), pero este test es engorroso, poco reproducible, y los resultados son tardíos. Una recuperación pobre de fibrinógeno y una vida media corta tras la sustitución son los mejores indicadores de un consumo excesivo. Cuando el diagnóstico diferencial entre fibrinólisis primaria y secundaria es difícil, la medición adicional de anti-trombina (esperable que esté reducida en coagulación intravascular diseminada y en fibrinólisis secundaria) y de antiplasmina (disminuida en fibrinólisis primaria) puede tener valor.

Pero ¿puede mejorar esta perspectiva?; ¿podríamos disponer de tests de cribado “globales” para el diagnóstico de trastornos de sangrado moderados? En los últimos años hay un interés creciente en ensayos que evalúan el potencial global hemostático y que puedan ser de valor en el diagnóstico de trastornos hemorrágicos.

Ensayos hemostáticos globales

Estos ensayos cuantifican, en sangre total, la fuerza y estabilidad de un trombo formado por la interacción de plaquetas, factores de coagulación, inhibidores y proteínas fibrinolíticas. Se analizan así tanto propiedades bioquímicas (formación del trombo y disolución) como mecánicas. Los analizadores globales tienen en común lo siguiente: 1) la capacidad de monitorizar todos los aspectos de la hemostasia (plaquetas, coagulación y fibrinólisis); y 2) la disponibilidad en el sitio de evaluación. Aunque la tecnología para algunos de estos ensayos está disponible desde 1950, el interés en ellos se ha renovado en los años ochenta, cuando se emplearon para el manejo de los cambios hemostáticos de pacientes sometidos a trasplante hepático. Aplicaciones clínicas actuales incluyen: predicción del sangrado perioperatorio durante la derivación cardiopulmonar, monitorización de la hiper- o hipocoagulabilidad tras cirugía general, y la monitorización de agentes farmacológicos que afectan a: 1) coagulación (heparina, HBPM, FVIIa); 2) plaquetas (inhibidores de GP IIb/IIIa, aspirina); y 3) fibrinólisis (t-PA, estreptoquinasa). Hay poca evidencia de su utilidad como test de cribado para trastornos hemorrágicos. Estos ana-

lizadores cuantifican fundamentalmente cuatro parámetros del trombo: 1) tiempo de formación; 2) velocidad de crecimiento; 3) fuerza; y 4) velocidad de disolución.

El **tromboelastógrafo TEG** (Haemoscope) mide la fuerza elástica (rigidez) de un trombo que se forma en el interior de un contenedor oscilante, mediante cambios en la fuerza de torsión transmitidos a un sensor. Es una metodología especialmente utilizada por anestistas en ambiente perioperatorio.

El **ROTEG** (Pentapharm) es similar al anterior, excepto en que un sistema óptico mide las oscilaciones de un sensor en un contenedor estático, y la formación del coágulo se acelera por el uso de ácido eláigico o factor tisular.

El **Sonoclot** (Sienco) mide las propiedades viscoelásticas de la formación del trombo y su retracción mediante impedancia a un sensor en vibración.

El **PAS** (Platelet Analysis System, Hemodyne) mide la fuerza de contracción plaquetaria (dinas) de un trombo formado entre dos superficies, estando la superior conectada a un transductor.

Además, en los últimos años se han ido perfeccionando los métodos para la determinación de curvas de generación de trombina en plasma. El área bajo la curva de generación de trombina, o el potencial endógeno de trombina, se ha utilizado en la valoración del riesgo tanto hemorrágico como trombótico²⁰. El test parece ser sensible a niveles muy bajos de algunos factores de coagulación, y el potencial endógeno de trombina parece relacionarse con la tendencia clínica al sangrado²¹. Sin embargo, hasta el momento este ensayo no tiene un papel demostrado como test de cribado general en trastornos hemorrágicos.

En conclusión, la investigación en el laboratorio de la hemostasia debe orientarse por el examen clínico y las circunstancias concomitantes. Los tests de laboratorio preoperatorios no deben prescribirse de forma sistemática. Cuando se necesite, esta investigación se lleva a cabo con pasos sucesivos, desde ensayos de cribado a otros más complejos y específicos. En todo caso, dadas las limitaciones de los diversos tests, la obtención de resultados normales no supone inequívocamente la ausencia de defectos hemostáticos. Los ensayos de *point of care*, que evitan los retrasos en la transmisión de datos, contemplan varios aspectos de la hemostasia, desde la hemostasia primaria a la coagulación y fibrinólisis. Aunque desde un punto de vista analítico y conceptual estos sistemas son muy prometedores, sus ventajas sobre las aproximaciones diagnósticas con los tests convencionales raramente se han documentado con grandes estudios de alta calidad metodológica. Consecuentemente, por el momento, no se puede concluir que de su empleo se deriven beneficios en términos de calidad o de su eficacia en la práctica clínica general.

Bibliografía

- Diamandopoulos AA, Goudas PC. The late Greco-Roman and Byzantine contribution towards the evolution of laboratory examinations of bodily excrement. Part 2: sputum, vomit, blood, sweat, autopsies. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43: 90-6.
- Eika C, Havig O, Godal HC. The value of preoperative haemostatic screening. *Scand J Haematol* 1978; 21: 349-54.
- Burk CD, Miller L, Handler SD, Cohen AR. Preoperative history and coagulation screening in children undergoing tonsillectomy. *Pediatrics* 1992; 89: 691-5.
- Lippi G, Franchini M, Montagnana M, Salvagno GL, Poli G, Guidi GC. Quality and reliability of routine coagulation testing: can we trust that sample? *Blood Coagul Fibrinolysis* 2006; 17: 513-9.
- Chee YL, Greaves M. Role of coagulation testing in predicting bleeding risk. *Hematol J* 2003; 4: 373-8.
- Veyradier A, Fressinaud E, Meyer D. Laboratory diagnosis of von Willebrand disease. *Int J Clin Lab Res* 1998; 2: 201-10.
- Buchanan MR, Brister SJ. Individual variation in the effects of ASA on platelet function: implications for the use of ASA clinically. *Can J Cardiol* 1995; 11: 221-7.
- Peterson P, Hayes TE, Arkin CF, Bovill EG, Fairweather RB, Rock WA, et al. The preoperative bleeding time test lacks clinical benefit: College of American Pathologists' and American Society of Clinical Pathologists' position article. *Arch Surg* 1998; 133: 134-9.
- Hayward CP, Harrison P, Cattaneo M, Ortel TL, Rao AK, and the Platelet Physiology Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Platelet function analyzer (PFA)-100 closure time in the evaluation of platelet disorders and platelet function. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 312-9.
- Jilma B. Platelet function analyzer (PFA-100): a tool to quantify congenital or acquired platelet dysfunction. *J Lab Clin Med* 2001; 138: 152-63.
- Despotis GJ, Levine V, Filos KS, Santoro SA, Joist JH, Spitznagel E, et al. Evaluation of a new point-of-care test that measures PAF-mediated acceleration of coagulation in cardiac surgical patients. *Anesthesiology* 1996; 85: 1311-23.
- Forestier F, Coiffic A, Mouton C, Ekouevi D, Chene G, Janvier G. Platelet function point-of-care tests in post-bypass cardiac surgery: are they relevant? *Br J Anaesth* 2002; 89: 715-21.
- Fattorutto M, Pradier O, Schmartz D, Ickx B, Barvais L. Does the platelet function analyser (PFA-100) predict blood loss after cardiopulmonary bypass? *Br J Anaesth* 2003; 90: 692-3.
- Rivera J, Navarro-Núñez L, Lozano ML, Martínez C, Corral J, González-Conejero R, et al. Valor diagnóstico de las pruebas de función plaquetaria. *Haematologica* 2007; 92 (Extra 1): 48-62.
- Warlow C, Corina A, Ogston D, Douglas AS. Proceedings: The relationship between the time interval after venepuncture and the rate of platelet aggregation. *Br J Haematol* 1974; 27: 357-8.
- Paniccia R, Antonucci E, Gori AM, Marcucci R, Giglioli R, Antonucci D, et al. Different methodologies for evaluating the effect of clopidogrel on platelet function in high-risk coronary artery disease patients. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 1839-47.
- Craft RM, Chávez JJ, Snider CC, Muenchen RA, Carroll RC. Comparison of modified Thrombelastograph and plateletworks whole blood assays to optical platelet aggregation for monitoring reversal of clopidogrel inhibition in elective surgery patients. *J Lab Clin Med* 2005; 145: 309-15.
- Mobley JE, Bresee SJ, Wortham DC, Craft RM, Zinder CC, Carroll RC. Frequency of nonresponse antiplatelet activity of clopidogrel during pretreatment for cardiac catheterization. *Am J Cardiol* 2004; 93: 456-8.
- Savion N, Varon D. Impact—the cone and plate(let) analyzer: testing platelet function and anti-platelet drug response. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2006; 35: 83-8.
- Hemker HC, AlDieri R, De Smedt E, Beguin S. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. *Thromb Haemost* 2006; 96: 553-61.
- Al Dieri R, Peyvandi F, Santagostino E, Giansily M, Mannucci PM, Schved JF, et al. The thrombogram in rare inherited coagulation disorders: Its relation to clinical bleeding. *Thromb Haemost* 2002; 88: 576-82.

NUEVOS FÁRMACOS ANTIAGREGANTES: ¿MÁS POTENTES, MÁS SEGUROS Y MÁS EFICACES?

D. VIVAS, J.C. GARCÍA-RUBIRA,
A. FERNÁNDEZ-ORTIZ

*Unidad Coronaria. Instituto Cardiovascular.
Hospital Clínico San Carlos. Madrid.*

Introducción

La rotura o erosión de una placa de ateroma en el árbol coronario pone en marcha de forma inmediata la adhesión, activación y agregación plaquetarias; por ello, la terapia antiagregante plaquetaria constituye un pilar básico en el tratamiento farmacológico de los síndromes coronarios agudos (SCA). Aunque la fisiopatología de este primer paso hemostático supone la liberación de numerosos mediadores que interactúan con múltiples receptores, desde el punto de vista clínico el tratamiento antiplaquetario se ha centrado en tres dianas bien definidas: la inhibición de la enzima ciclooxigenasa con aspirina, la inhibición de la agregación mediada por adenosín difosfato (ADP) con las tienopiridinas y la inhibición de la vía final común de la agregación plaquetaria con los bloqueantes de la glucoproteína IIb/IIIa (GP IIb/IIIa)^{1,2}.

Hoy debemos reconocer que, a pesar de la utilización combinada de estos fármacos, existen todavía pa-

cientes con enfermedad cardiovascular que presentan eventos isquémicos en el seguimiento y, cada vez más, manejamos pacientes en los que el riesgo hemorrágico puede superar el beneficio antiisquémico de estos tratamientos; continúa, por tanto, el interés en encontrar y mejorar la terapia antiagregante con fármacos más eficaces pero también más seguros frente a las complicaciones hemorrágicas. En la presente revisión analizaremos los efectos y las limitaciones de los agentes antiagregantes disponibles en la actualidad –o clásicos–, así como las características de los nuevos, con un desarrollo clínico más avanzado; valoraremos los resultados de los ensayos clínicos hasta ahora publicados; y, finalmente, destacaremos el posible lugar de este segundo grupo en el complejo arsenal terapéutico de los pacientes con enfermedad coronaria.

Fármacos antiagregantes clásicos

Aspirina

La aspirina debe su efecto antiagregante a la inhibición irreversible de la ciclooxigenasa-1, reduciendo así la síntesis de tromboxano A₂, un potente agonista plaquetario. Comparada con placebo, es capaz de evitar en hasta un 53% la incidencia de eventos cardiovasculares en pacientes con enfermedad coronaria³; por ello, hoy es indiscutible su papel en el tratamiento y la prevención de episodios isquémicos en estos pacientes. Por otro lado, la aspirina inhibe la síntesis de prostaglandinas en la mucosa gástrica aumentando el riesgo de hemorragia gastrointestinal. En términos relativos, podría decirse que su efecto antiagregante es moderado, habiéndose comprobado además una importante variabilidad interindividual en la respuesta a la aspirina cuando ésta es valorada *in vitro* con cualquiera de los métodos disponibles⁴. Este hecho ha llevado a la sospecha de que determinados grupos de pacientes escasamente respondedores a la aspirina mantendrían un riesgo elevado de eventos cardiovasculares a pesar de la toma continuada de este fármaco⁴.

Clopidogrel

Las tienopiridinas, ticlopidina y clopidogrel, actúan inhibiendo de forma irreversible el receptor P2Y₁₂ para el ADP en la superficie plaquetaria. Por su menor incidencia de efectos adversos, el clopidogrel es hoy día la tienopiridina más utilizada en la práctica clínica. El clopidogrel ha demostrado mayor eficacia que la aspirina en la prevención de eventos isquémicos en pacientes con enfermedad vascular periférica, ictus o infarto de miocardio previo⁵. Pero sobre todo la com-

binación de ambos fármacos, aspirina y clopidogrel, en pacientes con SCA ha demostrado mayor eficacia que la aspirina sola, tanto a corto como a largo plazo e independientemente de que la estrategia terapéutica elegida sea conservadora o sea invasiva con coronariografía y revascularización precoz^{6,7}.

El efecto antiagregante más potente de esta combinación se acompaña de un aumento en la tasa de hemorragias, aunque ha quedado bien patente en los pacientes con SCA que el beneficio clínico supera con creces los riesgos. Por tanto, la toma conjunta de aspirina y clopidogrel es actualmente un tratamiento fuertemente recomendado en las guías de práctica clínica para el manejo de los SCA^{1,2}. Dado que el efecto antiagregante del clopidogrel se prolonga durante varios días, se recomienda interrumpir el fármaco al menos con 5 días de antelación en los pacientes que precisen de una intervención quirúrgica^{1,2}. Con las indicaciones actuales de mantener el tratamiento con clopidogrel durante 9-12 meses tras un SCA, o incluso más en los pacientes portadores de endoprótesis farmacológicas, este efecto prolongado del clopidogrel puede suponer un importante inconveniente, ya que en ocasiones no es posible cumplir estos plazos antes de una cirugía. También, y al igual que sucede con la aspirina, se ha demostrado una gran variabilidad interindividual en la respuesta antiagregante del clopidogrel, lo que ha llevado a suponer que determinados pacientes con menor inhibición plaquetaria podrían mantener un mayor riesgo de eventos cardiovasculares a pesar de la toma de clopidogrel^{8,9}.

Inhibidores de la GP IIb/IIIa

Los fármacos que inhiben la GP IIb/IIIa actúan impidiendo la unión del fibrinógeno a este receptor, bloqueando así la vía final común de la agregación plaquetaria. Actualmente están comercializados tres agentes inhibidores de la GP IIb/IIIa: el abciximab, el tirofiban y el eptifibatide. Los tres son potentes inhibidores de la agregación plaquetaria y se utilizan durante la fase aguda de los síndromes coronarios por vía endovenosa y durante cortos periodos de tiempo (horas o días). La mayor eficacia de estos agentes se ha demostrado en los pacientes con SCA sin elevación del segmento ST de alto riesgo y que son manejados con una estrategia intervencionista precoz¹⁰; y, en el caso del abciximab, también en los pacientes con SCA con elevación del ST tratados con angioplastia primaria¹¹. Los inhibidores de la GP IIb/IIIa se utilizan añadidos al tratamiento combinado con aspirina y clopidogrel y, de nuevo, su principal efecto adverso es el riesgo de hemorragias potencialmente graves, por lo que su uso debe restringirse en pacientes con alto riesgo de sangrado.

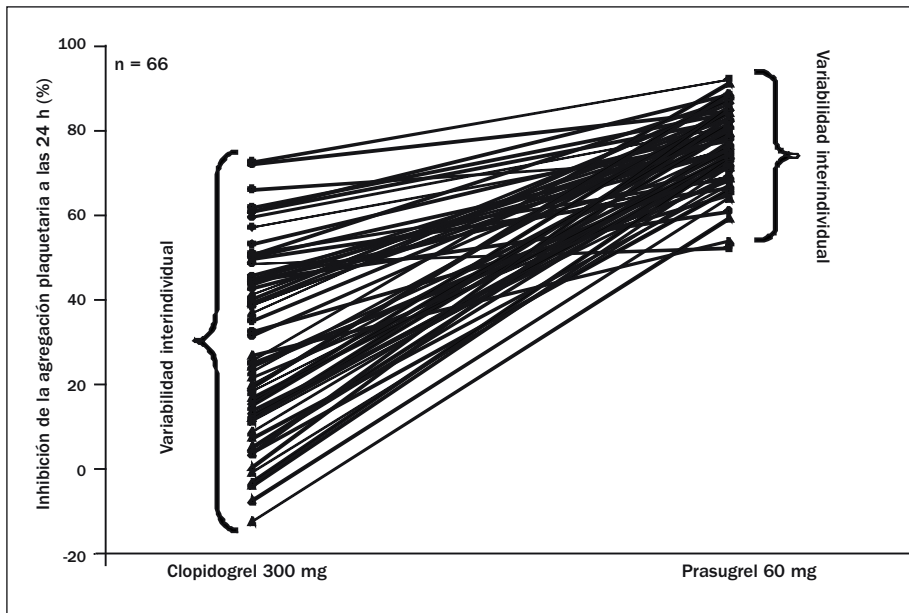


Figura 1. Inhibición de la agregación plaquetaria a las 24 horas de la administración de una dosis de carga de 300 mg de clopidogrel o de 60 mg de prasugrel en un grupo de 66 voluntarios sanos (modificada de Brandt *et al.*^[20]).

Nuevos fármacos antiagregantes

Prasugrel

El prasugrel es una tienopiridina que, al igual que el clopidogrel, inhibe de manera irreversible el receptor P2Y12 para el ADP en la superficie plaquetaria. El prasugrel actúa también a través de un metabolito, pero su inicio de acción es mucho más rápido y su potencia antiagregante mayor que la del clopidogrel. Además, la variabilidad interindividual del efecto antiagregante con prasugrel es mucho menor que con clopidogrel (Figura 1). Los primeros estudios en fase II con este fármaco mostraron ya una incidencia menor de eventos isquémicos tras la angioplastia coronaria en pacientes tratados con prasugrel frente a los tratados con clopidogrel¹². Recientemente se han publicado los resultados del *TRITON-TIMI 38 (TRial to Assess Improvement in Therapeutic Outcomes by Optimizing Platelet Inhibition with Prasugrel-Thrombolysis In Myocardial Infarction)*¹³, primer ensayo en fase III con prasugrel en más de 13.000 pacientes con SCA sin elevación del ST manejados con estrategia invasiva. En este ensayo se compara prasugrel en dosis de carga de 60 mg seguidas de 10 mg diarios frente a clopidogrel en dosis de carga de 300 mg seguidas de 75 mg diarios –ambos tratamientos, durante un periodo de 12 meses–. El evento de valoración primaria de este estudio fue el combinado de muerte, infarto o ictus; y, aunque no se demostraron diferencias aisladas en las cifras de mortalidad global, en los pacientes tratados con prasugrel se redujo de forma significativa la incidencia del evento primario respecto a los tratados con clopidogrel (9,9% vs. 12,1%; $p < 0,001$).

Además, se demostraron también reducciones significativas en el porcentaje de infartos de miocardio

(7,4% vs. 9,7%; $p < 0,001$), necesidad de revascularización quirúrgica urgente (3,7% vs. 2,5%; $p < 0,001$) y trombosis de la ferulización (2,4% vs. 1,1%; $p < 0,001$) en los pacientes tratados con prasugrel respecto a los tratados con clopidogrel.

Por el otro lado, la incidencia de sangrados mayores (1,4% vs. 0,9%; $p = 0,01$) y hemorragias fatales aunque escasas (0,4% vs. 0,1%; $p = 0,002$) fue algo superior en el grupo tratado con prasugrel. Con este ensayo se concluye que la inhibición más potente del receptor de ADP con prasugrel reduce la incidencia de eventos isquémicos pero también aumenta el riesgo de complicaciones hemorrágicas, por lo que el interés se debe centrar en identificar los grupos de pacientes en los que el perfil de riesgo/beneficio con prasugrel sea más favorable. En cualquier caso, la mayor rapidez que este fármaco tiene en su inicio de acción debería suponer ya una ventaja clara para los pacientes que son tratados con angioplastia coronaria y no han recibido el pretratamiento con clopidogrel con antelación suficiente, y también se ha sugerido un posible beneficio del prasugrel en los subgrupos de pacientes con escasa inhibición plaquetaria tras la toma de clopidogrel³.

AZD6140

El AZD6140 es el primer inhibidor oral del receptor plaquetario P2Y12 que actúa de manera reversible. A diferencia de clopidogrel y prasugrel, este fármaco actúa directamente sobre el receptor sin requerir transformación en metabolito activo alguno. Su inicio de acción es rápido, se administra dos veces al día (cada 12 horas) y su efecto antiagregante desaparece de forma precoz

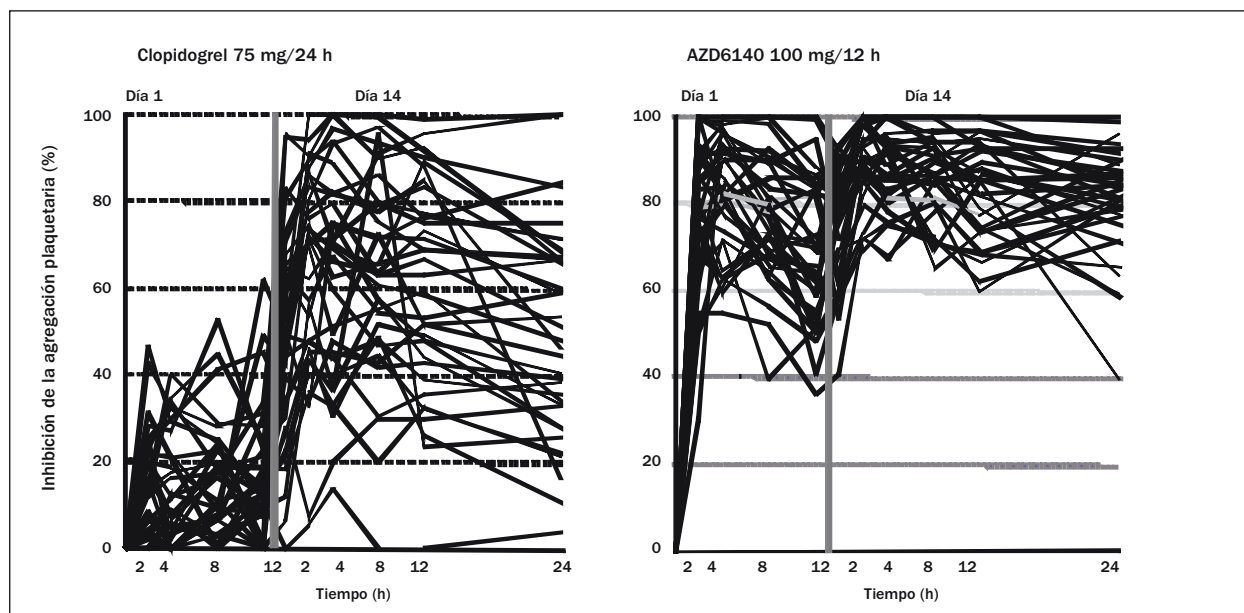


Figura 2. Inhibición de la agregación plaquetaria en las 12 primeras horas y en el día 14 con la administración de clopidogrel 75 mg al día o AZD6140 100 mg dos veces al día (modificado de Husted, presentado en el ESC 2005).

tras suspender el tratamiento (Figura 2). La experiencia inicial con este fármaco en ensayos en fase II con pacientes que presentaban angina estable y SCA^{14,15} ha demostrado una mayor inhibición plaquetaria en comparación con el clopidogrel, sin diferencias significativas en la incidencia de sangrados. Aunque tampoco hubo una reducción global de eventos isquémicos en estos primeros estudios, sí se observó una tendencia a reducir la incidencia de nuevos infartos con dosis crecientes de AZD6140 en comparación con el clopidogrel (5,6% para clopidogrel 75 mg/24 h; 3,8% para AZD6140 90 mg/12 h; y 2,5% para AZD6140 180 mg/12 h; $p = 0,41$ y $p = 0,06$, respectivamente, frente a clopidogrel). Actualmente está en marcha el estudio *PLATO (a study of PLATElet inhibition and patient Outcomes)*, un ensayo en fase III en el que se van a incluir más de 18.000 pacientes con SCA tanto sin elevación del ST como con ella. En este ensayo se compara AZD6140 en dosis de carga de 180 mg seguidas de 90 mg/12 h frente a clopidogrel en dosis de carga de 300 mg seguidas de 75 mg al día, y el evento primario de valoración del estudio será la combinación de muerte de origen cardiovascular, iclus o reinfarcto durante 12 meses de seguimiento. A la espera de los resultados del ensayo, las teóricas ventajas de este fármaco residen en su mayor potencia antiagregante y en su efecto rápidamente reversible. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la necesidad de dos tomas diarias para mantener estable el efecto antiagregante puede verse como un inconveniente para el cada vez mayor número de pacientes portadores de endoprótesis coronarias farmacoactivas.

Cangrelor

El cangrelor es también un antagonista reversible del receptor P2Y₁₂ pero, a diferencia de todos los anteriores, se administra por vía intravenosa con un inicio del efecto antiagregante muy rápido. En los estudios iniciales con este fármaco se valoraron dosis de 2 y de 4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$, y ambas dosis demostraron un buen perfil de seguridad con un efecto antiagregante más potente que el clopidogrel¹⁶. Actualmente está en marcha el estudio *CHAMPION Platform (Cangrelor vs. Standard Therapy to Achieve Optimal Management of Platelet Inhibition)*, estudio multicéntrico en fase III que incluirá 4.400 pacientes con SCA sin elevación del ST manejados con angioplastia coronaria. En este ensayo se compara la administración de cangrelor en el momento de la angioplastia frente a la terapia estándar con clopidogrel. La principal ventaja se le supone para los pacientes que vayan a ser tratados con angioplastia coronaria y no hayan recibido el pretratamiento con clopidogrel con antelación suficiente.

SCH-530348

Aunque existen varias moléculas antiagregantes en desarrollo dirigidas a bloquear otros receptores plaquetarios diferentes de P2Y₁₂, como el receptor del colágeno o la serotonina, es el bloqueante de los receptores plaquetarios para la trombina SCH-530348 el fármaco con un desarrollo clínico más avanzado. La trom-

bina no es sólo un componente esencial en la cascada de coagulación; además, al interactuar con dos receptores plaquetarios pertenecientes a la familia de los receptores activados por proteasas (PAR: *protease-activated receptors*), el PAR1 y el PAR4, constituye un potente activador de las plaquetas. El SCH-530348, que procede de la planta *Galbulimima baccata*, es un agente que se administra por vía oral e inhibe la agregación plaquetaria mediada por la trombina¹⁷. Resultados preliminares en pacientes sometidos a ICP electiva tratados con aspirina y clopidogrel indican una excelente seguridad para el tratamiento con SCH-530348 sin incrementos en la tasa de hemorragias ni en la prolongación de los tiempos de coagulación¹⁸. A este respecto, actualmente está en marcha el estudio *TRACER (Thrombin Receptor Antagonist for Clinical Event Reduction in Acute Coronary Síndrome)*, estudio multicéntrico en fase III que pretende incluir 10.000 pacientes con SCA sin elevación del ST. En este ensayo, sobre la base de tratamiento estándar con la combinación de aspirina más clopidogrel e incluso inhibidores de la GP IIb/IIIa, se comparará la eficacia y seguridad de SCH-530348 frente a placebo durante un periodo de al menos 12 meses de tratamiento. Con su utilización clínica se abre una nueva diana terapéutica que pretende conseguir una mayor y más constante inhibición plaquetaria sin aumentar el riesgo de sangrados.

Conclusiones

A pesar del importante arsenal actualmente disponible para el tratamiento antiagregante plaquetario en los pacientes con enfermedad cardiovascular, estos fármacos todavía presentan ciertas limitaciones que dejan a algunos subgrupos de pacientes sin proteger frente a nuevos eventos isquémicos o que incrementan en otros de forma significativa el riesgo de sangrados. Por este motivo, persiste el interés en perfeccionar y descubrir nuevas dianas terapéuticas que permitan el desarrollo de fármacos antiplaquetarios más potentes, más rápidos, con un efecto más estable y necesariamente más seguros frente al riesgo hemorrágico. Los nuevos fármacos antiplaquetarios son, en general, más potentes y más eficaces en la reducción de eventos isquémicos, pero no son más seguros en la prevención de complicaciones hemorrágicas. En el futuro será necesario investigar además en la identificación de perfiles y momentos clínicos donde la combinación de los antiagregantes actualmente disponibles y la utilización de los nuevos fármacos obtengan su mejor balance riesgo/beneficio.

Bibliografía

1. Bassand JP, Hamm CW, Ardissino D, Boersma E, Budaj A, Fernández-Avilés F, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. *Eur Heart J* 2007; 28: 1598-660.
2. Anderson JL, Adams CD, Antman EM, Bridges CR, Califf RM, Casey DE, et al. ACC/AHA 2007 Guidelines for the management of patients with unstable angina/non-ST-elevation myocardial infarction. *Circulation* 2007; 116: e148-e304.
3. The Anti-Thrombotic Trialists's Collaboration. Collaborative metaanalysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* 2002; 324: 71-86.
4. Hankey GJ, Eikelboom JW. Aspirin resistance. *Lancet* 2006; 367: 606-17.
5. CAPRIE Steering Committee. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *Lancet* 1996; 348: 1329-39.
6. Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, Chrolavicius S, Tognonin G, Fox KK, et al. Effect of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. Clopidogrel in unstable angina to prevent recurrent events (CURE) study. *N Engl J Med* 2001; 345: 494-502.
7. Chen ZM, Jiang LX, Chen YP, Xie JX, Pan HC, Peto R, et al. Addition of clopidogrel to aspirin in 45,852 patients with acute myocardial infarction: randomised placebo-controlled trial. COMMIT collaborative group. *Lancet* 2005; 366: 1607-21.
8. Angiolillo DJ, Fernández-Ortiz A, Bernardo E, Alfonso F, Mayaca C, Bass TA, Costa MA. Variability in individual responsiveness to clopidogrel: clinical implications, management, and future perspectives. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49 (14): 1505-16.
9. Angiolillo DJ, Bernardo E, Sabaté M, Jiménez-Quevedo P, Costa MA, Palazuelos J, et al. Impact of platelet reactivity on cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50 (16): 1541-7.
10. Boersma E, Harrington RA, Moliterno DJ, White H, Théroux P, Van de Werf F, et al. Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in acute coronary syndromes: a meta-analysis of all major randomised clinical trials. *Lancet* 2002; 359: 189-98.
11. De Luca G, Suryapranata H, Stone GW, Antoniucci D, Tcheng JE, Neumann FJ, et al. Abciximab as adjunctive therapy to reperfusion in acute ST-segment elevation myocardial infarction: a meta-analysis of randomized trials. *JAMA* 2005; 293 (14): 1759-65.
12. Wiviott SD, Antman EM, Winters KJ, Weerakkody G, Murphy SA, Behounek BD, et al. Randomized comparison of prasugrel (cs-747, ly640315), a novel thienopyridine p2y12 antagonist, with clopidogrel in percutaneous coronary intervention: results of the joint utilization of medications to block platelets optimally (JUMBO)-TIMI 26 trial. *Circulation* 2005; 111: 3366-73.
13. Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, Montalescot G, Ruzyllo W, Gottlieb S, et al. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. The TRITON-TIMI 38 Investigators. *N Eng J Med* 2007; 357: 2001-15.
14. Cannon CP, Husted S, Harrington RA, Scirica BM, Emanuelsson H, Peters G, et al. Safety, tolerability and initial efficacy of AZD6140, the first reversible oral adenosine diphosphate receptor antagonist, compared with clopidogrel, in patients with non ST-segment elevation acute coronary syndrome: primary results of the DISPERSE-2 Trial. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50: 1844-51.
15. Storey RF, Husted S, Harrington RA, Heptinstall S, Wilcox RG, Gurbel PA, et al. Inhibition of platelet aggregation by AZD6140, a reversible oral P2Y12 receptor antagonist, compared with clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50: 1852-6.
16. Greenbaum AB, Grines CL, Bittl JA, Becker RC, Kereiakes DJ, Gilchrist IC, et al. Initial experience with an intravenous

- P2Y12 platelet receptor antagonist in patients undergoing percutaneous coronary intervention: results from a 2-part, phase II, multicenter, randomized, placebo- and active-controlled trial. *Am Heart J* 2006; 151 (3): 689.e1-689.e10.
17. Chackalamannil S, Wang Y, Greenlee WJ, Hu Z, Xia Y, Ahn HS, et al. Discovery of a novel, orally active himacine-based thrombin receptor antagonist (SCH 530348) with potent antiplatelet activity. *J Med Chem* 2008; 51 (11): 3061-4.
 18. Moliterno DJ, Becker RC, Jennings LK, Yang B, Strony J, Veltri E, et al; for the TRA-PCI study investigators. Results of a multinational randomized, double-blind, placebo-controlled study of a novel thrombin receptor antagonist (SCH-530348) in percutaneous coronary intervention. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49: 2402-9.
 20. Brandt JT, Payne CD, Wiviott SD, Weerakkody G, Farid NA, Small DS, et al. A comparison of prasugrel and clopidogrel loading doses on platelet function: magnitude of platelet inhibition is related to active metabolite formation. *Am Heart J* 2007; 153 (1): 66.e9-16.

ANTICOAGULANTES: ¿QUÉ NOS ESPERA?

J. MATEO

Unitat d' Hemostàsia i Trombosi.

Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona

Introducción

Los anticoagulantes disponibles en la actualidad son la heparina, las heparinas de bajo peso molecular (HBPM) los antagonistas de la vitamina K (AVK) y, más recientemente, el fondaparinux. Aunque estos fármacos han probado ser eficaces en el tratamiento y prevención del tromboembolismo venoso (TEV), tienen inconvenientes que limitan su uso y su manejo en la clínica. A pesar de los avances que han supuesto las HBPM y el fondaparinux, persiste la necesidad de anticoagulantes más eficaces y seguros. Para la utilización a largo plazo, también existe una necesidad de fármacos más seguros, con mayor margen terapéutico, que se administren por vía oral y que no precisen control analítico rutinario. En la actualidad, los cumarínicos son los únicos anticoagulantes orales disponibles, pero tienen un margen terapéutico estrecho, su metabolismo varía entre los individuos y están influidos por factores dietéticos, fármacos concomitantes y comorbilidades (Tabla 1)¹. Por ello es preciso realizar una monitorización, costosa en tiempo y recursos, para asegurar su eficacia. Aun así, en la vida real, los pacientes están dentro del rango terapéutico entre un 60 y un 70% del tiempo.

Es evidente que existe una necesidad de fármacos más seguros, efectivos y simples de utilizar. En los últimos años, se han desarrollado nuevos fármacos que

podrían reunir estas características y existe un desarrollo clínico amplio en los campos de la prevención y el tratamiento del TEV y en la prevención del ictus en pacientes con fibrilación auricular².

Nuevos anticoagulantes

Al contrario que las heparinas y AVK, los nuevos anticoagulantes se dirigen contra dianas específicas en la coagulación. Las estrategias inhibitoras de la trombogénesis se focalizan en el bloqueo del inicio de la coagulación, en la prevención de la generación de trombina atenuando la fase de propagación o reduciendo la formación de fibrina inhibiendo la trombina generada².

El inicio de la coagulación puede inhibirse por fármacos contra el complejo TF/FVIIa, y la generación de trombina puede bloquearse con fármacos contra el FIXa o el Xa, o por inactivación del FVa or FVIIIa. Los inhibidores de la trombina no sólo previenen la formación de fibrina, sino también la activación del FV, FVIII, XI, XIII y atenúan la agregación plaquetaria inducida por trombina (Figura 1).

En la actualidad, los nuevos anticoagulantes que están siendo investigados en la prevención y tratamiento del tromboembolismo venoso y en la prevención del embolismo en la fibrilación auricular van dirigidos contra el factor Xa y contra la trombina (Tabla 1). Los inhibidores del factor Xa incluyen inhibidores indirectos como el idraparinux y el idraparinux biotinilado, que inhiben el factor Xa potenciando el efecto de la antitrombina, y apixabán y rivaroxabán, activos por vía oral, que inhiben de manera directa el factor Xa. Los inhibidores directos de la trombina incluyen xime-

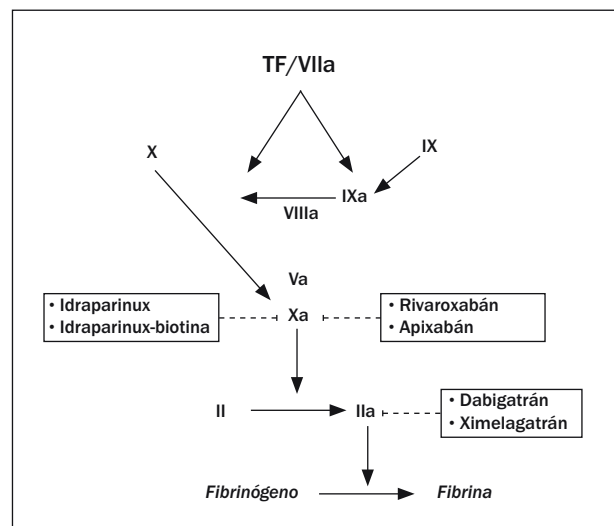


Figura 1. Dianas de los nuevos anticoagulantes y situación en el esquema de la coagulación.

Tabla 1. Tabla comparativa de los anticoagulantes más usados y de los nuevos anticoagulantes

Fármaco	Diana	Vía admin.	Monitorización	T ½ (h)	Excreción renal (%)	Interacciones	Seguridad en embarazo	Antídoto
AVK	Vit K epóxido reductasa	Oral/24 h	INR	36-40	No	CYP2Cg VCOR1 Múltiples...	No	Vit K, PFC, CPT
HBPM	FXa, FIIa...	s.c./24 h	No	4-7	Sí (40-70%)	No relevantes	Sí	Protamina (parcial)
Idraparinux	FXa	s.c. semanal	No	80	Sí	No relevantes	Desconocido	No
Idraparinux- biotina	FXa	s.c. semanal	No	80	Sí	No relevantes	Desconocido	Avidina
Apixabán	FXa	Oral/12 h	No	9-14	25%	Inhib. CYP3A4 ^a y glicoproteína P	No	No
Rivaroxabán	FXa	Oral/24 h	No	9	66%	Inhib. CYP3A4 ^a y glicoproteína P	No	No
Dabigatrán	Trombina	Oral/12 h	No	14-17	80%	Inhib. bomba protones ^b	No	No

AVK: antagonistas de la vitamina K; CPT: complejo protrombínico; PFC: plasma fresco congelado.

^a Incluyen: macrólidos, inhibidores de proteasas.

^b Reducen la absorción.

lagatrán y dabigatrán etexilato. Ximelagatrán se retiró del mercado por toxicidad hepática, pero en ensayos clínicos en fase III demostró su eficacia en la prevención del ictus, en el tratamiento de la trombosis venosa profunda y en la prevención secundaria del tromboembolismo venoso. De algún modo, inauguró una etapa en la terapia antitrombótica estableciendo la eficacia de este tipo de fármacos².

Inhibidores indirectos del factor Xa

Idraparinux

El idraparinux es un pentasacárido de segunda generación. Se trata de un derivado hipermetilado de fondaparinux que se une a la antitrombina con una gran afinidad. Su vida media es de 80 horas, similar a la de la antitrombina. Este agente muestra una completa biodisponibilidad tras inyección subcutánea y ocasiona una respuesta anticoagulante predecible; en consecuencia, puede administrarse una vez a la semana sin monitorización. Como el fondaparinux, el idraparinux no se metaboliza y se elimina por vía renal. La protamina carece de efecto³. Debido a su vida media larga y a la falta de antídoto, se desarrolló el idraparinux biotilado, con los mismos efectos que el idraparinux. La adición de biotina permite una reversión rápida del efecto anticoagulante tras la inyección intravenosa de avidina.

En TEV se realizaron los estudios en fase III *Van Gogh-DVT* y *Van Gogh-PE*, con 2.904 pacientes con trombosis venosa profunda (TVP) aguda y 2.215 con embolia pulmonar (EP) para recibir tratamiento duran-

te 3 y 6 meses, respectivamente.⁴ Se compararon dosis de idraparinux 2,5 mg/semana frente al tratamiento convencional (HBPM seguida de AVK, con INR 2-3). En los pacientes con TVP, la variable principal de eficacia, la recurrencia de TEV a los 3 meses, fue similar en los 2 grupos (2,9% y 3,0%, respectivamente). Las hemorragias relevantes fueron menores en grupo tratado con idraparinux (4,5% frente a 7,0%; p = 0,004). En cambio, en los pacientes con EP, idraparinux fue menos efectivo que el tratamiento convencional. La tasa de TEV recurrente fue de 3,4% frente a 1,6% en los pacientes tratados de manera convencional. Esta discordancia en ambas situaciones muestra la importancia de unos niveles de anticoagulación adecuados en el tratamiento de la EP, ya que la mayoría de las recurrencias sucedieron de manera precoz en los pacientes tratados con idraparinux. La eficacia del tratamiento a largo plazo se evaluó en el estudio *Van Gogh-extension*, en el que los pacientes incluidos previamente se aleatorizaron en dos grupos, uno tratado con idraparinux (2,5 mg semanales) y otro con placebo durante 6 meses⁵. Se observó una disminución de las recurrencias de 3,7% a 1,0% (reducción de riesgo del 73%; p = 0,002). En cambio, hubo un 3,7% de hemorragias mayores en el grupo tratado con idraparinux, incluyendo 3 intracra-neales y ninguna en el grupo placebo. Estos hallazgos muestran que el idraparinux causa un sangrado excesivo, por lo que el desarrollo clínico se está centrando en la forma biotilada. Sin embargo, no está claro que esto vaya a mejorar la seguridad ya que la neutralización sería una vez ocasionada la hemorragia.

En el ámbito de la prevención del ictus en fibrilación auricular, idraparinux se ha comparado con AVK en el

ensayo *Amadeus*, un ensayo abierto de no inferioridad en el que se evaluaba la eficacia clínica y la seguridad en la profilaxis del ictus en pacientes con fibrilación auricular⁶. Los pacientes se aleatorizaron en dos grupos. Uno recibía idraparinux (2,5 mg s.c. 1 vez a la semana) o dosis ajustadas de AVK para mantener una diana de INR entre 2 y 3. La variable principal de eficacia era la incidencia acumulada de ictus y embolismo sistémico. La variable principal de seguridad fue el sangrado clínico relevante. El ensayo se detuvo prematuramente debido a un exceso de hemorragia en el grupo tratado con idraparinux (19,7 contra 11,3 por cada 100 pacientes-año). Hubo 21/2.283 hemorragias intracraneales en el grupo tratado con idraparinux y 9/2.293 con AVK (1,1 contra 0,4 por 100 pacientes-año, $p = 0,014$). Se observaron 18 casos de tromboembolismo en el grupo de idraparinux y 27 en el de AVK (0,9 contra 1,3 por 100 pacientes-año; HR 0,71; IC 95%: 0,93-1,30), lo que satisfacía el criterio de no inferioridad. Las tasas de mortalidad fueron similares. Los autores concluyeron que en términos de eficacia el tratamiento con idraparinux no era peor que con los AVK, pero causaba más complicaciones hemorrágicas. Éstas se observaron sobre todo en pacientes ancianos con insuficiencia renal, por lo que en futuros estudios debería considerarse un ajuste de dosis según edad y filtrado glomerular. Hay en marcha un estudio en el que se compara idraparinux biotilado (2,5 mg semanal) contra warfarina (*Boreal AF*) para poder revertir el efecto de idraparinux con avidina en caso de hemorragia.

Inhibidores directos del factor Xa por vía oral

Rivaroxabán

El rivaroxabán es un inhibidor potente y selectivo del factor Xa. Se une al centro activo del factor Xa y lo inhibe de manera reversible y competitiva. Inhibe el factor Xa libre y el Xa unido en el complejo protrombinasa. Se absorbe por vía oral y su biodisponibilidad es superior al 80%. La comida no interfiere en su absorción. El pico plasmático se consigue a las 3 horas, y la semivida es de 5-9 horas en jóvenes y de 11-13 en ancianos. Dos tercios se excretan por vía renal, y el resto, en las heces. Como otros inhibidores directos del factor Xa, el rivaroxabán prolonga el tiempo de protrombina (TP) y el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA), aunque la inhibición del factor Xa es el mejor test para monitorizar su concentración en plasma⁷.

El primer estudio para probar la seguridad del rivaroxabán fue un estudio en pacientes sometidos a artroplastia total de cadera. En 873 pacientes, se compararon dosis de 5, 10, 20, 30 o 40 mg/24 h, iniciados 6 horas postoperatoriamente, frente a enoxaparina

40 mg/24 iniciados la víspera. La variable principal de eficacia (una suma de TVP, EP o muerte por cualquier causa) sucedió en 14,9%, 10,6%, 8,5%, 13,5% y 6,4% en los respectivos grupos de rivaroxabán, y del 25,2% en el grupo enoxaparina. No se encontró relación dosis-respuesta en cuanto a eficacia. En cambio, sí se apreció una relación dosis-respuesta en los grupos de rivaroxabán en cuanto al sangrado mayor (2,3%, 0,7%, 4,3%, 4,9% y 5,1%). En el grupo de enoxaparina fue de 1,9%. Los grupos más parecidos a enoxaparina fueron los de 5 y 10 mg. Teniendo en cuenta la eficacia y seguridad, la dosis de 10 mg parecía la más adecuada para desarrollos clínicos posteriores⁸. En el estudio *RECORD-2*, que comparaba rivaroxabán 10 mg/24 h frente a enoxaparina 40 mg/24 h, se encontró una reducción del riesgo de la variable principal de TEV más mortalidad por cualquier causa del 9,3% al 20% ($p < 0,001$)⁹. Las complicaciones hemorrágicas fueron similares. En el estudio *RECORD-3* en artroplastia de rodilla, la variable principal se observó en el 18,9% de los pacientes tratados con enoxaparina y en el 9,8% de los tratados con rivaroxabán ($p < 0,001$)¹⁰.

Se han realizado dos ensayos en fase II en tratamiento de pacientes con TVP. El primero comparaba en 613 pacientes 4 dosis de rivaroxabán (10, 20 o 30 mg/12 h o 40 mg/24 h) o HBPM seguida de warfarina durante 3 meses. La variable principal de eficacia fue la mejoría ecográfica a los 21 días, sin recurrencias. Todas las ramas mostraron mejorías equivalentes con un perfil de seguridad aceptable. En el segundo ensayo se evaluaron, en 543 pacientes, dosis diarias de rivaroxabán (20, 30 o 40 mg) frente a tratamiento convencional. La variable principal de eficacia, la suma de TEV recurrente y empeoramiento del trombo, se observó en el 6% de los que recibieron rivaroxabán y en el 9,9% de los tratados de manera convencional. No se observó aparentemente una respuesta dosis-dependiente de rivaroxabán en cuanto a eficacia¹¹. No se apreciaron diferencias en las tasas de hemorragias.

Basándose en estos datos, se está evaluando rivaroxabán 20 mg/24 h frente al tratamiento convencional en ensayos en fase III.

En fibrilación auricular, rivaroxabán (20 mg/24 h) está siendo comparado con warfarina (INR 2-3) en prevención del ictus en pacientes con fibrilación auricular no valvular. La muestra de estudio se estima en 14.000 pacientes.

Apixabán

El apixabán es un inhibidor selectivo y reversible del centro activo del factor Xa. Al igual que el rivaroxabán, inhibe el factor Xa libre y el que está unido en el complejo protrombinasa. El fármaco se absorbe vía oral y su biodisponibilidad es superior al 50%.

El pico plasmático se consigue a las 3 horas, y la vida media oscila entre 9 y 14 horas. Aproximadamente el 25% se excreta vía renal, mientras que el resto aparece en las heces¹².

Recientemente ha finalizado un estudio en fase II en prevención del TEV en cirugía de rodilla. El estudio comparaba 6 dosis orales de apixabán (5, 10 y 20 mg en dosis única o dividida en dos tomas) frente a enoxaparina o warfarina en una muestra de 1.217 pacientes. La variable principal de eficacia (TEV y muerte por cualquier causa) descendía al aumentar la dosis de apixabán. En general, la eficacia se mostró superior en los grupos tratados con apixabán frente a los grupos tratados con enoxaparina o warfarina sin mayor riesgo hemorrágico¹³.

En tratamiento de TEV, en un estudio de fase II con 520 pacientes con TEV proximal, se han probado diferentes dosis de apixabán (5 mg o 10 mg/12 horas, 20 mg/24 h) o tratamiento convencional. La variable principal de eficacia, la suma de TEV recurrente más crecimiento del trombo, ocurrió en 6,0%, 5,6%, y 2,6% en pacientes tratados con apixabán con dosis de 5 mg o 10 mg /12 horas o 20 mg/24 horas, respectivamente, y 4,2% en los que recibieron tratamiento convencional. Las tasas de hemorragia relevante fueron 8,6%, 4,5% y 7,3% en las ramas de apixabán y 7,9% en la rama convencional. Basándose en estos datos, se están evaluando en estudios en fase III de tratamiento inicial frente a tratamiento convencional, y de prolongación frente a placebo.

El apixabán se está evaluando en un ensayo en fase III que compara 5 mg/12 horas frente a warfarina (INR 2-3) en prevención del ictus en pacientes con fibrilación auricular. La muestra de estudio estimada es de unos 15.000 pacientes. Existe otro ensayo con apixabán contra aspirina en pacientes en los que los AVK están contraindicados.

Otros inhibidores orales del factor Xa

Hay al menos otros dos fármacos orales, YM-150 y DU-176b, que están evaluándose en la actualidad en ensayos clínicos en fase II².

Inhibidores directos de la trombina vía oral

Dabigatrán etexilato

El dabigatrán es un inhibidor directo de la trombina que se convierte *in vivo* por la acción de esterasas en su metabolito activo, el dabigatrán. Se trata de un fármaco con pocas interacciones farmacológicas. La biodisponibilidad vía oral es baja, del 6%. El pico plasmático se consigue en 2 horas y la semivida es de 8 horas tras

una dosis única de 14-17 horas tras múltiples dosis. El 80% se elimina vía renal sin metabolizar. El dabigatrán prolonga el TTPA y tiene un efecto mínimo en el TP. Prolonga el tiempo de ecarina de manera dosis-dependiente, por lo que sería el test de coagulación más recomendable en caso de precisar monitorización¹⁴.

En profilaxis de TEV en cirugía ortopédica se han realizado dos ensayos en fase III. En 3.494 pacientes operados de artroplastia de cadera se evaluaron dos dosis de dabigatrán (220 mg/24 h y 150 mg/24 h) frente a enoxaparina 40 mg/24 h. La variable principal de eficacia (TEV o muerte por cualquier causa) se observó en el 6,7% en el grupo enoxaparina, 6,0% en el grupo tratado con dabigatrán 220 mg y 8,6% en el grupo dabigatrán 150 mg. No se observaron diferencias en el sangrado, ni en elevaciones de transaminasas entre los grupos¹⁵. En otro estudio en cirugía de rodilla en 2.076 pacientes repartidos en 3 grupos, la variable principal de eficacia (TEV sintomática, venográfica y mortalidad) se observó en 37,7% en el grupo enoxaparina, 36,4% en el grupo dabigatrán 220 mg y 40,5% en el grupo dabigatrán 150 mg. Tampoco se observaron diferencias en las tasas de hemorragia ni en incrementos de las enzimas hepáticas¹⁶. En ambos estudios se concluye que dabigatrán etexilato es al menos tan efectivo y seguro como la enoxaparina en ambas cirugías.

Existe un amplio programa de ensayos en fase III que incluyen el tratamiento con dabigatrán en pacientes con TEV agudo y en prevención secundaria.

El potencial de dabigatrán en la prevención del ictus en fibrilación auricular se ha evaluado en el estudio *PETRO (Prevention of Embolic and ThROMbotic events)* y en su ampliación, el *PETRO-EX* (n = 353). El fármaco tiene una vida media de 14-17 horas, lo que permite una administración diaria o cada 12 horas. El estudio *PETRO* aleatorizó 502 pacientes para recibir 3 dosis diferentes de dabigatrán y AAS (81-325 mg) o dosis ajustadas de warfarina durante 12 semanas. La dosis que se mostró como mejor tolerada y eficaz fue 150 mg/12 horas¹⁷. Recientemente se ha iniciado un ensayo en fase III con esta posología. El estudio *RELY (Randomized Evaluation of Long-term anticoagulant therapy)* evaluará aproximadamente 18.000 pacientes con fibrilación auricular en 3 ramas, dos con dabigatrán (150 mg/12 horas o 300 mg/24 horas) y otra con warfarina (INR 2-3). La posible toxicidad hepática se ha controlado cuidadosamente y, hasta el momento, parece que el dabigatrán es más seguro que el ximelagatrán.

Ximelagatrán

Al igual que el dabigatrán, el ximelagatrán es un inhibidor directo de la trombina por vía oral. Después de su administración, al menos el 40-70% se absorbe y es rápidamente convertido a su metabolito activo, el

melagatrán. La interacción con la dieta es mínima y no precisa monitorización. El ximelagatrán prolonga el TTPA y el tiempo de trombina, y tiene mínimo efecto sobre el TP. También prolonga el tiempo de ecarina de manera dosis-dependiente.¹⁸ Después de un programa de desarrollo clínico importante, con más de 30.000 pacientes, se retiró del mercado por toxicidad hepática. Sin embargo, de esos ensayos clínicos se ha obtenido un conocimiento importante con relación a la eficacia clínica y a la seguridad hemorrágica de este tipo de fármacos².

Su ventaja sobre la warfarina es que muestra un perfil farmacocinético y farmacodinámico mucho más atractivo, con un inicio rápido de la acción (2-3 horas), margen terapéutico más amplio, la ausencia de necesidad de realizar continuos controles y ajustes de dosis, y la ausencia de influencias dietéticas y del uso concomitante de otros fármacos.

Se evaluó su eficacia y seguridad en profilaxis en cirugía ortopédica, en tratamiento del TEV, en prevención secundaria del TEV y en prevención del ictus en pacientes con fibrilación auricular y factores de riesgo adicionales. En todos los estudios se demostró una eficacia similar a la de los tratamientos convencionales excepto en prevención secundaria del TEV. En este ámbito se observó una mayor eficacia que el placebo, con similar tasa de complicaciones hemorrágicas. En el análisis combinado de los estudios en fibrilación auricular, (n = 7.329; 11.346 pacientes-año), ximelagatrán y warfarina fueron igualmente eficaces en la reducción de las tasas anuales de ictus o embolismo sistémico (1,62% y 1,65%, respectivamente). No se observaron diferencias en las tasas de hemorragia mayor (1,88% ximelagatrán frente a 2,46% warfarina), pero las hemorragias totales (mayores y menores) fueron inferiores en el grupo tratado con ximelagatrán (31,7% contra 38,7% por año). El beneficio clínico neto de ximelagatrán se calculó añadiendo el número de eventos principales, hemorragias mayores y muerte. El uso de ximelagatrán se asoció con una reducción de riesgo relativo del 1% (p = 0,038). Desgraciadamente, el ximelagatrán fue retirado del mercado por el fabricante en 2006 por toxicidad hepática. No obstante, quedó probada la eficacia de un inhibidor oral de la trombina y ello marcó un gran avance significativo en el tratamiento anticoagulante a largo plazo².

Conclusiones

Nunca antes se había producido la situación actual en la que tantos anticoagulantes nuevos están disponibles para estudio. Los datos disponibles hasta la actualidad sugieren que el factor Xa y de la trombina son buenas dianas terapéuticas en el tratamiento y prevención de la trombosis. La eficacia y seguridad

parece similar tanto si se atenúa la generación de trombina como si se inhibe su actividad.

Los inhibidores directos de la trombina y del factor Xa tienen un gran potencial en la eficacia y seguridad de la anticoagulación. Están siendo desarrollados fármacos con novedosos mecanismos de acción y límites de seguridad más amplios. Aunque fue retirado prematuramente, el ximelagatrán suministró evidencias convincentes de que los nuevos anticoagulantes orales tienen un gran potencial para reemplazar la warfarina.

Aunque los nuevos anticoagulantes se han diseñado para ser administrados sin monitorización, hay situaciones en las que sería recomendable hacerlo, como en la insuficiencia renal o hepática, o en el tratamiento concomitante con determinados fármacos. Aún no se dispone de datos suficientes que recomienden con qué tests y qué niveles deben considerarse como terapéuticos. Los inhibidores de la trombina son más fáciles de controlar, ya que afectan a pruebas básicas de la coagulación. En principio, los tests que evalúan la inhibición del factor Xa pondrían ser los más recomendables para controlar los inhibidores orales del factor Xa, aunque sería preciso desarrollar su estandarización.

Otra consideración es que la no necesidad de vigilancia analítica y médica con la frecuencia actual, sin duda disminuirá el cumplimiento por parte del paciente con el potencial incremento de complicaciones.

La mayoría de los ensayos clínicos que se realizan son con diseños de no inferioridad frente a warfarina, lo que motiva que muestren defectos inherentes porque se basan en múltiples asunciones estadísticas y clínicas y son menos atractivos que los estudios de superioridad porque, de manera ideal, los nuevos tratamientos deben ofrecer beneficios en eficacia y seguridad sobre el tratamiento vigente. Además, incluso si estos nuevos fármacos probasen superioridad sobre la warfarina, sus beneficios deberían ser considerables (más eficacia, seguridad y comodidad) con el fin de superar su inevitable mayor coste.

Bibliografía

1. Hirsh J, O'Donnell M, Eikelboom JW. Beyond unfractionated heparin and warfarin: current and future advances. *Circulation* 2007; 116: 552-60.
2. Harenberg J, Wehling M. Current and future prospects for anticoagulant therapy: inhibitors of factor Xa and factor IIa. *Semin Thromb Hemost* 2008; 34: 39-57.
3. Herbert JM, Herault JP, Bernat A, van Amsterdam RG, Lormeau JC, Petitou M, et al. Biochemical and pharmacological properties of SANORG 34006, a potent and long-acting pentasaccharide. *Blood* 1998; 91: 4197-205.
4. The van Gogh Investigators, Buller HR, Cohen AT, Davidson B, Decousus H, Gallus AS, Gent M, et al. Idraparinux versus standard therapy for venous thromboembolic disease. *N Engl J Med* 2007; 357: 1094-104.

5. The van Gogh Investigators, Buller HR, Cohen AT, Davidson B, Decousus H, Gallus AS, Gent M, et al. Extended prophylaxis of venous thromboembolism with idraparinux. *N Engl J Med* 2007; 357: 1105-12.
6. Amadeus Investigators, Bousser MG, Bouthier J, Büller HR, Cohen AT, Crijns H, Davidson BL, et al. Comparison of idraparinux with vitamin K antagonists for prevention of thromboembolism in patients with atrial fibrillation: a randomised, open-label, non-inferiority trial. *Lancet* 2008; 371: 315-21.
7. Kubitza D, Haas S. Novel factor Xa inhibitors for prevention and treatment of thromboembolic diseases. *Expert Opin Investig Drugs* 2006; 15: 843-55.
8. Eriksson BI, Borris LC, Dahl OE, Haas S, Huisman MV, Kakkar AK, et al, for the ODIXa-HIP Study Investigators. A once-daily, oral, direct factor Xa inhibitor, rivaroxaban (BAY 59-7939), for thromboprophylaxis after total hip replacement. *Circulation* 2006; 114: 2374-81.
9. Kakkar AJ, Brenner B, Dahl OE, Eriksson BI, Mouret P, Muntz J, et al. Extended thromboprophylaxis with rivaroxaban compared with Short-Term Thromboprophylaxis with Enoxaparin after Total Hip Arthroplasty: The RECORD2 Trial. *Blood* [abstract] 2007; 110: 307.
10. Lassen MR, Turpie AGG, Rosencher N, Borris LC, Ageno W, Lieberman JR, et al. Rivaroxaban- an oral, direct factor Xa inhibitor- for thromboprophylaxis after total knee arthroplasty: The RECORD3 trial. *Blood* [abstract] 2007; 110: 308.
11. Agnelli G, Gallus A, Goldhaber SZ, Haas S, Huisman MV, Hull RD, et al; ODIXa-DVT Study Investigators. Treatment of proximal deep-vein thrombosis with the oral direct factor Xa inhibitor rivaroxaban (BAY 59-7939) The ODIXa-DVT Study. *Circulation* 2007; 116: 180-7.
12. Pinto DJ, Orwat MJ, Koch S, Rossi KA, Alexander RS, Smallwood A, et al. Discovery of 1-(4-methoxyphenyl)-7-oxo-6-(4-(2-oxopiperidin-1-yl)phenyl)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-pyrazolo[3,4-c]pyridine-3-carboxamide (apixaban, BMS-562247), a highly potent, selective, efficacious, and orally bioavailable inhibitor of blood coagulation factor Xa. *J Med Chem* 2007; 50: 5339-56.
13. Lassen MR, Davidson BL, Gallus A, Pineo G, Ansell J, Deitchman D. The efficacy and safety of apixaban, an oral, direct factor Xa inhibitor, as thromboprophylaxis in patients following total knee replacement. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 2368-75.
14. Stangier KJ, Rathgen K, Staehle H, Gansser D, Roth W. The pharmacokinetics, pharmacodynamics and tolerability of dabigatran etexilate, a new oral direct thrombin inhibitor, in healthy male subjects. *Br J Clin Pharmacol* 2007; 64: 292-303.
15. Eriksson BI, Dahl OE, Rosencher N, Kurth AA, van Dijk CN, Frostick SP, et al.; RE-NOVATE Study Group. Dabigatran etexilate versus enoxaparin for prevention of venous thromboembolism after total hip replacement: a randomised, double-blind, non-inferiority trial. *Lancet* 2007; 370: 949-56.
16. Eriksson BI, Dahl OE, Rosencher N, Kurth AA, van Dijk CN, Frostick SP, et al.; RE-MODEL Study Group. Oral dabigatran etexilate vs. subcutaneous enoxaparin for the prevention of venous thromboembolism after total knee replacement: the RE-MODEL randomized trial. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 2178-85.
17. Ezekowitz MD, Reilly PA, Nehmiz G, Simmers TA, Nagarakanti R, Parcham-Azad K, et al. Dabigatran with or without concomitant aspirin compared with warfarin alone in patients with nonvalvular atrial fibrillation (PETRO Study). *Am J Cardiol* 2007; 100: 1419-26.
18. Gustafsson D, Nystrom J, Carlsson S, Bredberg U, Eriksson U, Gyzander E, et al. The direct thrombin inhibitor melagatran and its oral prodrug H376/95: intestinal absorption properties, biochemical and pharmacodynamic effects. *Thromb Res* 2001; 101: 171-81.

Disfunción endotelial e inflamación

COORDINADOR: G. ESCOLAR. *Barcelona*

Resumen del simposio

De ser considerado un recubrimiento pasivo interpuesto entre la sangre y el árbol vascular, el endotelio ha pasado a ser considerado en los últimos 25 años el órgano más extenso y con un papel más determinante en el correcto funcionamiento de nuestro organismo. El rango de órgano lo adquiere el endotelio ante la evidencia de una función perfectamente coordinada de las células endoteliales con la pared vascular y la adventicia. Cada célula endotelial actúa como un detector de señales capaz de generar respuestas y transmitir las al entorno vascular y a distancia a través de la circulación sanguínea. Actualmente no existen dudas de que el endotelio es un órgano activo que participa en: a) la regulación del tono vascular; b) el crecimiento y migración de la fibra muscular lisa vascular subyacente; c) el mantenimiento y la renovación de la arquitectura vascular (angiogénesis); d) la regulación de la composición de la matriz subendotelial; e) la permeabilidad a sustancias y células durante la respuesta inflamatoria; y f) la regulación del balance entre coagulación y fibrinólisis. La integridad tanto funcional como estructural del endotelio garantiza el correcto funcionamiento de los diferentes sistemas en nuestro organismo.

En la última década emerge el concepto de disfunción endotelial como un trastorno en la regulación de las funciones previamente descritas que aparece tras una agresión vascular continuada. Clásicamente, la disfunción endotelial se describió en pacientes con insuficiencia renal crónica en los que se desarrollan trastornos complejos de la hemostasia y en los que coexistía sintomatología hemorrágica con un elevado riesgo cardiovascular. Investigaciones en los pacientes urémicos permitieron detectar elevaciones en distintos biomarcadores circulantes tales como el factor de von Willebrand, PAI-1, trombosmodulina, endotelina y citocinas. Más recientemente se pudo demostrar que la vasodilatación dependiente de endotelio estaba alterada frente a varios estímulos, como la isquemia, hipertermia o acetilcolina en pacientes con insuficiencia renal. El concepto de disfunción endotelial se ha ido extendiendo a otras patologías: diabetes, hipertensión, síndrome metabólico, insuficiencia cardiaca o coronaria, y cirrosis; y continúa siendo investigado en el contexto de otras disfunciones. Las presentaciones de este simposio profundizarán en alguna de estas patologías y ofrecerán nuevas aproximaciones al concepto de la disfunción endotelial.

Una característica del endotelio es su habilidad, ampliamente contrarrestada por su elevada capacidad regenerativa. La descamación del endotelio puede ocurrir con facilidad tras una agresión física o química. En los últimos años se está dedicando gran interés al descubrimiento de la presencia en la circulación de células endoteliales y de progenitores de célula endotelial. La exposición del endotelio a factores de riesgo cardiovascular produce alteraciones complejas en la presencia de estas poblaciones celulares. La presentación de la Dra. Dignat-George nos actualizará los mecanismos implicados en estas alteraciones y la interpretación de estos hallazgos.

Diversos mediadores circulantes o generados en el endotelio o en la pared vascular pueden realimentar mecanismos inflamatorios que han sido claramente implicados en el desarrollo de arteriosclerosis. Es lógico pensar que la disfunción endotelial precede la aparición de evidencia clínica de enfermedad cardiovascular. La disfunción endotelial avanzada a nivel de los vasos coronarios está directamente relacionada con el desarrollo de síndromes coronarios agudos. El Dr. López-Farré revisará el papel del óxido nítrico (NO) y las implicaciones de los radicales libres y otros mediadores (prostaglandinas y leucotrienos) en la disfunción endotelial y su papel en la insuficiencia cardiaca.

Razonamientos diversos apuntan en la dirección de que algunas de las complicaciones que aparecen durante el trasplante con progenitores hematopoyéticos, incluida la enfermedad del injerto contra el huésped

ped, podrían estar relacionadas con el desarrollo de disfunción endotelial en el paciente. La complejidad y la intensidad de los tratamientos a los que los pacientes se ven sometidos antes, durante y después del trasplante dificultan la investigación en este campo. En su presentación, el Dr. E. Carreras ha hecho frente a estas dificultades y expondrá los resultados preliminares de un estudio sobre la disfunción endotelial en el trasplante de progenitores hematopoyéticos.

ENDOTHELIAL PROGENITORS AND CIRCULATING ENDOTHELIAL CELLS REGENERATION VERSUS DEGENERATION

F. DIGNAT-GEORGE

Inserm U 608, Faculté de Pharmacie, Marseille, France

The balance between endothelial lesion and regeneration is critical for the maintenance of vessel integrity. Exposure to cardiovascular risk factors alters the regulatory functions of the endothelium, which progress to proinflammatory activation, apoptosis and death. In the last 10 years, circulating endothelial cells (CEC) and endothelial derived-microparticles (EMP) have raised considerable interest as markers of stress-injured and dying endothelial cells, because elevated levels were found in patients with vascular disorders. These endothelial-derived biomarkers correlated with established markers of endothelial dysfunction and behave as bioactive vectors disseminating thrombotic and inflammatory properties in the vascular compartment. The general belief that cardiovascular risk factors promote endothelial damage has been enlarged by the discovery of circulating endothelial progenitors (EPC) subsequently mobilized from the bone marrow and able to restore endothelial integrity at site of vascular injury. Recent studies indicate that risk factors reduce the number and regenerative capacities of EPC. The combined measurement of CEC, EMP and EPC in the circulation offer new perspectives not only as surrogate marker of endothelial dysfunction but also as predictive marker for assessment of the vascular risk and pharmacological target to monitor treatment efficacy.

DISFUNCIÓN ENDOTELIAL Y METABOLISMO DEL CORAZÓN EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA

A. LÓPEZ-FARRÉ

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

El endotelio tiene una localización anatómica estratégica en la pared vascular que le permite interactuar con las diferentes células que componen el entorno microvascular tanto físicamente como mediante diferentes mediadores hormonales y agentes vasoactivos. El endotelio es conocido como fuente de numerosos mediadores y como el lugar de expresión de receptores y moléculas de adhesión que juegan un papel im-

portante en la enfermedad arterial coronaria. Además, la antigua idea de que la descamación endotelial precede al desarrollo de lesiones ha llevado al concepto de disfunción del endotelio. En esta revisión, resumimos los últimos conocimientos sobre el papel del endotelio y su disfunción en el desarrollo de síndromes coronarios agudos, así como la implicación de la inflamación en esas condiciones.

Definición de disfunción del endotelio

Cuando Furchgott y Zawadzki descubrieron en 1980 la existencia de un factor derivado de endotelio que tenía capacidad vasorrelajante, probablemente no imaginaban la importancia que iba a tener el estudio del óxido nítrico (NO) en la patofisiología cardiovascular. El NO es liberado por el endotelio mediante la conversión metabólica de L-arginina en L-citrulina, reacción catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (NOSe). El NO producido por la NOSe es responsable de la vasorrelajación dependiente de endotelio vía unión del NO a guanilato ciclasa soluble (GCs), enzima localizada en la capa de músculo liso, capaz de generar GMP cíclico (GMPc). Es importante tener en mente que el NO no es sólo el principal regulador del tono vascular sino que también inhibe la activación de plaquetas y leucocitos. Así pues, un aumento de los niveles intracelulares de GMPc inducidos por el NO en plaquetas está asociado con su reducida adhesión y agregación. La falta de relajación por la vía del sistema NO/GMPc ha sido definida como disfunción endotelial, que ha sido detectada en prácticamente todas las patologías de origen cardiovascular.

La disfunción del endotelio ocurre no sólo cuando hay evidencias clínicas de enfermedad cardiovascular, sino que incluso antes de que el daño vascular pueda ser detectado como tal se ha descrito en pacientes con arterias coronarias angiográficamente normales.

Los mecanismos causantes de la disfunción del sistema NO/GMPc son un tema complejo, todavía no esclarecido. La inducción de disfunción endotelial, considerada como una reducción de la respuesta vasorrelajante dependiente de endotelio, puede ocurrir a varios niveles.

Actividad de la NOSe

Existen descritos inhibidores endógenos de la NOSe como la dimetil arginina asimétrica (ADMA), que es capaz de competir con la L-arginina, previniendo la formación de NO. En este sentido, en pacientes con hipertensión sal-sensible, la administración de dietas con alto contenido en sal aumenta los niveles plasmáticos de ADMA, lo que está asociado con un aumento

en la presión arterial y una reducción en la excreción urinaria de NO. Se han detectado niveles circulantes elevados de ADMA en pacientes diabéticos.

Otra vía de regulación de la actividad de la NOSe es mediante la interacción de la NOSe con una proteína de membrana conocida como caveolina. Las caveolinas son proteínas localizadas en invaginaciones de la membrana plasmática de las células endoteliales conocidas como caveolas. La unión de la caveolina a NOSe inhibe la actividad de esta última.

Otra manera conocida de modular la actividad de la NOSe es mediante la fosforilación de esta enzima por la proteína serín-treonina Akt (proteína quinasa B). La NOSe se une directamente a una proteína de estrés de 90 kDa, denominada Hsp90, en respuesta a la estimulación de células endoteliales por el factor de crecimiento vascular derivado de endotelio, histamina y tensión por fuerzas de rozamiento. Además, la estimulación de la actividad de la NOSe por estos agonistas puede ser atenuado por la geldanamicina, un inhibidor específico de Hsp90 que bloquea los efectos de la caveolina-1 sobre la NOSe. De este modo, la interacción de Hsp90 con Akt y NOSe permite a Hsp90 servir como punto de anclaje para la fosforilación de NOSe Akt-dependiente y liberar así óxido nítrico. Hoy en día, no hay estudios sobre el nivel de interacción entre Hsp90 y NOSe durante un síndrome coronario agudo ni sobre si la inflamación puede modificar esta interacción.

Biodisponibilidad de óxido nítrico

El mecanismo más estudiado implicado en la disfunción endotelial es la biodegradación de NO por radicales libres (ROS) y fundamentalmente por el anión superóxido. Niveles elevados de ROS, tales como los que ocurren durante procesos de isquemia/reperfusión del miocardio, reducen la biodisponibilidad de NO y aumentan el estrés oxidativo local reaccionando directamente con NO para formar peroxinitrito, que provoca un mayor daño oxidativo endotelial. Un buen ejemplo de la implicación de ROS en la génesis de la disfunción endotelial puede ser el tabaco. La asociación entre el hecho de fumar y las enfermedades vasculares está bien documentada, y múltiples investigaciones han sugerido que el NO y su función vasodilatadora están alterados por el consumo de tabaco, lo que puede ser prevenido por la administración de antioxidantes como la vitamina C. Más aún, los fumadores tienen niveles circulantes reducidos de vitamina C.

Expresión de NOSe

Aunque en primera instancia esta isoforma de la NOS se define como constitutiva por su presencia de forma

constitutiva en las células endoteliales, hoy en día se conoce la existencia de complejos mecanismos que regulan los niveles de expresión de la NOSe.

En este sentido, nosotros y otros autores hemos demostrado recientemente que citoquinas como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) reducen la expresión de NOSe en células endoteliales en cultivo. Así pues, la inflamación parece ser un importante inductor de disfunción endotelial. En este sentido, describimos la existencia de proteínas endoteliales citosólicas que son capaces de interactuar con la región 3'UTR del ARNm de la NOSe, desestabilizando el mensajero y reduciendo su vida media, lo que reduce la expresión proteica de la NOSe.

Producción de NO por las células sanguíneas

Los síndromes coronarios agudos son el resultado de la formación de un trombo en una arteria coronaria. En el infarto agudo de miocardio se produce una oclusión total de la arteria coronaria, mientras que la angina inestable es debida a una oclusión parcial coronaria.

La asociación de inflamación con los síndromes coronarios agudos es conocida desde hace 60 años. Múltiples evidencias demuestran que la isquemia miocárdica genera una respuesta inflamatoria aguda mayor durante reperfusión, y gran parte del daño miocárdico generado tras procesos de isquemia-reperfusión es atribuible a los neutrófilos. De hecho, modelos clínicos y experimentales de isquemia coronaria han demostrado el papel de los neutrófilos en la progresión del daño miocárdico debido a su capacidad para generar radicales libres tales como el anión superóxido.

Recientemente, se ha demostrado que los neutrófilos y las células mononucleadas son capaces de liberar NO. Se ha demostrado que el NO liberado por los leucocitos previene su adhesión al endotelio vascular y regula la agregación de las plaquetas próximas.

En nuestro laboratorio hemos demostrado recientemente que tanto los neutrófilos como las células mononucleadas expresan una proteína NOSe similar a la NOSe encontrada en el endotelio. A su vez, la disminución en la expresión de la proteína NOSe en los neutrófilos humanos mediada por el factor de necrosis tumoral α ha sido asociada con la presencia de una proteína en el citosol de los neutrófilos de una proteína, denominada EDIP, que se une a la región 3'-UTR del ARN mensajero de la NOSe.

También durante un infarto agudo de miocardio, en los neutrófilos de estos pacientes se ha observado un aumento en la actividad de unión de EDIP a la región 3'UTR del ARNm de NOSe. Sin embargo, durante un síndrome coronario agudo, los neutrófilos de estos pacientes liberan mayores cantidades de NO que

los neutrófilos de individuos sanos, lo cual se acompañó de una mayor expresión de la isoforma inducible de la NOS. No obstante, este aumento en la generación de NO no originó un aumento en los niveles de GMPc generado por las plaquetas, lo cual indicaría que este NO liberado por los neutrófilos de pacientes con isquemia miocárdica no es funcionalmente activo para inducir a las plaquetas a generar GMPc. Este hecho está más acentuado en los neutrófilos de pacientes que han sufrido un infarto agudo de miocardio que en los neutrófilos de los que han sufrido una angina inestable, lo que se asoció con la diferente capacidad de los neutrófilos de liberar anión superóxido.

Estos hechos indican que el aumento de NO generado por los neutrófilos durante los síndromes coronarios agudos y más particularmente durante el infarto agudo de miocardio podría acompañarse por la inactivación concomitante de esta molécula.

Por todo ello, el NO generado por los neutrófilos parece poseer un importante papel en la inhibición de la activación de las plaquetas mediada por el GMPc. Langford *et al.* demostraron el diferente grado de activación de las plaquetas entre pacientes con infarto agudo de miocardio y con angina inestable. Así pues, la diferente actividad biológica del NO generado por pacientes con angina inestable y con infarto de miocardio podría tener relevancia clínica en el grado de activación de las plaquetas y, por consiguiente, en el crecimiento del trombo.

También se ha hallado una NOS constitutiva tanto en las plaquetas humanas como en las células megacariocíticas. Recientemente Fredman *et al.* (24) demostraron mediante un microelectrodo sensible para el NO, acoplado a un agregómetro para plaquetas, que la principal función de este NO generado por las plaquetas es la de inhibir el reclutamiento de plaquetas durante el crecimiento de un trombo. Estos hallazgos han sido confirmados en un modelo animal como es el ratón Nos3-null, deficiente en NO generado por las plaquetas.

Se ha investigado la importancia clínica del NO generado por las plaquetas en pacientes con síndrome coronario agudo. En este sentido, las plaquetas de pacientes con síndrome coronario agudo generaron una cantidad significativamente menor de NO que las de pacientes que sufrían angina de pecho estable. Por ello, la menor producción de NO por las plaquetas podría ser un factor determinante en la patofisiología de los síndromes coronarios agudos. A pesar de todo, aún no se han determinado los factores causantes de la menor liberación de NO por las plaquetas de pacientes con síndrome coronario agudo. Existen multitud de pruebas clínicas en las que se sugiere que el estrés oxidativo y la inflamación son dos parámetros importantes en la funcionalidad de las plaquetas, por lo cual tanto el estado redox de la plaqueta como el entorno infla-

matorio en el que ésta se encuentre modularán la expresión de NOSe en la plaqueta y/o en su precursor megacariocítico. Las plaquetas son una fuente de radicales libres entre los que se incluyen el anión y el 12(S) HETE. El elevado consumo de oxígeno por la plaqueta se debe a su capacidad como elemento agregante debido a la formación de prostanoïdes proagregantes derivados del ácido araquidónico. Se han identificado recientemente varios compuestos bioactivos similares a la prostaglandina (PGF₂) denominados isoprostanos, generados a partir del ácido araquidónico mediante un proceso no enzimático de peroxidación lipídica, proceso catalizado por radicales libres de oxígeno en membranas celulares y partículas LDL. Entre estos compuestos bioactivos, cabe destacar el 8-iso-PGF₂-α debido tanto a su función vasoconstrictora como al incremento que genera sobre la respuesta de plaquetas humanas a sus diferentes activadores. El elevado estrés oxidativo presente en la angina inestable podría estimular la formación de 8-iso-PGF₂-α así como de otros eicosanoides con actividad biológica, los cuales serían los responsables del menor efecto inhibitorio de la aspirina sobre la síntesis de tromboxano A₂.

Metabolismo del corazón hipertrófico

La hipertrofia cardiaca, y más concretamente la hipertrofia del ventrículo izquierdo, ha sido considerada un mecanismo adaptativo como consecuencia de un incremento de la sobrecarga cardiaca en pacientes con hipertensión. En un estudio realizado en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) mediante proteómica se analizó la expresión de diferentes proteínas asociadas al metabolismo energético en el ventrículo izquierdo de ratas SHR. Se aislaron los ventrículos izquierdos de cada uno de los animales. Los resultados más relevantes de este estudio mostraron que la expresión de enoil CoA hidratasa, enzima perteneciente a la beta-oxidación de ácidos grasos, estaba reducida en el ventrículo izquierdo de ratas SHR. Sin embargo, no se modificó la expresión de la 3-ketoacil CoA tiolasa, enzima también perteneciente a la beta-oxidación de ácidos grasos. La expresión de dos enzimas implicadas en las primeras etapas de la glucólisis, la fructosa bifosfato aldolasa y la triosafosfato isomerasa, estaba significativamente reducida en el ventrículo izquierdo de ratas SHR. La expresión de piruvato deshidrogenasa, enzima implicada en la oxidación de la glucosa, estaba aumentada en los ventrículos hipertróficos, mientras que la expresión de proteínas pertenecientes al ciclo de krebs, isocitrato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa, no se modificó. La expresión de la NADH deshidrogenasa y el precursor mitocondrial de la subunidad β de la ATP sintasa, proteínas pertenecientes a la fosforilación oxidativa, estaba au-

mentada en el ventrículo izquierdo de ratas SHR, no modificándose la expresión de otra proteína implicada en esta vía, la flavoproteína. Por otro lado, la expresión del precursor mitocondrial de la subunidad α de la ATP sintasa estaba aumentada en el ventrículo izquierdo de ratas SHR.

En conclusión, el ventrículo izquierdo de ratas SHR muestra una serie de modificaciones en la expresión de proteínas asociadas con la beta-oxidación de ácidos grasos, glucólisis, oxidación de la glucosa y la fosforilación oxidativa, que pueden contribuir al deterioro de la funcionalidad cardíaca en la hipertrofia.

Bibliografía

- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-6.
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs AE. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension* 1988; 12: 365-72.
- López-Farré A, Caramelo C, Esteban A, Alberola ML, Millás I, Montón M, Casado S. Effects of aspirin on platelet-neutrophil interactions: role of nitric oxide and endothelin-1. *Circulation* 1995; 91: 2080-8.
- Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae: specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 22810-4.
- Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 1999; 399: 597-601.
- Alonso J, Sánchez de Miguel, Montón M, Casado S, López-Farré A. Endothelial cytosolic proteins bind to the 3' untranslated region of endothelial nitric oxide synthase mRNA: regulation by tumor necrosis factor alpha. *Mol Cell Biol* 1997; 17 (10): 5719-26.
- Marqués M, Millas I, Jiménez A, García-Collis E, Rodríguez-Feo JA, Velasco S, et al. Alterations of the soluble guanylate cyclase system in the vascular wall of lead-induced hypertensive rats. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2594-600.
- Vita JA, Treasure CB, Nabel EG, McLenachan JM, Fish RD, Yeung AC, et al. Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation* 1990; 81: 491-7.
- O'Driscoll G, Green D, Taylor RR. Simvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, improves endothelial function within 1 month. *Circulation* 1997; 95: 1126-31.
- MacRitchie AN, Jun SS, Chen Z, German Z, Yuhanna IS, Sherman TS, Shaul PW. Estrogen upregulates endothelial nitric oxide synthase gene expression in fetal pulmonary artery endothelium. *Circ Res* 1997; 81: 355-62.
- Cuevas AM, Guasch V, Castillo O, Iribarra V, Minzon C, San Martín A, et al. A high-fat diet induces and red wine counteracts endothelial dysfunction in human volunteers. *Lipid* 2000; 35: 143-8.
- Flech M, Schwarg A, Bohm M. Effects of red and white wine on endothelium dependent vasorelaxation of rat aorta and human coronary arteries. *Am J Physiol* 1998; 275: H 1183-H 1190.
- De Frutos T, Sánchez de Miguel L, Farré J, Gómez J, Romero J, Marcos Alberca P, et al. Expression of an endothelial-type nitric synthase isoform in human neutrophils: modification by tumor necrosis factor- α and during acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 3800-7.

González Fernández F, Jiménez A, López Blaya A, Velasco S, Arriero MM, Celdrán A, et al. Cerivastatin prevents tumor necrosis factor-alpha-induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase: role of endothelial cytosolic proteins. *Atherosclerosis* 2001; 155: 61-70.

Laufs U, Liao JK. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem* 1998; 273: 24266-71.

Andrews NP, Husain M, Dakak N, Quyyumi A. Platelet inhibitory effect of nitric oxide in the human coronary circulation: impact of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 510-6.

Zeiger AM, Schächinger V, Weitzel SH, Wollschläger H, Just H. Intracoronary thrombus formation causes focal vasoconstriction of epicardial arteries in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1991; 83: 1519-25.

DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN EL TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS

E. CARRERAS¹, M. PALOMO²,
M. DÍAZ-RICART³

¹ Director del Programa de Trasplante Hematopoyético.
Hospital Clínic de Barcelona

² Servicio de Hemostasia y Hemoterapia.
Hospital Clínic de Barcelona

³ Servicio de Hemostasia y Hemoterapia.
Hospital Clínic de Barcelona

El endotelio es un epitelio plano simple constituido por una capa monocelular que recubre la superficie interior de todos los vasos sanguíneos, separando la sangre circulante de los tejidos. Considerado durante muchos años una barrera inerte, hoy se conoce que el endotelio es una interfase biológicamente activa que mantiene el flujo sanguíneo a nivel venoso y arterial, modula el tono vascular, regula el paso de células y fluidos entre la sangre y los tejidos, interviene en los fenómenos inflamatorios de cualquier origen, controla las propiedades hemostáticas de la sangre y participa en la generación de nuevos vasos sanguíneos¹⁻³.

El endotelio es capaz de responder a una gran variedad de estímulos físicos y químicos, balanceando su respuesta en direcciones opuestas en función de las necesidades del organismo (vasodilatación/vasoconstricción, procoagulante/anticoagulante, inflamatorio/antiinflamatorio, fibrinolítico/antifibrinolítico, oxidante/antioxidante). Cada célula endotelial (CE) trabaja como un dispositivo *on-off* adaptable, detectando los cambios en el compartimento extracelular (señales de entrada) y tratando de responder de la manera más beneficiosa para el organismo (señales de salida). Las señales de entrada incluyen múltiples

Tabla 1. Complicaciones postrasplante hematopoyético muy probablemente originadas en una disfunción endotelial

Síndrome venooclusivo hepático (o síndrome de oclusión sinusoidal)
Síndrome de rotura capilar
Hemorragia alveolar difusa
Microangiopatía trombótica del TPH
Síndrome del implante
Síndrome de neumonía idiopática
Síndrome de disfunción multiorgánica
Enfermedad del injerto contra el huésped crónica

mediadores solubles, oxigenación, temperatura, pH, fuerzas hemodinámicas e interacciones célula-célula. Las respuestas del endotelio incluyen cambios en el tono vasomotor, permeabilidad, hemostasia, respuesta inflamatoria y proliferación-supervivencia celular. Estas propiedades intrínsecas difieren de una CE a otra en función de su localización¹⁻³. En condiciones basales las señales de entrada (estímulo) producen una activación endotelial (respuesta) fisiológica que trata de mantener las propiedades del endotelio y su entorno. Los ejemplos más característicos de esta activación son: la vasoconstricción, el desarrollo de una actividad procoagulante, el aumento de la adhesividad leucocitaria, como consecuencia de la expresión de diversas moléculas de adhesión, o la pérdida de su función de barrera, permitiendo el paso de ciertos elementos y solutos a través del lecho endotelial. Esta activación endotelial no es un fenómeno del “todo o nada” sino que, por el contrario, comporta un amplio abanico de respuestas fisiológicas¹⁻³.

A pesar de su capacidad de adaptación a distintas situaciones ambientales, ciertos estímulos pueden originar respuestas anómalas de las CE, tanto funcionales (hemostasia, adhesividad y migración leucocitaria, tono vasomotor, pérdida de la función de barrera, apoptosis celular) como estructurales (vacuolización nuclear, edema y fragmentación de citoplasma, desnudación y pérdida de la adherencia a la matriz extracelular), que conducirán a una verdadera disfunción endotelial localizada, en uno o varios órganos, o generalizada⁴. Los ejemplos más habituales de dicha disfunción son los proporcionados por patologías como arteriosclerosis, diabetes, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, hipertensión, insuficiencia cardíaca o coronaria, y el envejecimiento. Además de estas causas de disfunción endotelial, que podríamos denominar “vasculares”, existen otras muchas situaciones capaces de desencadenar una disfunción. Son ejemplo de ello las asociadas a infecciones y estrados sépticos, neoplasias, trastornos obstétricos, síndrome antifosfolípido o anemia de células falciformes⁵.

Diversas evidencias sugieren que algunas de las complicaciones que aparecen precozmente tras el trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) y que se consideraban originadas por mecanismos patogénicos distintos, con toda probabilidad no son más que distintas formas de disfunción endotelial. Las mejor tipificadas (Tabla 1) son: el síndrome venooclusivo hepático (clásicamente denominado enfermedad venooclusiva hepática [EVOH])⁶, el síndrome de rotura capilar⁷, la hemorragia alveolar difusa⁸, la microangiopatía trombótica postrasplante⁹ y el síndrome del implante¹⁰. Es muy probable que determinadas complicaciones pulmonares, como la vasculopatía pulmonar, el síndrome de neumonía idiopática y el distrés respiratorio, tengan también el mismo origen¹¹. En su mayoría, estas complicaciones aparecen en el periodo inmediato post-TPH en clara relación con el tratamiento de acondicionamiento, el empleo de inhibidores de la calcineurina, la generación de una nueva población de neutrófilos, y los fenómenos de alorreactividad. Finalmente, hay evidencias indirectas de que una complicación algo más tardía, la enfermedad del injerto contra el huésped crónica (EICH), puede tener el mismo origen¹².

La incidencia de cada una de estas patologías post-TPH por disfunción endotelial no está bien establecida como consecuencia de sus límites clínicos mal definidos y en ocasiones superponibles entre una patología y otra, hecho que dificulta un correcto diagnóstico diferencial. Así, la incidencia de la mejor definida, la EVOH, oscila entre el 1% en los TPH autólogos y el 25% en los alogénicos. Desde el punto de vista clínico, todas estas complicaciones suelen presentarse en los 60 primeros días del TPH, si bien algunos casos de microangiopatía trombótica pueden ser observados más tardíamente. A pesar de que muchos casos de EVOH evolucionarán hacia su resolución espontánea, en los más graves y las demás patologías, de no mediar intervención terapéutica alguna, suele producirse una evolución hacia un síndrome de disfunción multiorgánica, por lo general irreversible, con fallo funcional de múltiples órganos (hígado, riñón, cardiopulmonar, sistema nervioso central). Es por todo ello por lo que la caracterización de estas patologías post-TPH adquiere una máxima relevancia si pretendemos encontrar medidas preventivas y/o terapéuticas eficaces⁶.

Los mecanismos por los cuales se obstruye la microcirculación hepática en la EVOH post-TPH han sido poco conocidos durante más de 20 años. Inicialmente se pensaba que era producida por fenómenos trombóticos en las venas intrahepáticas, pero evidencias posteriores mostraron que el cambio más importante era la oclusión del flujo venoso a nivel de los sinusoides hepáticos y que los cambios sinusoidales eran más tempranos que los cambios en las venas centrales. Estas observaciones promovieron que se

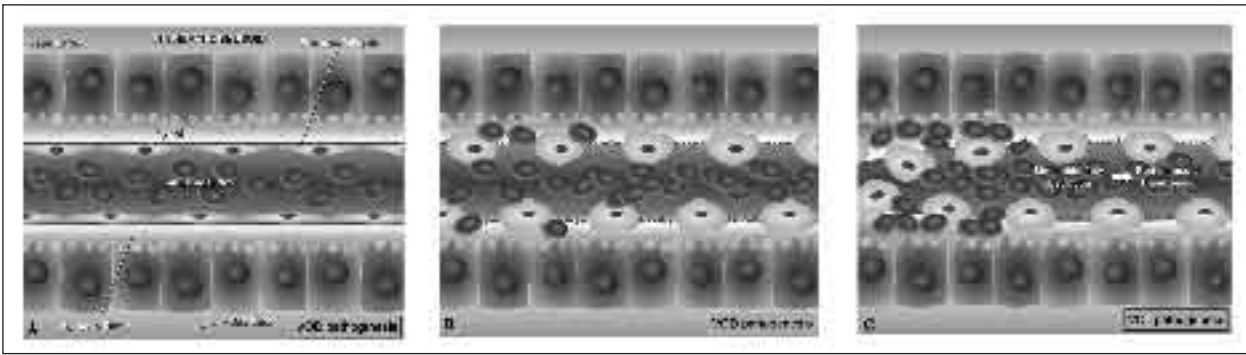


Figura 1. Fisiopatogenia de la EVOH. A: Sinusoide hepático y estructuras vecinas en condiciones normales. B: Sinusoide hepático en el que se ha producido una balonización de las células endoteliales, agrandamiento de los poros intercelulares y paso de elementos formes al espacio de Disse. C: Obstrucción del flujo sinusoidal por despegamiento del endotelio y oclusión de su luz. Cortesía de J. Bozzo.

intentara, con escaso éxito, modificar la denominación clásica de síndrome venooclusivo hepático por la de “síndrome de obstrucción sinusoidal”¹³. Una serie de relevantes estudios en modelos animales en los que se inducía esta situación mediante la administración de monocrotalina demostraron que el primer evento en el desarrollo de la EVOH es el edema y una progresiva balonización de las CE de los sinusoides hepáticos. Esta balonización aumenta el tamaño de los poros fisiológicos existentes entre las CE (a través de los cuales en condiciones normales se filtra el plasma de los sinusoides al espacio de Disse), permitiendo el paso de los elementos formes al espacio de Disse. Este hecho, junto con el progresivo despegamiento del endotelio de los hepatocitos por pérdida de la matriz extracelular que le fija, produce una progresiva reducción de la luz sinusoidal, con obstrucción del flujo sinusoidal e hipertensión portal, causa de las manifestaciones clínicas de esta enfermedad (Figura 1)¹⁴⁻¹⁶. Los mismos estudios han evidenciado que la lesión endotelial es producida por la acción directa sobre el endotelio sinusoidal de determinados metabolitos tóxicos producidos durante la metabolización de los agentes quimioterápicos empleados en el tratamiento de acondicionamiento para el TPH y que, como consecuencia de la lesión endotelial, se produce una reducción en la síntesis de óxido nítrico, con el consiguiente aumento en la actividad de determinadas metaloproteinasas de la matriz extracelular, hecho que favorece la pérdida de la matriz extracelular y la fijación del endotelio.

A pesar de su indudable interés, los estudios encaminados a caracterizar la disfunción endotelial del TPH son escasos y, hasta la fecha, se han limitado a la cuantificación de factores de la coagulación, proteínas solubles y algunas citoquinas, todos ellos de escasa especificidad y muy variables en función de otros muchos factores del huésped. Así, en los pacientes

con EVOH se ha demostrado la presencia de: a) niveles aumentados de factor von Willebrand (FvW) y trombomodulina; b) aumento de marcadores de activación de la coagulación (fragmentos F1+2 y complejos trombina-antitrombina); c) disminución en la concentración de anticoagulantes naturales (proteína C y antitrombina III); d) aumento de agentes procoagulantes como factor VIII y fibrinógeno; e) aumento en los niveles séricos del inhibidor del activador de plasminógeno-I (PAI-I) y de aminopropéptido del colágeno de tipo III, siendo éstos los marcadores más específicos de esta complicación^{17,18}. Con todo, se cree que todos estos cambios en la coagulación son un simple epifenómeno con un papel secundario en la patogénesis de la EVOH. Las citoquinas parecen jugar un papel importante en la disfunción endotelial observada en el TPH, siendo característicos los niveles elevados de factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y de diversas interleuquinas (IL-6, IL-8 e IL-1). Estas citoquinas pueden ser producidas por la agresión tisular de la quimio-radioterapia, los fenómenos de alorreactividad, la producción de neutrófilos después del implante, la toxicidad directa de algunos agentes empleados durante el TPH (como los inhibidores de la calcineurina), o por otros mediadores vasculares peor conocidos (como el factor de crecimiento del endotelio vascular o las endotelinas). Desgraciadamente, todos estos marcadores biológicos son inespecíficos y no permiten predecir o cuantificar la disfunción endotelial¹⁹.

Más recientemente los estudios de disfunción endotelial se han centrado en otros dos marcadores más específicos: las micropartículas²⁰ y las CE circulantes (CEC)^{21,22}. Las primeras son vesículas constituidas por componentes citoplasmáticos y fosfolípidos y pueden derivarse, entre otros, de plaquetas, músculo liso y leucocitos, habiéndose observado su presencia en diversas patologías con daño vascular. Las CEC

pueden ser aisladas y cuantificadas empleando diversos métodos y parecen ser un excelente marcador de disfunción endotelial en el TPH. Woywodt *et al.* demostraron que los recuentos de CEC tras el TPH se elevan notablemente en los TPH mieloablativos, en especial si han recibido irradiación corporal total, mientras que este incremento es más moderado entre los receptores de un TPH de intensidad reducida, lo que evidencia la correlación existente entre la intensidad del tratamiento de acondicionamiento y la disfunción endotelial²¹.

En nuestra institución, gracias a la disponibilidad en un mismo centro de una Unidad de TPH con una notable actividad (alrededor de 100 TPH/año, la mitad de ellos alogénicos) y una larga tradición en el estudio de la EVOH^{23,24}, y de un laboratorio de hemostasia experimental completamente dotado para el estudio de la disfunción endotelial^{25,26}, hemos querido profundizar en el análisis de la disfunción endotelial postrasplante. Para ello, además de los clásicos estudios *ex vivo* para valorar parámetros como FvW, trombomodulina soluble, receptores de adhesión solubles (sVCAM-1, sICAM-1, sELAM-1), receptor soluble de las interleuquinas 1 y 2, TNF- α , ADAMS13, fragmento F1+2 de la protrombina, y cuantificación de células endoteliales circulantes, estamos realizando sistemáticamente estudios *in vitro* empleando tanto cultivos de células endoteliales macrovasculares de cordón umbilical (HUVEC) como microvasculares humanas (HMEC) cedidas por el CDC. En dichos estudios valoramos cambios morfológicos y del ciclo celular, expresión de receptores de adhesión (VCAM-1, ELAM-1, ICAM-1) sobre la superficie de las células endoteliales y de proteínas de la matriz extracelular (FvW y factor tisular) adhesión leucocitaria a la CE y de plaquetas a la MEC en condiciones reológicas y proteínas de señalización específicas (ERK1/2, p38, MAPK, JNK, entre otras).

Los resultados preliminares de todos estos estudios (manuscritos en preparación) parecen indicar que:

1. Tras todo TPH se produce una disfunción endotelial de intensidad variable manifestada fundamentalmente por:
 - Incremento de vWF (Figura 2).
 - Incremento de receptores solubles s-VCAM-1 e s-ICAM-1 (Figura 3).
 - Aumento de la expresión de receptores de adhesión (VCAM-1 e ICAM-1) (Figura 4).
 - Cambios morfológicos de las células endoteliales en cultivo que se acompañan de cambios en el ciclo celular (aumento de fase G2) y de apoptosis.
 - Aumento de proteínas en la matriz extracelular (FvW, factor tisular).
 - Aumento de la adhesividad plaquetaria y leucocitaria (Figura 5).

Si bien muchos pacientes ya presentan un cierto grado de disfunción endotelial antes de iniciar el procedimiento.

2. Los cambios observados en cultivos celulares *in vitro* se producen tanto empleando células macrovasculares (HUVEC) como microvasculares (HMEC).
3. La disfunción endotelial no parece limitada a los días siguientes al tratamiento de acondicionamiento y se prolonga e incluso incrementa en las semanas siguientes al mismo.
4. La disfunción se observa tanto en los trasplantes autólogos como en los alogénicos, si bien es posible que la alorreactividad juegue un papel en la disfunción observada 3-4 semanas después del TPH alogénico.

En una segunda fase tenemos previsto tipificar de forma precisa e individualizada el impacto de cada uno de los agentes empleados en el tratamiento de acondicionamiento en los cultivos de células endoteliales para, a continuación, poder valorar tanto el efecto potenciador de otros agentes que también in-

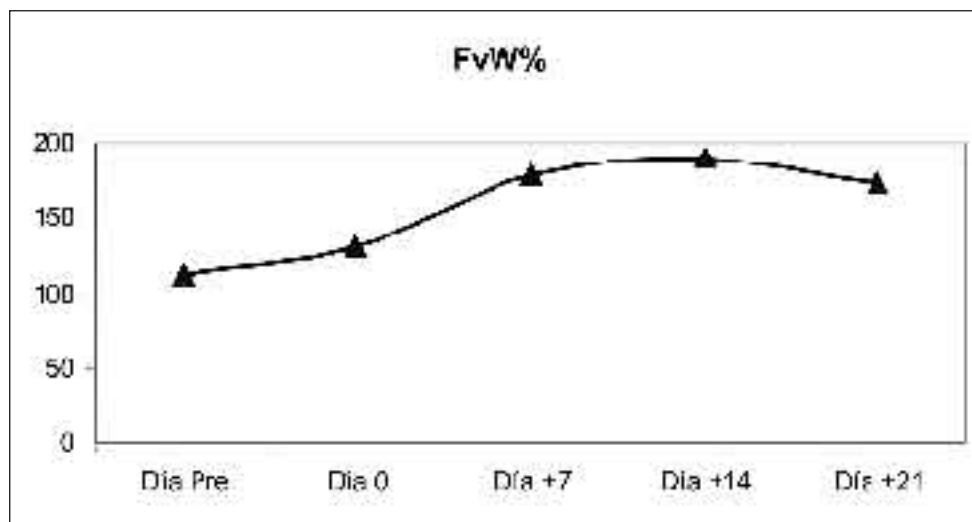


Figura 2. Cuantificación del factor de von Willebrand a lo largo del trasplante.

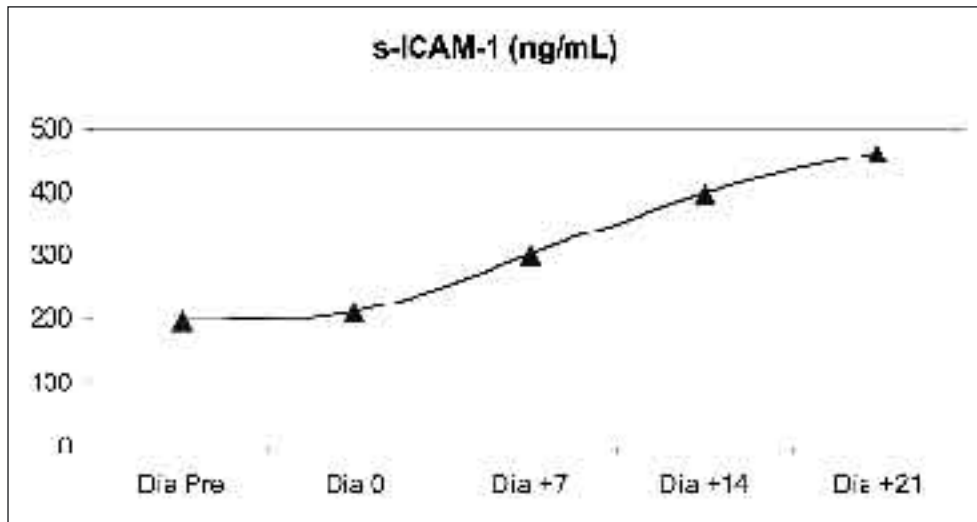


Figura 3. Cuantificación de s-ICAM-1 a lo largo del trasplante.

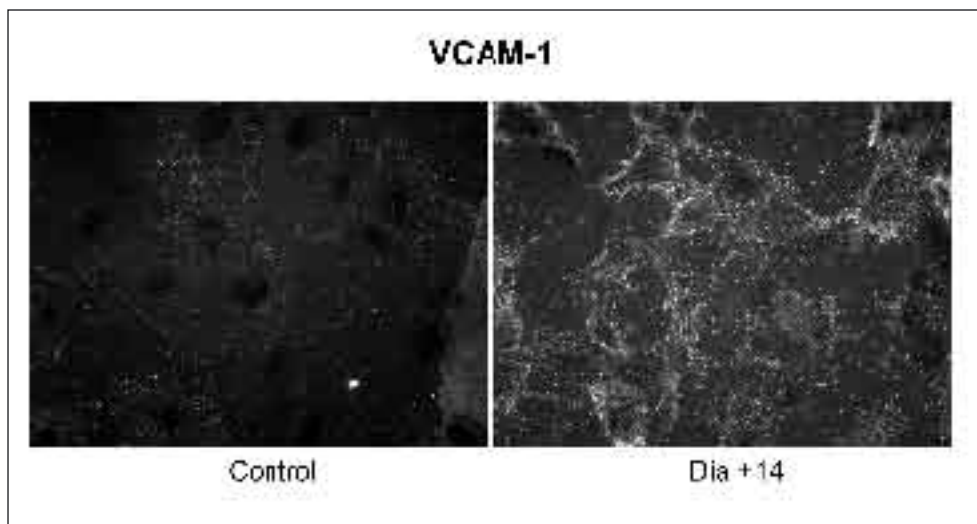


Figura 4. Expresión de VCAM-1 en la superficie de la célula endotelial en día +14 del TPH en comparación con el grupo control.

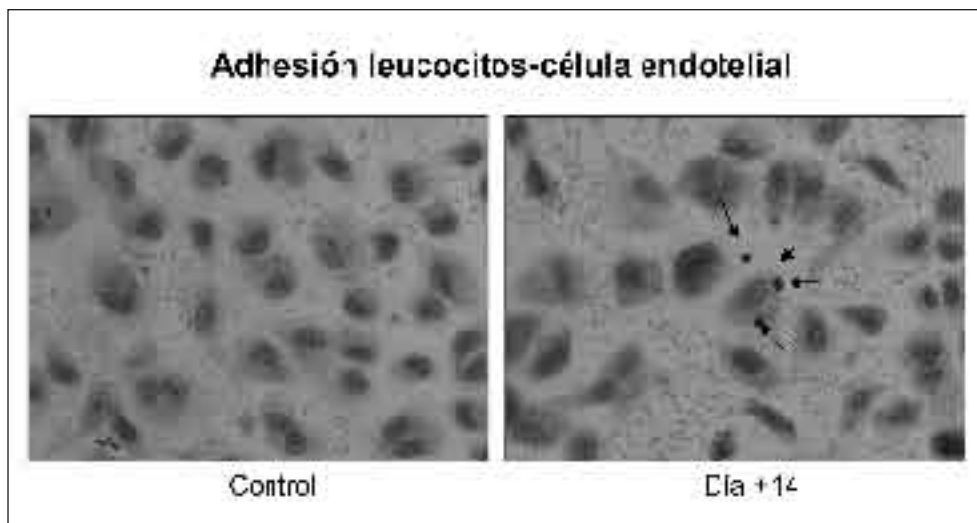


Figura 5. Adhesión leucocitaria a la célula endotelial en el día +14 del TPH comparada con el grupo control.

tervienen en el TPH (radioterapia, inhibidores de la calcineurina, magnesio, endotoxinas y alorreactividad) como el efecto de otros agentes que podrían emplearse para proteger el endotelio (defibro-

tide, corticosteroides, N-acetilcisteína), evitando así su disfunción y con ello las complicaciones anteriormente mencionadas. Estos estudios han de permitir diseñar estrategias para prevenir la disfunción endo-

telial post-TPH y, con ello, las complicaciones a ella asociadas.

Agradecimientos

Realizado en parte gracias a los proyectos de investigación FIS-050153 del Instituto de Salud Carlos III y R-07/41V de la Deutsche José Carreras Leukämie-Stiftung.

Bibliografía

- Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res* 2007; 100: 158-73.
- Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res* 2007; 100: 174-90.
- Trepels T, Zeiher AM, Fichtlscherer S. The endothelium and inflammation. *Endothelium* 2006; 13: 423-9.
- Esper RJ, Nordaby RA, Vilarino JO, Paragano A, Cacharron JL, Machado RA. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovasc Diabetol* 2006; 5: 4.
- Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood* 2003; 101: 3765-77.
- Carreras E. Early complications alter HSCT. En: Apperley J, Carreras E, Gluckman E, Gratwohl A, Masszi T (eds.). *The EBMT handbook: haematopoietic stem cell transplantation*. Genoa, Italy: Forum Service Editore; 2008. p. 181-95.
- Nürnberg W, Willers R, Burdach S, Göbel U. Risk factors for capillary leak-age syndrome after bone marrow transplantation. *Ann Hematol* 1997; 74: 221-4.
- Afessa B, Tefferi A, Litzow MR, et al. Diffuse alveolar hemorrhage in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 166: 641-5.
- George JN, Li X, McMinn JR, Terrell DR, Vesely SK, Selby GB. Thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome following allogeneic HPC transplantation. *Transfusion* 2004; 44: 294-304.
- Speizer TR. Engraftment syndrome following HSCT. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27: 893-8.
- Cooke KR, Jannin A, Ho V. The contribution of endothelial activation and injury to end-organ toxicity following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; 14: 23-32.
- Biedermann BC, Sahner S, Gregor M, et al. Endothelial injury mediated by cytotoxic T lymphocytes and loss of microvessels in chronic graft versus host disease. *Lancet* 2002; 359: 2078-83.
- DeLeve LD, Shulman HM, McDonald GB. Toxic injury to hepatic sinusoids: sinusoidal obstruction syndrome(veno-occlusive disease). *Semin Liver Dis* 2002; 22: 27-42.
- DeLeve LD, Wang X, Kanel GC, et al. Decreased hepatic nitric oxide production contributes to the development of rat sinusoidal obstruction syndrome. *Hepatology* 2003; 38: 900-8.
- DeLeve LD, Wang X, Tsai J, Kanel G, Strasberg S, Tokes ZA. Sinusoidal obstruction syndrome (veno-occlusive disease) in the rat is prevented by matrix metalloproteinase inhibition. *Gastroenterology* 2003; 125: 882-90.
- DeLeve LD, Ito Y, Bethea NW, McCuskey MK, Wang X, McCuskey RS. Embolization by sinusoidal lining cells obstructs the microcirculation in rat sinusoidal obstruction syndrome. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284: G1045-52.
- Salat C, Holler E, Kolb HJ, Reinhardt B, Pihusch R, Wilmanns W, Hiller E. Plasminogen activator inhibitor-1 confirms the diagnosis of hepatic veno-occlusive disease in patients with hyperbilirubinemia after bone marrow transplantation. *Blood* 1997; 89: 2184-8.
- Heikinheimo M, Halila R, Fasth A. Serum procollagen type III is an early and sensitive marker for veno-occlusive disease of the liver in children undergoing bone marrow transplantation. *Blood* 1994; 83: 3036-40.
- Ferrà C, de Sanjosé S, Gallardo D, Berlanga JJ, Rueda F, Marín D, de la Banda E, et al. IL-6 and IL-8 levels in plasma during hematopoietic progenitor transplantation. *Haematologica* 1998; 83: 1082-7.
- Ogura H, Tanaka H, Koh T, et al. Enhanced production of endothelial microparticles with increased binding to leukocytes in patients with severe systemic inflammatory response syndrome. *J Trauma* 2004; 56: 823-30.
- Woywodt A, Scheer J, Hambach L, Buchholz S, Ganser A, Haller H, et al. Circulating endothelial cells as a marker of endothelial damage in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2004; 103: 3603-5.
- Blann AD, Woywodt A, Bertolini F, et al. Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease. *Thromb Haemost* 2005; 93: 228-35.
- Carreras E, Rosiñol L, Terol MJ, Alegre A, de Arriba F, García-Laraña J, et al. Veno-occlusive disease of the liver after high-dose cytoreductive therapy with busulfan and melphalan for autologous blood stem cell transplantation in multiple myeloma patients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007; 13: 1448-54.
- Carreras E, Bertz H, Arcese W, Vernant JP, Tomás JF, Hagglund H, et al. Incidence and outcome of hepatic veno-occlusive disease after blood or marrow transplantation: a prospective cohort study of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *European Group for Blood and Marrow Transplantation Chronic Leukemia Working Party*. *Blood* 1998; 92: 3599-604.
- Fuste B, Mazzara R, Escolar G, Merino A, Ordinas A, Díaz-Ricart M. Granulocyte colony-stimulating factor increases expression of adhesion receptors on endothelial cells through activation of p38 MAPK. *Haematologica* 2004; 89: 578-85.
- Fuste B, Escolar G, Marín P, Mazzara R, Ordinas A, Díaz-Ricart M. G-CSF increases the expression of VCAM-1 on stromal cells promoting the adhesion of CD34+ hematopoietic cells: studies under flow conditions. *Exp Hematol* 2004; 32: 765-72.

Nuevos avances en síndromes mielodisplásicos de “bajo riesgo”

COORDINADOR: J.R. GONZÁLEZ PORRAS. *Salamanca*

Resumen del simposio

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) de “bajo riesgo” se caracterizan por presentar un curso clínico más indolente y una menor tasa de evolución a leucemia aguda. Constituyen cerca de las dos terceras partes de los pacientes con SMD. El interés reciente en los SMD de “bajo riesgo” surge, en parte, de la aprobación por la FDA de tres nuevos fármacos para el tratamiento de los SMD¹⁻³.

A pesar de que se han realizado importantes esfuerzos en investigación, los SMD continúan siendo un gran dilema biológico y clínico. La heterogeneidad de la historia natural de estos trastornos complica la decisión sobre la forma de tratamiento clínico y el calendario de aplicación de la terapia. Un mejor conocimiento de la patogenia de los SMD de “bajo riesgo” nos permitiría discutir el marco pronóstico como base para estrategias terapéuticas basadas en riesgo individual. El IPSS constituye el estándar para los ensayos clínicos y para el manejo clínico de pacientes con SMD⁴. En 2001, la OMS publicó una nueva clasificación de los SMD que mostró un importante valor pronóstico⁵. Recientemente, el grupo de Pavía liderado por el Prof. Cazzola ha demostrado que el número de transfusiones tiene impacto pronóstico sobre el riesgo de transformación a leucemia y la supervivencia de pacientes con SMD de bajo riesgo, y puede considerarse un indicador independiente de la gravedad de la enfermedad⁶. De este modo, se ha introducido un nuevo sistema de puntuación pronóstica que tiene en cuenta la dependencia transfusional, el WPSS⁷. El WPSS es un sistema pronóstico dinámico, capaz de estratificar la supervivencia y el riesgo de desarrollar leucemia no sólo al diagnóstico, sino también durante la historia natural de la enfermedad. El IPSS y el WPSS constituyen dos herramientas útiles para la aplicación de estrategias terapéuticas individuales en función del riesgo para los pacientes con SMD.

En la actualidad, el arsenal terapéutico para los SMD está creciendo. Decidir el momento de inicio y el tipo de tratamiento más acertado ha de hacerse de forma individualizada. La incorporación de los fármacos hipometilantes, capaces de modificar la evolución en SMD, pero cuyo uso rutinario en los casos de “bajo riesgo” necesita de mayor evidencia científica, y de la lenalidomida, con magníficos resultados en SMD 5q- con anemia transfusión-dependiente, abren una puerta de esperanza en el manejo de los pacientes con SMD en general. Sin embargo, no debemos olvidar que un número importante de pacientes sólo será candidato a tratamiento de soporte con transfusión y depleción férrica.

En este simposio se pretende revisar algunos de los mecanismos biológicos implicados en la patogenia de los SMD de “bajo riesgo” y plantear directrices básicas en el manejo de estos pacientes.

Bibliografía

1. Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, Kornblith AB, Holland JC, Odchimar-Reissig R, et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol* 2002; 20: 2429-40.
2. List A, Dewald G, Bennett J, Giagounidis A, Raza A, Feldman E, et al. Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *N Engl J Med* 2006; 355: 1456-65.
3. Kantarjian H, Issa JP, Rosenfeld CS, Bennett J, Albitar M, Dipersion J, et al. Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study. *Cancer* 2006; 106: 1794-803.
4. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997; 89: 2079-88.
5. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (eds.). *World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon, France: IARC Press; 2001.

6. Malcovati L, Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, Boni M, Travaglino E, et al. Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: a basis for clinical decision making. *J Clin Oncol* 2005; 23: 7594-603.
7. Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, Della Porta MG, Pascutto C, Invernizzi T, et al. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3503-10.

PATOGÉNESIS MOLECULAR DE LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS DE BAJO RIESGO

J. CERVERA¹, A. VALENCIA¹, E. SUCH¹,
P. MONTESINOS¹, F. MOSCARDÓ¹, E. MARCO¹,
M.L. SENENT¹, P. BOLUFER², E. BARRAGÁN²,
G.F. SANZ¹, M.A. SANZ¹

¹Servicio de Hematología y Hemoterapia.

Hospital Universitario La Fe. Valencia.

²Laboratorio de Biología Molecular.

Servicio de Análisis Clínicos.

Hospital Universitario La Fe. Valencia.

Introducción

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) son trastornos clonales hematopoyéticos caracterizados clínicamente y morfológicamente por una hematopoyesis ineficaz y un riesgo elevado de transformación a leucemia aguda. Sin embargo, la historia natural de los SMD es muy variable, probablemente como reflejo de una gran heterogeneidad en las alteraciones citogenéticas, genéticas y epigenéticas que subyacen en la patogenia de estas neoplasias. Los pacientes con SMD han sido clasificados en subgrupos basándose fundamentalmente en el porcentaje de blastos medulares, de acuerdo a la clasificación franco-americano-británica (FAB)¹ de 1982 y, más recientemente, según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS)², que incorpora la valoración de la displasia y la presencia de algunas anomalías cromosómicas características, como la delección del brazo largo del cromosoma 5. En esta ponencia se revisan de forma somera algunos de los principales mecanismos biológicos implicados en la patogenia de los SMD, particularmente en aquellos que, por presentar un curso clínico más indolente y una menor tasa de evolución a leucemia aguda, han dado en llamarse de “bajo riesgo”.

Etiopatogenia de los SMD

La mayor parte de los SMD son idiopáticos, aunque existen algunos factores genéticos y ambientales bien caracterizados que predisponen a la aparición de mielodisplasia: trastornos hematológicos previos (anemia aplásica, hemoglobinuria paroxística nocturna, anemia de Fanconi, etc.), trastornos genéticos (síndrome de Down, neurofibromatosis de tipo 1, disqueratosis congénita, etc.), deficiencias enzimáticas (p.ej.: fenotipo nulo para la glutatión-S-transferasa, GSTM1), exposición a tóxicos (benceno, metales, etc.), tratamientos con agentes alquilantes, exposición a radiaciones ionizantes, etc.

Apoptosis medular

Un incremento de la apoptosis intramedular parece contribuir a la hematopoyesis ineficaz de los SMD³, y podría explicar, al menos en parte, la paradoja de la existencia de citopenias en sangre periférica con la presencia de una celularidad medular aumentada. Así, se ha demostrado que la actividad de las caspasas 1 y 3, efectores finales de la apoptosis, está aumentada en las células de médula ósea de los pacientes con SMD de bajo riesgo⁴. Sin embargo, el incremento de la apoptosis que se produce en las fases iniciales de los SMD declina conforme progresan a fases más avanzadas. Por otra parte, es bien conocido que alteraciones en los niveles de citoquinas juegan un papel fundamental en el proceso apoptótico. Así, los niveles de citoquinas proapoptóticas –tumor necrosis factor α (TNF- α), *transforming growth factor* β (TGF- β), interferón γ (IFN- γ) e interleuquina 1 β (IL-1 β)– están aumentados en los SMD⁴. En la actualidad, sin embargo, se desconoce si este incremento de los procesos apoptóticos guarda relación con la patogenia de la enfermedad o si, por el contrario, no es más que una respuesta compensatoria indirecta a la hiperproliferación anormal.

Alteraciones inmunológicas

Aunque existen indudables anomalías inmunológicas en los SMD, los intentos de establecer que el sistema linfocitario forma parte del clon maligno por la alteración de una célula madre común han sido en general infructuosos. Sin embargo, parece que un funcionamiento anómalo del sistema inmune podría facilitar la expansión de un clon displásico. Así, entre las alteraciones del sistema inmune en los SMD se han observado alteraciones de la fagocitosis, manifestaciones autoinmunes, alteraciones en las poblaciones linfocitarias, hipergammaglobulinemias policlonales y aumento de la incidencia de tumores linfocitarios⁵. La mayor parte de estas alteraciones han sido explicadas por anomalías del sistema mononuclear-fagocítico y de las células dendríticas, capaces de originar una alteración en el normal balance de citoquinas. La respuesta de algunas formas de SMD a terapia inmunosupresora o inmunomoduladora parece avalar la hipótesis de que en la patogenia de los SMD, al menos en sus fases iniciales, el sistema inmune podría jugar un papel relevante.

Mecanismos moleculares

Los mecanismos últimos que conducen a la aparición de un SMD son todavía desconocidos en su mayor parte. Diversos estudios han demostrado que se tra-

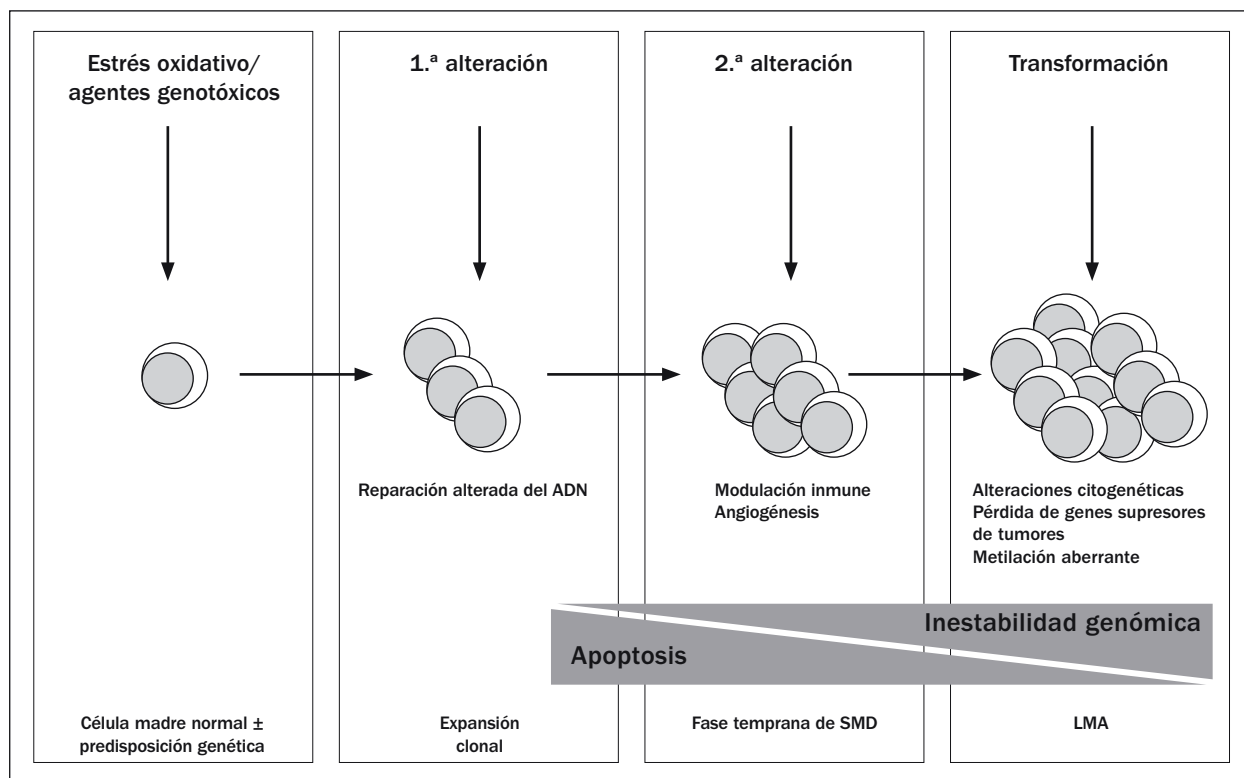


Figura 1. Modelo de patogénesis de los SMD.

ta de trastornos clonales de la célula madre hematopoyética⁶ caracterizados por una maduración defectuosa y, en estadios avanzados, una proliferación descontrolada. Al igual que en otros trastornos neoplásicos, en la patogénesis de los SMD se supone la existencia de múltiples lesiones sucesivas que conducen a la aparición de un clon anormal. En la Figura 1 se muestra un modelo de patogénesis de los SMD. Tras un daño inicial de los progenitores hematopoyéticos inducido por sustancias químicas, radiaciones, drogas citotóxicas o mutaciones endógenas espontáneas, sucesivas alteraciones adicionales pueden afectar a estas células, confiriéndoles una ventaja proliferativa. Estas alteraciones pueden incluir alteraciones clonales en la función de algunos genes (pérdida o ganancia de función) debidas a mutaciones individuales, alteraciones cromosómicas (balanceadas o no balanceadas) o fenómenos epigenéticos, como el silenciamiento de la expresión génica por hipermetilación aberrante que pueden afectar a oncogenes, genes relacionados con el ciclo celular o factores de transcripción, así como genes supresores de tumores. Generalmente se requiere la pérdida de función de ambos alelos de un gen supresor de tumores para que su efecto leucemogénico se manifieste. Sin embargo, la haploinsuficiencia (pérdida de función de una sola copia del gen) resulta en una reducción de los productos del gen, y también puede tener un pa-

pel patogénico. Existen crecientes evidencias de que este último mecanismo es fundamental en determinados SMD con deleciones de 5q, 7q y 20q. Por otra parte, la evolución a LMA probablemente no depende del orden en que ocurren todas estas alteraciones genéticas, pero sí de los genes que se ven alterados. Entre las alteraciones que han sido descritas destacan las del oncogén *N-ras*, los genes supresores de tumores *p53* e *IRF-1*, el gen antiapoptótico *Bcl-2*, el gen regulador del ciclo celular *p15^{INK4b}* y algunos factores de transcripción, como *Evi1* y *MLL7*.

Por otra parte, las evidencias actuales indican que la LMA y algunas formas de SMD son la consecuencia de la colaboración entre al menos dos amplias clases de mutaciones. Las mutaciones de clase I confieren una ventaja proliferativa o de supervivencia a las células sin afectar a su capacidad de diferenciación, mientras que las mutaciones de clase II impiden la normal diferenciación de las células hematopoyéticas⁸. Entre las primeras se incluyen las mutaciones que suponen una activación constitutiva de diversas proteínas, muchas de ellas con actividad tirosina quinasa, como las duplicaciones internas de *FLT3 (FLT3/ITD)* o las mutaciones de *c-Kit*, *RAS*, *BRAF* o *PTPN11*. Las mutaciones y reordenamientos de clase II, por el contrario, afectan casi invariablemente a factores de transcripción como *CBF (AML1 y CBPB)* o *RARA*, miembros de la

familia *HOX*, proteínas reguladoras de la transcripción como *MLL* y proteínas coactivadoras de la transcripción como *CBP*, *p300* y *TIF2*⁹.

Anemia refractaria sideroblástica con sideroblastos en anillo (ARSA)

Un caso particular que merece especial atención es la ARSA, un SMD considerado de bajo riesgo que se caracteriza por la acumulación de un exceso de hierro en las mitocondrias de los eritroblastos y cuya patogenia permanece inexplicada. Sin embargo, recientemente J. Boultonwood *et al.* han realizado una contribución importante al conocimiento de los mecanismos moleculares de la ARSA, tomando como modelo un raro trastorno hereditario denominado anemia sideroblástica con ataxia ligada al cromosoma X⁹. Este síndrome se caracteriza por una mutación que inactiva parcialmente la función del gen *ABCB7*, responsable del transporte del hierro desde la mitocondria al citoplasma de la célula. Mediante estudios de secuenciación y expresión en células CD34+ y eritroblastos en cultivo, este grupo ha demostrado que la expresión del gen *ABCB7* está significativamente disminuida en los pacientes con ARSA frente al resto de SMD y los individuos normales. Además, la expresión de *ABCB7* guarda una relación inversa con el porcentaje de sideroblastos en médula ósea. Estos resultados establecen

por primera vez una relación patogénica entre las formas hereditarias y adquiridas de las anemias sideroblásticas y sugieren que el gen *ABCB7* juega un papel fundamental en la patogenia de las ARSA.

Citogenética de los SMD

En el momento del diagnóstico se encuentran aberraciones cromosómicas recurrentes en el 30-50% de los pacientes con SMD *de novo* y en el 80-95% de los casos con SMD secundario¹⁰. En la Tabla 1 se muestran algunas de las alteraciones citogenéticas más características de los SMD. La frecuencia de estas alteraciones citogenéticas aumenta con el grado de la enfermedad y el riesgo de transformación leucémica. Así, mientras sólo el 15-20% de los casos con AR o ARSA presentan alteraciones, cerca del 75% de los casos con AREB o AREB-t tienen anomalías en su cariotipo. Las alteraciones cromosómicas más frecuentes en los SMD son las deleciones totales o parciales de los cromosomas 5, 7, 12, 20 e Y, así como la trisomía del cromosoma 8. Diversos estudios han confirmado el valor pronóstico, tanto para la supervivencia como para el riesgo de evolución a leucemia aguda, de las aberraciones cromosómicas¹¹⁻¹³, que han sido incorporadas como elementos clave en algunos índices pronósticos¹¹.

En general, las alteraciones recurrentes en los SMD son no balanceadas: pérdidas cromosómicas, delecio-

Tabla 1. Principales alteraciones citogenéticas en los SMD.

Anomalías citogenéticas	Pronóstico/Asociaciones	Características morfológicas	Genes relacionados
del(5q) aislada	Favorable/síndrome 5q-	Anemia macrocítica, plaquetas normales o aumentadas, hipoplasia eritroide, megacariocitos unilobulados	<i>RPS14</i> <i>SPARC</i>
del(20q) aislada	Favorable	Displasia eritroide y megacariocítica	
-Y aislada	Favorable		
Trisomía 8	Intermedio		
-5/del(5q)	Desfavorable/SMD-t (alquilantes)		<i>EGR1</i> <i>CTNNA1</i> Mutaciones <i>p53</i>
-7/del(7q)	Desfavorable/SMD-t (alquilantes)		Mutaciones <i>AML1</i> Metilación <i>p15^{INK4B}</i>
del(17p)	Desfavorable/SMD-t (alquilantes)	Pseudo-Pelger, neutrófilos vacuolados	<i>p53</i>
Cariotipo complejo (>2 alteraciones)	Desfavorable/SMD-t (alquilantes)		
Alteraciones 3q21	Desfavorable/SMD-t (inhibidores de TPI-II)	Micromegacariocitos abundantes y trombocitosis	<i>Evi1</i>
Alteraciones 21q22	SMD-t (inhibidores de TPI-II)		<i>AML1</i>
Alteraciones 11q23	SMD-t (inhibidores de TPI-II)		<i>MLL</i>
Alteraciones 12p	SMD/SMPC		<i>PDGFRb</i>

SMD-t: síndrome mielodisplásico secundario a quimioterapia/radioterapia; TPI-II: ADN-topoisomerasa II; SMPC: síndrome mieloproliferativo crónico.

nes o translocaciones no balanceadas. Aunque menos característico, algunos casos pueden presentar translocaciones balanceadas. Algunas anomalías cromosómicas están estrechamente relacionadas con algunos subtipos morfológicos y clínicos característicos, incluyendo el síndrome 5q-, el síndrome 17p- y la ARSA asociada a cromosoma X isodiccéntrico (que muestra un elevado riesgo de transformación a LMA). Muchos otros hallazgos, incluyendo las pérdidas o deleciones de los cromosomas 5 y 7, la trisomía 8 y los cariotipos complejos, son comunes tanto a los SMD como a las LMA.

Principales anomalías citogenéticas en los SMD y su contrapartida molecular

Cariotipo normal

Al igual que en la LMA, el subgrupo citogenético mayoritario dentro de los SMD lo constituyen los pacientes con un cariotipo normal (30-60% de los casos). Se trata de un grupo heterogéneo de pacientes en los que la alteración responsable de la transformación neoplásica no es detectable por citogenética convencional (ya sea por la propia naturaleza de la alteración o por selección en el cultivo de células normales). Este grupo de pacientes presenta un pronóstico favorable¹¹⁻¹³.

Un estudio¹⁴ llevado a cabo mediante el empleo de arrays de SNP (polimorfismos de un solo nucleótido) de alta resolución en 119 pacientes con SMD de bajo riesgo (68% con cariotipo normal) ha permitido constatar la existencia de regiones de disomía uniparental (UPD, pérdida de heterocigosidad sin alteración en el número de copias) en el 46% de los pacientes, pequeñas deleciones en el 10% y amplificaciones en el 8% de los casos. Tanto las deleciones como las amplificaciones se relacionaron con un peor pronóstico, mientras se confirmó que las UPD se trataban de alteraciones constitucionales cuya alta frecuencia podría constituir una predisposición a la inestabilidad cromosómica. Además, se identificó en algunos pacientes regiones de UPD en el brazo largo del cromosoma 4 que mediante análisis de expresión se relacionaron con la expresión de genes importantes en la diferenciación eritroide, sugiriendo un posible papel patogénico de esta región cromosómica en los SMD de bajo riesgo. Más recientemente, un trabajo realizado con la misma tecnología en un grupo más heterogéneo de pacientes, incluyendo 66 SMD de bajo riesgo, ha permitido confirmar la existencia de anomalías cromosómicas críticas en una proporción sustancial de pacientes con un cariotipo aparentemente normal, y en torno a un 20% de UPD en pacientes con SMD¹⁵. Sin embargo, la relevancia clínica o patogénica de estos hallazgos esta todavía por determinar.

Síndrome 5q-

El hallazgo aislado de una deleción intersticial del brazo largo del cromosoma 5 se asocia con un síndrome clínico característico que ha sido reconocido como una entidad independiente dentro de la clasificación de la OMS. Este síndrome, en contraste con el resto de SMD, afecta predominantemente a mujeres (2:1). Clínicamente, suele caracterizarse por anemia macrocítica, con un recuento de plaquetas normal o elevado. La displasia megacariocítica, especialmente la presencia de micromegacariocitos y megacariocitos hipolobulados, es el hallazgo predominante en la médula ósea. La evolución clínica suele ser favorable; de hecho, la mejor de cualquier subtipo de SMD, con una supervivencia prolongada y una baja tasa de transformación leucémica¹¹⁻¹³. Sin embargo, cerca de un tercio de los pacientes se presentan con una cifra de blastos superior al 5% (no cumpliendo, por tanto, los criterios establecidos por la OMS para el diagnóstico de síndrome 5q-), mostrando, en líneas generales, una peor evolución clínica.

La deleción en el síndrome 5q- es típicamente intersticial, aunque el tamaño de la región delecionada es variable entre los pacientes. Aproximadamente la mitad de los casos tienen una deleción entre las bandas 5q13 y 5q33, donde se supone que se localiza la región más crítica. Otras deleciones intersticiales incluyen q13q33, q22q33 y q15q33, entre otras. Existe también una elevada frecuencia de del(5q) en la misma región en pacientes con SMD y LMA secundarios a tratamientos alquilantes o radiaciones ionizantes.

Desde el punto de vista molecular, dos regiones comúnmente delecionadas (RCD) han sido identificadas en las bandas 5q31 y 5q32-q33. Se cree que el segmento más proximal en 5q31 contiene un gen supresor de tumores relacionado con la patogénesis tanto de los SMD y LMA *de novo* como de los secundarios a terapia (SMD-t/LAM-t)¹⁷, y donde recientemente dos genes candidatos (*EGR1* y *CTNNA1*) han sido comunicados^{18,19}. Por el contrario, la región más distal parece contener un segundo gen supresor de tumores relacionado con el síndrome 5q-²⁰. Durante los últimos treinta años y mediante el empleo de métodos de mapeo físico se ha conseguido delimitar esta RCD hasta un tamaño de aproximadamente 1,5 megabases, que contiene en torno a 40 genes conocidos. Sin embargo, no se han encontrado deleciones de ambos alelos o mutaciones puntuales en el alelo restante en ninguno de los genes de esta región. Recientemente, B. Ebert *et al.* han demostrado mediante el empleo de ARN de interferencia que la pérdida parcial de función (haploinsuficiencia) del gen *RPS14*, requerido para la maduración de la subunidad ribosómica 40S, es capaz de reproducir el fenotipo característico del síndrome 5q-, y que la reexpresión forzada de este gen es asimismo capaz de revertir dicho fenotipo en células progenitoras hemato-

poyéticas procedentes de individuos sanos²¹. Además, las células con haploinsuficiencia de *RPS14* muestran un bloqueo en el procesamiento del ARN prerribosómico análogo al defecto ribosómico funcional observado en la anemia de Diamond-Blackfan, estableciendo por primera vez una posible relación entre el síndrome 5q- y un síndrome de fallo medular congénito. Estos resultados sugieren que la haploinsuficiencia del gen *RPS14* tiene un papel patogénico en el síndrome 5q-, ocasionando un defecto en la maduración ribosómica. Sin embargo, aunque es probable que *RPS14* tenga un papel causal en el defecto de la maduración eritroide observada en el síndrome 5q-, es posible que la alteración de otros genes desconocidos sea necesaria para conceder una ventaja proliferativa al clon alterado²¹. En este sentido, la lenalidomida ha emergido recientemente como un tratamiento con una elevada efectividad en los pacientes con síndrome 5q- en términos de independencia transfusional y respuestas citogenéticas²². Recientemente, A. Pellagatti *et al.* han demostrado mediante estudios de expresión génica que el tratamiento *in vitro* con lenalidomida incrementa significativamente la expresión del gen *SPARC*, localizado también en la misma RCD en 5q31-q32. *SPARC* es un gen supresor de tumores que participa en la inhibición del crecimiento, la adhesión celular y la angiogénesis. Puesto que estos son algunos de los mecanismos de acción que se han sugerido para lenalidomida, y dado que este gen se localiza en la RCD del síndrome 5q-, se ha sugerido que *SPARC* pudiera jugar un papel en la respuesta a lenalidomida, así como en la patogenia del síndrome 5q-²³.

-5/5q-

Otras anomalías del cromosoma 5 incluyen las monosomías y las deleciones del brazo largo asociadas a otras alteraciones, y afectan al 10-15% de los pacientes con SMD. Estas anomalías suelen observarse en los subtipos AREB y AREB-t, y frecuentemente se asocian con cariotipos complejos. Es característica, asimismo, la relación con la exposición previa a agentes alquilantes o tóxicos^{24,25}. Las mutaciones de *p53* (77% de los casos)²⁶ son características. Clínicamente, los pacientes con anomalías del cromosoma 5 muestran una evolución desfavorable con rápida evolución a leucemia aguda, frecuente resistencia al tratamiento y corta supervivencia¹¹⁻¹³.

-7/7q-

Las alteraciones del cromosoma 7 afectan en torno al 5% y 55% de los pacientes con SMD *de novo* y SMD-t, respectivamente²⁷. Una entidad denominada "síndrome de la monosomía 7" se ha descrito en niños y se caracteriza por un predominio masculino en su incidencia (4:1), hepatoesplenomegalia, leucocitosis, trombocitopenia y un pronóstico muy adverso. Este síndrome guarda estrecha relación con la leuce-

mia mielomonocítica crónica juvenil (LMMC-J)²⁸, con la que presenta muchas características clínicas comunes, y en la que es frecuente el hallazgo de una monosomía 7, ya sea en el momento del diagnóstico o en el curso evolutivo. De hecho, algunos autores consideran el "síndrome de la monosomía 7" como un subtipo de la LMMC-J. Por otra parte, las alteraciones del cromosoma 7 son el hallazgo más frecuente en la médula ósea de los pacientes con una predisposición congénita (anemia de Fanconi, neurofibromatosis de tipo 1, síndrome de Kostman, etc.) o adquirida (anemia aplásica) a las neoplasias de estirpe mielóide. Además, al igual que las alteraciones del cromosoma 5, su presencia guarda relación con la exposición ambiental a tóxicos y el tratamiento previo con agentes alquilantes o radioterapia. El curso clínico es también muy desfavorable¹¹⁻¹³. Estudios mediante citogenética convencional, FISH y pérdida de heterocigosidad (LOH) muestran una gran heterogeneidad en las deleciones del brazo largo del cromosoma 7 en las diversas neoplasias mieloides. No obstante, aunque el cuadro general parece más complejo, existe consenso en definir una RCD en 7q22 en la mayoría de los casos²⁹.

Entre las alteraciones moleculares que se han encontrado en estos pacientes destacan algunas mutaciones de clase I, como las mutaciones puntuales de *AML1* (38%). La hipermetilación aberrante del promotor de *p15^{INK4B}* es también frecuente en los pacientes con anomalías del cromosoma 7. Por el contrario, las alteraciones de *RAS* o *p53* no son particularmente frecuentes²⁶.

del(20q)

La deleción del brazo del cromosoma 20 es una alteración recurrente común en diversas neoplasias mieloides que afecta aproximadamente al 5% de los SMD *de novo* y al 7% de los SMD-t. Morfológicamente, la presencia de del(20q) se asocia con una marcada displasia de las series roja y megacariocítica. Desde el punto de vista pronóstico, se le atribuye un pronóstico favorable, con baja tasa de evolución a LMA y una supervivencia prolongada cuando se presenta como anomalía aislada. Sin embargo, cuando se presenta en el contexto de un cariotipo complejo el pronóstico es particularmente ominoso¹¹⁻¹³. Los análisis moleculares demuestran que, aunque las deleciones suelen ser de gran tamaño y afectar a buena parte del cromosoma 20, existe una RCD localizada en 20q12, que contiene múltiples genes con potencial capacidad leucemogénica³⁰.

Trisomía 8

La trisomía del cromosoma 8 se observa en aproximadamente el 10% de los pacientes con SMD, afectando a todos los subgrupos FAB. Es frecuente su asociación con otras anomalías citogenéticas, y se le otorga un va-

lor pronóstico intermedio¹¹. Sin embargo, algunos estudios han señalado el elevado riesgo de transformación aguda de esta anomalía cromosómica^{12,13}.

Pérdida del cromosoma Y: -Y

El significado biológico de la pérdida del cromosoma Y es desconocido, ya que, aunque ha sido descrita en un gran número de neoplasias, también parece ser un fenómeno relacionado con el envejecimiento. Sin embargo, en neoplasias hematológicas se ha demostrado que una proporción significativa de metafases con pérdida del cromosoma Y (>75%) predice de forma efectiva la clonalidad de un trastorno determinado³¹. Clínicamente, la pérdida aislada del cromosoma Y confiere un pronóstico favorable en los SMD¹¹⁻¹³.

Síndrome 17p-

Las anomalías que suponen una pérdida del brazo corto del cromosoma 17 se han descrito en el 5% de los pacientes con SMD, e incluyen deleciones, translocaciones no balanceadas, cromosomas dicéntricos, isocromosomas y monosomía 17. Aproximadamente un tercio de estos pacientes tienen un SMD-t, y buena parte de ellos presentan anomalías citogenéticas adicionales (fundamentalmente anomalías de los cromosomas 5 y 7). Morfológicamente, el síndrome 17p- se asocia con una forma particular de disgranulopoyesis, caracterizada por hipolobulación pseudo-Pelger-Huet y la presencia de pequeños gránulos en los neutrófilos³². Molecularmente se caracteriza por una pérdida del gen *p53*, y el comportamiento clínico es adverso.

Cariotipo complejo

Generalmente se define un cariotipo complejo por la presencia de tres o más alteraciones cromosómicas independientes. En los SMD afectan a aproximadamente el 15% de los casos, e incluyen frecuentes anomalías no balanceadas, especialmente de los cromosomas 5 y 7. Clínicamente se caracterizan por un pronóstico sombrío¹¹⁻¹³.

Alteraciones epigenéticas en los SMD

En el inicio y progresión de las SMD intervienen no sólo alteraciones genéticas (mutaciones, deleciones, etc.), sino también fenómenos epigenéticos que originan alteraciones transmisibles en el patrón de expresión génica, sin cambios en la secuencia primaria de nucleótidos del ADN. La desregulación de estos mecanismos epigenéticos puede conducir a la transcripción aberrante de genes involucrados en el crecimiento, proliferación, diferenciación y apoptosis celular. Entre los mecanismos epigenéticos mejor estudiados destacan la metilación del ADN y la acetilación/desacetilación de histonas.

Al igual que en otras formas de cáncer, el patrón de metilación normal está invertido en los SMD, mostrando una hipometilación global del genoma con hipermetilación aberrante de islas CpG en las regiones promotoras de algunos genes. La hipermetilación aberrante del promotor de *p15^{INK4B}* (*CDKN2B*) parece jugar un papel determinante en la patogénia de los SMD^{33,34}. El gen *p15^{INK4B}* y su homólogo funcional *p16^{INK4A}* (*CDKN2A*) codifican proteínas que regulan negativamente el ciclo celular, inhibiendo las quinasas dependientes de ciclina (CDK) 4 y 6 y evitando la progresión del ciclo celular de la fase G1 a la fase de síntesis. La expresión del inhibidor de CDK *p15^{INK4B}* está aumentada durante la diferenciación granulocítica y megacariocítica normal de los progenitores hematopoyéticos³⁵. La inactivación de *p15^{INK4B}* y *p16^{INK4A}* por deleción y/o mutación ha sido descrita en numerosos tipos de cáncer, sugiriendo su potencial papel como genes supresores de tumores³⁶. Sin embargo, las deleciones o mutaciones de *p15^{INK4B}* y *p16^{INK4A}* son un hecho extraordinario en las neoplasias de estirpe mieloide³⁷. En contraste, la hipermetilación aberrante de *p15^{INK4B}* es un hallazgo frecuente en los SMD, especialmente en las formas con exceso de blastos (AREB y AREB-t), y se asocia con la pérdida de expresión del gen. Asimismo, los pacientes con metilación de *p15^{INK4B}* en el momento del diagnóstico o adquirida durante la evolución de la enfermedad presentan una menor supervivencia global y una mayor probabilidad de evolución a LMA^{33,34}.

Además de genes supresores de tumores, un gran número de genes se encuentran anormalmente metilados en las LMA y SMD³⁸, sugiriendo la existencia de una desregulación generalizada en los mecanismos normales de metilación del ADN que predisponen a la hipermetilación aberrante de múltiples genes.

Por otra parte, diversas modificaciones postraduccionales del tallo N-terminal de las histonas (como acetilación, metilación, fosforilación y ubiquitinación), cuya combinación constituye el llamado "código histona", son fundamentales en la regulación de la expresión génica. En particular, la desacetilación de las histonas, reacción catalizada por las desacetilasas de las histonas (HDAC), confiere a la cromatina una conformación fuertemente represora de la transcripción y contribuye, junto con la metilación del ADN, al silenciamiento génico³⁹.

Sin embargo, a diferencia de las aberraciones genéticas que ocurren en el cáncer, los cambios epigenéticos son potencialmente reversibles y, por tanto, existe la posibilidad de reactivar los genes silenciados con objeto de obtener un beneficio terapéutico. Los agentes hipometilantes 5-azacitidina y su derivado 5-aza-2'-desoxicitidina (decitabina) son potentes inhibidores de la metilación del ADN, que se incorporan en los ácidos nucleicos de las células en división, donde ac-

túan cómo inhibidores de las ADN-metiltransferasas. La actividad clínica que han mostrado estos agentes en los SMD, particularmente empleados a dosis bajas⁴⁰⁻⁴², sugiere que el estado de metilación de algunos genes podría contribuir significativamente al desarrollo del fenotipo mielodisplásico. Paradójicamente, los intentos por establecer una relación entre el estado de metilación de algunos de estos genes, como *p15^{INK4B}*, y la respuesta clínica a los agentes hipometilantes han resultado infructuosos⁴³.

Finalmente, el efecto sinérgico entre los agentes hipometilantes y los inhibidores de las desacetilasas de las histonas (iHDAC) hace particularmente atractivo el empleo combinado de ambos tipos de agentes en ensayos clínicos⁴⁴.

Conclusiones

Los SMD de bajo riesgo son trastornos neoplásicos con una gran heterogeneidad clínica, que se caracterizan por un curso clínico relativamente indolente y una menor tasa de evolución a leucemia aguda que otras formas de mielodisplasia. Los mecanismos patogénicos de estos trastornos son en su mayor parte desconocidos. De un modo general se caracterizan por presentar un incremento de los mecanismos apoptóticos medulares que condicionan una hematopoyesis ineficaz y explican, al menos en parte, la paradoja de la presencia de citopenias en sangre periférica con una médula ósea hiperclular. Además, suelen presentar diversas anomalías del sistema inmune que ocasionan una alteración en el normal balance de citoquinas y que podrían favorecer la proliferación de la clona neoplásica. Desde el punto de vista citogenético, acostumbra a presentar un cariotipo normal con más frecuencia que las formas con exceso de blastos. Cuando aparecen alteraciones cromosómicas, suelen ser no balanceadas con ganancias o pérdidas netas de material, siendo las alteraciones balanceadas mucho menos frecuentes. Las alteraciones moleculares descritas pueden afectar a oncogenes, genes relacionados con el ciclo celular o factores de transcripción, así como genes supresores de tumores, y pueden consistir en pérdidas de función (generalmente por delección, mutación o metilación aberrante) o, más raramente, en ganancia de función. Al igual que en otras neoplasias de estirpe mieloide, se supone la existencia de alteraciones sucesivas que cooperan en el desarrollo del fenotipo leucémico. Las alteraciones epigenéticas, aunque suelen afectar a fases más avanzadas de la enfermedad, son susceptibles de ser revertidas con fármacos cuyo potencial terapéutico es todavía objeto de estudio. Recientemente se ha postulado que el mecanismo de haploinsuficiencia de algunos genes supresores de tumores podría tener un papel determi-

nante en los casos con deleciones de 5q, 7q y 20q-. Así, entre los hallazgos más recientes en la patogenia de los SMD de bajo riesgo destacan el probable papel patogénico de la haploinsuficiencia del gen *RPS14* en el desarrollo del síndrome 5q- y del gen *ABCB7* en las ARSA adquiridas.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado en parte por las ayudas RD06/0020/0031, PI05/1224 e IF063709 del Instituto de Salud Carlos III y 2006/0137 de la Fundación para la Investigación Hospital Universitario La Fe-Fundación Bancaja.

Bibliografía

- Bennett, JM, Catovsky, D, Daniel, MT, et al. FAB Cooperative Group: Proposal for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1982; 51: 189-99.
- Burgers WA, Bennet JM, Flandrin G, et al. En: Jaffe E, Harris N, Stein H, et al., eds. WHO Classification of Tumours: pathology and genetics of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press; 2001: 61-73.
- Yoshida Y, Mufti GJ. Apoptosis and its significance in MDS: controversies revisited. *Leuk Res* 1999; 23: 777-85.
- Parker JE, Mufti GJ. The role of apoptosis in the pathogenesis of the myelodysplastic syndromes. *Int J Hematol* 2001; 73: 416-28.
- Hamblin TJ. Immunology aspects of the myelodysplastic syndromes. En: Bennet JM, ed. The myelodysplastic syndromes: pathobiology and clinical management. New York: Marcel Dekker, Inc.; 2002. p. 65-88.
- Okamoto T, Okada M, Wada H, et al. Clonal analysis of hematopoietic cells using a novel polymorphic site of the X chromosome. *Am J Hematol* 1998; 58: 263-6.
- Hofmann WK, Lübert M, Hoelzer D, Koeffler P. Myelodysplastic syndromes. *The Hematology Journal* 2004; 5: 1-8.
- Deguchi K, Gilliland DG. Cooperativity between mutations in tyrosine kinases and in hematopoietic transcription factors in AML. *Leukemia* 2002; 16: 740-4.
- Boultonwood J, Pellagatti A, Nikpour M, et al. The role of the iron transporter ABCB7 in refractory anemia with ring sideroblasts. *PLoS ONE* 2008; 3 (4): e1970.
- Olney HJ, Le Beau MM. The cytogenetics and molecular biology of myelodysplastic syndromes. En: Bennet JM, ed. The myelodysplastic syndromes: pathobiology and clinical management. New York: Marcel Dekker, Inc.; 2002. p. 89-110.
- Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997; 89 (6): 2079-88. Erratum En: *Blood* 1998; 91 (3): 1100.
- Solé F, Luño E, Sanzo C, Espinet B, Sanz GF, Cervera J, et al. Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2005; 90 (9): 1168-78.
- Haase D, Germing U, Schanz J, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2,124 patients. *Blood* 2007; 110 (13): 4385-95. Epub 2007 Aug 28.
- Mohamedali A, Gäken J, Twine NA, et al. Prevalence and prognostic significance of allelic imbalance by single-nucleotide polymorphism analysis in low-risk myelodysplastic syndromes. *Blood* 2007; 110: 3365-73.

15. Gondek LP, Tiu R, O'Keefe CL, et al. Chromosomal lesions and uniparental disomy detected by SNP arrays in MDS, MDS/MPD, and MDS-derived AML. *Blood* 2008; 111 (3): 1534-42.
16. Van den BH, Michaux L. 5q-, twenty-five years later: a synopsis. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 94: 1-7.
17. Boultonwood J, Fidler C, Strickson AJ, et al. Narrowing and genomic annotation of the commonly deleted region of the 5q- syndrome. *Blood* 2002; 15; 99 (12): 4638-41.
18. Liu TX, Becker MW, Jelinek J, et al. Chromosome 5q deletion and epigenetic suppression of the gene encoding a-catenin (CTNNA1) in myeloid cell transformation. *Nature Med* 2007; 13: 78-83.
19. Joslin, JM, Fernald AA, Tennant TR, et al. Haploinsufficiency of EGR1, a candidate gene in the del(5q), leads to the development of myeloid disorders. *Blood* 2007; 110: 719-26.
20. Boultonwood J, Fidler C, Strickson AJ, et al. Transcription mapping of the 5q- syndrome critical region: cloning of two novel genes and sequencing, expression, and mapping of a further six novel cDNAs. *Genomics* 2000; 66: 26-34.
21. Ebert BL, Pretz J, Bosco J, et al. Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature* 2008; 17; 451 (7176): 335-9.
22. List A, Dewald G, Bennett J, et al. Myelodysplastic Syndrome-003 Study Investigators. Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *N Engl J Med* 2006; 355 (14): 1456-65.
23. Pellagatti A, Jädersten M, Forsblom AM, et al. Lenalidomide inhibits the malignant clone and up-regulates the SPARC gene mapping to the commonly deleted region in 5q- syndrome patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104 (27): 11406-11. Epub 2007 Jun 18.
24. West RR, Stafford DA, White AD, et al. Cytogenetic abnormalities in the myelodysplastic syndromes and occupational or environmental exposure. *Blood* 2000; 95: 2093-7.
25. Pedersen-Bjergaard J, Andersen MK, Christiansen DH. Therapy-related acute myeloid leukemia and myelodysplasia after high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation. *Blood* 2000; 95: 3273-9.
26. Pedersen-Bjergaard J, Christiansen DH, Desta F, Andersen MK. Alternative genetic pathways and cooperating genetic abnormalities in the pathogenesis of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukaemia. *Leukemia* 2006; 20: 1943-9.
27. Olney HJ, Le Beau MM. The Cytogenetics and Molecular Biology of Myelodysplastic Syndromes. En: Bennet JM, ed. *The myelodysplastic syndromes: pathobiology and clinical management*. New York: Marcel Dekker, Inc.; 2002. p. 89-110.
28. Luna-Fineman S, Shannon KM, Lange BJ. Childhood monosomy 7: epidemiology, biology, and mechanistic implications. *Blood* 1995; 85: 1985-99.
29. Liang H, Fairman J, Claxton DF, et al. Molecular anatomy of chromosome 7q deletions in myeloid neoplasms: evidence for multiple critical loci. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3781-5.
30. Bench AJ, Nacheva EP, Hood TL, Holden JL, French L, Swanton S, et al. Chromosome 20 deletions in myeloid malignancies: reduction of the common deleted region, generation of a PAC/BAC contig and identification of candidate genes. UK Cancer Cytogenetics Group (UKCCG). *Oncogene* 2000; 19: 3902-13.
31. Wiktor A, Rybicki BA, Piao ZS, et al. Clinical significance of Y chromosome loss in hematologic disease. *Cancer* 2000; 27: 11-6.
32. Lai JL, Preudhomme C, Zandecki M, et al. Myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with 17p deletion. An entity characterized by specific dysgranulopoiesis and a high incidence of P53 mutations. *Leukemia* 1995; 9: 370-81.
33. Quesnel B, Guillemin G, Verecque R, et al. Methylation of the p15(INK4b) gene in myelodysplastic syndromes is frequent and acquired during disease progression. *Blood* 1998; 91: 2985-90.
34. Uchida T, Kinoshita T, Nagai H, et al. Hypermethylation of the p15INK4B gene in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997; 90: 1403-9.
35. Teofilii L, Martini M, Di Mario A, et al. Expression of p15(ink4b) gene during megakaryocytic differentiation of normal and myelodysplastic hematopoietic progenitors. *Blood* 2001; 98: 495-7.
36. Nobori T, Miura K, Wu DJ, et al. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 1994; 368: 753-6.
37. Uchida T, Kinoshita T, Saito H, Hotta T. CDKN2 (MTS1/p16INK4A) gene alterations in hematological malignancies. *Leuk Lymphoma* 1997; 24: 449-61.
38. Melki JR, Vincent PC, Clark SJ. Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 1999; 59: 3730-40.
39. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature* 2002; 3: 415-28.
40. Wijermans P, Lubbert M, Verhoef G, et al. Low-dose 5-aza-2'-deoxycytidine, a DNA hypomethylating agent, for the treatment of high-risk myelodysplastic syndrome: a multicenter phase II study in elderly patients. *J Clin Oncol* 2000; 18: 956-62.
41. Lubbert M, Wijermans P, Kunzmann R, et al. Cytogenetic responses in high-risk myelodysplastic syndrome following low-dose treatment with the DNA methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine. *Br J Haematol* 2001; 114: 349-57.
42. Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the Cancer and Leukemia Group B. *J Clin Oncol* 2002; 20: 2429-40.
43. Issa JP, García-Manero G, Giles FJ, et al. Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies. *Blood* 2004; 103 (5): 1635-40. Epub 2003 Nov 6.
44. García-Manero G, Kantarjian HM, Sánchez-González B, et al. Phase 1/2 study of the combination of 5-aza-2'-deoxycytidine with valproic acid in patients with leukemia. *Blood* 2006; 108 (10):3271-9. Epub 2006 Aug 1.

TREATMENT OF LOW RISK MYELODYSPLASTIC SYNDROMES

L. MALCOVATI, M.G. DELLA PORTA,
M. CAZZOLA

*Department of Hematology. University of Pavia
Medical School. Fondazione IRCCS Policlinico
San Matteo. Pavia (Italia)*

Treatment of myelodysplastic syndromes represents a challenge for several reasons, which include clinical heterogeneity of these conditions and lack of therapeutic options that can be employed and are effective in most patients¹. Several therapeutic tools have been proposed in the last decades but only few survived the evidence-based criteria of efficacy¹. In the last few years, Italian² and British³ guidelines for the therapy of myelodysplastic syndromes have been published.

The clinical heterogeneity of myelodysplastic syndromes is best illustrated by the observation that these disorders range from conditions with a near normal standardized mortality ratio to entities close to acute myeloid leukemia (AML)¹. The World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms⁴ provides clinicians with a very useful tool for defining the different subtypes. This classification is not only useful for diagnostic purposes but also has a relevant prognostic value, and can therefore be used to facilitate clinical decision-making in the individual patient⁵.

A risk-adapted treatment strategy is mandatory for disorders that range from indolent conditions lasting years to forms approaching acute myeloid leukemia. Definition of the individual risk is generally based on the use of a prognostic scoring system⁶⁻⁸. So far the International Prognostic Scoring System (IPSS)⁸ – based on percentage of marrow blasts, cytogenetic pattern and number and degree of cytopenias – has been commonly used for predicting survival and leukemic risk. Since cytogenetics is not always technically successful, the WHO classification can be used for defining risk groups. Moreover, the use of a novel prognostic scoring system based on WHO classification, cytogenetics, and transfusion requirement (the so called WPSS)⁹ may further improve the capacity of the WHO classification to stratify patients with myelodysplastic syndrome and may be more useful than IPSS in clinical decision-making.

The approach to a patient with myelodysplastic syndrome should begin with a period of observation, with sequential peripheral blood counts – and sometimes bone marrow examinations – to assess the rate of progression, if any. Not all patients must be treated. If the IPSS risk is low and anemia is mild (Hb higher than 10 g/dL) patients do not need any treatment and can be just followed. This “watchful-waiting” strate-

gy might change in the future provided that safe treatments capable of modifying the natural history of the disease are developed.

According to evidence-based practice guidelines^{2,3}, many patients should receive supportive therapy at present¹. Once anemia is symptomatic, regular red cell transfusions and iron chelation are the mainstay of therapy for many individuals with myelodysplastic syndrome. The life expectancy of patients with isolated erythroid lineage dysplasia aged 70 years or older is not significantly shorter than that of the general population¹⁰. Avoiding disease complication is therefore very important in these individuals. Only few studies have examined in the past the impact of transfusion iron overload on survival in myelodysplastic syndromes¹¹⁻¹³. We showed that the development of transfusion dependency may worsen the survival of patients with myelodysplastic syndrome^{5,14}. Although this poor prognosis partly reflects the severity of bone marrow failure, our observations also suggest that development of secondary iron overload *per se* can worsen survival of transfusion-dependent patients¹⁴. Despite the limited evidence, both the British³ and Italian² guidelines recommend iron chelation in patients with myelodysplastic syndrome and regular need for transfusion. Iron chelation should be considered once a patient has received between 20-25 units of red cells, but only in patients for whom long-term transfusion therapy is likely, or when an allogeneic stem cell transplantation is planned.

Erythropoietin therapy is largely employed but only a minor portion of patients really benefit from this treatment. Responsive patients are mainly those with early disease, inadequate endogenous erythropoietin productions and no regular need for blood transfusion¹. The British Expert Panel³ concluded that patients with refractory anemia with ringed sideroblasts (RARS) are more likely to respond to the combination of erythropoietin plus G-CSF. The response to treatment with erythropoietin plus G-CSF can be predicted by combining information about pretreatment transfusion need (< or 2 units per month) and serum Epo (≤ 500 mU/mL) using the decision model developed by Hellstrom-Lindberg¹⁵. We recently showed that treatment of anemia in MDS with erythropoietin plus G-CSF may have a positive impact on outcome in patients with no or low transfusion need, while not affecting the risk of leukemic transformation¹⁶.

Thalidomide has been employed in MDS patients with the aim of utilizing its anticytokine and antiangiogenic effects for improving the efficiency of hematopoiesis¹⁵. Some transfusion-dependent patients can become transfusion independent with thalidomide, but treatment is significantly limited by neurological toxicity. Lacking this adverse effect, lenalidomide appears more suitable for long-term treatment, and recent findings of its clinical use are interesting in several aspects.

Studies by List and coworkers^{17,18} have shown that lenalidomide can reduce transfusion requirements and reverse cytologic and cytogenetic abnormalities in patients who have the myelodysplastic syndrome with the 5q31 deletion. The most common adverse events are neutropenia and thrombocytopenia. There is no question that the drug can suppress the myelodysplastic clone carrying the 5q31 deletion, but this suppression is associated with increased red cell production and decreased neutrophil and platelet production, at least initially¹. This observation cannot be explained only by a direct effect on clonal stem cells, which should result in parallel changes in peripheral blood cells. The observed effects may be consistent with an anticytokine activity of lenalidomide. Lenalidomide has some clinical activity also in transfusion-dependent patients with low- or int-1-risk MDS who lack the deletion 5q karyotypic abnormality¹⁹.

On December 28, 2005, FDA has approved lenalidomide for use in patients with transfusion-dependent anemia due to low or intermediate-1 risk myelodysplastic syndromes associated with a deletion 5q cytogenetic abnormality with or without additional cytogenetic abnormalities. By contrast, on January 24, 2008, the EMEA Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) adopted a negative opinion, recommending the refusal of the marketing authorization for lenalidomide, intended for the treatment of anemia due to myelodysplastic syndromes. A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, 3-arm study is currently evaluating in Europe the efficacy and safety of 2 doses of lenalidomide versus placebo in transfusion-dependent subjects with low- or intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes associated with 5q deletion (<http://www.clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00179621>).

Marrow failure in some patients with myelodysplastic syndrome (MDS) responds to immunosuppressive treatment. A recent study indicates that immunosuppressive therapy produces significant improvement in the pancytopenia of a substantial proportion of MDS patients and is associated with improved overall and progression-free survival, especially in younger individuals with lower-risk disease²⁰.

References

- Cazzola M, Malcovati L. Myelodysplastic syndromes – coping with ineffective hematopoiesis. *N Engl J Med* 2005; 352: 536-8.
- Alessandrino EP, Amadori S, Barosi G, Cazzola M, Grossi A, Liberato LN, et al. Evidence- and consensus-based practice guidelines for the therapy of primary myelodysplastic syndromes. A statement from the Italian Society of Hematology. *Haematologica* 2002; 87: 1286-306.
- Bowen D, Culligan D, Jowitt S, Kelsey S, Mufti G, Oscier D, et al. Guidelines for the diagnosis and therapy of adult myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 2003; 120: 187-200.
- Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002; 100: 2292-302.
- Malcovati L, Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, Boni M, Travaglio E, et al. Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: a basis for clinical decision making. *J Clin Oncol* 2005; 23: 7594-603.
- Sanz GF, Sanz MA, Vallespi T, Canizo MC, Torrabadella M, García S, et al. Two regression models and a scoring system for predicting survival and planning treatment in myelodysplastic syndromes: a multivariate analysis of prognostic factors in 370 patients. *Blood* 1989; 74: 395-408.
- Mufti GJ, Stevens JR, Oscier DG, Hamblin TJ, Machin D. Myelodysplastic syndromes: a scoring system with prognostic significance. *Br J Haematol* 1985; 59: 425-33.
- Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997; 89: 2079-88.
- Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, Della Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, et al. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3503-10.
- Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, Della Porta MG, Invernizzi R, Giagounidis A, et al. A WHO classification-based prognostic scoring system (WPSS) for predicting survival in myelodysplastic syndromes. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2005; 106: 788.
- Schafer AI, Cheron RG, Dluhy R, Cooper B, Gleason RE, Soeldner JS, et al. Clinical consequences of acquired transfusional iron overload in adults. *N Engl J Med* 1981; 304: 319-24.
- Schafer AI, Rabinowe S, Le Boff MS, Bridges K, Cheron RG, Dluhy R. Long-term efficacy of deferoxamine iron chelation therapy in adults with acquired transfusional iron overload. *Arch Intern Med* 1985; 145: 1217-21.
- Cazzola M, Barosi G, Gobbi PG, Invernizzi R, Riccardi A, Ascari E. Natural history of idiopathic refractory sideroblastic anemia. *Blood* 1988; 71: 305-12.
- Malcovati L, Della Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, Passamonti F, Arcaini L, et al. The effect of transfusion dependency and secondary iron overload on survival of patients with myelodysplastic syndrome. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2005; 106 (abstract 791).
- Hellstrom-Lindberg E. Update on supportive care and new therapies: immunomodulatory drugs, growth factors and epigenetic-acting agents. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2005; 2005: 161-6.
- Jädersten M, Malcovati L, Ingunn Dybedal I, Della Porta MG, Invernizzi R, Montgomery SM, et al. Erythropoietin and G-CSF Treatment Associated with Improved Survival in Myelodysplastic Syndrome. *J Clin Oncol* 2008; in press.
- List A, Kurtin S, Roe DJ, Buresh A, Mahadevan D, Fuchs D, et al. Efficacy of lenalidomide in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* 2005; 352: 549-57.
- List A, Dewald G, Bennett J, Giagounidis A, Raza A, Feldman E, et al. Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *N Engl J Med* 2006; 355: 1456-65.
- Raza A, Reeves JA, Feldman EJ, Dewald GW, Bennett JM, Deeg HJ, et al. Phase 2 study of lenalidomide in transfusion-dependent, low-risk, and intermediate-1 risk myelodysplastic syndromes with karyotypes other than deletion 5q. *Blood* 2008; 111: 86-93.
- Sloand EM, Wu CO, Greenberg P, Young N, Barrett J. Factors Affecting Response and Survival in Patients With Myelodysplasia Treated With Immunosuppressive Therapy. *J Clin Oncol* 2008; in press.

EXPERIENCIA NACIONAL Y MANEJO PRÁCTICO DE LENALIDOMIDA EN SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS DE BAJO RIESGO

J. SÁNCHEZ-GARCÍA^{1,*},
A. FEERNÁNDEZ-JURADO^{2,*}, G. SANZ³,
P. MONTESINOS³, B. NOMDEDÉU⁴, J. BUENO⁵,
F. RAMOS⁶, R. ANDREU⁷, J. SERRANO¹,
A. TORRES-GÓMEZ¹

¹ Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba.

² Hospital Juan Ramón Jiménez. Huelva.

³ Hospital Universitario La Fe. Valencia.

⁴ Hospital Clínic i Provincial. Barcelona⁵.

Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona.

⁶ Hospital General de León.

⁷ Hospital Universitario Dr. Peset. Valencia.

* Grupo Andaluz de Síndromes Mielodisplásicos (GASMD)

Introducción

El tratamiento de los síndromes mielodisplásicos (SMD) de bajo riesgo en la mayoría de los pacientes no tiene intencionalidad curativa, pero persigue mejorar la calidad de vida aliviando las citopenias y prolongar la supervivencia. Hasta hace menos de 4 años, el uso de eritropoyetina ± factor estimulante de colonias granulocitarias o terapias inmunosupresoras constituían las principales alternativas terapéuticas que conseguían respuestas hematológicas variables en calidad y duración¹. Sin embargo, desde la publicación en 2005 de los resultados obtenidos con lenalidomida en SMD de bajo riesgo², se ha abierto un nuevo escenario, más ambicioso, en el tratamiento de estos pacientes, que persigue nuevas metas, como la independencia transfusional, respuestas citogenéticas o incluso modificar la historia natural, al igual que han conseguido los fármacos desmetilantes en los SMD de intermedio-2 o alto riesgo.

Mecanismos de acción de la lenalidomida

La lenalidomida (CC-5013) es un análogo estructural de la talidomida, perteneciente a la familia de drogas inmunomoduladoras (IMiD3) desarrollado por Celgene Corporation (Warren, NJ, EE UU) para el tratamiento de mieloma múltiple y neoplasias sólidas. Los efectos sobre el sistema inmunológico incluyen una potente inhibición de la producción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) tras activación del sistema monocito-macrófago. Además, los IMiD producen una estimulación de los linfocitos T vía B7-CD28 con aumento de expresión de CD69/CD25, disminución

en la expresión de TNF-R y producción de IL-2. Provoan, además, un aumento en las poblaciones *natural killer* (NK) y linfocitos NK-T, estimulando su función antitumoral y actuando de forma sinérgica con el anticuerpo monoclonal anti-CD20 en neoplasias linfoides^{3,4}. Poseen efectos antiangiogénicos, disminuyendo la expresión de factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) en líneas de leucemia mieloide⁵.

Ninguno de estos efectos anteriormente citados, y que son comunes a talidomida e IMiD, justificaba los resultados clínicos obtenidos en los SMD de bajo riesgo, especialmente las remisiones citogenéticas observadas en los pacientes con del(5q) q13-q31. El síndrome 5q- se caracteriza por una delección del brazo largo del cromosoma 5 en la región común que contiene 41 genes. Estudios *in vitro* han demostrado que las líneas celulares con del(5q) son las más sensibles a los efectos citotóxicos directos de lenalidomida⁶, produciendo parada de ciclo en G0/G1 y apoptosis, inhibición de la vía Akt y de la fosforilación de Gab1. Lenalidomida inhibe *in vitro* la acción de fosfatasa (PP2A y Cdc25C) que regulan el ciclo celular⁷. Empleando un modelo de cultivo de eritroblastos a partir de células CD34 normales o con del(5q), se ha demostrado que lenalidomida inhibe específicamente el crecimiento de los precursores eritroides citogenéticamente aberrantes y modifica la expresión de numerosos genes contenidos en la región comúnmente delecionada, siendo muy importante la sobreexpresión del gen supresor de tumor SPARC⁸. La acción de lenalidomida en la expresión de otros genes que contribuyen a la patogénesis de la enfermedad (*EGR1*, *CTNNA1*, *NPM1* y principalmente *RPS14*⁹) no ha sido aún dilucidada.

En los pacientes afectados de SMD sin del(5q) existe un perfil génico con un set de 30 genes específicos eritroides que se hayan disminuidos en los pacientes que responden al tratamiento¹⁰. A pesar de los estudios *in vitro* que demuestran nula o escasa citotoxicidad en las poblaciones celulares CD34 genéticamente normales, el uso de lenalidomida *in vivo* en pacientes con mieloma múltiple provoca dificultades en la movilización de *stem cell* para realización de auto-TPH¹¹.

Resultados clínicos de lenalidomida en SMD

Lenalidomida recibió la aprobación de la FDA en diciembre de 2005 para el tratamiento de SMD de riesgo bajo-intermedio y con del(5q), tras la publicación de los estudios en fase I-II SMD-001 y SMD-003. El primero incluía 43 pacientes afectados de SMD dependientes de transfusión, y el segundo, 148 pacientes afectados de SMD con delección 5q31 sola o en cariotipo complejo^{1,12}. Los espectaculares resultados en cuanto a independencia transfusional (46,5-67%) y respuestas

Tabla 1. Características y resultados de los estudios publicados con lenalidomida en SMD

Referencia	Número	del(5q)/otros	Dosis	IT	Duración de IT	Resp. citog. C/P	Neutropenia	Trombopenia	TVP-EP
A. List; 2005	43	12/31	25 mg/24 h 10 mg/24 h 10 mg/24 h/21 d	46,5%	81 semanas	50%	58%	50%	0%
A. List; 2006	148	111	10 mg/24 h 10 mg/24 h/21 d	67%	>2 años	45%	55%	44%	3%
A. Raza; 2008	214	214	10 mg/24 h 10 mg/24 h/21 d	26%	41 semanas	19%	30%	25%	1%/0%

del(5q): delección del brazo largo q31 del cromosoma 5; IT: independencia transfusional; resp. citog. C/P: porcentaje de respuestas citogenéticas completas/parciales; TVP-EP: trombosis venosa profunda-embolismo pulmonar.

citogenéticas se traducen en beneficio coste-efectividad y calidad de vida en los pacientes con síndrome 5q⁻¹³. Recientemente¹⁴ se han publicado los resultados del estudio fase II SMD-002 que incluía 214 pacientes con cariotipos distintos a del5q31 con independencia transfusional en 26% de menor duración (41 semanas). Los resultados de los tres estudios se detallan en la Tabla 1. Actualmente se está desarrollando el protocolo en fase III SMD-004 que aleatoriza a los pacientes 5q⁻ a recibir 10 mg, 5 mg o placebo; y el estudio ECOG 2905, que compara lenalidomida con o sin darbepoetina en los SMD.

Registro nacional de lenalidomida en SMD

Tras su aprobación por la FDA, se pudo solicitar lenalidomida para uso en SMD como medicación extranjera y/o uso compasivo. Así, los primeros pacientes, principalmente con síndrome 5q⁻, recibieron lenalidomida en España en el primer semestre del año 2006. Teniendo en cuenta que el número de pacientes tratados en cada centro no era muy grande, la falta de consenso en el manejo del fármaco y la falta de estudios confirmatorios, se decidió intentar unar la experiencia de todos los hospitales que habían administrado el fármaco, creando el Registro Nacional de Lenalidomida (RNL). Para ello, se diseñó un Cuaderno de Recogida de Datos que se distribuyó en abril de 2007. A fecha de mayo de 2008, con la colaboración de 27 facultativos, se han incluido un total de 45 pacientes de 24 centros distribuidos a lo largo de toda la geografía nacional, que se detallan en la Tabla 2.

Características clínicas de los pacientes incluidos en el Registro Nacional de Lenalidomida

La mediana de edad de los pacientes incluidos fue de 67,5 años (rango: 37-91), incluyendo 35 mujeres (77,8%) y 10 hombres (22,2%). La distribución de

SMD según la clasificación de la OMS mostró una mayoría de síndrome 5q⁻ (n = 33, 73,3%), aunque se incluían otros subtipos como AREB-1, AREB-2 y LAM-SMD. El tiempo transcurrido entre el diagnóstico de SMD y el inicio de lenalidomida fue de 29 meses (ran-

Tabla 2. Participantes del Registro Nacional de Lenalidomida

Hospital	Población	Facultativo	N
Reina Sofía	Córdoba	Dr. Sánchez/Dr. Álvarez	4
Clínica Provincial	Barcelona	Dr. Nomdedéu	4
La Fe	Valencia	Dr. Montesinos	4
Vall d'Hebron	Barcelona	Dr. Bueno	4
General	León	Dr. Ramos	3
Dr. Peset	Valencia	Dr. Andreu	3
General	Móstoles	Dra. Monteagudo	2
San Carlos	Madrid	Dr. García Sánchez	2
Clínica	Salamanca	Dr. González Porras	2
Ramón y Cajal	Madrid	Dr. García Laraña/ Dra. Núñez	2
Sta. María Rosell	Cartagena	Dra. López/Dra. Funes	2
Puerta del Mar	Cádiz	Dr. Muñoz Muñoz	1
La Inmaculada	Huércal-Overa	Dr. Tudela	1
Germans Trias	Barcelona	Dr. Ribera	1
La Princesa	Madrid	Dr. Loscertales	1
General	Guadalajara	Dr. López San Román	1
Verge del Toro	Menorca	Dra. Galán	1
Joan XXIII	Tarragona	Dra. Escoda	1
Virgen del Puerto	Plasencia	Dr. Martín Núñez	1
C. Hospitalario	Albacete	Dra. Ibáñez García	1
C. Hospitalario	Ourense	Dr. Rodríguez	1
Laredo	Cantabria	Dr. Cortes	1
Clínica	Málaga	Dra. Ramírez	1
Virgen de la Luz	Cuenca	Dr. Cerveró	1

Tabla 3. Características clínicas de los 45 pacientes incluidos en el RNL

	Categoría	Número	%
	Mediana edad años (rango)	67,5 (37-91)	
Sexo	Mujer	35	77,8
	Hombre	10	22,2
Clasificación OMS	Síndrome 5q-	33	73,3
	AR	2	4,4
	ARSA	1	2,2
	CRDM	3	6,7
	AREB-1	2	4,4
	AREB-2	3	6,7
	LAM-SMD	1	2,2
Citogenética	del(5q) 31	35	77,8
	del(5q) compleja	6	13,3
	Normal	3	6,7
	Complejo	1	2,2
Índice pronóstico	Bajo-0	31	68,9
	Intermedio-1	0	20
	Intermedio-2	4	8,9
	Alto	1	2,2
Tratamientos previos	EPO ± G-CSF	24	53,3
	Ninguno	15	33,3
	AZA	1	2,2
	Múltiples	5	11,1

AR: anemia refractaria; ARSA: anemia refractaria con sideroblastos en anillo; CRDM: citopenia refractaria con displasia multilineaje; AREB: anemia refractaria con exceso de blastos; EPO: eritropoyetina; AZA: 5-azacitidina.

go: 5-156 meses). El estudio citogenético se realizó en todos los pacientes e incluía 35 casos con del(5q31) (77,8%), 6 casos con del(5q) compleja (13,3%), 3 casos con cariotipo normal (6,7%) y un caso con cariotipo complejo (2,2%). Con respecto al grupo de riesgo según el IPSS, 40 pacientes (88,9%) correspondían a riesgo bajo (0/Int-1).

La mayoría de los pacientes (76,6%) ya habían recibido tratamientos previos, principalmente EPO ± G-CSF. Las características clínicas de los pacientes incluidos en el RNL se detallan en la Tabla 3.

Eficacia de lenalidomida en el RNL

Al inicio del tratamiento, la mediana de hemoglobina fue de 7,9 g/dL (rango: 4,6-11,7 g/dL), la mediana de neutrófilos fue de $1.960 \times 10^9/L$ (rango: 400-9.440) y la cifra de plaquetas de $251 \times 10^{12}/L$ (rango: 19-754). Los pacientes habían recibido transfusiones periódicas, y la mediana de concentrado de hematíes transfundidos en las ocho semanas previas al inicio del tratamiento fue de 5,5 unidades (rango: 0-21). La dosis inicial empleada en 41 pacientes fue de 10 mg/24 h/21 día y semana de descanso. Los otros cuatro pacientes

recibieron 5 mg/24 h/21 días por edad avanzada o insuficiencia renal. Recibieron profilaxis de enfermedad tromboembólica 17 pacientes (37,8%) (en la mayoría de los casos, ácido acetilsalicílico).

Con los datos disponibles en mayo de 2008, el 60% de los pacientes continúan con tratamiento y 16 pacientes lo han suspendido por toxicidad (n = 6), muerte (n = 3), progresión (n = 1) o pérdida de respuesta (n = 1), y cinco por hallarse en respuesta completa. Un 64% de los pacientes alcanzaron independencia transfusional, con una mediana de duración de 25 semanas (rango: 8-91). Cuando consideramos los pacientes afectados de síndrome 5q- que han completado al menos cuatro ciclos de tratamiento (n = 19), la cifra de respuestas hematológicas con independencia transfusional es de 89,5% y una mediana de duración de la respuesta de 32 semanas (rango: 13-91) (Figura 1). Para la serie global, la respuesta citogenética se valoró en 19 pacientes con 11 respuestas completas, 4 respuestas parciales, 3 sin respuesta y un paciente con progresión.

Efectos adversos de lenalidomida en el RNL

Los efectos adversos más importantes fueron hematológicos, con una incidencia de neutropenia de grado 3-4 del 55%, y de trombopenia del 35,6%, que obligaron al uso de G-CSF en un 49% de los pacientes y a las transfusiones de plaquetas en un 13,3%. De forma concordante, un 55,6% de los pacientes precisaron modificación de dosis con reducción a 5 mg/24-48 h. Las toxicidades extrahematológicas más frecuentes en nuestra serie fueron rash cutáneo (11,1%) y fenómenos tromboembólicos (6,6%).

Los resultados obtenidos de los 45 pacientes incluidos en el RNL, la mayoría afectados de síndrome 5q-, reproducen fielmente los publicados por A. List en 2006¹² en cuanto a eficacia y toxicidad hematológica. Por tanto, es un fármaco con notable actividad, con un perfil de toxicidad hematológica manejable y de indicación incuestionable en los pacientes afectados de síndrome 5q¹⁵. Sin embargo, la incidencia de fenómenos tromboembólicos en nuestra serie es superior a la reportada en los ensayos multicéntricos en fase II publicados hasta la fecha^{2,12,14}.

Cuestiones abiertas en el manejo práctico de lenalidomida en SMD

Pacientes candidatos

El uso de lenalidomida está aprobado por la FDA para pacientes con anemia transfusión-dependiente con SMD de riesgo bajo-0 o intermedio-1 con del(5q) aislada o compleja. Sin embargo, no todos los pacientes con este cariotipo corresponden a riesgos 0 o int-1,

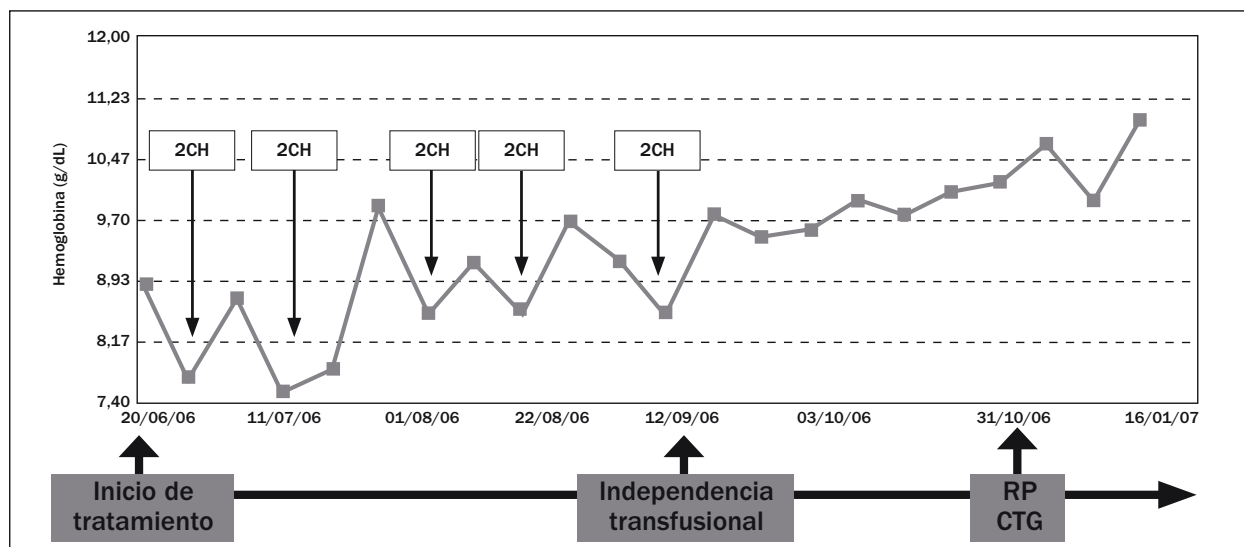


Figura 1. Evolución de las cifras de hemoglobina y necesidades transfusionales tras tratamiento con lenalidomida en paciente afectada de síndrome 5q.

principalmente por un número de blastos en médula superior al 5%. El Grupo Francés de Mielodisplasia (GFM) ha notificado los resultados de lenalidomida en SMD con del(5q), pero con IPSS int-2 o alto-16, con 49 pacientes incluidos y una tasa de respuestas en los pacientes evaluables claramente inferior (21%, incluyendo completas, parciales y mejorías-eritroides), con un alto porcentaje de hospitalización por complicaciones derivadas de la mielosupresión.

El empleo de lenalidomida en los SMD de bajo riesgo sin del(5q) puede aportar beneficios en aproximadamente un tercio de los pacientes¹⁴. Los resultados que aporte el estudio en fase III MDS-005, junto con los perfiles genéticos, darán las claves para saber qué pacientes sin del(5q) son claros candidatos.

Dosis inicial

Actualmente, salvo ajuste por aclaramiento de creatinina en pacientes con insuficiencia renal o de edad avanzada, el esquema terapéutico inicial es de 10 mg/24 h/21 días y semana de descanso. La mielosupresión será el resultado de la acción selectiva o preferencial del fármaco sobre el clon 5q-, del tal forma que la intensidad de las citopenias se correlaciona con la respuesta a lenalidomida¹⁷.

Manejo de toxicidades hematológicas. Neutropenia. Trombopenia

La intensidad de la mielosupresión es mayor durante los primeros ciclos de tratamiento. Existen recomen-

daciones (pero no consenso) de expertos para su manejo¹⁸. La supresión temporal del fármaco y el uso de G-CSF están indicados. Para los pacientes que inician el tratamiento con cifras de neutrófilos $< 1.000 \times 10^9/L$ se puede administrar Lenalidomida con G-CSF. De la misma forma, la supresión temporal y la transfusión de plaquetas se contemplan en el manejo de la trombopenia.

Profilaxis de enfermedad tromboembólica

La incidencia reportada de enfermedad tromboembólica (ETE) en los pacientes afectados de SMD tratados con lenalidomida es muy baja. Sin embargo, en el RNL la incidencia actual es de 6,6% debido a TVP (n = 1), TEP (n = 1) y trombosis arterial (n = 1). La incidencia podría ser diferente por motivos geográficos o aleatorios, algo que clarificarán los estudios MDS-004 y MDS-005. El empleo de profilaxis de ETE debe adecuarse a los antecedentes del paciente antes de iniciar el tratamiento, y posteriormente a la intensidad de la trombopenia.

Duración del tratamiento y actuación según respuesta

El tratamiento debe mantenerse, salvo toxicidad, hasta completar cuatro ciclos, ya que es en ese momento cuando se producen la mayoría de las respuestas en los pacientes, independientemente de la citogenética. Si se alcanza respuesta completa o parcial, aunque hay descritos casos de respuesta duradera sin tratamiento¹⁹, se recomienda mantenerlo a la dosis máxi-

ma tolerada. Si se produce la pérdida de respuesta, los pacientes deben ser considerados candidatos a otras modalidades de tratamiento.

Conclusiones

Lenalidomida es un fármaco de probada eficacia en SMD de bajo riesgo o intermedio-1 con del(5q), con un perfil de toxicidad manejable. La creación del Registro Nacional de Lenalidomida ha permitido confirmar estos hallazgos y abrir una referencia para aunar experiencias personales cuando el número de pacientes tratados por centro no permite conclusiones relevantes.

Agradecimientos

A todos los facultativos y centros enumerados en la Tabla 2, por su esfuerzo de participación en el RNL.

Bibliografía

- Hellström-Lindberg E, Malcovati L. Supportive care, growth factors and new therapies in myelodysplastic syndromes. *Blood Reviews* 2008; 22: 75-91.
- List A, Kurtin S, Roe DJ, et al. Efficacy of lenalidomide in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* 2005; 352: 549-57.
- Zhu D, Corral LG, Fleming YW, Stein B. Immunomodulatory drugs Revlimid (Lenalidomida) and CC-4047 induce apoptosis of both hematological and solid tumor cells through NK cell activation. *Cancer Immunol Immunother* 2008; Epub ahead of print.
- Reddy N, Hernández-Ilizaliturri FJ, Beeb G, et al. Immunomodulatory drugs stimulate natural killer cell function, alter cytokine production by dendritic cells, and inhibits angiogenesis enhancing the anti-tumour activity of rituximab in vivo. *Br J Haematol* 2008; 140: 36-45
- List A, Tate W, Glinsmann-Gibson B. The immunomodulatory thalidomide analog, CC5013, inhibits thropic response in VEGF in AML cells by abolishing cytokine-induced PI3/Akt activation. *Blood* 2002; 100: 139.
- Gandhi AK, Kang J, Naziruddin S, et al. Lenalidomide inhibits proliferation of Namalwa CSN.70 cells and interferes with Gab1phosphorylation and adaptor protein complex assembly. *Leuk Res* 2006; 30: 849-58.
- Wei S, Rocha K, Williams A, et al. Gene dosage of the cell cycle regulatory phosphatases Cdc25C and PP2A determines sensitivity to lenalidomide in del(5q) MDS. *Blood* 2007; 110: 11 (abstract #118).
- Pellagatti A, Jädersten M, Forsblom AM, et al. Lenalidomide inhibits the malignant clone and up-regulates the SPARC gene mapping to the commonly deleted region in 5q- syndrome patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 11406-11.
- Ebert BL, Prestz J, Bosco J, et al. Identification of RPSA14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature* 2008; 415: 335-9.
- Ebert BL, Galili N, Tamayo P, et al. An erythroid differentiation signature predicts response to lenalidomide in myelodysplastic syndrome. *Plos Med* 2008; 5: e35.
- Paripati H, Stewart AK, Cabou S, et al. Compromised stem cell mobilization following induction therapy with lenalidomide in myeloma. *Leukemia* 2008; epub ahead of print.
- List A, Dewald G, Bennett J, et al. Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *N Engl J Med* 2006; 355: 1456-65.
- Goss TE, Szende A, Schaefer C, et al. Cost effectiveness of lenalidomide in the treatment of transfusion-dependent myelodysplastic syndromes in the United States. *Cancer Control* 2006; 13S: 17-25.
- Raza A, Reeves JA, Feldman EJ, Dewald GW, Bennett JM, Deeg HJ, et al. Phase 2 study of lenalidomide in transfusion-dependent, low-risk, and intermediate-1 risk myelodysplastic syndromes with karyotypes other than deletion 5q. *Blood* 2008; 111: 86-93.
- Keladi C, Eclache V, Fenaux P. The role of lenalidomide in the management of myelodysplasia with del 5q. *Br J Haematol* 2008; 140: 267-78.
- Bucheri S, Prebet O, Beyne-Rauzy O, et al. Lenalidomide (LEN) in INT 2 and High risk MDS with del 5q. Interim results of a phase II trial by the GFM: *Blood* 2007; 110: S11 (abstract#820).
- Sekeres MA, Maciejewski JP, Giagounidis A, et al. Lenalidomide-induced cytopenias: relationship to hematologic improvement in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood* 2007; 110: S11 (abstract#821).
- Giagounidis A, Fenaux P, Muftić GJ, et al. Practical recommendations on the use of lenalidomide in the management of myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol* 2008; 87 (5): 345-52.
- Giagounidis AN, Haase S, Heinsch M, et al. Lenalidomide in the context of complex karyotype or interrupted treatment: case reviews of del(5q) MDS patients with unexpected responses. *Ann Hematol* 2007; 86: 133-7.

Otras gammopatías monoclonales

COORDINADOR: J. GARCÍA LARAÑA. *Madrid*

Resumen del simposio

Dentro de las discrasias de células plasmáticas, el mieloma es indiscutiblemente la patología protagonista, la más estudiada desde el punto de vista biológico y clínico, y en la que se están produciendo más avances terapéuticos en los últimos años. La incorporación de nuevos medicamentos, junto a los ya disponibles, el empleo de las distintas modalidades de trasplante y una mejoría importante de las medidas de soporte están convirtiendo esta enfermedad en un proceso crónico con mejor supervivencia y mejor calidad de vida. Sin embargo, existen otras enfermedades que tienen en común su característica de proceso sistémico, en cuya patogenia tiene un papel clave la discrasia de células plasmáticas. Este simposio se ocupa de tres de estas patologías.

La amiloidosis primaria (AL) es una enfermedad sistémica que cada vez vemos más en la consulta de hematología, tras haber estado durante mucho tiempo siendo seguida en diversos servicios médicos, generalmente en relación con el órgano preferentemente afectado. El hecho de que las fibrillas de amiloide que se depositan en los órganos y causan su disfunción estén constituidas por la porción variable de cadenas ligeras de inmunoglobulinas producidas de forma monoclonal por células plasmáticas clonales ha hecho que la dirección del tratamiento se haya enfocado a frenar el crecimiento de esa clona plasmática con tratamientos muy similares al mieloma, desde la clásica combinación de melfalán y corticoides hasta el trasplante de progenitores hematopoyéticos.

El Dr. J. Bladé revisa la fisiopatología de la amiloidosis AL, su expresión clínica con afectación pluriorgánica, el diagnóstico diferencial con otras patologías, incluyendo otras formas de amiloidosis, así como las opciones disponibles de tratamiento, con especial énfasis en hacer una terapia adaptada al riesgo, especialmente a la hora de utilizar quimioterapia en altas dosis y trasplante.

La macroglobulinemia de Waldenström (MW) es una entidad que comparte en su fisiopatología y clínica características de discrasia de células plasmáticas y de linfoma de bajo grado, lo que también le da carácter de enfermedad sistémica por la sintomatología tan pleomórfica que presenta, tanto en relación con la hiperproducción de IgM, como hiperviscosidad, interacción con otras proteínas produciendo alteraciones de la hemostasia, polineuropatía etc., como por los síntomas dependientes del crecimiento adenopático e infiltración tumoral.

Desde hace años, existe un grupo internacional de trabajo que actualiza periódicamente los criterios de diagnóstico, tratamiento y respuesta de esta entidad, criterios que lógicamente han ido cambiando conforme se ha ido profundizando en el conocimiento de su biología y han ido surgiendo nuevos avances terapéuticos.

El Dr. R. García Sanz, con amplia experiencia tanto en los aspectos biológicos como clínicos de la MW, revisa en profundidad el diagnóstico y el tratamiento de esta enfermedad, que por su naturaleza, unas veces indolente y otras más agresiva, oscila entre la observación sin tratamiento, y el trasplante y el empleo de las nuevas drogas.

Finalmente, la Dra. A. Dispenzieri nos presenta una actualización del síndrome de POEMS, basada en su trayectoria personal como integrante destacada del equipo de la Clínica Mayo, institución esta cuya experiencia acumulada en todo tipo de discrasias plasmáticas, incluyendo algunas menos frecuentes como el síndrome de POEMS, es extraordinaria y ha sido frecuentemente comunicada y publicada.

La enfermedad de POEMS coincide con las otras dos patologías en su carácter sistémico, con afectación pluriorgánica, que no se reduce sólo a los órganos expresados en el acrónimo POEMS (polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, componente M y alteraciones de la piel), sino que puede producir también lesiones osteoscleróticas, retención de fluidos, policitemia, afectación de la función pulmonar, etc.

La Dra. A. Dispenzieri nos ofrece una exposición detallada sobre la biología de la enfermedad, su clínica y su tratamiento, que también sigue la estela del tratamiento del mieloma, con aportaciones recientes interesantes sobre el empleo de dosis altas de quimioterapia y trasplante.

AMILOIDOSIS PRIMARIA: ASPECTOS DIAGNÓSTICOS Y TRATAMIENTO ACTUAL

J. BLADÉ, M.T. CIBEIRA, J. ESTEVE, M. ROVIRA
*Institut de Malalties Hemato-Oncològiques. Servei
d'Hematologia. Institut d'Investigacions Biomèdiques
August Pi i Sunyer (IDIBAPS). Hospital Clínic. Barcelona.*

Introducción

La amiloidosis es un trastorno caracterizado por el depósito de una sustancia aparentemente amorfa en diversos tejidos y órganos. Bajo la luz polarizada, la sustancia amiloide se tiñe con el rojo Congo y produce una birrefringencia de color verde manzana. Al microscopio electrónico se demuestra que la sustancia amiloide está compuesta por una red de fibrillas unidas entre sí. Todos los tipos de amiloide se caracterizan por compartir una estructura fibrilar similar dispuesta en anti-paralelo o en estructura beta plegada. Este plegamiento es el responsable de las características tintoriales y de las propiedades ópticas de la sustancia amiloide. En esta revisión se abordan la patogenia, presentación clínica, diagnóstico diferencial, pronóstico y tratamiento de la amiloidosis primaria.

Patogenia

La sustancia amiloide es rica en glicosaminoglicano, que se une de forma no covalente a las fibrillas amiloides. Otro componente constante de los depósitos amiloides es el denominado componente P (SAP), una glicoproteína resistente a las proteasas que también se encuentra en el suero. El SAP se une a las fibrillas amiloides y puede contribuir a la relativa estabilidad de los depósitos amiloides *in vivo*. La posibilidad de emplear técnicas gamma-gráficas utilizando SAP marcado con radioisótopos ha proporcionado información útil sobre la historia natural y la respuesta al tratamiento en la amiloidosis sistémica. Ello ha permitido demostrar que la amiloidosis es un proceso más dinámico de lo que hasta la fecha se había venido considerando¹⁻⁴. En todas las formas de amiloidosis, la formación y depósito de las fibrillas amiloides precisan de la producción de la respectiva proteína precursora. Las razones por las cuales el material amiloide se deposita en unos individuos y no en otros que tienen el mismo precursor potencial no se conocen^{1,3}.

Concepto e incidencia

En la amiloidosis primaria (AL) las fibrillas amiloides están constituidas por la porción variable de una ca-

dena ligera de las inmunoglobulinas. El tipo de cadena ligera es con mayor frecuencia lambda que kappa (relación 3:1).

El pico de máxima incidencia se sitúa entre los 60 y 70 años, con una edad mediana de 65 años. Dos tercios de los pacientes son hombres. La incidencia anual es de 0,9 casos nuevos por 100.000 habitantes y año^{5,6}.

Manifestaciones clínicas

La astenia y la pérdida de peso constituyen los síntomas más frecuentes de la AL. Los pacientes que tienen insuficiencia cardiaca suelen presentar disnea o edemas. También se pueden constatar parestesias y disestesias, síncope, hipotensión ortostática o cambios en el tono de la voz. La sequedad de boca, debida a la infiltración amiloide de las glándulas salivales, es frecuente y puede constituir una de las manifestaciones iniciales. La impotencia es relativamente frecuente y se debe a afección del sistema nervioso autónomo. Se han referido casos de claudicación intermitente mandibular, por infiltración amiloide vascular^{6,7}.

Los principales hallazgos a la exploración física son: hepatomegalia, macroglosia, púrpura y edemas. El 20% de los pacientes presentan hepatomegalia y alrededor del 5% esplenomegalia. Un 10% de los pacientes presentan macroglosia y, en este caso, la consistencia de la lengua suele estar aumentada. Se puede observar aumento de las estructuras submandibulares, que se puede confundir con adenopatías. La púrpura en cara y cuello, particularmente en párpados superiores, se da en alrededor del 15% de los casos.

Los síndromes que se asocian a la AL son: síndrome nefrótico y del túnel carpiano, insuficiencia cardiaca congestiva, neuropatía periférica e hipotensión ortostática. La existencia de cualquiera de estos síndromes en presencia de un componente monoclonal (M) sérico o urinario es indicativa de AL. En esta enfermedad, la sustancia amiloide puede depositarse en prácticamente cualquier órgano, excepto en el sistema nervioso central^{6,7}.

Un tercio de los pacientes presentan síndrome nefrótico en el momento del diagnóstico. La AL rara vez se presenta en forma de insuficiencia renal progresiva. Cuando existe insuficiencia renal puede aparecer hipertensión.

La insuficiencia cardiaca se presenta en el 15-20% de los casos en el momento del diagnóstico. Acostumbra a ser de inicio brusco y de evolución muy rápida. El electrocardiograma muestra con frecuencia voltajes bajos, arritmias y, a veces, un patrón que remeda un infarto anteroseptal en ausencia de en-

fermedad coronaria. El ecocardiograma es una exploración muy valiosa en la evaluación de la cardiomiopatía amiloidótica, y la biopsia endomiocárdica es positiva en la práctica totalidad de los casos⁸. En la evaluación de todos los pacientes con AL se debería efectuar un ecocardiograma, que es patológico en dos tercios de los casos y suele mostrar un patrón restrictivo con una hipertrofia concéntrica del ventrículo izquierdo y un aumento del grosor del tabique interventricular. La fracción de eyección en el momento del diagnóstico es normal en el 80% de los casos. Los pacientes que presentan un tabique interventricular de grosor superior a 15 mm tienen una mediana de supervivencia inferior a 6 meses, frente a una mediana de dos años y medio para los que tienen un tabique interventricular igual o inferior a 12 mm⁸. La claudicación intermitente es otra de las posibles manifestaciones de la AL. Una sexta parte de los pacientes presentan hipotensión ortostática, que puede llegar a ser lo suficientemente intensa como para impedir la deambulación.

Alrededor del 15% de los casos presentan una neuropatía periférica en el momento del diagnóstico. La neuropatía es más sensitiva que motora y, generalmente, de predominio distal, simétrica y progresiva. Afecta con mayor frecuencia a las extremidades inferiores. El examen histopatológico muestra una degeneración axonal. La neuropatía disautonómica se manifiesta en forma de inestabilidad o síncope (hipotensión ortostática), trastornos gastrointestinales (diarrea) y, en ocasiones, impotencia. El síndrome del túnel carpiano se presenta en una cuarta parte de los casos^{6,7}.

Aunque los depósitos de material amiloide en el tracto gastrointestinal son prácticamente constantes, las manifestaciones clínicas son infrecuentes. Sin embargo, en algún caso la infiltración gastrointestinal puede ser una manifestación prominente y dar lugar a hemorragia digestiva recidivante. En el 5% de los casos existe síndrome de malabsorción. Una forma de presentación rara es la estenosis colónica debida a una colitis isquémica por afección vascular⁹. Aunque la afección histopatológica hepática es también frecuente, sólo existe hepatomegalia palpable en alrededor del 20% de los casos. Una pequeña proporción de pacientes (2%) presentan ictericia colostática, dato que comporta un pronóstico ominoso. De hecho, cuando la bilirrubina es superior a 5 mg/dL, la mediana de supervivencia es inferior a un mes¹⁰. En ocasiones, la forma de presentación de la AL consiste en una hepatomegalia masiva, que simula una hepatopatía crónica evolucionada o sugiere la existencia de metástasis hepáticas¹⁰. En estos casos, la clave diagnóstica radica en el hallazgo de un componente M sérico o urinario. Se han referido casos en los que la manifestación inicial ha sido una ruptura espontá-

nea del bazo con *shock* hipovolémico. En una cuarta parte de los casos existe hipoesplenismo, que se traduce en la presencia de cuerpos de Howell-Jolly en las extensiones de sangre periférica^{6,7}.

La afección cutánea puede manifestarse en forma de petequias, equimosis, pápulas, nódulos, lesiones bullosas con frecuente sangrado superficial o engrosamiento de la piel simulando una esclerodermia. Los depósitos amiloides en vítreo (opacidad vítrea) pueden dar lugar a trastornos visuales. La opacidad vítrea, sin embargo, es más característica de la amiloidosis familiar que de la AL. El material amiloide también puede depositarse en las estructuras periarticulares. De forma excepcional, grandes tumores amiloides (amiloidomas) pueden dar lugar a lesiones osteolíticas e incluso fracturas patológicas, masas mediastínicas o retroperitoneales, o grandes masas cutáneas. En este último caso se debe considerar la posibilidad de efectuar una resección quirúrgica.

Datos de laboratorio

Cuando se efectúa la inmunofijación sérica y urinaria, se encuentra un componente M en el 90% de los casos. La electroforesis sérica muestra una banda homogénea de moderada cuantía en la mitad de los casos e hipogammaglobulinemia en una cuarta parte. En el estudio cualitativo por inmunofijación, el tipo de componente M sérico es: IgG (32%), IgA (10%), cadenas ligeras (24%), IgM (5%), IgD (1%). En una cuarta parte de los casos no existe componente monoclonal sérico. En el 90% de los pacientes se encuentra proteinuria. El uroproteinograma muestra un patrón glomerular con eliminación predominante de albúmina, y en las tres cuartas partes de los casos la inmunofijación pone de manifiesto la existencia de cadenas ligeras. Alrededor del 20% de los pacientes presentan una cifra de creatinina superior a 2 mg/dL. La mediana de células plasmáticas en medula ósea se sitúa alrededor del 5%. Tanto por lo que se refiere a la cuantía del componente M como a la proporción de células plasmáticas en médula ósea, la clona plasmocelular en la AL es similar a la que se observa en la gammapatía monoclonal de significado incierto. No obstante, casi una quinta parte de los enfermos presentan una proporción de células plasmáticas en medula ósea igual o superior al 20%. Más de la mitad de estos casos con mayor proporción de células plasmáticas en medula ósea tienen datos característicos de mieloma múltiple, en cuyo caso el diagnóstico definitivo será de mieloma múltiple con amiloidosis asociada. En el 5-10% de los casos existe trombocitosis. En una cuarta parte existe elevación de la fosfatasa alcalina. En un 15% de los pacientes existe un déficit de factor X^{6,7}.

Tabla 1. Pruebas a realizar en los pacientes con amiloidosis

1. Historia clínica y exploración física completas, con especial atención a síndromes asociados
2. Parámetros analíticos:
Analítica básica, con hemograma, creatinina, calcemia, albúmina, bilirrubina, fosfatasa alcalina, LDH, β_2 -microglobulina, vitamina B ₁₂ y factor X
Estudio de proteínas: proteínas totales, proteinograma sérico, proteinuria de 24 horas, uroproteinograma e inmunofijación sérica y urinaria. Determinación de cadenas ligeras en suero (<i>free-light chain</i>)
Determinación de troponinas (cTnT y cTnI) y factor natriurético cerebral NT-proBNP-
3. Demostración del depósito de sustancia amiloide (tinción de rojo Congo) y caracterización inmunohistoquímica:
Biopsia de grasa subcutánea (positiva en el 80%)
Si ésta es negativa, biopsia rectal (positiva en el 70%) o de médula ósea. Si son negativas, biopsia del órgano afecto
Tipificación inmunohistoquímica del depósito tisular (cadenas ligeras de Ig, transtirretina, proteína A, β_2 -microglobulina)
4. Radiografía de tórax (AP y lateral)
5. ECG, ecocardiograma y Holter
6. Electromiograma
7. Mielograma
8. Seriado esquelética (si dolores óseos)
9. Estudio molecular de la transtirretina (sospecha de amiloidosis familiar)

Diagnóstico

El diagnóstico de amiloidosis se basa en la demostración del depósito de sustancia amiloide en los tejidos. La posibilidad de una AL debe considerarse en todo paciente que presente un componente M sérico o urinario y alguno de los síndromes propios de la amiloidosis. En la Tabla 1 se resumen las exploraciones que se deben efectuar en un paciente con AL. En cualquier paciente adulto con síndrome nefrótico se debe practicar una inmunofijación sérica y urinaria. En el 98% de los pacientes con AL existe componente M sérico o urinario, o bien se puede demostrar una población monoclonal de células plasmáticas en médula ósea. El procedimiento diagnóstico inicial consistirá en una punción de la grasa subcutánea, que es positiva en el 80% de los casos. La biopsia de médula ósea es positiva en más del 50% de los pacientes. Si estas dos localizaciones son negativas, el siguiente paso consistirá en la práctica de una biopsia rectal, que resulta positiva en el 70% de los casos. Si tras estas exploraciones no se llega al diagnóstico, se procederá a la práctica de una biopsia del órgano presu-

miblemente afecto, la cual es positiva en la práctica totalidad de los pacientes^{6,7}. En este sentido, se debe tener en cuenta que la realización de una biopsia hepática puede dar lugar a una hemorragia e incluso a ruptura hepática, mientras que una biopsia endomiocárdica conlleva escaso riesgo y es casi siempre positiva. Si existe neuropatía periférica, la biopsia sural es también casi siempre positiva.

Para tipificar la amiloidosis, se efectuará un estudio inmunohistoquímico de la muestra obtenida utilizando anticuerpos frente a la proteína A, cadenas ligeras kappa y lambda, transtirretina (prealbúmina) y β_2 -microglobulina. En la Figura 1 se expone el algoritmo diagnóstico en la AL.

Diagnóstico diferencial

El diagnóstico diferencial entre AL y amiloidosis asociada a mieloma no acostumbra a ofrecer dificultades. Sin embargo, se debe tener presente que los límites entre los dos procesos son arbitrarios, ya que ambos son proliferaciones de células plasmáticas con distinta expresividad clínica. Así, si un paciente presenta un cuadro clínico propio de AL y no tiene lesiones osteolíticas, se considerará que tiene una AL, aunque la proporción de células plasmáticas en médula ósea y la proteinuria de cadenas ligeras sean relativamente elevadas. Por el contrario, si las manifestaciones clínicas son las propias del mieloma múltiple (anemia, dolores óseos, lesiones osteolíticas, plasmocitomas), se considerará, a efectos terapéuticos, que el paciente tiene un mieloma múltiple con AL asociada. Siempre que se sospeche una amiloidosis primaria con tinción rojo Congo positiva y no se encuentre componente M en suero u orina, se debe desconfiar de este diagnóstico y descartar otras formas de amiloidosis, particularmente la amiloidosis familiar y la amiloidosis cardiaca senil.

La amiloidosis familiar se hereda de forma autosómica dominante, y generalmente se debe a mutaciones de la transtirretina. La transtirretina no mutada tiene una estructura beta plegada, hecho que hace que cualquier cambio en su estructura incremente su capacidad amiloidogénica. Si bien la causa más frecuente de amiloidosis hereditaria es la mutación de la transtirretina, existen mutaciones de la apolipoproteína A1, la gelsolina, el fibrinógeno alfa y la lisozima que pueden dar lugar a distintas formas de amiloidosis familiar. Existen tres formas clínicas fundamentales de amiloidosis familiar: neuropática, nefropática y cardiopática. La forma más frecuente es la predominantemente neuropática, debida a la sustitución de metionina por valina en la posición 30 de la transtirretina (MET 30). La posibilidad de una amiloidosis familiar se debe investigar en todo paciente que pre-

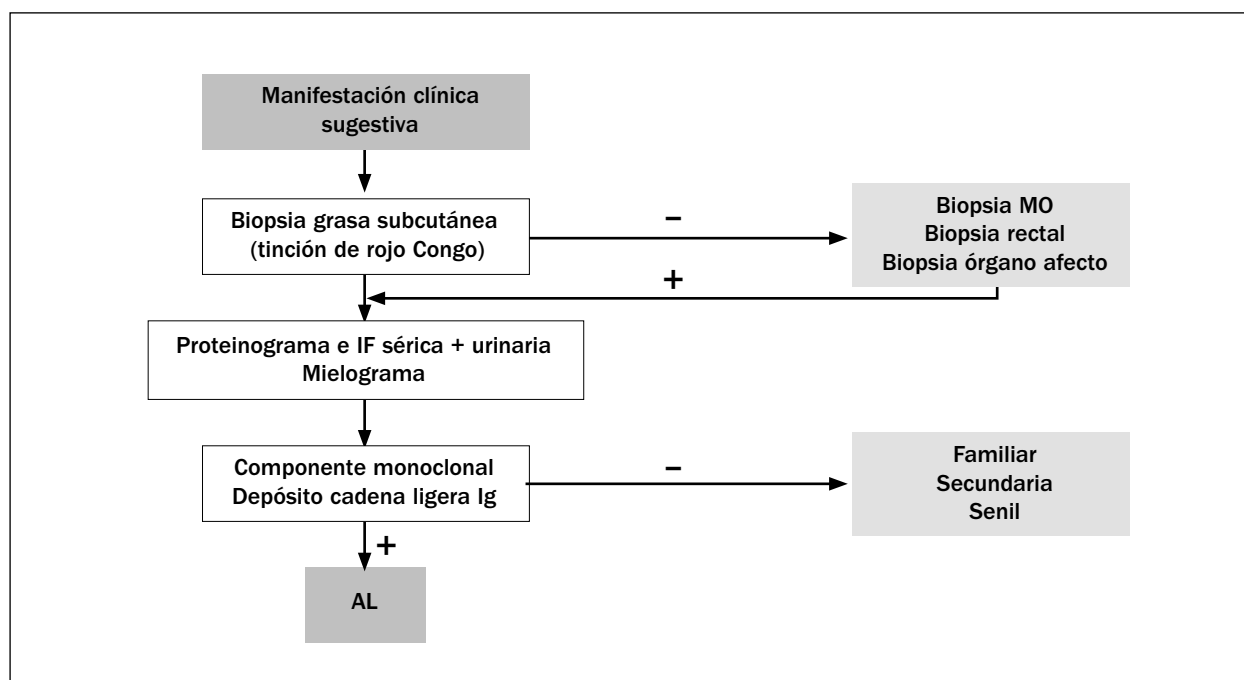


Figura 1. Algoritmo diagnóstico de la amiloidosis.

sente un cuadro clínico sugestivo de AL con demostración de sustancia amiloide en el cual no existan datos de proliferación clonal de células plasmáticas (componente M sérico o urinario, células plasmáticas monoclonales en médula ósea). En estos casos, deberá efectuarse un estudio inmunohistoquímico de la sustancia amiloide con anticuerpos frente a la transtirretina junto al estudio molecular para identificar la mutación responsable. Dado que más del 90% de la transtirretina se produce en el hígado, con la práctica de un trasplante hepático se consigue la desaparición de la mutante de la transtirretina y la consiguiente mejoría clínica al degradarse, al menos parcialmente, los depósitos existentes en los distintos órganos. En los pacientes con afección cardíaca grave se debe considerar la práctica de un trasplante cardíaco, inmediatamente antes o simultáneamente con el trasplante hepático.

En la amiloidosis senil, la proteína responsable de la formación de la sustancia amiloide es la transtirretina no mutada, y su depósito suele localizarse en corazón, cerebro, páncreas y bazo. Desde un punto de vista clínico, la amiloidosis senil que tiene mayor relevancia es la cardíaca. La existencia de una insuficiencia cardíaca congestiva con patrón ecocardiográfico propio de una amiloidosis en un paciente de edad superior a los 60 años, en ausencia de componente M y de otros datos clínicos propios de la AL, despertará una fuerte sospecha de amiloidosis cardíaca senil. La fibrilación auricular se da en el 60% de

los casos, y un tercio de los pacientes presentan un síndrome del túnel carpiano. El estudio inmunohistoquímico de la biopsia endomiocárdica muestra que la sustancia amiloide está constituida por transtirretina, y no por cadenas ligeras de inmunoglobulina. El reconocimiento de este tipo de amiloidosis es importante, pues en estos pacientes no se debe efectuar tratamiento citostático con melfalán. Por otro lado, la mediana de supervivencia de los pacientes con amiloidosis cardíaca senil es de 6 años, frente a la de tan sólo unos pocos meses en los enfermos con insuficiencia cardíaca debida a AL.

Pronóstico

La mediana de supervivencia de los pacientes con AL es inferior a 2 años y depende fundamentalmente del síndrome asociado, de tal modo que es inferior a 6 meses en los pacientes con insuficiencia cardíaca, mientras que es superior a los 5 años cuando el síndrome asociado es una polineuropatía periférica¹¹. En el estudio multivariado de una amplia serie, los factores pronósticos para la supervivencia fueron: insuficiencia cardíaca, presencia de cadenas ligeras en orina, hepatomegalia y cuantía de la pérdida de peso¹¹. Los niveles séricos de β_2 -microglobulina también constituyen un importante factor pronóstico. Los niveles séricos de troponinas cardíacas (cTnT y cTnI) y del factor natriurético cerebral (NT-proBNP) son fac-

tores pronósticos tan importantes que han permitido establecer una clasificación pronóstica^{12,13}. La cuantía de cadenas ligeras circulantes también constituye un factor pronóstico¹⁴⁻¹⁶.

Tratamiento

Los resultados del tratamiento de la AL son desalentadores. Menos del 5% de pacientes sobreviven a los 10 años de haberse realizado el diagnóstico¹⁷. La eficacia del tratamiento con melfalán y prednisona (MP) es muy limitada, con una tasa global de respuestas que fue del 20% en una serie de 153 pacientes. En los pacientes con síndrome nefrótico, sin insuficiencia renal ni afección cardíaca, la tasa de respuestas a MP es del 40%¹⁸. En varios estudios se ha investigado la posible eficacia de la colchicina. En un estudio llevado a cabo en la Clínica Mayo se comparó la eficacia de tres opciones terapéuticas: colchicina, MP y la combinación de MP/colchicina. La supervivencia fue significativamente inferior para los pacientes tratados con colchicina, frente a la de los pacientes tratados con MP o MP/colchicina (medianas de 8,5, 18 y 17 meses, respectivamente)¹⁹. Este estudio demuestra, de una forma definitiva, que la colchicina no tiene ningún papel en el tratamiento de la AL. Por otro lado, en un estudio aleatorizado se ha demostrado que el tratamiento poliquimioterápico con VBMCP (vincristina, BCNU, melfalán, ciclofosfamida, prednisona) no es superior al tratamiento con melfalán y prednisona²⁰. Algunos grupos emplean tratamiento con poliquimioterapia de tipo VAD (vincristina, adriamicina, dexametasona). En nuestra institución no somos partidarios de este tipo de tratamiento por los siguientes motivos: 1) la dexametasona es poco eficaz frente al clon de células plasmáticas y, por otra parte, comporta una notable toxicidad gastrointestinal y riesgo de miopatía esteroidea en pacientes ya notablemente debilitados; 2) la vincristina puede empeorar la neuropatía y su eficacia antitumoral es también muy limitada; y 3) la mayoría de los pacientes presentan afección cardíaca clínica o subclínica, que puede agravarse con la adriamicina. A la luz de los datos recientemente publicados, el tratamiento estándar para los pacientes que no son candidatos a autotrasplante sería la asociación de melfalán y dexametasona. De hecho, en un estudio aleatorizado publicado muy recientemente, la eficacia de esta asociación fue similar a los resultados obtenidos con autotrasplante²¹. Sin embargo, el limitado número de pacientes incluidos en ambos brazos terapéuticos y los criterios de selección de pacientes cuestionan los resultados del mencionado estudio. Cabe destacar que en los pacientes con AL tratados con melfalán la probabilidad actuarial de aparición de un síndro-

me mielodisplásico o una leucemia secundaria a los 3 años de iniciado el tratamiento es del 21%²².

Al igual que ha ocurrido en el mieloma múltiple, los denominados nuevos fármacos se están empezando a utilizar en la AL. El tratamiento con talidomida tiene una eficacia limitada en pacientes con resistencia al tratamiento más convencional y, además, su tolerancia es mala^{23,24}. La lenalidomida es un fármaco inmunomodulador (IMiD) más potente que la talidomida y con un mejor perfil de seguridad. En dos estudios recientemente publicados, la asociación de lenalidomida y dexametasona se ha mostrado muy prometedora, con una tasa de respuestas hematológicas de hasta el 67%, incluyendo un 29% de remisiones completas (RC)^{25,26}. Por otro lado, en otro estudio muy reciente se ha referido una tasa de respuestas de hasta el 74%, incluyendo un 21% de RC, con la asociación de ciclofosfamida, talidomida y dexametasona²⁷. Finalmente, el bortezomib, un inhibidor del proteasoma, solo o asociado a dexametasona también se ha mostrado eficaz en dos series cortas de pacientes con AL²⁸⁻³⁰. En una de ellas, la tasa de respuestas hematológicas en los pacientes evaluables para respuesta fue del 94%, incluyendo un 44% de RC, y las medianas de tiempo hasta la respuesta hematológica y respuesta orgánica fueron de tan sólo 1 y 4 meses, respectivamente²⁸. Sin embargo, en una de estas series la duración de la respuesta ha sido corta³⁰.

El tratamiento más prometedor para los pacientes menores de 65 años consiste en dosis elevadas de melfalán, seguido de rescate con progenitores hematopoyéticos de sangre periférica^{21,31-37}. Los grupos de Boston y de la Clínica Mayo tienen la mayor experiencia. Con una cuidadosa selección de pacientes, la mortalidad relacionada con el procedimiento ha disminuido del 30-40% a un aceptable 10-20%^{31,32,34}. Entre el 35 y el 50% de los pacientes alcanzan una respuesta serológica, y en el 65% de los enfermos que sobreviven al año del tratamiento intensivo se alcanza una mejoría objetiva de los órganos afectados^{21,31-37}. La probabilidad de alcanzar una respuesta es mayor si la cadena ligera es de tipo kappa (90% vs. 40%)³¹. El hecho de alcanzar la RC es el mayor determinante de la supervivencia a largo plazo³⁸⁻⁴¹. Con todo, cabe destacar que se han descrito casos de mortalidad ya en el procedimiento de aféresis, fundamentalmente debido a hipoxia e hipotensión refractaria y arritmias. Por dicho motivo, durante la movilización se debe monitorizar la tensión arterial al objeto de mantener una TA sistólica superior a 90 mmHg, así como una saturación arterial de oxígeno superior a 92% y vigilar el incremento o aparición de edemas. También se han observado casos de muerte súbita durante la infusión de los precursores hematopoyéticos, presumiblemente por toxicidad cardíaca del DMSO. Las causas más frecuentes de mortalidad en el postrasplante

inmediato son: hemorragia digestiva por toxicidad gastrointestinal, insuficiencia cardíaca y arritmias, rotura de vísceras (intestino, bazo), hipotensión arterial refractaria, obstrucción de vías aéreas superiores, insuficiencia renal y fallo multiorgánico. Si bien el tratamiento intensivo seguido de rescate con progenitores hematopoyéticos mejora la tasa de respuestas y puede prolongar la supervivencia, la elevada mortalidad que conlleva este procedimiento hace imprescindible una cuidadosa selección de los pacientes, limitando la indicación a los enfermos con afección de sólo uno o dos órganos y sin cardiopatía complicada⁴²⁻⁴⁴. Los pacientes con AL que sean posibles candidatos a autotrasplante deberían ser remitidos a una institución especializada en este tipo de tratamiento, a fin de proceder a una cuidadosa valoración de la indicación. En caso de que se opte por el autotrasplante, no se debe iniciar tratamiento con regímenes que contengan melfalán, ya que la terapia alquilante podría comprometer la obtención de progenitores hematopoyéticos.

En los pacientes con insuficiencia renal avanzada, el tratamiento sustitutivo con diálisis constituye una excelente medida paliativa. Alrededor del 10% de los pacientes tienen una afección cardíaca grave predominante con poca afectación de otros órganos o sistemas. En este caso se debe considerar la posibilidad de efectuar un trasplante cardíaco, especialmente si se tienen en cuenta las expectativas creadas por el autotrasplante de progenitores hematopoyéticos, con el fin de intentar este procedimiento en un segundo tiempo^{45,46}. En cualquier caso, la supervivencia a los 3 años de los pacientes sometidos a trasplante cardíaco por AL, aunque no fuera seguida de autotrasplante, no es diferente a la de los pacientes sometidos a dicho tipo de trasplante por otras causas, si bien existe una tendencia a una menor supervivencia a los 5 años⁴⁵.

Bibliografía

- Falk RH, Comenzo R, Skinner M. The systemic amyloidosis. *N Engl J Med* 1997; 337: 898-909.
- Gillmore JD, Hawkins PN, Pepys M. Amyloidosis: a review of recent diagnostic and therapeutic developments. *Br J Haematol* 1997; 99: 245-56.
- Merlimi G, Bellotti V. Molecular mechanisms of amyloidosis. *N Engl J Med* 2003; 349: 583-96.
- Merlini G, Stone MJ. Dangerous small B-cell clones. *Blood* 2006; 108: 2520-30.
- Kyle RA, Linos A, Beard CM, et al. Incidence and natural history of primary systemic amyloidosis in Olmstead County, Minnesota, 1950 through 1989. *Blood* 1992; 79: 1817-22.
- Kyle RA, Gertz MA. Amyloidosis. In: *Neoplastic Diseases of the Blood*. 2nd ed. Wiernik PH, Canellios GP, Kyle RA, Schiffer CA, eds. New York: Churchill Livingstone; 1991. p. 525-70.
- Kyle RA, Gertz MA. Primary systemic amyloidosis: clinical and laboratory features in 474 cases. *Semin Hematol* 1995; 32: 45-59.
- Cueto-García L, Reeder GS, Kyle RA, et al. Echocardiographic findings in systemic amyloidosis: spectrum of cardiac involvement and relation to survival. *J Am Coll Cardiol* 1985; 6: 737-43.
- Rives S, Pera M, Rosiñol L, Vidal O, Miquel R, Solé M, García-Valdecasas J, Bladé J. Primary systemic amyloidosis presenting as a colonic stricture. Successful treatment with left hemicolectomy followed by autologous hematopoietic stem-cell transplantation: report of a case. *Dis Colon Rectum* 2002; 45: 1263-6.
- Gertz MA, Kyle RA. Hepatic amyloidosis (primary -AL-, immunoglobulin light chain): the natural history in 80 patients. *Am J Med* 1988; 85: 73-80.
- Kyle RA, Greipp PR, O'Fallon WM. Primary systemic amyloidosis: multivariate analysis for prognostic factors in 168 cases. *Blood* 1986; 68: 220-4.
- Dispenzieri A, Kyle RA, Gertz MA, et al. Survival in patients with primary systemic amyloidosis and raised serum cardiac troponins. *Lancet* 2003; 361: 1787-9.
- Dispenzieri A, Gertz MA, Kyle RA, et al. Serum cardiac troponins and N-terminal pro-brain natriuretic peptide: a staging system for primary systemic amyloidosis. *J Clin Oncol* 2004; 22: 3751-7.
- Abraham RS, Katzmann JA, Clark RJ, et al. Quantitative analysis of serum free light chains. A new marker for the diagnostic evaluation of primary systemic amyloidosis. *Am J Clin Pathol* 2003; 119: 274-8.
- Dispenzieri A, Lacy MQ, Katzman JA, et al. Absolute value of immunoglobulin light chain are prognostic in patients with primary systemic amyloidosis undergoing peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 2006; 107: 3378-83.
- Palladini G, Lavatelli F, Russo P, et al. Circulating amyloidogenic free-light chains and serum N-terminal natriuretic peptide type B decreases simultaneously in association with improvement of survival in AL. *Blood* 2006; 107: 3854-8.
- Kyle RA, Gertz MA, Greipp PR, et al. Long-term survival (10 year or more) in 30 patients with primary amyloidosis. *Blood* 1999; 93: 1062-10.
- Gertz MA, Kyle RA, Greipp PR. Response rate and survival in primary systemic amyloidosis. *Blood* 1991; 77: 257-62.
- Kyle RA, Gertz MA, Greipp PR, et al. A trial of three regimens for primary amyloidosis: colchicine alone, melphalan and prednisone, and melphalan, prednisone and colchicine. *N Engl J Med* 1997; 336: 1202-7.
- Gertz MA, Lacy MQ, Lust JP, Greipp PR, Witzig TE, Kyle RA. Prospective randomized trial of melphalan and prednisone versus vincristine, carmustine, melphalan, cyclophosphamide, and prednisone in the treatment of primary systemic amyloidosis. *J Clin Oncol* 1999; 17: 262-7.
- Jaccard A, Moreau P, Leblond V, et al. High-dose melphalan versus melphalan plus dexamethasone for AL amyloidosis. *N Engl J Med* 2007; 357: 1083-93.
- Gertz MA, Kyle RA. Acute leukemia and cytogenetics abnormalities complicating melphalan treatment of primary systemic amyloidosis. *Arch Intern Med* 1990; 150: 629-33.
- Dispenzieri A, Lacy MQ, Rajkumar SV, et al. Poor tolerance to high dose thalidomide in patients with primary systemic amyloidosis. *Amyloid* 2003; 10: 257-61.
- Palladini G, Perfetti V, Perlini S, et al. The combination of thalidomide and intermediate-dose dexamethasone is an effective but toxic treatment for patients with primary amyloidosis (AL). *Blood* 2005; 105: 2949-51.
- Santhorawala V, Wright DG, Rosenzweig M, et al. Lenalidomide and dexamethasone in the treatment of AL amyloidosis: results of a phase 2 trial. *Blood* 2007; 109: 492-6.
- Dispenzieri A, Lacy MQ, Zeldenrust SR, et al. The activity of lenalidomide with or without dexamethasone in patients with primary systemic amyloidosis. *Blood* 2007; 109: 465-70.

27. Wechalekar AD, Goodman HJB, Lachmann HJ, et al. Safety and efficacy of risk-adapted cyclophosphamide, thalidomide, and dexamethasone in systemic AL amyloidosis. *Blood* 2007; 109: 457-64.
28. Kastritis E, Anagnostopoulos A, Roussou M, et al. Treatment of light chain (AL) with the combination of bortezomib and dexamethasone. *Haematologica* 2007; 92: 1351-8.
29. Sitia R, Palladini G, Merlini G. Bortezomib in the treatment of AL amyloidosis: targeted therapy? *Haematologica* 2007; 92: 1302-7.
30. Wechalekar AD, Lachmann HJ, Offer M, Hawkins PN, Gillmore JD. Efficacy of bortezomib in systemic AL amyloidosis with relapsed/refractory clonal disease. *Haematologica* 2008; 93: 295-8.
31. Comenzo RL, Gertz MA. Autologous stem cell transplantation for primary systemic amyloidosis. *Blood* 2002; 99: 4276-82.
32. Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A, et al. Stem cell transplantation for the management of primary systemic amyloidosis. *Am J Med* 2002; 113: 549-55.
33. Dispenzieri A, Kyle RA, Lacy MQ, et al. Superior survival in primary systemic amyloidosis patients undergoing peripheral blood stem cell transplantation: a case control study. *Blood* 2004; 103: 3960-3.
34. Skinner M, Sanchorawala V, Seldin DC, et al. High-dose melphalan and autologous stem cell transplantation in patients with AL amyloidosis: an 8-year study. *Ann Intern Med* 2004; 140: 85-93.
35. Vesole DH, Pérez WS, Akashed M, et al. High-dose therapy and hematopoietic stem cell transplantation for patients with primary systemic amyloidosis: a Center for International Blood and Marrow Transplant Research Study. *Mayo Clin Proc* 2006; 81: 880-8.
36. Goodman HJ, Gillmore JD, Lachmann HJ, et al. Outcome of autologous stem cell transplantation for AL amyloidosis in the UK. *Br J Haematol* 2006; 134: 417-25.
37. Perfetti V, Siena S, Palladini G, et al. Long-term results of a risk-adapted approach to melphalan conditioning in autologous peripheral blood stem cell transplantation for primary (AL) systemic amyloidosis. *Haematologica* 2006; 91: 1635-43.
38. Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A, et al. Effect of hematologic response on outcome of patients undergoing transplantation for primary amyloidosis: importance of achieving a complete response. *Haematologica* 2007; 92: 1415-8.
39. Sanchorawala V, Skinner M, Quillen K, Finn KT, Doros G, Seldin DC. Long-term outcome of patients with AL amyloidosis treated with high-dose melphalan and stem-cell transplantation. *Blood* 2007; 110: 3561-3.
40. Comenzo RL. Hematopoietic stem cell transplantation for primary amyloidosis: what have we learned? *Leuk & Lymph* 2000; 37: 245-58.
41. Rives S, Bladé J, Martínez C, Marín P, Carreras E, Montserrat E. Tratamiento con melfalán a altas dosis seguido de rescate con progenitores hematopoyéticos en la amiloidosis primaria. *Med Clin* 2000; 115: 216-20.
42. Gertz MA, Lacy M, Dispenzieri A, et al. Troponin T level as an exclusion criterion for stem cell transplantation in light-chain amyloidosis. *Leuk Lymphoma* 2008; 49: 36-41.
43. Dimopoulos M, Kastritis E. High dose therapy for light chain amyloidosis: can we reduce treatment-related mortality further? *Leuk Lymphoma* 2008; 49: 4-5.
44. Dispenzieri A, Lacy MQ, Kyle RA, Therau TM, Larson D, Rajkumar SV, et al. Eligibility for hematopoietic stem cell transplantation for primary systemic amyloidosis is a favorable prognostic factor for survival. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3350-6.
45. Dubrey S, Falk RH. Heart transplantation in AL amyloidosis. *Amyloid Int J Exp Clin Invest* 1995; 86: 855-61.
46. Gillmore JD, Goodman HJ, Lachmann HJ, et al. Sequential heart and autologous stem cell transplantation for systemic AL amyloidosis. *Blood* 2006; 107: 1227-9.

MACROGLOBULINEMIA DE WALDENSTRÖM

R. GARCÍA SANZ, E.M. OCIO,
M.E. SARASQUETE, A. BALANZATEGUI,
M. ALCOCEBA, M.C. CHILLÓN,
M. GONZÁLEZ, J.F. SAN MIGUEL
Servicio de Hematología.
Hospital Universitario de Salamanca.

Introducción

La macroglobulinemia de Waldenström (MW) es un trastorno linfoproliferativo de línea B caracterizado por infiltración de la médula ósea por células linfoplasmocíticas, junto con demostración de gammapatía monoclonal de IgM¹. Se considera que este estado corresponde al linfoma linfoplasmocitoide, tal como se define en las clasificaciones REAL² y de la OMS³. Fue descrita en 1944 por Jan Waldenström, quien describió dos pacientes con “alto nivel de macroglobulina (inmunoglobulina M pentamérica) con marcada hiperviscosidad y oftalmoscopia típica junto a anemia, diátesis hemorrágica, linfadenopatías e infiltración linfoplasmocitaria de la médula ósea”⁴ (Tabla 1). La MW es una enfermedad poco común, diez veces menos frecuente que el mieloma múltiple. Constituye un 2% de todos los cánceres hematológicos. En Estados Unidos la tasa de incidencia ajustada según la edad es de 3,4 por millón entre los hombres y de 1,7 por millón entre las mujeres, con un aumento geométrico con la edad^{5,6}. En España, se estima su incidencia en 3,1 casos por millón de habitantes y año⁷.

Etiopatogenia

La causa de la MW no se conoce, pero hay datos que apoyan una influencia genética o familiar, ya que se han descrito familias con varios miembros diagnosticados de MW u otros síndromes linfoproliferativos (SLP)⁸⁻¹⁰. Dicha influencia ha sido recientemente avallada por una serie en la que hasta el 19% de los pacientes con MW cuenta con algún familiar con MW u otro SLP¹¹.

Un 8% de las MW proceden de la evolución de una GMSI IgM diagnosticada previamente^{1,12}. En este sentido, se ha propuesto que la presencia de una GMSI previa es el principal factor de riesgo para desarrollar una MW¹³ y que los pacientes con GMSI IgM tienen un riesgo mucho mayor de padecer un LNH o una MW^{14,15}. No obstante, hay datos que indican que la MW evolucionada desde una GMSI puede ser diferente del resto de las MW¹⁶.

En la actualidad se sospecha que el origen de la MW habría que buscarlo en un proceso multifásico de transformación neoplásica en el que se acumulan fenómenos oncogénicos de forma secuencial. Esta hipótesis se ve apoyada por la elevada frecuencia de cambios genéticos entre diagnóstico y progresión, hecho que indica una evolución clonal, que además coincide con la aparición de subclones cada vez menos secretores, más proliferativos y más resistentes al tratamiento¹⁷⁻¹⁹. Los estudios de reordenamiento de los genes de las Ig indican que las células que inician el clon tumoral en la MW son linfocitos B que han sufrido el proceso de mutación somática, pero que no han sido capaces de llevar a cabo el proceso de cambio de clase^{20,21}. Esto situaría a la célula clonotípica cerca de la salida del centro germinal (posfolicular), pero sin haberlo hecho de forma completa, ya que el proceso de cambio de clase tiene lugar al final del proceso de maduración folicular. Por otro lado, se sabe que aunque la mayoría de los casos tienen hipermutación somática, hay un subgrupo de pacientes no mutados, hecho que sugiere una posible transformación desde una subpoblación linfoide B policlonal extragerminal, rara e inusual^{16,21}. Ello se ve apoyado también por la elevada preferencia a elegir o rechazar ciertos segmentos VH a la hora de reordenar la célula clonogénica, como la elevada frecuencia de VH3-23 o la ausencia de VH1-69 y VH4-34¹⁶. Todo sugiere que la célula que origina la MW probablemente proviene de una población específica que completa su maduración de una forma anómala sin pasar por el centro germinal, totalmente diferente a la idea que se tiene hasta ahora. No obstante, todo este proceso está actualmente bajo revisión, ya que los nuevos datos que van apareciendo no encajan del todo en este esquema. Aquí habría que encajar los datos que indican que la célula de la MW sí es capaz de llevar a cabo el cambio de clase²², aunque lo haga sólo en el 17% de los casos¹⁶, o la revisión del concepto de variación intraclonal en esta enfermedad, ya que hay hallazgos que indican que sí es posible en la MW^{23,24}.

Cuadro clínico

La MW es una enfermedad de curso generalmente crónico, por lo que puede permanecer estable durante mucho tiempo sin presentar síntomas importantes. Este hecho permite realizar una primera clasificación de la MW entre formas sintomáticas y asintomáticas, con importantes implicaciones pronósticas y terapéuticas.

Motivo de consulta

El síntoma inicial más frecuente es la astenia progresiva, pero existen otros de presentación frecuente, como

las manifestaciones hemorrágicas y neurológicas y las adenopatías^{7,25-27}. Hasta un 20% de los casos tienen manifestaciones iniciales inusuales: respiratorias, oculares, insuficiencia renal, síntomas cutáneos, etc. El diagnóstico también puede ser casual, al observar un proteinograma con un CM o una VSG elevada en un estudio realizado por otra causa. Finalmente, como se ha mencionado previamente, en torno a un 10% de las MW provienen de una de GMSI de tipo IgM diagnosticada previamente.

Características clínicas

Los síntomas y signos clínicos de la MW son producidos por el crecimiento y la infiltración tumoral, o bien por la presencia de la paraproteína IgM. En este apartado analizaremos por separado las manifestaciones dependientes de cada una de dichas características.

Manifestaciones clínicas dependientes del crecimiento y la infiltración tumoral

Debido a la escasa agresividad del crecimiento tumoral, los síntomas suelen ser leves; sin embargo, entre un 25 y un 50% de los pacientes presentan un cuadro constitucional (astenia, anorexia, pérdida de peso) más o menos evidente^{7,19,28}. La aparición de citopenias periféricas por infiltración de la médula ósea (MO) es relativamente común. La anemia es el signo más frecuente en la MW sintomática^{7,28,29}, aunque puede ser falsa por hemodilución secundaria a hipervolemia o por hiperviscosidad, que puede llegar a reducir el hematocrito hasta en un 30%. La neutropenia y la trombopenia son poco frecuentes y, si existen, poco acusadas^{7,28}.

Un 15-30% de los pacientes tienen infiltración de órganos linfoides, con hepatomegalia, esplenomegalia o adenopatías palpables^{7,26,28-32}, que suelen ser moderadas en la mayoría de los casos.

Tabla 1. Enfermedades que pueden cursar con IgM monoclonal

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

La **infiltración extraganglionar** es poco frecuente y generalmente con poca repercusión clínica^{7,19}. Se han descrito casos aislados de afectación pleuropulmonar que suelen manifestarse como lesiones nodulares asimétricas, de pequeño tamaño y localización basal. La infiltración pleural suele ser bilateral y asociada a la parenquimatosa, siendo en ocasiones el síntoma clínico inicial. La infiltración parenquimatosa renal es relativamente frecuente y se traduce, generalmente, como un aumento asintomático del volumen renal. La afectación cutánea es excepcional y se revela, en general, como nódulos o pápulas en extremidades y cara, aunque también se han descrito casos de pioderma gangrenoso. La presencia de dolor óseo o lesiones osteolíticas obliga a descartar un mieloma múltiple (MM) IgM. El tracto gastrointestinal raramente está infiltrado y, en esos casos, suele cursar con diarrea y malabsorción. Finalmente, aunque las manifestaciones neurológicas suelen ser debidas a la hiperviscosidad, también puede haber infiltración del sistema nervioso central (cuadro tumoral: focalidad neurológica, hipertensión intracraneal, coma) o del sistema nervioso periférico (neuropatía periférica).

Manifestaciones clínicas dependientes de la paraproteína monoclonal

La molécula de IgM es muy grande y tiende a formar pentámeros, lo que, unido a una alta concentración sérica, la hace responsable de un importante aumento de la viscosidad sanguínea. Además, esta proteína, por sí sola o interaccionando con otras proteínas, puede adquirir características de crioglobulina o de anticuerpo, provocando una clínica específica.

Síndrome de hiperviscosidad

La frecuencia de este síndrome de hiperviscosidad se sitúa en torno al 15-30% del total de las MW^{7,30}. Aunque no hay una relación directa exacta entre la cantidad de paraproteína y el desarrollo del síndrome²⁹, generalmente nunca aparece con concentraciones de IgM inferiores a 30 g/L. Sus manifestaciones clínicas varían de unos pacientes a otros, pero pueden resumirse en:

i) **Manifestaciones neurológicas y oculares:** cuadro clínico progresivo, que comienza por cefalea, seguida de confusión, vértigo, somnolencia y estupor, y que puede originar convulsiones o coma paraproteínico. Este cuadro se agrava si aparecen trombosis o hemorragias intracraneales. Puede aparecer neuropatía periférica por oclusiones vasculares de los *vasa nervorum* (síndrome de Bing-Neel). En la retina es posible observar imágenes vasculares con dilataciones y restricciones (en "ristra de salchichas"), así como exudados, hemorragias, desprendimientos serosos, microaneurismas, papiledema y oclusión de la vena central.

ii) **Manifestaciones cardíacas:** la hiperviscosidad facilita la aparición de insuficiencia cardíaca, sobre todo en ancianos, algo a tener en cuenta cuando se transfunden concentrados de hematíes¹⁵.

iii) **Manifestaciones hemorrágicas:** se deben a estasis sanguínea y lesión de capilares, y son más graves cuando hay trombopenia, trombopatía o coagulopatía.

Crioglobulina

La inmunoglobulina M puede formar complejos proteicos que precipitan a bajas temperaturas. El 10-20% de los pacientes presentan una paraproteína con características de crioglobulina, pero sólo la cuarta parte de ellos tienen manifestaciones clínicas³⁰. Los síntomas más frecuentes son fenómeno de Raynaud, necrosis acra (oreja, nariz, dedos) y púrpura vascular en extremidades inferiores. Más raramente aparece urticaria, acrocianosis, úlceras supramaleolares, *livedo reticularis*, artralgias o insuficiencia renal^{26,32-34}.

Actividad de la IgM como anticuerpo y su interacción con otras proteínas

Puede afectar a diferentes órganos y sistemas, originando las siguientes manifestaciones clínicas:

a) **Manifestaciones hematológicas.** Generalmente se trata de tendencia hemorrágica por alteraciones en la función plaquetaria o por defectos de coagulación por interacción entre la IgM y algunos factores. En algunos casos la paraproteína tiene actividad antifosfolipídica, comportándose como un anticoagulante lúpico (riesgo trombótico). También se han descrito síndromes de aglutininas frías por actividad de Ac frente a Ag eritrocitarios, con aparición de fenómeno de Raynaud y anemia hemolítica³⁰. Finalmente, la paraproteína puede interferir con proteínas del sistema del complemento, aumentando el riesgo infeccioso.

b) **Manifestaciones neurológicas.** Un tercer mecanismo se suma a la infiltración tumoral y al síndrome de hiperviscosidad en la clínica neurológica de los pacientes con MW: la actividad de la IgM como Ac frente a la glicoproteína asociada a mielina (MAG)³⁵⁻³⁷. Ello provoca polineuropatía periférica desmielinizante, que suele ser crónica, simétrica, sensitiva y de predominio en extremidades inferiores.

c) **Manifestaciones renales.** La insuficiencia renal es excepcional en la MW y, a diferencia de la clásica tubulopatía del MM producida por la hipercalcemia y la proteinuria de Bence Jones, es predominantemente glomerular. En la MW, la IgM puede formar agregados ocluyendo capilares glomerulares y atrofiando los túbulos renales. No obstante, si aparece albuminuria franca o una glomerulonefritis rápidamente progresiva, habría que pensar en la presencia de amiloidosis o de crioglobulinemia³⁰.

- d) **Amiloidosis.** Es muy poco frecuente (2% de todas las gammopatías IgM)³⁸; se diferencia de la amiloidosis primaria en que afecta más frecuentemente a corazón, pleura y pulmón.³⁸ Debe descartarse siempre en el momento del diagnóstico, ya que, si existe, es una importante causa de mortalidad de los pacientes con MW^{38,39}.
- e) **Otras manifestaciones.** Poliartralgias, que son raras a pesar de que un 30% de los casos presentan factor reumatoide; cuadros de edema angioneurótico por actividad Ac frente al inhibidor de la fracción C1s del complemento; malabsorción por depósito de IgM en intestino delgado sin infiltración linfoplasmocitaria; lesiones cutáneas nodulares por depósito intradérmico de IgM⁴⁰ o lesiones urticariales conocidas como *síndrome de Schnitzler*⁴¹.

Datos biológicos y exploraciones complementarias

Hemograma

El 50-70% de los enfermos tienen anemia normocítica y arregenerativa^{7,28,29}, aunque también puede haber un componente periférico (pérdidas sanguíneas, aglutininas frías o hemodilución). Los leucocitos son normales, pero en la tercera parte de los pacientes hay linfocitosis ($>4 \times 10^9/L$), frecuentemente monoclonal, y no es rara la neutropenia. La trombopenia sólo aparece en menos del 20% de los casos^{7,28}. En el frotis es característico el hallazgo de hematíes en pilas de monedas (fenómeno de *rouleaux*) debido a la paraproteinemia.

Bioquímica

La bioquímica de los pacientes con MW suele ser normal. Las alteraciones en la función renal, aunque pueden darse en pacientes con MW, orientan más hacia el diagnóstico de MM IgM. El perfil bioquímico, también nos puede dar información acerca de la presencia de hemólisis o de lesiones de otros órganos secundarias o no a la MW.

Estudios proteicos

Las proteínas totales están aumentadas por la paraproteína IgM, con elevación de la velocidad de sedimentación globular (VSG). La electroforesis pone de manifiesto la existencia de una banda monoclonal IgM cuya identificación se hace por inmunoelectroforesis o inmunofijación; y a diferencia del MM, los niveles de las restantes Ig (IgG e IgA) suele ser normales, aunque

pueden estar ligeramente disminuidas²⁶. Un 30-50% de los pacientes presentan proteinuria de Bence Jones que, en general, es escasa ($<2 \text{ g}/24 \text{ horas}$)^{7,26}.

Biopsia de médula ósea

Para el diagnóstico de MW es obligatoria la demostración de LNH linfoplasmocítico en la *biopsia ósea*, siendo el patrón de infiltración más frecuente el intertrabecular, al igual que sucede en el LNH de la zona marginal. La presencia de mastocitos o células cebadas en la biopsia ósea es muy característica de MW, que muy probablemente tienen algún papel en la patogenia de la enfermedad. La afectación de la MO es generalmente difusa³⁴, aunque hay casos con infiltración nodular o intersticial, y es muy frecuente la hiperplasia reticulínica.

Aspirado de médula ósea

El *medulograma* de la MW se caracteriza por una infiltración linfoide polimorfa, de intensidad variable, compuesta de linfocitos, linfoplasmocitos y células plasmáticas. Los linfoplasmocitos pueden tener inclusiones inmunoglobulínicas PAS+ de localización citoplasmática o nuclear, denominadas cuerpos de Russell y Dutcher, respectivamente^{42,43}. Si el porcentaje de células plasmáticas excede del 10%, es necesario hacer un diagnóstico diferencial con el MM. Finalmente, volvemos a recordar aquí que es frecuente la presencia de mastocitos.

Biopsia de adenopatía

La reunión de consenso recomendó su realización en los casos en los que existan adenopatías accesibles con el fin de descartar la existencia de otro tipo de linfoma no Hodgkin (LNH). La *histología ganglionar* es superponible a la del *linfoma linfoplasmocítico*. No obstante, recientemente se ha descrito que hasta el 9% de los casos de MW con afectación extramedular presentaban afectación por otro linfoma diferente al linfoplasmocítico¹⁹, hecho que cambiaría el diagnóstico de MW por el de LNH con componente IgM asociado.

Inmunofenotipo

El patrón inmunofenotípico de la MW no es patognomónico de esta enfermedad, pero puede facilitar el diagnóstico. El primer dato característico, aunque no constante, es la coexistencia de linfoplasmocitos y células plasmáticas junto con los linfocitos tumo-

rales. El patrón inmunofenotípico característico de los linfocitos tumorales de la MW es el siguiente^{19,44-48}: expresión constante de antígenos pan B (CD19⁺⁺, CD20⁺⁺ y CD22⁺) y de inmunoglobulinas de superficie (sIg) (más frecuentemente kappa); negatividad para los antígenos CD5 y CD23 en ~70% de los casos (diferencia con leucemia linfocítica crónica – LLC– y LNH del manto); ausencia del Ag CD10 (diferencia con LNH folicular); negatividad para CD103 y CD11c (diferencia con tricoleucemia); y presencia de FMC7. Tiene especial interés remarcar que el patrón CD25⁺/CD22^{debil} es muy característico de los linfocitos de la MW y permite el diagnóstico diferencial con otros síndromes linfoproliferativos crónicos (SLPc) con fenotipo muy semejante, como el LNH esplénico de la zona marginal⁴⁶. Finalmente, debemos saber que las células plasmáticas de los pacientes con MW tienen un perfil antigénico (CD38⁺⁺ CD19^{++/-} CD56⁻ CD45⁺⁺ CD20⁺) diferente al de las células plasmáticas tanto normales como mielomatosas⁴⁷.

Análisis del ADN y del ciclo celular

De forma similar a lo que ocurre con el LNH de bajo grado, los enfermos con MW presentan, casi constantemente, un patrón de ADN diploide⁴⁹. Esta situación es diferente a la del MM, donde hasta el 70% de los casos son aneuploides. Respecto al perfil de ciclo celular, tanto la MW como el MM y los SLPc de bajo grado son entidades muy poco proliferativas con una fracción de células proliferativas menor al 2% en el caso de la MW⁴⁹.

Citogenética

El bajo índice proliferativo de la célula tumoral hace que la información cariotípica sea bastante pobre en la MW (<25% de metafases anormales por citogenética convencional). Por ello, la mayoría de los estudios citogenéticos han utilizado la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (HISF). A pesar de que no existen alteraciones específicas de la MW, la delección del brazo largo del cromosoma 6 ha sido descrita como la alteración más recurrente (35-60% de los casos)^{50,51}. Otras alteraciones menos frecuentes son translocaciones en IgH (14q32) (3-15%)^{51,52} y delección del gen del retinoblastoma y de *p53*, observadas en casos de enfermedad avanzada.^{52,53} Algunas de estas alteraciones son útiles para el diagnóstico diferencial de la MW con otros SLPc; así, la presencia de delección de 6q permite diferenciarla del LNH esplénico de la zona marginal⁴⁶, mientras que la ausencia de t(11;14) y t(9;14) permite distinguirla del MM IgM⁵⁴ y del LNH linfoplasmocítico sin IgM⁵⁵, respec-

tivamente. Por otro lado, la presencia de algunas alteraciones ha sido asociada con el pronóstico, como la del(6q), que se relaciona con factores adversos y evolución desfavorable.

Otras exploraciones complementarias

Otras exploraciones complementarias que pueden realizarse en durante el diagnóstico son: estudio de *fondo de ojo* para valorar signos de hiperviscosidad; estudio de *amiloides* (*tinción con rojo Congo*), bien en la biopsia de la médula ósea, en la grasa peritoneal o en la mucosa rectal; *test de Coombs*, para descartar la presencia de anemia hemolítica; y determinación de *crioaglutininas séricas*. En función de la clínica del paciente, también puede estar indicado efectuar un *estudio neurológico* mediante *electromiograma* y *biopsia del nervio sural* con búsqueda de Ac, tanto depositados en el nervio como circulantes en el suero; *serie ósea* para descartar lesiones líticas (indicativas de MM) en caso de dolores osteomusculares; y un estudio *radiológico baritado intestinal* y *biopsia de mucosa intestinal* si existen datos de malabsorción.

Diagnóstico diferencial de la macroglobulinemia de Waldenström

Como ya se ha mencionado, los límites entre MW y otros SLPc y entidades relacionadas son imprecisos, por lo que el diagnóstico diferencial con estas entidades es uno de los principales retos que hay cuando nos enfrentamos a estos pacientes. Podemos diferenciar dos grupos de patologías con dificultades de diferenciación:

Entidades relacionadas con la MW

En la reunión consenso de Atenas se distinguieron cuatro entidades que, con un probable mecanismo patogénico común, presentan características clínicas y biológicas diferentes. Estas entidades son: la MW sintomática e indolente; la gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) IgM y los trastornos relacionados con CM IgM (TR IgM). La Tabla 2 resume las características diferenciales fundamentales de cada una de ellas.

Otras enfermedades que pueden cursar con un componente monoclonal IgM

Hay tres patologías que pueden cursar con un componente monoclonal IgM y presentar problemas de diagnóstico diferencial con la MW.

Tabla 2. Diagnóstico de la MW y trastornos relacionados

	Proteína IgM monoclonal ⁽¹⁾	Infiltración de médula ósea ⁽²⁾	Síntomas por IgM	Síntomas por infiltración tumoral ⁽³⁾
MW sintomática	+	+	+(4)	+(4)
MW asintomática	+	+	-	-
Trastornos relacionados con paraproteinemia IgM ⁽⁵⁾	+	-	+	-
GMSI IgM	+	-	-	-

⁽¹⁾Se considera inapropiado usar un umbral en la cantidad de IgM para distinguir entre GMSI y MW.

⁽²⁾Si hay infiltración por linfoma linfoplasmocítico hablaremos de MW; y si no la hay, de GMSI. En caso de duda para considerar si hay infiltración o no, es obligado acudir a técnicas como la citometría de flujo o la PCR: si se demuestra la existencia de monoclonalidad linfocitoide B, se considerará MW; mientras que si no la hay, se deberá considerar una GMSI en tanto no haya otros datos.

⁽³⁾Incluyen: síntomas constitucionales, citopenias, organomegalias.

⁽⁴⁾Basta la presencia de uno de los dos tipos de síntomas, aunque pueden estar presentes los dos.

⁽⁵⁾Son pacientes con síntomas derivados de la proteína monoclonal IgM, pero sin evidencias de linfoma o infiltración medular. Tales pacientes pueden tener crioglobulinemia sintomática, amiloidosis o fenómenos autoinmunes como neuropatía periférica y síndrome de aglutininas frías. Estos pacientes constituyen un grupo diferenciado para el que se ha propuesto el término de "trastornos relacionados con IgM".

Síndromes linfoproliferativos B (generalmente de bajo grado) con componente monoclonal IgM

El diagnóstico diferencial con estas patologías se fundamenta en criterios histológicos. Además, estos casos suelen tener mas adenopatías y visceromegalias, y la biopsia de alguna de dichas adenopatías puede favorecer el diagnóstico del SLP (que debe ser diferente de LNH linfoplasmocítico). Además, ya se han comentado las diferencias que hay desde el punto de vista inmunofenotípico y citogenético.

Mieloma múltiple IgM

Es una entidad muy poco frecuente que representa menos de un 1% de los MM⁵⁶. El diagnóstico diferencial se basa tanto en las diferencias en la presentación clínica (lesiones óseas, insuficiencia renal e hipercalcemia típicas en el MM) como en la infiltración de la médula ósea (células plasmáticas maduras en el caso del MM y linfocitos B con linfoplasmocitos y escasas células plasmáticas en el caso de la MW).

En la Tabla 3 se señala la distribución porcentual de las diferentes gammapatías monoclonales IgM a que se ha hecho referencia³⁴.

LNH linfoplasmocítico sin componente monoclonal IgM

Otra patología con la que hay que realizar el diagnóstico diferencial de la MW es el LNH linfoplasmocítico con componente monoclonal distinto de IgM, que supone un 11% de los casos de LNH linfoplasmocítico⁴⁸. La ausencia de la paraproteína hace sencilla su diferenciación clínica. Sin embargo, no está bien definido si estas enfermedades tienen realmente un mismo sustrato anatomopatológico o si se trata de entidades distintas.

Tratamiento

La primera decisión importante que se debe tomar al considerar el tratamiento de la MW es decidir qué pacientes tienen que tratarse y cuándo. En la reunión de Atenas de 2002²⁷ se convino que el criterio para iniciar el tratamiento en los pacientes sería la aparición de alguno de los siguientes síntomas o signos: niveles de hemoglobina < 10 g/dL, trombopenia < 100 × 10⁹/L, masas voluminosas u organomegalias, hiperviscosidad sintomática, neuropatía grave, amiloidosis, crioglobulinemia, enfermedad por aglutininas frías o evidencias de transformación, así como cualquier síntoma atribuible a infiltración linfocitoide o efecto del CM. Los pacientes que no presenten ninguno de estos criterios se consideran portadores de una MW indolente, y únicamente deben ser controlados cada 3-6 meses con el fin de detectar la eventual progresión de la enfermedad. Como queda dicho, la cantidad de IgM por sí misma no es un criterio de inicio de tratamiento, aunque el aumento progresivo de la paraproteína sí podría hacer razonable el inicio de alguna terapia. Pese a ello, casi todos los pacientes con IgM ≥ 3 g/L acaban por necesitar terapia, y tan sólo el 13% están libres de tratamiento al cabo de 10 años de evolución⁵⁷. Estos aspectos han sido confirmados recientemente en la IV Reunión Internacional de MW celebrada en Kos⁵⁸.

El segundo aspecto importante es determinar el mejor esquema terapéutico para los pacientes con MW. Para ello se han ido añadiendo nuevas alternativas en distintas reuniones de consenso celebradas en Atenas⁵⁹, París⁶⁰ y Kos⁵⁸. Así se han establecido unas recomendaciones de tratamiento que incluyen primera línea y rescate (Tablas 4-6). Respecto al tratamiento de primera línea, existen tres grupos de fármacos re-

Tabla 3. Esquemas de uso de los principales fármacos activos en MW

Fármaco		Dosis	Vía	Días
CLORAMBUCILO				
Monoterapia	LEUK	0,1 mg/kg/día	Oral	Continuo (6-12 meses)
	LEUK	0,3 mg/kg/día	Oral	7 días cada 6 semanas
	LEUK	40 mg/m ² /día	Oral	1 día cada 28 días
	LEUK	0,4 mg/kg/día	Oral	2 días cada 2 semanas
Con prednisona	LEUK	12 mg/m ² /día	Oral	7 días de cada 28 días
	PDN	30 mg/m ² /día		
	LEUK	0,4 mg/kg/día	Oral	5-6, cada 2 semanas
	PDN	60 mg/m ² /día		1-4, cada 2 semanas
MELFALÁN y PREDNISONA	MF	9 mg/m ² /día	Oral	1-4, cada 28 días
	PDN	60 mg/m ² /día		
CICLOFOSFAMIDA	CTX	50 mg/día	Oral	Continuo
	CTX	150 mg/día	Oral	7 días cada 2-4 semanas
FLUDARABINA	FLD	30 mg/m ² /día	i.v.	5 días cada 4 semanas
	FLD	50 mg/m ² /día	Oral	5 días cada 4 semanas
2-CLORO-DEOXI-ADENOSINA	2-CdA	0,12 mg/m ² /día	i.v.	5 días, 1-2 cursos (6 semanas)
	2-CdA	0,10 mg/m ² /día	i.v.	7 días, 1-2 cursos (6 semanas)
	PDN	60 mg/m ² /día	Oral	
	2-CdA	1,5 mg/m ² /8 h	s.c.	7 días, 1-2 cursos (6 semanas)
CTX	40 mg/m ² /12 h	Oral		
ANTI-CD20	Rituximab	375 mg/m ² /día	i.v.	Cada 7 días, 4 semanas

comendados: agentes alquilantes (clorambucilo y ciclofosfamida), análogos de las purinas (fludarabina y 2-CdA) y anti-CD20 o combinaciones de los mismos. Todos estos fármacos tienen una eficacia similar, y la elección de uno u otro dependerá de las características del paciente y de la enfermedad. De hecho, actualmente se está llevando a cabo el primer estudio en fase III aleatorizado que compara la eficacia de clorambucilo y fludarabina⁶¹. El tratamiento de rescate también se basa en estos fármacos: o bien se reutiliza el mismo agente si la respuesta previa fue adecuada, o bien se cambia a uno alternativo o sus combinaciones si no se cumple ese supuesto. Otras posibilidades de segunda línea son el trasplante autólogo u otros fármacos en investigación. Es importante tener en cuenta que en aquellos pacientes jóvenes, candidatos a trasplante autólogo, debe limitarse el uso de agentes alquilantes y de análogos de las purinas con el fin de no dificultar la aféresis de células progenitoras.

Agentes alquilantes

Este grupo de fármacos es uno de los tratamientos de primera elección y, probablemente, el más utilizado

hasta el momento debido a su comodidad de uso y a su escaso coste. El principal representante es el clorambucilo, que se puede emplear en pauta continua o intermitente. Se utilizan bien solos o en combinación con prednisona. En un estudio comparativo lle-

Tabla 4. Actualización de las recomendaciones del panel de consenso para tratamiento de primera línea y rescate en macroglobulinemia (Fourth International Workshop on WM)

Tratamiento de primera línea

Alquilantes (ej. clorambucilo)*

Análogos de las purinas (ej. fludarabina o cladribina)*

Anticuerpos monoclonales (ej. rituximab)

Terapia de combinación*

Tratamiento de rescate

Reutilización o uso alternativo del agente de primera línea*

Terapia de combinación*

Talidomida ± esteroides

Bortezomib

Anticuerpos monoclonales (alemtuzumab)

Trasplante autólogo

*El uso de alquilantes y análogos de purinas debería estar limitado en pacientes elegibles para trasplante autólogo.

Tabla 5. Opciones terapéuticas de primera línea en pacientes con macroglobulinemia de Waldenström. Actualización de las recomendaciones del panel de consenso del IV Workshop Internacional de macroglobulinemia de Waldenström⁵⁸

Clase terapéutica	Agentes	Evidencia de eficacia ¹	Recomendación ³¹
Agentes alquilantes ^a	Clorambucilo	Ila	B
Análogos de las purinas ^a	Cladribina o fludarabina	Ila	B
Anticuerpos monoclonales	Rituximab (estándar o en programa extendido)	Ila	B
Análogos de las purinas más alquilantes ^a	Cladribina o fludarabina más ciclofosfamida	Ila	B
Análogos de las purinas más rituximab ^a	Fludarabina más rituximab	Ila	B
Análogos de las purinas más alquilantes y rituximab ^a	Cladribina, ciclofosfamida y rituximab	Ila	B
	Fludarabina, ciclofosfamida y rituximab	III	C
	Pentostatina, ciclofosfamida y rituximab	III	C
Terapias basadas en ciclofosfamida y tratamiento de combinación con rituximab	CHOP y rituximab	Ila	B
	Ciclofosfamida, dexametasona y rituximab	Ila	B
Drogas inmunomoduladoras y rituximab	Talidomida y rituximab	Ila	B

^aLa elección de la terapia más apropiada debería ser hecha teniendo en cuenta la candidatura del paciente a altas dosis de quimioterapia, dado que el uso prolongado tanto de agentes alquilantes como de análogos de las purinas es tóxico para las células madre hematopoyéticas.

vado a cabo en la Clínica Mayo, ninguna de las diferentes pautas de tratamiento con alquilantes (continuo o intermitente, con o sin esteroides) obtuvo beneficios respecto al resto⁶². La tasa de respuestas objetivas con este tratamiento se encuentra en torno a un 50-70%, con una duración media de la respuesta de 4 ó 5 años y un 43% de pacientes libres de progresión a los 5 años (28% a los 10 años)^{7,62}. Las respuestas son generalmente lentas (al menos se debe mantener el tratamiento durante 6 meses antes de suspenderlo por falta de respuesta)⁶², por lo que no es aconsejable emplearlos en enfermedades muy agresivas. No se debe olvidar el riesgo de desarrollar un síndrome mielodisplásico tras el tratamiento con alquilantes^{62,63} y la posible dificultad para recoger células progenitoras, por lo que su uso en pacientes jóvenes tiene que ser cuidadosamente evaluado.

Análogos de las purinas

Los análogos de las purinas (fludarabina y 2-CdA) han pasado a formar parte del tratamiento de primera línea de la MW gracias a los buenos resultados obtenidos en pacientes refractarios⁶⁴⁻⁶⁷. En los estudios llevados a cabo con estos fármacos en primera línea se obtuvieron unos resultados similares a los hallados con agentes alquilantes o incluso ligeramente superiores, ya que el porcentaje de respuestas varió entre el 40 y el 85%^{64,68-70}, y la duración de la misma fue de 40-50 meses. No se han observado diferencias importantes entre la utilización de la fludarabina o la cladribina (2-CdA), aunque parece que el segundo puede ser ligeramente más eficaz. Las respuestas obtenidas con estos fármacos, al contrario de lo que sucede con los

agentes alquilantes, son muy rápidas, por lo que pueden estar especialmente indicados en pacientes muy sintomáticos, con un síndrome de hiperviscosidad evidente o con gran infiltración tumoral.

A pesar de la eficacia que ha demostrado, esta familia de fármacos no está exenta de efectos adversos. Así, al igual que los alquilantes, tiene riesgo de mielodisplasia a largo plazo⁷¹ y producen una importante inmunosupresión con descenso de los linfocitos CD4 y CD8⁶⁹ que conlleva un alto riesgo de infecciones oportunistas^{72,73}.

Anti-CD20 (rituximab)

El clon tumoral de la MW expresa CD20 de forma intensa, lo que permite la utilización de rituximab como tratamiento en esta enfermedad. Varios estudios han demostrado la eficacia del rituximab en monoterapia en la MW, con un porcentaje de respuestas del 30-60%⁷⁴⁻⁷⁶, sin diferencias importantes entre pacientes de nuevo diagnóstico y previamente tratados. Además, el rituximab tiene la ventaja de facilitar la recuperación hematológica y de ser mucho menos tóxico que la quimioterapia convencional. Sin embargo, la duración de la respuesta es corta (7-16 meses)^{74,76}. Con la experiencia de los últimos años se ha visto que, en ocasiones, las máximas respuestas al rituximab tardan meses en aparecer, por lo que se están ensayando tratamientos prolongados con rituximab con el fin de mejorar las respuestas⁷⁷. Se ha descrito un aumento transitorio de la cantidad de paraproteína tras el inicio del tratamiento con rituximab (*flare* o "llamarada" de IgM)^{59,78}. Dicha elevación se normaliza, generalmente, en 3 ó 4 meses. Es importante que el clínico lo tenga en cuenta

Tabla 6. Opciones de tratamiento de rescate en macroglobulinemia de Waldenström. Recomendaciones del IV Workshop internacional de macroglobulinemia Waldenström⁴

Clase terapéutica	Agentes	Evidencia de eficacia ¹	Recomendación ²¹
Agentes alquilantes ^{a,b}	Clorambucilo	IIa	B
Análogos de las purinas ^{a,b}	Cladribina o fludarabina	Ib	A
Anticuerpos monoclonales ^b	Rituximab (estándar o en programa extendido)	IIa	B
	Alemtuzumab	IIa	B
Análogos de las purinas más alquilantes ^{a,b}	Cladribina o fludarabina más ciclofosfamida	IIa	B
Análogos de las purinas más rituximab ^{a,b}	Fludarabina más rituximab	IIa	B
Análogos de las purinas más alquilantes y rituximab ^{a,b}	Cladribina, ciclofosfamida y rituximab	IIb	B
	Fludarabina, ciclofosfamida y rituximab	III	C
	Pentostatina, ciclofosfamida y rituximab	III	C
Combinación de quimioterapia y rituximab	CHOP y rituximab	III	C
Talidomida	Talidomida sola o en combinación con dexametasona	IIa	B
Bortezomib	Bortezomib solo	IIa	B
Trasplante de progenitores hematopoyéticos ^c	Altas dosis de quimioterapia y trasplante autólogo de progenitores	IIa	B
	Trasplante alogénico	III	C

^aLa elección de la terapia más apropiada debería ser hecha teniendo en cuenta la candidatura del paciente a altas dosis de quimioterapia, dado que el uso prolongado tanto de agentes alquilantes como de análogos de las purinas es tóxico para las células madre hematopoyéticas. ^bLa reutilización del agente de primera línea o su combinación es razonable si se alcanzó una respuesta ≥ 1 año. De otro modo, se puede usar un agente alternativo solo o en combinación. ^cPara pacientes resistentes o refractarios que sean elegibles, el trasplante de progenitores autólogos es una opción razonable; el trasplante alogénico convencional o con acondicionamiento reducido debe llevar una cuidadosa evaluación coste-beneficio, y ser llevado a cabo en el seno de un ensayo clínico.

ta, porque en pacientes con un componente monoclonal inicial muy alto la llamada puede aumentar el nivel de IgM hasta niveles que provoquen el desarrollo de un síndrome de hiperviscosidad. De hecho, para estos pacientes se recomienda una plasmaféresis previa. Además, hay que tener paciencia y no caer en el error de interpretar este incremento paradójico como una progresión bajo tratamiento, que sería falsa.

Combinaciones

La principal novedad implantada en la reunión de París fue la introducción de combinaciones de alquilantes y análogos de las purinas entre sí o con rituximab entre los esquemas recomendados como tratamiento de primera línea. En este sentido, varios

estudios han combinado agentes alquilantes y análogos de las purinas (Tabla 7), con una tasa de respuestas globales superior al 78% en todos ellos y una supervivencia libre de progresión de unos 25-30 meses⁷⁹⁻⁸².

Sin embargo, ya se han ensayado numerosas combinaciones en las que el medicamento más frecuentemente utilizado es rituximab, que ha mejorado la tasa de respuestas globales, que se sitúa entre el 82 y el 94% (Tabla 8)⁸¹⁻⁸⁵. En la mayoría de estos estudios, la mediana de supervivencia aún no ha sido alcanzada. Aunque se han descrito efectos adversos, generalmente infecciosos, la mayoría de estos esquemas parecen bastante bien tolerados y, en nuestra opinión, deben ser el tratamiento de elección en pacientes jóvenes en los que se plantee una posible opción curativa.

Tabla 7. Combinaciones de alquilantes y análogos de purinas en el tratamiento de la MW

Estudio	Régimen	Respuesta global (%)	Duración de la respuesta (meses)
Laurentet <i>et al.</i> ⁷⁹	Cladribina + ciclofosfamida + prednisona	88	
Weber <i>et al.</i> ⁷⁰	Cladribina + ciclofosfamida	84	36
Tam <i>et al.</i> ⁸²	Fludarabina + ciclofosfamida	88	13
Tamburini <i>et al.</i> ⁸⁰	Fludarabina + ciclofosfamida	78	27

Tabla 8. Combinaciones que incluyen rituximab en el tratamiento de la MW

Estudio	Régimen	Respuesta global (%)	Duración de respuesta (meses)
Weber <i>et al.</i> ⁷⁰	Cladribina + ciclofosfamida + rituximab	94	+21
Tam <i>et al.</i> ⁸²	Fludarabina + ciclofosfamida + rituximab	80	+30
Hensel <i>et al.</i> ⁸⁴	Pentostatina + ciclofosfamida + rituximab	90	+12
Treon <i>et al.</i> ⁸⁵	CHOP + rituximab	84	
Dimopoulos <i>et al.</i> ⁸³	Ciclofosfamida + dexametasona + rituximab	83	+24
Thomas <i>et al.</i> ; 2007 ¹⁰⁶	Ciclofosfamida + dexametasona + rituximab	94 (17% RC)	59
Laszlo <i>et al.</i> ; 2007 ¹⁰⁷	Rituximab + cladribina s.c.	83%	–
Tedeschi <i>et al.</i> ; 2007 ¹⁰⁸	Rituximab + fludarabina + ciclofosfamida	79%	–
Vargatíf J, <i>et al.</i> ; 2007 ¹⁰⁹	Rituximab + fludarabina + ciclofosfamida	78%	8
Dimopoulos <i>et al.</i> ; 2007 ⁸³	Dexametasona, rituximab, ciclofosfamida	83%	+24
Abonour <i>et al.</i> ; 2007 ¹¹⁰	Rituximab and CHOP	91%	+18
Soumerai <i>et al.</i> ; 2007 ¹¹¹	Talidomida y rituximab (RT)	78%	42+
Soumerai <i>et al.</i> ; 2007 ¹¹²	Lenalidomida y rituximab	67%	16
Treon <i>et al.</i> ; 2007 ⁹⁰	Bortezomib solo	85%	78
Chen <i>et al.</i> ; 2007 ⁸⁹	Bortezomib	78%	–
Treon <i>et al.</i> ; 2007 ¹¹³	Bortezomib + dexametasona + rituximab (BDR)	96%	
Agathocleous <i>et al.</i> ; 2007 ¹¹⁴	Bortezomib + dexametasona + rituximab (BDR)		
Hunter <i>et al.</i> ; 2006 ¹¹⁵	Alemtuzumab	76%	

Otros tratamientos

La *talidomida* ha demostrado una gran eficacia en el tratamiento del MM, situación que ha hecho que, sola o en combinación con claritromicina y dexametasona, se haya testado en pacientes con MW^{86,87}. Los resultados obtenidos hasta ahora han demostrado eficacia en pacientes refractarios a otras líneas con una toxicidad no desdeñable, fundamentalmente en pacientes ancianos, por lo que, de momento, deber reservarse como tratamiento de rescate. Del mismo modo, varios estudios han demostrado efecto antitumoral de *bortezomib* en pacientes con MW refractaria, siendo la toxicidad más importante la neuropatía, en un 25% de pacientes aproximadamente⁸⁸⁻⁹⁰.

Como en otras enfermedades hematológicas, en algunos enfermos jóvenes y refractarios a otros tratamientos, también se ha usado el *trasplante de progenitores hematopoyéticos*, tanto autólogo⁹¹⁻⁹⁴ como alogénico^{91,94-97}. Uno de estos trabajos es un estudio retrospectivo de 36 casos (10 autólogos y 26 alogénicos) comunicados al Center for International Blood and Marrow Transplant Research entre 1986 y 2002⁹¹, en el cual se describe una mejor supervivencia global en los pacientes que reciben trasplante autólogo (70%)

en comparación con los sometidos a trasplante alogénico (46%), condicionada fundamentalmente por una mayor mortalidad relacionada con el trasplante en estos últimos (11 vs. 40% respectivamente). En conclusión, el trasplante autólogo sí puede ser un tratamiento de rescate para pacientes jóvenes, mientras que el trasplante alogénico debe utilizarse únicamente en el contexto de ensayos clínicos.

El tratamiento antitumoral se está basando, cada vez más, en fármacos dirigidos contra dianas específicas, y la MW no está exenta de este tipo de ensayos. En una reciente publicación⁹⁸ se revisan la mayoría de estos fármacos, entre los que se incluyen el alemtuzumab (anti-CD52), el zevalin (anti-CD20 marcado con itrio radiactivo), el epratuzumab (anti-CD22), el sildenafil y otros compuestos que interfieren con diferentes vías de señalización.

Tratamiento de soporte

En los pacientes con síntomas de hiperviscosidad, el tratamiento de elección es la plasmaféresis precoz^{99,100}, ya que pequeños descensos en el nivel de IgM producen una importante disminución de la viscosidad sanguínea. También los recambios plasmáticos han demostrado ser eficaces en la neuropatía por IgM¹⁰¹⁻¹⁰³.

Las plasmaféresis deben ser diarias, hasta que desaparezca la sintomatología, y después deben repetirse cada 1 ó 2 semanas. Sin embargo, no se pueden considerar un tratamiento de la MW, por lo que simultáneamente se debe iniciar tratamiento citostático para reducir la producción de IgM. En algunos enfermos la plasmaféresis puede estar indicada durante bastante tiempo, incluso indefinidamente, si la quimioterapia no es eficaz y se mantiene la clínica de hiperviscosidad.

Criterios de respuesta

La respuesta al tratamiento fue otro de los puntos de consenso más relevantes del 2.º Workshop Internacional de MW, ya que hasta la fecha había sido otro de los principales puntos de desencuentro entre los diferentes grupos, no sólo en los criterios de respuesta, sino también en cuanto a los métodos para determinarla. En el consenso alcanzado no sólo se consiguió acordar unos criterios concretos para definir la respuesta, sino que además se dieron varias recomendaciones para determinarla. Así, se recomendó usar la electroforesis mejor que la nefelometría para medir la proteína monoclonal, incluir la TC como necesaria para definir la respuesta (no así la RM o el PET), etc. Asimismo, se consideró que, a diferencia de las leucemias agudas, no es necesario el requisito de la recuperación hematológica en la definición de la respuesta al tratamiento, dado que la presencia de una o varias citopenias puede estar relacionada con muchos mecanismos, y no sólo la presencia de la MW.

En cuanto a la respuesta, quedó definida como:

- **Respuesta completa (RC):** desaparición del componente monoclonal en suero y en orina determinado por inmunofijación (IF), resolución de adenopatías y organomegalias, desaparición de signos y síntomas atribuibles a la MW (fiebre no explicada $\geq 38,4$ °C, sudoración nocturna, pérdida de peso $\geq 10\%$ del total corporal, hiperviscosidad o crioglobulinemia sintomática) y ausencia de células malignas mediante evaluación histológica de la médula ósea. Se debe confirmar a las 6 semanas.
- **Respuesta parcial (RP):** reducción del componente monoclonal sérico en $\geq 50\%$ medido con electroforesis, y reducción en $\geq 50\%$ de las organomegalias y adenopatías medidas por TC, sin aparición de síntomas o signos nuevos.
- **No evaluable (NE):** datos o tiempo transcurrido insuficientes como para determinar la respuesta.
- **Enfermedad progresiva (EP):** incremento del componente M en suero superior al 25% del nivel más bajo alcanzado en la respuesta (medido por electroforesis), confirmado al menos en otra investigación posterior, o progresión clínicamente significativa de los signos y síntomas relacionados.

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

Evolución y pronóstico

En general, la MW tiene un curso crónico y progresivo, con una supervivencia media superior a 5 años^{104,105} y con, al menos, un 30% de pacientes vivos a los 10 años del diagnóstico^{7,26,31,32}. No obstante, su evolución es variable. Así, hay casos que permanecen estables durante años y otros con comportamiento clínico agresivo y supervivencia inferior a un año. Hasta el momento se han propuesto varios sistemas para estratificar el pronóstico de los pacientes con MW^{7,31,32,64,104,105}, y en estos estudios, la presencia de enfermedad sintomática, edad avanzada, anemia, albúmina baja y β_2 -microglobulina alta confieren un pronóstico adverso. En el congreso de la Asociación Americana de Hematología que tuvo lugar en 2006, se propuso un IPSS (*international prognostic scoring system*) para WM en el que las variables de edad > 65 años, plaquetas $\leq 100 \times 10^9/L$, componente monoclonal > 70 g/L, hemoglobina ≤ 115 g/L y β_2 -microglobulina > 3 mg/L demostraron influir en el pronóstico¹⁰⁵. El grupo de bajo riesgo se define por la presencia de un factor adverso o ninguno, salvo la edad; el grupo intermedio, por la presencia de dos factores adversos o una edad > 65 años; y el grupo de alto riesgo, por la presencia de más de dos factores adversos. Estos grupos de riesgo tienen una supervivencia del 87%, 68% y 36%, respectivamente. Sin embargo, el 96% de estos pacientes sólo recibieron alquilantes, análogos de purinas o combinaciones como tratamiento inicial.

Hasta un tercio de los pacientes fallecen por causas no relacionadas con la MW. El resto se relacionan con la progresión de la enfermedad (hiperviscosidad, hemorragia, anemia hemolítica, etc.) y los procesos infecciosos secundarios a la inmunosupresión propia de la enfermedad y su tratamiento^{13,30}. Otras causas de muerte son la infiltración amiloidótica y el desarrollo de mielodisplasia, leucemias agudas secundarias y otras segundas neoplasias, entre las que destacan el cáncer de pulmón, el síndrome mielodisplásico y el cáncer de colon⁷.

Bibliografía

1. Owen RG, Treon SP, Al Katib A, et al. Clinicopathological definition of Waldenstrom's macroglobulinemia: consen-

- sus panel recommendations from the Second International Workshop on Waldenstrom's Macroglobulinemia. *Semin Oncol* 2003; 30: 110-5.
2. Harris NL, Jaffe ES, Stein H et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994; 84: 1361-92.
 3. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC Press; 2001.
 4. Waldenström J. Incipient myelomatosis or "essential" hyperglobulinemia with fibrinogenopenia, a new syndrome? *Acta Med Scand* 1944; 117: 217-47.
 5. Groves FD, Travis LB, Devesa SS, Ries LA, Fraumeni JF, Jr. Waldenstrom's macroglobulinemia: incidence patterns in the United States, 1988-1994. *Cancer* 1998; 82: 1078-81.
 6. Herrinton LJ, Weiss NS. Incidence of Waldenstrom's macroglobulinemia. *Blood* 1993; 82: 3148-50.
 7. García-Sanz R, Montoto S, Torrequebrada A, et al. Waldenstrom macroglobulinaemia: presenting features and outcome in a series with 217 cases. *Br J Haematol* 2001; 115: 575-82.
 8. McMaster ML. Familial Waldenstrom's macroglobulinemia. *Semin Oncol* 2003; 30: 146-52.
 9. McMaster ML, Giambaresi T, Vásquez L, Goldstein AM, Tucker MA. Cytogenetics of familial Waldenstrom's macroglobulinemia: in pursuit of an understanding of genetic predisposition. *Clin Lymphoma* 2005; 5: 230-4.
 10. McMaster ML, Goldin LR, Bai Y, et al. Genomewide linkage screen for Waldenstrom macroglobulinemia susceptibility loci in high-risk families. *Am J Hum Genet* 2006; 79: 695-701.
 11. Treon SP, Hunter ZR, Aggarwal A, et al. Characterization of familial Waldenstrom's macroglobulinemia. *Ann Oncol* 2006; 17: 488-94.
 12. Cesana C, Klersy C, Barbarano L, et al. Prognostic factors for malignant transformation in monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1625-34.
 13. Ghobrial IM, Gertz MA, Fonseca R. Waldenstrom macroglobulinaemia. *Lancet Oncol* 2003; 4: 679-85.
 14. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2002; 346: 564-9.
 15. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al. Long-term follow-up of IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Semin Oncol* 2003; 30: 169-71.
 16. Martín-Jiménez P, García-Sanz R, Balanzategui A, et al. Molecular characterization of heavy chain immunoglobulin gene rearrangements in Waldenstrom's macroglobulinemia and IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Haematologica* 2007; 92: 635-42.
 17. García R, Hernández JM, Caballero MD, González M, San Miguel JF. Immunoblastic lymphoma and associated non-lymphoid malignancies following two cases of Waldenstrom's macroglobulinemia. A review of the literature. *Eur J Haematol* 1993; 50: 299-301.
 18. Harousseau JL, Flandrin G, Tricot G, et al. Malignant lymphoma supervening in chronic lymphocytic leukemia and related disorders. Richter's syndrome: a study of 25 cases. *Cancer* 1981; 48: 1302-8.
 19. Lin P, Bueso-Ramos C, Wilson CS, Mansoor A, Medeiros LJ. Waldenstrom macroglobulinemia involving extramedullary sites: morphologic and immunophenotypic findings in 44 patients. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 1104-13.
 20. Sahota SS, Forconi F, Ottensmeier CH, et al. Typical Waldenstrom macroglobulinemia is derived from a B-cell arrested after cessation of somatic mutation but prior to isotype switch events. *Blood* 2002; 100: 1505-7.
 21. Kriangkum J, Taylor BJ, Treon SP, et al. Clonotypic IgM V/D/J sequence analysis in Waldenstrom macroglobulinemia suggests an unusual B-cell origin and an expansion of polyclonal B cells in peripheral blood. *Blood* 2004; 104: 2134-42.
 22. Martín-Jiménez P, García-Sanz R, Sarasquete ME, et al. Functional class switch recombination may occur 'in vivo' in Waldenstrom macroglobulinaemia. *Br J Haematol* 2007; 136: 114-6.
 23. Babbage G, Townsend M, Zojer N, et al. IgM-expressing Waldenstrom's macroglobulinemia tumor cells reveal a potential for isotype switch events in vivo. *Leukemia* 2007; 21: 827-30.
 24. Ciric B, VanKeulen V, Rodríguez M, et al. Clonal evolution in Waldenstrom macroglobulinemia highlights functional role of B-cell receptor. *Blood* 2001; 97: 321-3.
 25. Fonseca R, Hayman S. Waldenstrom macroglobulinaemia. *Br J Haematol* 2007; 138: 700-20.
 26. Dimopoulos MA, Alexanian R. Waldenstrom's macroglobulinemia. *Blood* 1994; 83: 1452-9.
 27. Kyle RA, Treon SP, Alexanian R, et al. Prognostic markers and criteria to initiate therapy in Waldenstrom's macroglobulinemia: consensus panel recommendations from the Second International Workshop on Waldenstrom's Macroglobulinemia. *Semin Oncol* 2003; 30: 116-20.
 28. Bjorkholm M, Johansson E, Papamichael D, et al. Patterns of clinical presentation, treatment, and outcome in patients with Waldenstrom's macroglobulinemia: a two-institution study. *Semin Oncol* 2003; 30: 226-30.
 29. Gertz MA, Fonseca R, Rajkumar SV. Waldenstrom's macroglobulinemia. *Oncologist* 2000; 5: 63-7.
 30. Dimopoulos MA, Panayiotidis P, Mouloupoulos LA, Sfakakis P, Dalakas M. Waldenstrom's macroglobulinemia: clinical features, complications, and management. *J Clin Oncol* 2000; 18: 214.
 31. Facon T, Brouillard M, Duhamel A, et al. Prognostic factors in Waldenstrom's macroglobulinemia: a report of 167 cases. *J Clin Oncol* 1993; 11: 1553-8.
 32. Gobbi PG, Bettini R, Montecucco C, et al. Study of prognosis in Waldenstrom's macroglobulinemia: a proposal for a simple binary classification with clinical and investigational utility. *Blood* 1994; 83: 2939-45.
 33. Brouet JC, Clauvel JP, Danon F, Klein M, Seligmann M. Biologic and clinical significance of cryoglobulins. A report of 86 cases. *Am J Med* 1974; 57: 775-88.
 34. Kyle RA, Garton JP. The spectrum of IgM monoclonal gammopathy in 430 cases. *Mayo Clin Proc* 1987; 62: 719-31.
 35. Dellagi K, Dupouey P, Brouet JC, et al. Waldenstrom's macroglobulinemia and peripheral neuropathy: a clinical and immunologic study of 25 patients. *Blood* 1983; 62: 280-5.
 36. Latov N, Sherman WH, Nemni R, et al. Plasma-cell dyscrasia and peripheral neuropathy with a monoclonal antibody to peripheral-nerve myelin. *N Engl J Med* 1980; 303: 618-21.
 37. Nobile-Orazio E, Marmiroli P, Baldini L, et al. Peripheral neuropathy in macroglobulinemia: incidence and antigen-specificity of M proteins. *Neurology* 1987; 37: 1506-14.
 38. Gertz MA, Kyle RA. Amyloidosis with IgM monoclonal gammopathies. *Semin Oncol* 2003; 30: 325-8.
 39. Forget BG, Squires JW, Sheldon H. Waldenstrom's macroglobulinemia with generalized amyloidosis. *Arch Intern Med* 1966; 118: 363-75.
 40. Whittaker SJ, Bhogal BS, Black MM. Acquired immunobullous disease: a cutaneous manifestation of IgM macroglobulinaemia. *Br J Dermatol* 1996; 135: 283-6.
 41. Barriere H, Schnitzler L, Moulin G, Grolleau Y. [Chronic urticarial lesions and macroglobulinemia. Apropos of 5 cases]. *Sem Hop* 1976; 52: 221-7.
 42. Bartl R, Frisch B, Mahl G, et al. Bone marrow histology in Waldenstrom's macroglobulinaemia. Clinical relevance of subtype recognition. *Scand J Haematol* 1983; 31: 359-75.

43. Dutcher T, Fahey J. The histopathology of the macroglobulinemia of Waldenstrom. *J Natl Cancer Inst* 1959; 22: 887-917.
44. Feiner HD, Rizk CC, Finfer MD, et al. IgM monoclonal gammopathy/Waldenstrom's macroglobulinemia: a morphological and immunophenotypic study of the bone marrow. *Mod Pathol* 1990; 3: 348-56.
45. Owen RG, Barrans SL, Richards SJ, et al. Waldenstrom macroglobulinemia. Development of diagnostic criteria and identification of prognostic factors. *Am J Clin Pathol* 2001; 116: 420-8.
46. Ocio EM, Hernández JM, Mateo G, et al. Immunophenotypic and cytogenetic comparison of Waldenstrom's macroglobulinemia with splenic marginal zone lymphoma. *Clin Lymphoma* 2005; 5: 241-5.
47. San Miguel JF, Vidriales MB, Ocio E, et al. Immunophenotypic analysis of Waldenstrom's macroglobulinemia. *Semin Oncol* 2003; 30: 187-95.
48. Owen RG, Parapia LA, Higginson J, et al. Clinicopathological correlates of IgM paraproteinemias. *Clin Lymphoma* 2000; 1: 39-43.
49. Ocio EM, Mateo G, Vidriales B, et al. Cell cycle analysis of Waldenstrom's macroglobulinemia. *Clin Lymphoma* 2005; 5: 250-2.
50. Ocio EM, Schop RF, González B, et al. 6q deletion in Waldenstrom macroglobulinemia is associated with features of adverse prognosis. *Br J Haematol* 2007; 136: 80-6.
51. Schop RF, Kuehl WM, Van Wier SA, et al. Waldenstrom macroglobulinemia neoplastic cells lack immunoglobulin heavy chain locus translocations but have frequent 6q deletions. *Blood* 2002; 100: 2996-3001.
52. Chang H, Samiee S, Li D, et al. Analysis of IgH translocations, chromosome 13q14 and 17p13.1(p53) deletions by fluorescence in situ hybridization in Waldenstrom's macroglobulinemia: a single center study of 22 cases. *Leukemia* 2004; 18: 1160-2.
53. Schop RF, Jalal SM, Van Wier SA, et al. Deletions of 17p13.1 and 13q14 are uncommon in Waldenstrom macroglobulinemia clonal cells and mostly seen at the time of disease progression. *Cancer Genet Cytogenet* 2002; 132: 55-60.
54. Avet-Loiseau H, Garand R, Lode L, Harousseau JL, Bataille R. Translocation t(11;14)(q13;q32) is the hallmark of IgM, IgE, and nonsecretory multiple myeloma variants. *Blood* 2003; 101: 1570-1.
55. Offit K, Parsa NZ, Filippa D, Jhanwar SC, Chaganti RS. t(9;14)(p13;q32) denotes a subset of low-grade non-Hodgkin's lymphoma with plasmacytoid differentiation. *Blood* 1992; 80: 2594-9.
56. MacLennan IC. In which cells does neoplastic transformation occur in myelomatosis? *Curr Top Microbiol Immunol* 1992; 182: 209-14.
57. García-Sanz R, Montoto S, Torrequebrada A, et al. Waldenstrom macroglobulinaemia: presenting features and outcome in a series with 217 cases. *Br J Haematol* 2001; 115: 575-82.
58. Dimopoulos MA, Gertz MA, Kastridis E, et al. Update on Treatment Recommendations from the Fourth International Workshop on Waldenström's Macroglobulinemia [abstract]. *J Clin Oncol* 2008 (in press).
59. Gertz MA, Anagnostopoulos A, Anderson K, et al. Treatment recommendations in Waldenstrom's macroglobulinemia: consensus panel recommendations from the Second International Workshop on Waldenstrom's Macroglobulinemia. *Semin Oncol* 2003; 30: 121-6.
60. Treon SP, Gertz MA, Dimopoulos M, et al. Update on treatment recommendations from the Third International Workshop on Waldenstrom's macroglobulinemia. *Blood* 2006; 107: 3442-6.
61. Johnson SA, Owen RG, Oscier DG, et al. Phase III study of chlorambucil versus fludarabine as initial therapy for Waldenstrom's macroglobulinemia and related disorders. *Clin Lymphoma* 2005; 5: 294-7.
62. Kyle RA, Greipp PR, Gertz MA, et al. Waldenstrom's macroglobulinaemia: a prospective study comparing daily with intermittent oral chlorambucil. *Br J Haematol* 2000; 108: 737-42.
63. Horsman DE, Card RT, Skinnider LF. Waldenstrom macroglobulinemia terminating in acute leukemia: a report of three cases. *Am J Hematol* 1983; 15: 97-101.
64. Dhodapkar MV, Jacobson JL, Gertz MA, et al. Prognostic factors and response to fludarabine therapy in patients with Waldenstrom macroglobulinemia: results of United States intergroup trial (Southwest Oncology Group S9003). *Blood* 2001; 98: 41-8.
65. Dimopoulos MA, Kantarjian H, Estey E, et al. Treatment of Waldenstrom macroglobulinemia with 2-chlorodeoxyadenosine. *Ann Intern Med* 1993; 118: 195-8.
66. Hellmann A, Lewandowski K, Zaucha JM, et al. Effect of a 2-hour infusion of 2-chlorodeoxyadenosine in the treatment of refractory or previously untreated Waldenstrom's macroglobulinemia. *Eur J Haematol* 1999; 63: 35-41.
67. Leblond V, Ben Othman T, Deconinck E, et al. Activity of fludarabine in previously treated Waldenstrom's macroglobulinemia: a report of 71 cases. *Groupe Cooperatif Macroglobulinemie. J Clin Oncol* 1998; 16: 2060-4.
68. Foran JM, Rohatiner AZ, Coiffier B, et al. Multicenter phase II study of fludarabine phosphate for patients with newly diagnosed lymphoplasmacytoid lymphoma, Waldenstrom's macroglobulinemia, and mantle-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 1999; 17: 546-3.
69. Dimopoulos MA, Kantarjian H, Weber D, et al. Primary therapy of Waldenstrom's macroglobulinemia with 2-chlorodeoxyadenosine. *J Clin Oncol* 1994; 12: 2694-8.
70. Weber DM, Dimopoulos MA, Delasalle K, et al. 2-chlorodeoxyadenosine alone and in combination for previously untreated Waldenstrom's macroglobulinemia. *Semin Oncol* 2003; 30: 243-7.
71. Van Den NE, Louviaux I, Michaux JL, et al. Myelodysplastic syndrome with monosomy 5 and/or 7 following therapy with 2-chloro-2'-deoxyadenosine. *Br J Haematol* 1999; 105: 268-70.
72. Cheson BD. Infectious and immunosuppressive complications of purine analog therapy. *J Clin Oncol* 1995; 13: 2431-8.
73. Van Den NE, Delannoy A, Vandercam B, et al. Infectious complications after 2-chlorodeoxyadenosine therapy. *Eur J Haematol* 1996; 56: 235-40.
74. Byrd JC, White CA, Link B, et al. Rituximab therapy in Waldenstrom's macroglobulinemia: Preliminary evidence of clinical activity. *Ann Oncol* 1999; 10: 1525-7.
75. Gertz MA, Rue M, Blood E, et al. Multicenter phase 2 trial of rituximab for Waldenstrom macroglobulinemia (WM): an Eastern Cooperative Oncology Group Study (E3A98). *Leuk Lymphoma* 2004; 45: 2047-55.
76. Treon SP, Agus DB, Link B, et al. CD20-directed antibody-mediated immunotherapy induces responses and facilitates hematologic recovery in patients with Waldenstrom's macroglobulinemia. *J Immunother* 2001; 24: 272-9.
77. Treon SP, Emmanouilides C, Kimby E, et al. Extended rituximab therapy in Waldenstrom's macroglobulinemia. *Ann Oncol* 2005; 16: 132-8.
78. Treon SP, Branagan AR, Hunter Z, et al. Paradoxical increases in serum IgM and viscosity levels following rituximab in Waldenstrom's macroglobulinemia. *Ann Oncol* 2004; 15: 1481-3.
79. Laurencet FM, Zulian GB, Guetty-Alberto M, et al. Cladribine with cyclophosphamide and prednisone in the management of low-grade lymphoproliferative malignancies. *Br J Cancer* 1999; 79: 1215-9.

80. Tamburini J, Levy V, Chaletix C, et al. Fludarabine plus cyclophosphamide in Waldenstrom's macroglobulinemia: results in 49 patients. *Leukemia* 2005; 19: 1831-4.
81. Weber D, Treon SP, Emmanouilides C, et al. Uniform response criteria in Waldenstrom's macroglobulinemia: consensus panel recommendations from the Second International Workshop on Waldenstrom's Macroglobulinemia. *Semin Oncol* 2003; 30: 127-31.
82. Tam CS, Wolf MM, Westerman D, et al. Fludarabine combination therapy is highly effective in first-line and salvage treatment of patients with Waldenstrom's macroglobulinemia. *Clin Lymphoma Myeloma* 2005; 6: 136-9.
83. Dimopoulos MA, Anagnostopoulos A, Kyrtonis MC, et al. Primary treatment of Waldenstrom macroglobulinemia with dexamethasone, rituximab, and cyclophosphamide. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3344-9.
84. Hensel M, Villalobos M, Kornacker M, Krasniqi F, Ho AD. Pentostatin/cyclophosphamide with or without rituximab: an effective regimen for patients with Waldenstrom's macroglobulinemia/lymphoplasmacytic lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma* 2005; 6: 131-5.
85. Treon SP, Hunter Z, Barnagan AR. CHOP plus rituximab therapy in Waldenstrom's macroglobulinemia. *Clin Lymphoma* 2005; 5: 273-7.
86. Coleman M, Leonard J, Lyons L, Szelenyi H, Niesvizky R. Treatment of Waldenstrom's macroglobulinemia with clarithromycin, low-dose thalidomide, and dexamethasone. *Semin Oncol* 2003; 30: 270-4.
87. Dimopoulos MA, Tsatalas C, Zomas A, et al. Treatment of Waldenstrom's macroglobulinemia with single-agent thalidomide or with the combination of clarithromycin, thalidomide and dexamethasone. *Semin Oncol* 2003; 30: 265-9.
88. Dimopoulos MA, Anagnostopoulos A, Kyrtonis MC, et al. Treatment of relapsed or refractory Waldenstrom's macroglobulinemia with bortezomib. *Haematologica* 2005; 90: 1655-8.
89. Chen CI, Kouroukis CT, White D, et al. Bortezomib is active in patients with untreated or relapsed Waldenstrom's macroglobulinemia: a phase II study of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1570-5.
90. Treon SP, Hunter ZR, Matous J et al. Multicenter clinical trial of bortezomib in relapsed/refractory Waldenstrom's macroglobulinemia: results of WMCTG Trial 03-248. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 3320-5.
91. Anagnostopoulos A, Hari PN, Pérez WS, et al. Autologous or allogeneic stem cell transplantation in patients with Waldenstrom's macroglobulinemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12: 845-54.
92. Desikan R, Dhodapkar M, Siegel D, et al. High-dose therapy with autologous haemopoietic stem cell support for Waldenstrom's macroglobulinaemia. *Br J Haematol* 1999; 105: 993-6.
93. Dreger P, Glass B, Kuse R, et al. Myeloablative radiochemotherapy followed by reinfusion of purged autologous stem cells for Waldenstrom's macroglobulinaemia. *Br J Haematol* 1999; 106: 115-8.
94. Toumilhac O, Leblond V, Tabrizi R, et al. Transplantation in Waldenstrom's macroglobulinemia – the French experience. *Semin Oncol* 2003; 30: 291-6.
95. Martino R, Shah A, Romero P, et al. Allogeneic bone marrow transplantation for advanced Waldenstrom's macroglobulinemia. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 747-9.
96. Anagnostopoulos A, Dimopoulos MA, Aleman A, et al. High-dose chemotherapy followed by stem cell transplantation in patients with resistant Waldenstrom's macroglobulinemia. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27: 1027-9.
97. Anagnostopoulos A, Aleman A, Giralt S. Autologous and allogeneic stem cell transplantation in Waldenstrom's macroglobulinemia: review of the literature and future directions. *Semin Oncol* 2003; 30: 286-90.
98. Treon SP, Hatjiharissi E, Leleu X et al. Novel agents in the treatment of Waldenstrom's macroglobulinemia. *Clin Lymphoma Myeloma* 2007; 7 (Suppl 5): S199-S206.
99. Avnstorp C, Nielsen H, Drachmann O, Hippe E. Plasmapheresis in hyperviscosity syndrome. *Acta Med Scand* 1985; 217: 133-7.
100. Buskard NA, Galton DA, Goldman JM, et al. Plasma exchange in the long-term management of Waldenstrom's macroglobulinemia. *Can Med Assoc J* 1977; 117: 135-7.
101. Dyck PJ, Low PA, Windebank AJ, et al. Plasma exchange in polyneuropathy associated with monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 1991; 325: 1482-6.
102. Gorson KC. Clinical features, evaluation, and treatment of patients with polyneuropathy associated with monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS). *J Clin Apheresis* 1999; 14: 149-53.
103. Wicklund MP, Kissel JT. Paraproteinemic Neuropathy 2001; 3: 147-56.
104. Merlini G, Baldini L, Broglia C, et al. Prognostic factors in symptomatic Waldenstrom's macroglobulinemia. *Semin Oncol* 2003; 30: 211-5.
105. Morel P, Duhamel A, Gobbi P, et al. International Prognostic Scoring System (IPSS) for Waldenstrom's macroglobulinemia (WM). [abstract]. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2007; 108: 127a.
106. Thomas SK, Delasalle KB, Gavino M, et al. 2-CDA-cyclophosphamide ± rituximab for symptomatic WM [abstract]. *Haematologica-The Hematology Journal* 2007; 92: 228.
107. Laszlo D, Rabascio R, Andreola G, et al. Expression of the human concentrative nucleotide transporter (hCNT1) gene correlates with clinical response in patients affected by Waldenstrom's macroglobulinemia (WM), undergoing a combination treatment with cladribine (2-CdA) and rituximab [abstract]. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2007; 110: 1357a.
108. Tedeschi A, Miqueleiz S, Ricci F, et al. Fludarabine, cyclophosphamide and rituximab in Waldenstrom's macroglobulinemia: an effective regimen requiring a new category of response criteria and a delayed assessment of results [abstract]. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2007; 110: 1290a.
109. Vargaftig J, Pegourie-Bandelier B, Mahe B, et al. Fludarabine plus cyclophosphamide and rituximab (RFC) in Waldenstrom's macroglobulinemia (WM): results in 25 patients [abstract]. *Haematologica-The Hematology Journal* 2007; 92: 227.
110. Abonour R, Zhang LA, Rajkumar SV, et al. Phase II pilot study of rituximab + CHOP in patients with newly diagnosed Waldenstrom's macroglobulinemia, an eastern cooperative oncology group trial (Study E1A02) [abstract]. *Blood* 2008; 110: 3616.
111. Soumerai JD, Branagan AR, Patterson CJ, Hunter ZR, Treon SP. Long-term responses to thalidomide and rituximab in Waldenstrom's macroglobulinemia. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2007; 25: 8017.
112. Soumerai JD, Branagan AR, Hunter ZR, et al. Use of the immunomodulators thalidomide and lenalidomide to augment rituximab clinical activity in Waldenstrom's macroglobulinemia [abstract]. *Haematologica* 2007; 99: 95.
113. Treon SP, Soumerai J, Hunter Z, et al. Novel agents in the treatment of Waldenstrom's macroglobulinemia: update of WMCTG clinical trials [abstract]. *Haematologica* 2008; 92.
114. Agathocleous A, Rule S, Johnson P, et al. Preliminary results of a phase i/ii study of weekly or twice weekly bortezomib in combination with rituximab, in patients with follicular lymphoma, mantle cell lymphoma and Waldenstrom's macroglobulinaemia [abstract]. *Blood* 2008; 110: 2559a.
115. Hunter ZR, Boxer M, Kahl B, et al. Phase II study of alemtuzumab in lymphoplasmacytic lymphoma: results of WMCTG trial 02-079 [abstract]. *J Clin Oncol* 2006; 24: 7523.

POEMS SYNDROME: DIAGNOSIS AND TREATMENT

A. DISPENZIERI

*Division of Hematology and Internal Medicine.
Mayo Clinic. Rochester, MN. USA.*

Introduction

POEMS syndrome, also known as Crow-Fukase Syndrome, and Takatsuki syndrome, is a paraneoplastic disorder associated with an underlying plasma cell dyscrasia. The acronym POEMS (polyneuropathy, organomegaly, endocrinopathy, M protein, and skin changes) captures several dominant features of the syndrome, but excludes other important traits like elevated levels of vascular endothelial growth factor, sclerotic bone lesions, Castleman's disease, papilledema, peripheral edema, ascites, effusions, thrombocytosis, polycythemia, fatigue, clubbing and abnormal pulmonary function test. The major clinical feature of the syndrome is a chronic progressive polyneuropathy with a predominant motor disability¹. Although the majority of patients have osteosclerotic myeloma, these same patients usually have only 5% bone marrow plasma cells or less (almost always monoclonal λ), and rarely have anemia, hypercalcemia or renal insufficiency. These characteristics and the superior median survival differentiate POEMS syndrome from multiple myeloma.

Pathogenesis

The pathogenesis of this multisystem disease is complex. Elevations of vascular endothelial growth factor and pro-inflammatory cytokines are the hallmark of this disorder¹. Little is known about the plasma cells except that more than 95% of the time they are λ light chain restricted with restricted V λ 1 germline gene usage^{2,3}. POEMS is not an immunoglobulin deposition disease. Aneuploidy and deletion of chromosome 13 have been described⁴.

Clinical features

Table 1 includes criteria for a diagnosis of POEMS syndrome^{5,6}. The peak incidence of the POEMS syndrome is in the 5th and 6th decades. Symptoms of peripheral neuropathy usually dominate the clinical picture. Symptoms begin in the feet and consist of tingling, paresthesias, and coldness. Motor involvement follows the sensory symptoms, and the former usually overshadows the latter. Both are distal, symmetric, and progressive with a gradual proximal spread. Severe weakness occurs in more than one-half of patients and results in inability to climb stairs, arise from a chair, or grip objects firmly with their hands. Impotence occurs, but autonomic symptoms are not a feature. The cranial nerves are not involved except for papilledema. Bone pain and fractures rarely occur. Patients report fatigue, which

Table 1. Criteria for the diagnosis of POEMS syndrome*

Major criteria	1. Polyneuropathy (typically demyelinating)
	2. Monoclonal plasma cell-proliferative disorder (almost always λ)
	3. Castleman's disease
	4. Sclerotic bone lesions
	5. Vascular endothelial growth factor elevation
Minor criteria	6. Organomegaly (splenomegaly, hepatomegaly, or lymphadenopathy)
	7. Extravascular volume overload (edema, pleural effusion, or ascites)
	8. Endocrinopathy (adrenal, thyroid, ^a pituitary, gonadal, parathyroid, pancreatic ^a)
	9. Skin changes (hyperpigmentation, hypertrichosis, glomeruloid hemangiomas, plethora, acrocyanosis, flushing, white nails)
	10. Papilledema
	11. Thrombocytosis/polycythemia ^b
Other symptoms and signs	Clubbing, weight loss, hyperhidrosis, pulmonary hypertension/restrictive lung disease, thrombotic diatheses, diarrhea, low vitamin B ₁₂ values
Possible associations	Arthralgias, cardiomyopathy (systolic dysfunction), and fever

POEMS: polyneuropathy, organomegaly, endocrinopathy, M protein, skin changes.

*Polyneuropathy and monoclonal plasma cell disorder or Castleman's disease present in all patients; to make diagnosis at least one other major criterion and 1 minor criterion is required to make diagnosis, once other diagnoses have been excluded.

^aBecause of the high prevalence of diabetes mellitus and thyroid abnormalities, this diagnosis alone is not sufficient to meet this minor criterion.

^bAnemia and/or thrombocytopenia are distinctively unusual in this syndrome unless Castleman's disease is present.

may be cytokine mediated or due to associated respiratory disease.

Hyperpigmentation is common. Coarse black hair may appear on the extremities. Other skin changes include skin thickening, rapid accumulation of glomeruloid angiomas, flushing, dependent rubor or acrocyanosis, white nails and clubbing. Testicular atrophy and gynecomastia may be present in men and galactorrhea in women. Pitting edema of the lower extremities is common. Ascites and pleural effusion occur in approximately one-third of patients. The liver is palpable in almost one-half of patients but splenomegaly and lymphadenopathy is found in fewer patients. On lymph node biopsy, in 11-30% the histology is angiofollicular lymph node hyperplasia (Castleman's disease) or Castleman's disease-like¹.

Patients appear to be at increased risk for arterial and/or venous thromboses during their course, with nearly 20% of patients experiencing one of these complications^{1,7}.

Laboratory investigations

Thrombocytosis is common, and polycythemia may be seen. Anemia and thrombocytopenia are not characteristic unless there is co-existing Castleman's disease. Hypercalcemia and renal insufficiency are rarely present. The size of the M-protein on electrophoresis is small (median 1.1 g/dL) and is rarely more than 3.0 g/dL. The M-protein is usually IgG or IgA and almost always of the lambda type. Renal dysfunction is usually not a dominant feature of this syndrome, but it is more common in those patients who have co-existing Castleman's disease. In our experience only 9% of patients have proteinuria exceeding 0.5 g/24 hours and 6% have a serum creatinine greater than or equal to 1.5 mg/dL. The renal histology is diverse with membranoproliferative features and evidence of endothelial injury being most common^{1,8}. Protein levels in the cerebrospinal fluid are elevated in virtually all patients. Bone marrow usually contains < 5% plasma cells, and when clonal cells are found they are almost always monoclonal λ .

Osteosclerotic lesions occur in approximately 95% of patients, and can be confused with benign bone islands, aneurysmal bone cysts, non-ossifying fibromas, and fibrous dysplasia. Some lesions are densely sclerotic, while others are lytic with a sclerotic rim, while still others have a mixed soap-bubble appearance. Bone windows of CT body images are often very informative. FDG-avidity is variable.

Endocrinopathy is a central but poorly understood feature of POEMS. In a recent large series from the Mayo Clinic⁹, approximately 84% of patients had a recognized endocrinopathy, with hypogonadism as the most common endocrine abnormality, followed

by thyroid abnormalities, glucose metabolism abnormalities, and lastly by adrenal insufficiency. The majority of patients have evidence of multiple endocrinopathies in the four major endocrine axes (gonadal, thyroid, glucose and adrenal).

Nerve conduction studies and electromyography demonstrate a polyneuropathy with prominent demyelination as well as features of axonal degeneration, which can be similar to the findings of patients with chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (CIDP).

The pulmonary manifestations are protean, including pulmonary hypertension, restrictive lung disease, impaired neuromuscular respiratory function, and impaired diffusion capacity of carbon monoxide, but improve with effective therapy^{10,11}. In a series of 20 patients with POEMS, followed over a 10-year period, 25% manifested pulmonary hypertension¹⁰. Whether the digital clubbing seen in POEMS is a reflection of underlying pulmonary hypertension and/or parenchymal disease is yet to be determined.

Differential diagnosis

The dominant feature of this syndrome is typically the peripheral neuropathy, and not infrequently patients are initially diagnosed with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP) or, less frequently, Guillain-Barré. An algorithm for making the diagnosis is shown in Figure 1. If a monoclonal protein is detected, monoclonal gammopathy associated peripheral neuropathy and AL amyloidosis are considered. The two best ways to distinguish POEMS from these entities is to measure a plasma or serum VEGF level and to determine whether there are other POEMS syndrome symptoms or signs.

Prognosis

The course of POEMS syndrome is usually chronic with reported median survivals ranges from 33 months to nearly 14 years. The number of POEMS features does not affect survival^{1,12}. In our experience, only fingernail clubbing and extravascular volume overload, i.e. effusions, edema, and ascites, were significantly associated with a shorter overall survival. More recently, we have identified respiratory symptoms to be predictive of adverse outcome¹¹.

Therapy

Our treatment approach is outlined in Figure 2, but there are no randomized controlled trials in patients

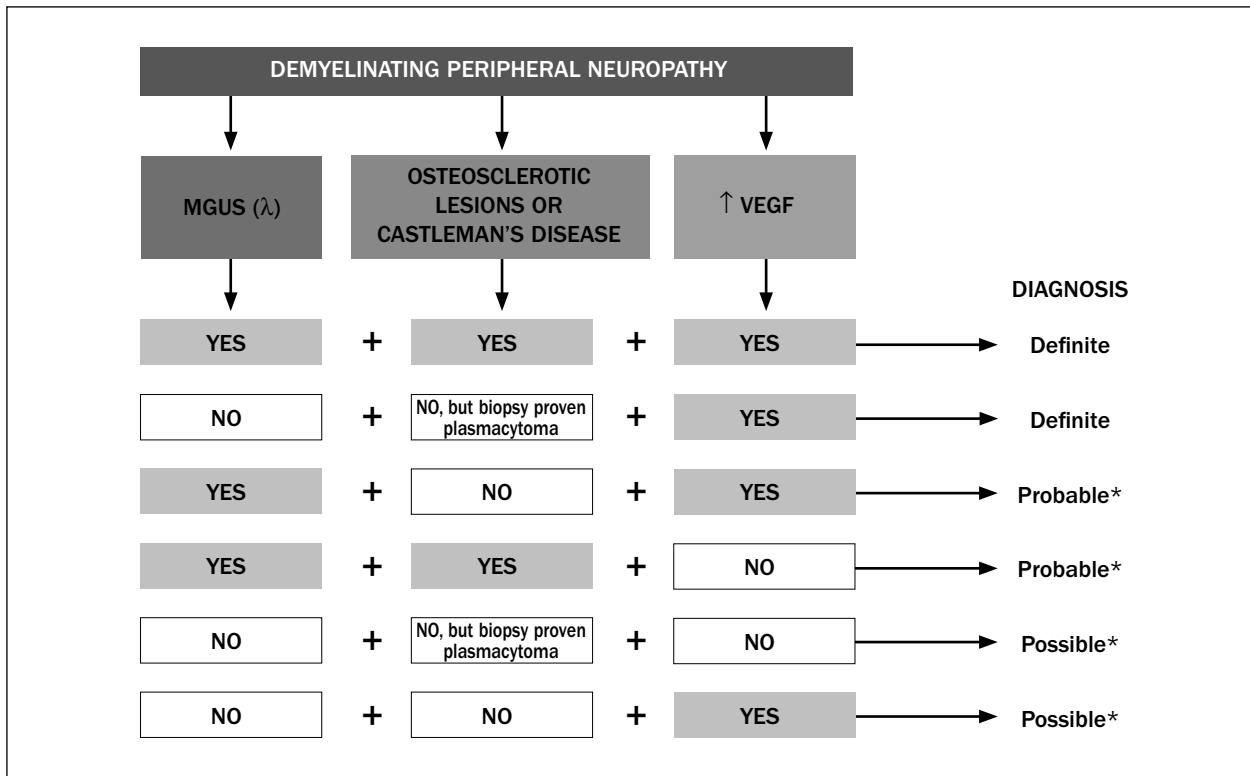


Figure 1. Algorithm for making a diagnosis of POEMS syndrome.
*Consider other features defined in Table 1 to make diagnosis.

with POEMS. Information about benefits of therapy is most typically derived retrospectively. Given these limitations, however, there are therapies which benefit patients with POEMS syndrome, including radiation therapy, alkylator based therapies, and corticoste-

roids¹. Intensive supportive care measures must also be instituted. Single or multiple osteosclerotic lesions in a limited area should be treated with radiation. If a patient has widespread osteosclerotic lesions or diffuse bone marrow plasmacytosis, systemic therapy is

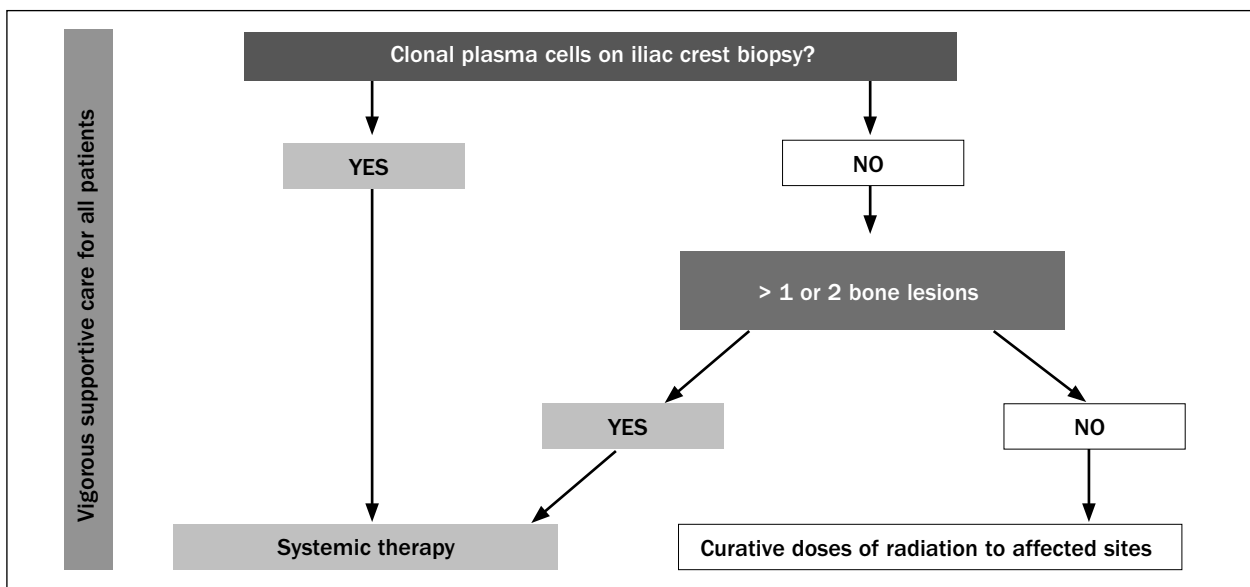


Figure 2. Treatment algorithm.

warranted. High dose chemotherapy with peripheral blood transplant is yielding very promising results^{1,13}. When the selected therapy is effective, response of systemic symptoms and skin changes typically precede those of the neuropathy, with the former beginning to respond within a month, and the latter within 3-6 months with maximum benefit frequently not seen before 2 to 3 years. Clinical response to therapy correlates better with VEGF level than M-protein level^{6,14}, and complete hematological response is not required to derive substantial clinical benefit^{1,13}.

Based on retrospective data, approximately 40% of patients with POEMS syndrome will respond to low dose alkylator based therapy like melphalan and corticosteroids or cyclophosphamide and corticosteroids. Single agent corticosteroid will have temporary benefit in about 25% of patients. If the patient is considered to be a candidate for peripheral blood stem cell transplantation, melphalan-containing regimens should be avoided until after stem cell harvest.

High dose chemotherapy with peripheral blood stem cell transplant is an emerging therapy for patients with POEMS^{1,13}. All patients had improvement of their neuropathy over time; as in the case with radiation therapy and other chemotherapy, improvement of the peripheral neuropathy takes months to years. Other clinical features improve after stem cell transplantation, including levels of VEGF. Among the first 16 patients we transplanted, the treatment related morbidity was higher than expected with more than one-third requiring mechanical ventilation. We subsequently looked at our experience with 30 patients undergoing stem cell transplant and found that from day 8 to 16 patients with POEMS had higher than expected rates of fever, diarrhea, weight gain, and rash (93%, 77%, 53%, and 43%, respectively), and up to 50% had an engraftment-like syndrome that appeared to be corticosteroid responsive¹³. Splenomegaly was the baseline factor that best predicted for a complicated peri-transplant course. Patients had a higher than expected transfusion need with median numbers of platelet and erythrocyte transfusions being 5 apheresis units and 6 units, respectively. They also had delayed engraftment with a median time to neutrophil engraftment of 16 days, with only 10 % engrafting by day 13. Their times to platelets $20 \times 10^9/L$ and $50 \times 10^9/L$ were 14.5 days and 19.5 days, respectively.

There have been case reports of using plasmapheresis, intravenous immunoglobulin, interferon-alpha, tamoxifen, trans-retinoic acid, thalidomide, ticlopidine, argatroban, strontium-89, bevacizumab, and lenalidomide¹. Neither plasmapheresis nor intravenous immunoglobulin is effective. Although there is a theoretical rationale (anti-vascular endothelial growth factor and anti-tumor necrosis factor effects) for using the thalidomide in POEMS patients, enthusiasm for

its use should be tempered by the high rate of peripheral neuropathy induced by the drug. In contrast, the next generation immune modulatory drug, lenalidomide, has a much lower risk of peripheral neuropathy. We have observed dramatic improvements in one patient treated with this drug¹⁵. Bevacizumab has been tried with mixed results. Two patients who had also received alkylator during and/or predating the bevacizumab had benefit. Two other patients receiving it died. Another had improvement, but was then consolidated with HSCT¹⁶⁻¹⁹.

The physical limitations of the patient should not be overlooked while evaluating and/or treating the underlying plasma cell disorder. As always, a multidisciplinary, thoughtful treatment program will improve a complex patient's treatment outcome. A physical therapy and occupational therapy program is essential to maintain flexibility and assist in lifestyle management despite the neuropathy. In those patients with respiratory muscle weakness and/or pulmonary hypertension, overnight oxygen or continuous positive airway pressure (CPAP) may be useful.

Conclusions

POEMS Syndrome is a complex syndrome that shares elements with other diseases — most notably other plasma cell dyscrasias and Castleman's disease. Significant clues to the underlying pathogenesis lies in the monoclonal lambda light chain restriction, the osteosclerotic lesions, and VEGF levels. The best treatments are those that are useful to treat patients with myeloma, although neurotoxic therapies should be applied sparingly (if at all), limiting the treatment armamentarium. One of the greatest practical challenges is making the diagnosis in a timely fashion to prevent severe irreversible neurological disability.

References

1. Dispenzieri A. POEMS Syndrome. *Blood Reviews* 2007; 21 (6): 285-99.
2. Soubrier M, Labauge P, Jouanel P, Viillard JL, Piette JC, Sauvezie B. Restricted use of Vlambda genes in POEMS syndrome. *Haematologica* 2004; 89 (4): ECR02.
3. Nakaseko C, Abe D, Takeuchi M, Takeda Y, Tanaka H, Oda K, et al. Restricted Oligo-Clonal Usage of Monoclonal Immunoglobulin (lambda) Light Chain Germline in POEMS Syndrome. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2007; 110 (11): 2483.
4. Bryce AH, Ketterling RP, Gertz MA, Kyle RA, Lust JA, Fonseca R, et al. Cytogenetic analysis using multiple myeloma targets in POEMS syndrome. *Proceedings of American Society of Oncology Meeting* 2007. Chicago, IL; 2007.
5. Dispenzieri A, Kyle RA, Lacy MQ, Rajkumar SV, Therneau TM, Larson DR, et al. POEMS syndrome: definitions and long-term outcome. *Blood* 2003; 101 (7): 2496-506.

6. Mineta M, Hatori M, Sano H, Hosaka M, Kokubun S, Hiroki E, et al. Recurrent Crow-Fukase syndrome associated with increased serum levels of vascular endothelial growth factor: a case report and review of the literature. *Tohoku J Exp Med* 2006; 210 (3): 269-77.
7. Lesprit P, Authier FJ, Gherardi R, Belec L, Paris D, Melliére D, et al. Acute arterial obliteration: a new feature of the POEMS syndrome? *Medicine* 1996; 75 (4): 226-32.
8. Sanada S, Ookawara S, Karube H, Shindo T, Goto T, Nakamichi T, et al. Marked recovery of severe renal lesions in POEMS syndrome with high-dose melphalan therapy supported by autologous blood stem cell transplantation. *Am J Kidney Dis* 2006; 47 (4): 672-9.
9. Ghandi GY, Basu R, Dispenzieri A, Basu A, Montori V, Brennan MD. Endocrinopathy in POEMS Syndrome: The Mayo Clinic Experience. *Mayo Clin Proc* 2007; 82 (7): 836-42.
10. Lesprit P, Godeau B, Authier FJ, Soubrier M, Zuber M, Larroche C, et al. Pulmonary hypertension in POEMS syndrome: a new feature mediated by cytokines. *American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine* 1998; 157 (3 Pt 1): 907-11.
11. Allam JS, Kennedy CC, Aksamit TR, Dispenzieri A. Pulmonary manifestations in patients with POEMS syndrome: a retrospective review of 137 patients. *Chest* 2008; 133 (4): 969-74.
12. Soubrier MJ, Dubost JJ, Sauvezie BJ. POEMS syndrome: a study of 25 cases and a review of the literature. French Study Group on POEMS Syndrome. *American Journal of Medicine* 1994; 97 (6): 543-53.
13. Dispenzieri A, Lacy MQ, Hayman SR, Kumar SK, Buadi F, Dingli D, et al. Peripheral blood stem cell transplant for POEMS syndrome is associated with high rates of engraftment syndrome. *Eur J Haematol* 2008; 80 (5): 397-406.
14. Nakano A, Mitsui T, Endo I, Takeda Y, Ozaki S, Matsumoto T. Solitary plasmacytoma with VEGF overproduction: report of a patient with polyneuropathy. *Neurology* 2001; 56 (6): 818-9.
15. Dispenzieri A, Klein CJ, Mauermann ML. Lenalidomide therapy in a patient with POEMS syndrome. *Blood* 2007; 110 (3): 1075-6.
16. Badros A, Porter N, Zimrin A. Bevacizumab therapy for POEMS syndrome. *Blood* 2005; 106 (3): 1135.
17. Straume O, Bergheim J, Ernst P. Bevacizumab therapy for POEMS syndrome. *Blood* 2006; 107 (12): 4972-3; author reply 3-4.
18. Dietrich PY, Duchosal MA. Bevacizumab therapy before autologous stem-cell transplantation for POEMS syndrome. *Ann Oncol* 2008; 19 (3): 595.
19. Samaras P, Bauer S, Stenner-Liewen F, Steiner R, Zweifel M, Renner C, et al. Treatment of POEMS syndrome with bevacizumab. *Haematologica* 2007; 92 (10): 1438-9.

Nuevas tecnologías en transfusión

COORDINADOR: M. ALGORA. *Madrid*

Resumen del simposio

En este simposio revisaremos nuevas tecnologías aplicadas a la transfusión dirigidas a ofrecer un producto sanguíneo, por un lado, más seguro desde el punto de vista de la transmisión de enfermedades infecciosas y, por otro, más eficaz en situaciones de complejidad inmunológica.

Un avance importante para la seguridad de los pacientes transfundidos es la inactivación patogénica de los productos sanguíneos a transfundir. En los últimos años se han realizado esfuerzos importantes para reducir la posible carga patogénica de estos productos sanguíneos lábiles (glóbulos rojos, plasma y plaquetas). Esta reducción afecta tanto a los virus, bacterias y parásitos conocidos, como a los que pudieran emerger en un futuro. Sin embargo, la adición de productos químicos ajenos al producto sanguíneo no está exenta de polémica: ¿son totalmente seguros?, ¿se produce una inactivación completa?, ¿afectan al funcionamiento plaquetario?... El Dr. M. Lozano Molero, hematólogo del Hospital Clínic Provincial de Barcelona, expondrá una “visión crítica sobre la inactivación de los componentes sanguíneos”, en la que, a la luz de los últimos conocimientos actuales, se dará respuesta a estas importantes cuestiones.

Otro de los pilares de la seguridad transfusional es la eficacia de las pruebas serológicas que realizamos en la sangre donada. En los últimos años la obligatoriedad del tipaje genómico del virus de la hepatitis C ha contribuido a disminuir –podríamos decir erradicar– la transmisión transfusional de este virus de la hepatitis. Sin embargo, todavía existe la hepatitis B posttransfusional. Nuestro reto es detectar esos donantes serológicamente negativos que pueden transmitir el VHB. El Dr. N. Lelie, director médico de Novartis, nos expondrá la última tecnología en este momento para “detectar las hepatitis ocultas”.

Para finalizar, el Dr. F. García-Sánchez, inmunólogo del Centro de Transfusión de Madrid, nos detallará nuevos avances en situaciones especiales que nos permitan asegurar la compatibilidad transfusional –tipaje celular y eventual presencia de anticuerpos que pudieran disminuir la eficacia de la transfusión–. Así, la citometría de flujo, que en la década de los años sesenta empezó como una técnica experimental, actualmente ha consolidado su uso de manera rutinaria y de utilidad demostrada en muchos aspectos de la medicina transfusional. Hoy en día, se utiliza tanto para analizar antígenos eritrocitarios, subpoblaciones de glóbulos rojos, como para la detección de anticuerpos anti-HLA, antieritrocitarios o determinación de marcadores de actividad plaquetaria. Más reciente –y por ahora casi experimental– es el uso del tipaje genómico extendido para grupos sanguíneos y sistema HLA en soportes reducidos: los *microarrays*. Su potencial es enorme y es una técnica que experimentará gran crecimiento en un futuro próximo. Por ahora el tipaje genómico se utiliza para resolver situaciones importantes en la práctica diaria, tal como se explicará y queda recogido en el artículo elaborado por el Dr. García Sánchez para este simposio: “¿Qué pueden aportar las técnicas de *microarrays* y citometría de flujo a la práctica transfusional?”.

VISIÓN CRÍTICA SOBRE LA INACTIVACIÓN DE LOS COMPONENTES SANGUÍNEOS

M. LOZANO MOLERO

Servicio de Hemoterapia y Hemostasia.

Hospital Clínic Provincial. Barcelona

Introducción

Aunque en los últimos años se han realizado progresos significativos en la reducción del riesgo de la transmisión de agentes infecciosos a través de la transfusión, aún existe riesgo de transmisión de virus, bacterias, protozoos y priones. Estos riesgos incluyen tanto agentes para los cuales se realizan pruebas de cribado específicas, como, por ejemplo, hepatitis B, hepatitis C o virus de la inmunodeficiencia humana, como otros patógenos para los cuales estas pruebas no se realizan de forma rutinaria como, por ejemplo, virus linfotropo de células T humanas, virus del Nilo Occidental, el *Trypanosoma cruzi*, el virus de la hepatitis A, el virus herpes humano de tipo 8, el virus Chikungunya o varias especies de bacterias.

Las tecnologías de inactivación de patógenos (IP) aplicables a los componentes sanguíneos lábiles proporcionan un elemento de seguridad adicional a las pruebas de cribado que no sólo permitirían neutralizar a aquellos agentes infecciosos ya conocidos, sino que además podrían servir de contención para aquellos otros agentes que pudieran aparecer en el futuro. Una posibilidad que en los últimos años ha vuelto a quedar demostrada con la aparición del virus del Nilo Occidental o el virus Chikungunya.

Sin embargo, la aplicación de las tecnologías de IP a los componentes sanguíneos lábiles no está exenta de repercusiones y potenciales efectos adversos. Idealmente las tecnologías de IP deben eliminar o inactivar a los agentes infecciosos, incluso a los patógenos emergentes, sin reducir la función o la vida media del componente o producto tratado. En el producto final, los restos de la molécula y sus productos de degradación o los complejos formados con los componentes sanguíneos no deben ser ni tóxicos ni inmunogénicos para el receptor. Cualquier riesgo del componente sanguíneo después de ser tratado con IP debe ser inferior al riesgo de transmitir una infección por transfusión del componente original.

En este trabajo se pretende revisar cuáles son los principales efectos adversos sobre los diferentes componentes sanguíneos que poseen los métodos de IP actualmente en el mercado.

Solvente-detergente

El método del solvente-detergente (SD) fue autorizado en 1985 para los concentrados de factores de la coagulación y en 1991 se empezó a utilizar para tratar el plasma fresco congelado (PFC)¹. Este método consiste en la adición de dos moléculas capaces de romper la cubierta lipídica de los virus encapsulados, bacterias y eucariotas. La combinación más utilizada es la de un 1% de tri-(N-butil)-fosfato (TNBP) y un 1% de polioxietileno-p-t-octilfenol (Triton X-100). El TNBP actúa como un solvente orgánico y extrae los lípidos de las membranas. El Triton X-100 es un detergente aniónico que rompe las bicapas lipídicas para una extracción de los lípidos; también ayuda a estabilizar el TNBP. Ambos componentes se aplican a mezclas de plasma de entre 500 y 2.500 unidades. Una vez finalizado el tratamiento, los reactivos SD se eliminan de forma muy eficiente mediante extracción con aceite y cromatografía. En el producto final, TNBP y Triton X-100 son o bien indetectables o bien presentes en dosis traza, bien por debajo de los niveles de toxicidad, y ésta es probablemente la causa de que nunca se hayan descrito eventos adversos causados por los reactivos utilizados en el tratamiento.

El mismo método SD ha sido aplicado por diferentes fabricantes, pero variaciones en el material de partida y en el proceso de fabricación han resultado en notorias diferencias en el producto final. En Europa existe un proceso de producción patentado por Octapharma (Lachen, Suiza), y en EE UU existe otro patentado por Vitex (Watertown, EE UU). Mientras que el de Octapharma emplea PFC obtenido mediante aféresis o proveniente de donaciones de sangre total congelado dentro de las 4 horas de la obtención, el de Vitex era PFC separado de donaciones de sangre total y congelado dentro de las 15 horas de la obtención. Otras diferencias a destacar son el sistema escogido para la estabilización de las proteínas (fosfato sódico vs. cloruro cálcico) y el aceite utilizado para la extracción (aceite de ricino vs. aceite de soja).

Como consecuencia de las diferencias en la preparación, el contenido del plasma SD de Vitex mostraba una pronunciada reducción en proteína S, lo que, junto a otros factores, probablemente contribuyó a la aparición de 6 casos mortales de embolismo pulmonar en pacientes sometidos a trasplante hepático, lo que llevó a que finalmente Vitex retirara su plasma SD del mercado. Por el contrario, el plasma SD de Octapharma mostró su eficacia y seguridad en 208 trasplantes ortotópicos de hígado y además se ha preparado una nueva forma de plasma SD que permite ser transfundido independientemente del grupo ABO². No obstante, un estudio retrospectivo ha sus-

citado preocupación sobre una posible relación entre tromboembolismo venoso (la mayoría en relación con catéteres venoso centrales) y el tratamiento con recambios plasmáticos de la púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) cuando se utiliza plasma SD de Octapharma³.

Se ha sugerido que además el hecho de realizar la inactivación en mezclas de entre 500 y 1.600 unidades permite que se produzca un efecto dilucional que potencialmente tendría un efecto protector al reducir la infectividad de una unidad individual en el caso de los priones y reducir el riesgo de provocar lesión pulmonar aguda asociada a transfusión (LPAT) y reacciones transfusionales alérgicas.

Azul de metileno

El azul de metileno (AM), cuando se añade al plasma y se expone a luz visible, puede inactivar la mayoría de los virus y bacterias por la generación de radicales de oxígeno (superóxido, peróxido de hidrógeno e hidroxilo) que destruyen los ácidos nucleicos. Debido a las enzimas presentes en el citoplasma de las células, el AM no es activo frente a virus intracelulares, por lo que el plasma debe ser leucorreducido previamente al tratamiento. Una alternativa es someter al plasma a fases de congelación-descongelación para destruir las células y liberar su contenido para que sea susceptible a la inactivación (método de Springe).

Tras haber eliminado los leucocitos, se añade el AM (concentración final: 1 μ M) y se somete a la iluminación con luz blanca durante entre 20 y 60 minutos. Existe la posibilidad de filtrar el plasma tratado para eliminar tanto el excedente de AM como los productos de degradación generados durante la iluminación (azures y tionina). La filtración se asocia a una disminución en el factor XI de la coagulación y a una activación del sistema de contacto de la coagulación (aumento de factor XII activado)⁴.

La dosis de AM que recibe un receptor de una transfusión estándar de PFC (15 mL/kg) tratado con AM y luz se sitúa en unos 33 μ g o menos de 1 μ g en un prematuro de 2 kg. El AM ha sido empleado en la práctica médica para otras funciones (tinción perioperatoria de glándulas paratiroides o tejido óseo desvitalizado, o tratamiento de la metahemoglobinemia), en las cuales la dosis administrada ha oscilado entre 200 y 300 mg (una dosis unas 10.000 veces mayor a la recibida durante la transfusión de plasma). El AM administrado es eliminado rápidamente de la circulación y de la médula ósea (la vida media en los humanos es de 60 minutos) y, aunque existe alguna captación en algunos tejidos, la inmensa mayoría del AM es eliminado por vía gastrointestinal y urinaria en los 2-3 días siguientes a su administración⁵.

Existen datos experimentales que sugieren que el AM podría ser carcinogénico y mutagénico bajo ciertas circunstancias. Por ejemplo, estudios de administración crónica de AM (dosis de 5, 25 y 50 mg/kg por día, 5 días a la semana) durante 2 años han encontrado algunas evidencias de actividad carcinogénica en ratas y ratones macho pero no en ratas o ratones hembras. Asimismo, en diversos modelos se han encontrado datos que sugieren genotoxicidad por parte del AM: en un modelo de *Salmonella* y de *Escherichia coli*, con o sin la fracción microsomal hepática S9, y en un cultivo de células de hámster chino. Por el contrario, en un modelo de ratón no se encontraron datos de genotoxicidad en estudios de una sola dosis o dosis administradas durante 3 meses⁶.

Precisamente, ciertos datos que sugerían potenciales efectos mutagénicos en algunos modelos, especialmente en presencia de la fracción lisosomal S9, constituyeron la razón de que el Paul Ehrlich Institut en Alemania no concediera la renovación de la autorización al plasma tratado con AM, sin que se retire el exceso de AM.

El tratamiento con AM del plasma afecta a la funcionalidad de varios factores e inhibidores de la cascada de la coagulación. Las proteínas más gravemente afectadas por el tratamiento con el AM son el factor VIII y el fibrinógeno, cuya actividad se reduce entre el 20% y el 35%. La disminución de la concentración del fibrinógeno se observa cuando se mide mediante métodos funcionales como el de Clauss pero no por métodos antigénicos, lo que sugiere que el tratamiento con AM afecta a la actividad biológica pero no a la concentración del fibrinógeno. Existen datos que sugieren que la pérdida de actividad de los factores se produce por la foto-oxidación inducida por el tratamiento y no por las fases de congelación-descongelación a las que se somete el plasma.

El impacto de esta caída en los niveles de los factores e inhibidores de la coagulación es controvertido. En una publicación de un solo hospital de Cataluña se encontró que la implantación del plasma tratado con AM se asoció a un incremento del 56% en el consumo de plasma junto con un incremento en la transfusión de crioprecipitados⁷. Por el contrario, un análisis del consumo del plasma en relación con el consumo de concentrados de hematíes en toda Cataluña tras la implantación del plasma tratado con azul de metileno no evidenció ningún impacto. Cabe destacar las notables diferencias en el número de unidades de PFC transfundidas entre los tres mayores hospitales de esa comunidad⁸. Los datos son similares a nivel de todo el Estado español, donde el 63% del plasma transfundido es tratado con AM; tras su introducción, la ratio entre PFC y concentrados de he-

matías (CH) permaneció invariable en alrededor del 15%. De nuevo se observan notables diferencias de un hospital a otro; por ejemplo, entre hospitales que transfunden más de 10.000 unidades de CH al año, la ratio PFC:CH varía entre un 10,1% y un 36,8%⁹.

Existen datos en las revisiones publicadas que sugieren que el tratamiento de la PTT mediante recambios plasmáticos donde se utiliza plasma tratado con AM como solución de reposición es menos eficaz. Un reciente estudio multicéntrico prospectivo de cohortes ha encontrado en 56 episodios de PTT que los que recibieron plasma tratado con AM en comparación con los tratados con plasma cuarentenado acusaban un mayor número de recambios para alcanzar la remisión (16 vs. 9), necesitaban un mayor volumen de plasma (766 mL vs. 429) y presentaban más recurrencias durante el tratamiento con recambios (18/31 vs. 6/25)¹⁰. No obstante, cuando se ha estudiado el contenido de ADAMTS-13 en el plasma tratado con AM, los niveles observados son similares a los del plasma no tratado¹¹.

Amotosaleno

El amotosaleno es un psoraleno sintético, producido específicamente para inactivar patógenos en concentrados de plaquetas (CP) y plasma. El sistema (Intercept Blood System®, Cerus Co) consiste en añadir el amotosaleno al producto a tratar (concentración final de 150 µM) y exponerlo a continuación a luz ultravioleta A (UVA, longitud de onda de 320 a 400 nm). En el caso de los CP, el producto está resuspendido en solución aditiva (65% del volumen total) y plasma (35% restante), y tras la iluminación se incubaba entre 4 y 16 horas con un compuesto de absorción para eliminar el exceso de amotosaleno y los productos generados durante la iluminación. En el caso del plasma, la fase de eliminación se realiza haciendo pasar el plasma a través de un filtro de absorción. El tratamiento fotoquímico con amotosaleno y UVA ha demostrado un perfil de seguridad aceptable en extensos estudios de toxicidad aguda y de dosis repetidas, toxicidad reproductiva, fototoxicidad y potencial mutagénico y carcinogénico.

En el caso de los CP, el tratamiento se asocia con una merma en el producto tratado de entre un 5 y un 10%. Estudios *in vitro* han mostrado una razonable preservación de los distintos parámetros que definen el estado funcional de las plaquetas, por lo que se pasó a continuación a estudios *in vivo*. Los estudios *in vivo* con plaquetas marcadas ponen de manifiesto que el tratamiento fotoquímico se asocia con una reducción en la recuperación (50,3% en el control vs. 42,5% en las plaquetas tratadas) y en la supervivencia en circulación de las plaquetas (6,0 días vs. 4,8).

La última fase, definitiva, de la evaluación ha sido el estudio en ensayos clínicos, aleatorizados con un número suficiente de pacientes. Los estudios han mostrado que el tratamiento fotoquímico con amotosaleno y UVA se asocia a una menor recuperación postransfusional y a un acortamiento del intervalo entre transfusiones en paralelo a una menor dosis de plaquetas en el producto tratado. Sin embargo, cuando se comparan aquellos pacientes que reciben CP con una dosis similar de plaquetas en el producto tratado y en el producto control se advierte que no aumenta el número de CP transfundidos en el grupo que recibe producto tratado¹².

El tratamiento del plasma fresco con amotosaleno y UVA se asocia con una disminución en la actividad de todos los factores de coagulación pero a niveles que aún se encuentran dentro de los límites de referencia usados en el control de calidad de las bolsas de plasma no inactivado. En concreto, el tiempo de protrombina (TP) y el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa) se alargaron 1 y 4,3 segundos, respectivamente. Los factores que más se afectaron fueron el fibrinógeno, el factor VII y el VIII, con una retención de actividad después de la inactivación de entre el 72 y el 78%. Los demás factores analizados mostraron una retención de actividad de al menos el 82% y, en concreto, los factores V, XIII y VWF:RCo presentaron una actividad de al menos el 92%. Las proteínas inhibidoras de la coagulación analizadas mostraron una retención de actividad de entre el 80 y el 95%¹³.

Se han publicado tres estudios clínicos que han investigado la eficacia y seguridad del plasma sometido a tratamiento fotoquímico en pacientes con deficiencias congénitas de factores de coagulación, pacientes con deficiencias adquiridas de factores de coagulación y pacientes con PTT. En todos ellos los resultados observados con plasma tratado con amotosaleno fueron comparables a los obtenidos con plasma control. Quizá el único aspecto a destacar es que, debido a la dificultad de reclutar pacientes, el número de pacientes incluidos en el estudio de la PTT fue sólo de 35 (17 pacientes en el grupo tratado con plasma sometido a tratamiento fotoquímico y 18 en el grupo en el que los recambios se realizaron con PFC), a pesar de que se evaluaron 192 pacientes para ser incluidos en el estudio¹⁴.

Riboflavina

La riboflavina (vitamina B₂) es un nutriente esencial que también se ha utilizado para la inactivación de patógeno en CP y unidades de plasma. En octubre de 2007 recibió el marcado "CE" para su aplicación a los CP (Mirasol® PRT, Gambro BCT). El sistema consis-

te en añadir a CP en plasma la riboflavina (500 μM) y posteriormente someterlo a iluminación con luz ultravioleta (6,24 J/mL, durante 10 minutos, en agitación). La toxicidad de la riboflavina y de sus fotoderivados no parece ser un elemento de preocupación, dado que los dos están presentes en los alimentos y se encuentran de forma natural en la sangre circulante, por lo que no sería necesaria una fase de eliminación al final del proceso. No obstante, existen datos de que uno de los principales fotoderivados de la riboflavina, la lumiflavina, en presencia de enzimas metabólicas (fracción microsomal hepática S9), tiene una significativa capacidad mutagénica en tres modelos distintos¹⁵.

Los estudios publicados realizados *in vitro* muestran que el tratamiento con riboflavina y UVA provoca un significativo incremento aunque leve en los marcadores de activación. Por ejemplo, en el caso de la selectina P, tras el tratamiento y 5 días de almacenamiento, el porcentaje de plaquetas que expresan selectina P en su superficie es del 12% en el control, mientras que las tratadas alcanzan el 30%. No obstante, los estudios de la capacidad adhesiva y cohesiva de las plaquetas almacenadas hasta 5 días bajo condiciones de flujo mostraron resultados muy similares en las plaquetas tratadas y en el control¹⁶. Los estudios *in vivo* con plaquetas marcadas ponen de manifiesto que el tratamiento con riboflavina se asocia con una reducción en la recuperación (66,5% en el control vs. 50% en las plaquetas tratadas) y en la supervivencia de las plaquetas (5,9 días vs. 4,3)¹⁷.

En el momento de escribir este resumen, no había estudios clínicos publicados de la eficacia y seguridad de las plaquetas tratadas con riboflavina. Se acaba de finalizar un estudio multicéntrico, en Francia, con 100 pacientes, en el que se ha estudiado como variable principal el incremento postransfusional.

Conclusión

La IP puede provocar una reducción en la vida media *in vivo* de las plaquetas o una disminución en los factores de la coagulación o sus inhibidores en el PFC. Incluso tras estudios en fase III, sólo puede identificarse una potencial toxicidad de los métodos de IP tras un uso clínico a gran escala. Por ello, para asegurar la inocuidad de los métodos de IP, tanto a corto como a largo plazo, son esenciales estudios de fase IV poscomercialización.

Bibliografía

- Horowitz B, Bonomo R, Prince AM, Chin SN, Brotman B, Shulman RW. Solvent/detergent-treated plasma: a virus-inactivated substitute for fresh frozen plasma. *Blood* 1992; 79: 826-31.
- Solheim BG, Granov DA, Juravlev VA, Krawczyk M, Kubishkin VA, Patutko UI, et al. Universal fresh-frozen plasma (Uniplas): an exploratory study in adult patients undergoing elective liver resection. *Vox Sang* 2005; 89: 19-26.
- Yarranton H, Cohen H, Pavord SR, Benjamin S, Hagger D, Machin SJ. Venous thromboembolism associated with the management of acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *Brit J Haematol* 2003; 121: 778-85.
- Riggert J, Humpe A, Legler TJ, Wolf C, Simson G, Kohler M. Filtration of methylene blue-photooxidized plasma: influence on coagulation and cellular contamination. *Transfusion* 2001; 41: 82-6.
- Williamson LM, Cardigan R, Prowse CV. Methylene blue-treated fresh-frozen plasma: what is its contribution to blood safety? *Transfusion* 2003; 43: 1322-9.
- National Toxicology Program. Department of Health and Human Service. Toxicology and Carcinogenesis Studies of Methylene Blue Trihydrate (CAS No. 7720-79-3) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Study). Consultable en <http://ntp.niehs.nih.gov/?objectid=DED069ED-F1F6-975E-79DB8BE826C4B72D>. Último acceso 8 de mayo de 2008.
- Atance R, Pereira A, Ramírez B. Transfusing methylene blue-photoinactivated plasma instead of FFP is associated with an increased demand for plasma and cryoprecipitate. *Transfusion* 2001; 41: 1548-52.
- Solheim BG, Cid J, Osselaer JC. Pathogen reduction technologies. En: Lozano M, Contreras M, Blajchman M (eds.). *Global Perspective in Transfusion Medicine*. Bethesda, MD: AABB Press; 2006. p. 103-48.
- Algora M, Barbolla L. Uses of plasma in Spain. *Transfus Clin Biol* 2007; 14 (6): 564-7.
- Muncunill J, Del Río J, Álvarez Larrán A, García Gala J, Paniagua C, Hernández Jodra M, et al. Methylene blue photoinactivated plasma vs fresh frozen plasma in thrombotic thrombocytopenic purpura treatment: a multicentric prospective cohort study. *Transfusion* 47, 14a. 2007.
- Cardigan R, Allford S, Williamson L. Levels of von Willebrand factor-cleaving protease are normal in methylene blue-treated fresh-frozen plasma. *Br J Haematol* 2002; 117: 253-4.
- Lozano Molero M. Tratamiento fotoquímico con amotosaleno y luz ultravioleta aplicado a los concentrados de plaquetas. En: Lozano Molero M, Cid Vidal J (eds.). *Actualización en tecnología para la inactivación de patógenos basada en amotosaleno y FRALE*. Barcelona: ICL Marge; 2008. p. 71-88.
- Cid Vidal J. Tratamiento fotoquímico con amotosaleno y luz ultravioleta aplicado a las unidades de plasma. En: Lozano Molero M, Cid Vidal J (eds.). *Actualización en tecnología para la inactivación de patógenos basada en amotosaleno y FRALE*. Barcelona: ICL Marge; 2008. p. 89-105.
- Mintz PD, Neff A, MacKenzie M, Goodnough LT, Hillyer C, Kessler C, et al. A randomized, controlled phase III trial of therapeutic plasma exchange with fresh-frozen plasma (FFP) prepared with amotosalen and ultraviolet A light compared to untreated FFP in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Transfusion* 2006; 46: 1693-704.
- Kale H, Harikumar P, Nair PM, Netrawali MS. Assessment of the genotoxic potential of riboflavin and lumiflavin. A. Effect of metabolic enzymes. *Mutat Res* 1992; 298: 9-16.
- Pérez-Pujol S, Tonda R, Lozano M, Fuste B, López-Vílchez I, Galan AM, et al. Effects of a new pathogen-reduction technology (Mirasol PRT) on functional aspects of platelet concentrates. *Transfusion* 2005; 45: 911-9.
- AuBuchon JP, Herschel L, Roger J, Taylor H, Whitley P, Li J, et al. Efficacy of apheresis platelets treated with riboflavin and ultraviolet light for pathogen reduction. *Transfusion* 2005; 45: 1335-41.

HEPATITIS B, THE HIDDEN VIRUS UNCOVERED

N. LELIE

Chiron, París, France

MANUSCRITO NO RECIBIDO

¿QUÉ PUEDEN APORTAR LAS TÉCNICAS DE MICROARRAYS Y CITOMETRÍA A LA PRÁCTICA TRANSFUSIONAL?

F. GARCÍA SÁNCHEZ

*Unidad Funcional de Histocompatibilidad y Biología Molecular.
Centro de Transfusión de Madrid*

Aunque las técnicas de aglutinación han sido, y son, la base de la inmunohematología, tanto la citometría de flujo como la biología molecular se han incorporado como nuevos métodos de estudio en el área de la medicina transfusional. En este trabajo repasaremos algunas de las aplicaciones más comunes que tanto la citometría de flujo como la biología molecular, y en concreto las técnicas de *microarrays*, aportan a la práctica de la medicina transfusional en el día a día de nuestros laboratorios.

Citometría e inmunohematología

En la actualidad, la citometría de flujo representa una técnica esencial en el trabajo rutinario de los laboratorios implicados en la práctica de la medicina transfusional. Su constante desarrollo desde los años sesenta-setenta nos permite medir múltiples características sobre células individuales tales como el tamaño, la complejidad (granularidad o presencia de estructuras internas) y la fluorescencia (pigmentos fluorescentes o fluorocromos, antígenos de superficie, citoplasmáticos o nucleares, ADN, potenciales de membrana, tráfico de iones, necrosis/apoptosis, actividad enzimática, activación celular, etc.). Pueden analizar cientos e incluso miles de células por segundo. Por todo ello la citometría se define como una técnica rápida, sensible, cualitativa, cuantitativa y objetiva.

Principios básicos de la citometría

Para realizar un estudio de citometría es necesario preparar una suspensión de células o partículas individuales. Varios fluorocromos por sí mismos, o conjugados a anticuerpos, se pueden unir a antígenos o proteínas de interés. La suspensión de partículas o células es aspirada dentro de la cámara de análisis, donde, rodeada de forma muy estrecha por un fluido isotónico, se produce un enfoque que se denomina hidrodinámico. Este enfoque hidrodinámico permite que las células o partículas pasen una a una a través del punto de incidencia de una fuente potente de luz o láser. La luz es tanto absorbida como dispersada cuando incide sobre una célula o partícula. La luz absorbida de una apropiada longitud de onda puede ser reemitida en forma de fluorescencia si la célula o partícula contiene una sustancia fluorescente natural o si un anticuerpo, o más de uno, conjugado con fluorocromos ha sido unido a su superficie o estructura celular interna previamente.

La luz dispersada es dependiente de la estructura interna de la célula, así como del tamaño y de su forma. Las sustancias fluorescentes absorben luz de una determinada longitud de onda y reemiten luz de una longitud de onda diferente. El isotiocianato de fluoresceína (FITC), rojo Texas (Texas red) y ficoeritrina (PE) son los fluorocromos más comúnmente usados en la práctica biomédica. Tanto la luz como las fluorescencias dispersadas son detectadas por una serie de fotodiodos y amplificadas. Los filtros ópticos son esenciales para bloquear la luz de longitud de onda indeseada y guiar la luz de la longitud de onda deseada hacia los fotodetectores. Los pulsos eléctricos resultantes son digitalizados, y los datos almacenados, analizados y mostrados bajo un soporte informático adecuado. Dado que se pueden analizar grandes cantidades de células o partículas en un periodo muy corto de tiempo ($> 1.000/s$), es posible obtener información sobre poblaciones celulares muy rápidamente con valor estadístico.

Aplicaciones de la citometría de flujo a la práctica transfusional

La diferente estructura que presentan los distintos tipos celulares del sistema hematopoyético, eritrocitos, leucocitos y plaquetas, hace del sistema hematopoyético un sistema fácil de ser analizado por técnicas de citometría de flujo. La explicación detallada de las múltiples aplicaciones de la citometría de flujo al campo de la medicina transfusional excedería con mucho del propósito de este trabajo, por lo cual nos limitaremos a enumerar algunas de las aplicaciones más utilizadas en la práctica transfusional.

Citometría sobre eritrocitos

Podemos aplicar diferentes tipos de análisis sobre los glóbulos rojos en función de cuáles sean los parámetros que nos interese determinar. Una descripción de las aplicaciones más usadas en el laboratorio de medicina transfusional mediante citometría de flujo podría ser la siguiente:

- Detección y cuantificación de proteínas unidas a eritrocitos:
 - Detección de inmunoglobulinas y complemento unidos a eritrocitos.
 - Identificación de subtipos de IgG.
 - Cuantificación de inmunoglobulina unida a eritrocito.
 - Determinación antigénica de eritrocitos.
- Detección y cuantificación de subpoblaciones:
 - Hemorragia feto-materna.
 - Mosaicismo de grupo sanguíneo.
 - Quimerismo genético o postrasplante.
 - Detección y cuantificación de hematíes transfundidos.
 - Fenotipaje de pacientes transfundidos.
 - Recuento de reticulocitos.
 - Hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN).
 - Tipaje en *pool*.
 - Determinación del grado de leucorreducción.

Citometría sobre leucocitos

Los anticuerpos anti-neutrófilos y anti-HLA son causa de una variedad de reacciones transfusionales. Éstas incluyen las reacciones febriles por la transfusión y las reacciones pulmonares por la transfusión, tanto en receptores de concentrados de granulocitos como en receptores de plasma. La citometría de flujo ha resultado de una gran ayuda para la determinación de ambos tipos de anticuerpos.

- Detección de anticuerpos anti-HLA (*human leukocyte antigen*):
 - Detección de anticuerpos anti-HLA-I.
 - Detección de anticuerpos anti-HLA-II.
- Detección de anticuerpos anti-HNA (*human neutrophil antigens*, anti-neutrófilos).

Citometría sobre plaquetas

La citometría de flujo se ha convertido en una técnica excelente para su uso tanto en medicina transfusional plaquetaria como en investigación. Entre sus aplicaciones más importantes podemos destacar.

- Detección de anticuerpos antiplaquetarios o anti-HLA unidos a plaquetas.
- Detección de anticuerpos antiplaquetarios libres en plasma.
- Determinación de marcadores de activación plaquetaria.

Microarrays y medicina transfusional

Los *microarrays* de ADN surgieron de la necesidad de analizar una ingente cantidad de información surgida de los grandes proyectos de secuenciación de genomas desarrollados en los últimos años. Se definen como colecciones de moléculas de ADN inmovilizadas sobre un soporte en localizaciones conocidas, y se emplean para el estudio de la secuencia de genes conocidos, o bien para determinar los niveles de expresión genética de un tipo celular o tejido determinado. Sus principales aplicaciones se centraron inicialmente en el análisis de la expresión génica y el diagnóstico genético, basado fundamentalmente en la búsqueda de mutaciones o polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). Los nuevos desarrollos tecnológicos han permitido ampliar estas aplicaciones hacia nuevas áreas de interés. Una de estas áreas de desarrollo es la del diagnóstico molecular, que posee entre sus principales aplicaciones el cribado genético de mutaciones o polimorfismos relacionados con enfermedades mediante técnicas de resecuenciación del ADN.

A la hora de fabricar un *microarray* de ADN, existen un número de elementos que tendrán una importancia crucial en función de las aplicaciones deseadas, como:

- Elección de la sonda.
- Elección del soporte.
- Tecnología de inmovilización de la sonda.
- Técnica de fabricación del *array*.
- Método de detección de la hibridación.
- Sistemas de amplificación de la señal/sonda.
- Sistemas de análisis e interpretación de la señal.

Aplicaciones de las técnicas de *microarrays* de ADN a la medicina transfusional

Existen en la actualidad dos grandes aplicaciones: la genotipación de grupos sanguíneos y la genotipación del sistema HLA. Aunque ambas se traten en este resumen en apartados separados, cabe siempre la posibilidad de generar un nuevo sistema de *array* en el que se combinen los dos estudios, al igual que ocurriría con otros tipos antigénicos, como los plaquetarios o los de neutrófilos.

Genotipación de grupos sanguíneos

Describiremos cuáles serían las situaciones en las que parecería estar más indicado el estudio de los grupos sanguíneos por este tipo de tecnología y qué beneficios obtendríamos de su aplicación para la práctica transfusional.

1. Cuando obtener una muestra de glóbulos rojos comporta riesgo de morbimortalidad, como en el caso

de embarazadas en las que es necesario conocer algún grupo sanguíneo del feto. En situaciones de embarazadas sensibilizadas, es necesario conocer si el feto tiene el antígeno contra el que va dirigido el anticuerpo de la madre. Para ello, se puede obtener una muestra de sangre fetal mediante cordocentesis (técnica que conlleva un riesgo de morbimortalidad fetal) y realizar el tipaje sanguíneo del feto por los procedimientos convencionales, o bien obtener, si hay riesgos, muestra de ADN de líquido amniótico o de la sangre materna y realizar el tipaje genético.

2. Cuando hay dificultad técnica para realizar el grupo en la forma convencional, debido a la naturaleza de la enfermedad del paciente, como por ejemplo en los caso de anemia hemolítica autoinmune. En estas situaciones puede ser difícil, o imposible, conocer el perfil antigénico del paciente, siendo al mismo tiempo necesaria esta información para una transfusión más segura del paciente.
3. Cuando la complejidad del caso exige el estudio genético:
 - Gestantes y pacientes con Rh positivo débil.
 - Detección de variantes alélicas (discrepancias serohemáticas).
 - Donantes Del.
4. Donantes fenotipados. Los centros de transfusión disponen de un registro de donantes tipados para varios grupos sanguíneos, cuya sangre se reserva para los pacientes sensibilizados. Los *microarrays* de ADN permiten ampliar el tipaje de estos donantes a otros grupos eritrocitarios, plaquetarios y de neutrófilos.

Genotipación de antígenos HLA

Las técnicas de genotipación de grupos sanguíneos, que hemos explicado anteriormente, desembocan en la asignación de dos únicos alelos por sistema estudiado. En el sistema HLA, ese mismo nivel de resolución sólo lo proporcionan las técnicas de tipaje basado en la secuencia (SBT) y no siempre. Estas técnicas son muy costosas y laboriosas, lo que ha permitido el desarrollo de sistemas de genotipación masiva que, debido al elevado polimorfismo del sistema HLA, no permite una asignación alélica única, sino la asignación de un grupo de alelos, que se ha venido en denominar genotipación de intermedia/baja resolución para los *loci* HLA-A, -B, -C, -DR, -DP y -DQ.

La aplicación de este tipo de sistema de genotipación hasta el momento no se monta sobre soporte tipo vidrio, sino que las sondas grupo-alelo-específicas se encuentran sobre unas microesferas y son analizadas por un sistema combinado entre el *microarray* y la citometría de flujo.

Las aplicaciones más comunes en medicina transfusional de este tipo de sistema las encontramos en:

- Tipaje de donantes de plaquetas.
- Tipaje de donantes de médula ósea.
- Tipaje de sangre de cordón umbilical.

Conclusión

En conclusión, podemos afirmar que es incuestionable el auge que otras técnicas basadas en la biología molecular y celular están adquiriendo en la práctica médica y, por supuesto, también en la práctica de la medicina transfusional. Es de recomendada lectura el artículo editorial de la revista *Transfusion* de uno de sus números del año 2005, titulado "Goodbye to agglutination and all that?" (Transfusión 2005; 45: 652-3), en el que se hace una reflexión sobre si estas nuevas técnicas provocarían la revolución suficiente en el campo como para eliminar las técnicas de aglutinación de las mismas. Nada creemos de eso. Entendemos simplemente que, como ha ocurrido en otras muchas áreas de la ciencia médica, inmunología, microbiología, etc., las nuevas técnicas, farragosas en sus conceptos a veces, complicadas en sus tecnicismos la mayoría, ocupan un lugar complementario muchas veces a las técnicas convencionales, pero que, sin duda alguna, se han ganado el hueco que les corresponde por el grado de información, especificidad y sensibilidad que aportan y por el coste.

Bibliografía

- Bakke AC. The principles of flow cytometry. *Lab Med* 2001; 32: 207-11.
- Brown M, Wittwer C. Flow cytometry. Principles and clinical applications in Hematology. *Clin Chem* 2000; 46: (8 Pt 2): 1221-9.
- Brown S. *Essential of Medical Genomics*. New Jersey: Wiley-Liss; 2003.
- Garratty G, Arndt PA. Applications of flow cytofluorometry to red blood cell immunology. *Cytometry* 1999; 38: 259-67.
- Givan AL. Principles of flow cytometry: an overview. *Methods Cell Biol* 2001; 63: 19-50.
- López M, Mallorquín P, Vega M. Aplicaciones de los *microarrays* y *biochips* en salud humana. *Genoma España/CIBT-FGUAM*; 2006.
- Nature Genetics* 1999; 21 (1s): The chipping forecast I.
- Nature Genetics* 2002; 32 (4s): The chipping forecast II.
- Nature Genetics* 2005; 37 (6s): The chipping forecast III.
- Petrik J. Diagnostic applications of *microarrays*. *Transfus Med* 2006; 16: 233-47.
- Scheffold A, Kern F. Recent developments in flow cytometry. *J Clin Immunol* 2000; 20: 400-7.
- Stears RL, Martinsky T, Schena M. Trends in *microarray* analysis. *Nature Medicine* 2003; 9 (1): 140-5.
- Stewart CC. Multiparameter flow cytometry. *J Immunoassay* 2000; 21: 255-72.
- Stroncek DF, Emmanuel Fadey, Admas S. Leucocyte antigen and antibody detection assays: tools for assessing and preventing pulmonary transfusion reactions. *Transfus Med Rev* 2007; 4: 273-86.

Alteraciones hemostáticas en hemopatías

COORDINADOR: L.J. GARCÍA FRADE. *Valladolid*

Resumen del simposio

Debido a la complejidad creciente de las diferentes áreas de la hematología se precisa una mayor especialización, lo que hace difícil un conocimiento en profundidad de otros campos hematológicos. El propósito del presente simposio es tratar de evitar en lo posible este vacío actualizando las alteraciones de la hemostasia que acontecen en las hemopatías. Abordamos el estado del conocimiento en procesos hematológicos en los que las alteraciones de la hemostasia son muy relevantes: leucemias agudas, síndromes mieloproliferativos crónicos y anemias hemolíticas.

La Dra. M^aJ. Peñarrubia presenta el tema de las leucemias agudas y señala la importancia tanto de las complicaciones hemorrágicas como de las trombóticas. En el primer caso destaca la trombocitopenia, a veces asociada a trombocitopatía y coagulopatía. La leucemia promielocítica es el tipo más característico. En la misma, los blastos tienen una expresión aumentada de factor tisular y de *cancer procoagulant*, y la actividad fibrinolítica está también aumentada debido a una mayor expresión de uPA, tPA y anexina II en la superficie celular. La anexina II actúa como receptor de tPA y plasminógeno, favoreciendo la generación de gran cantidad de plasmina. El tratamiento con ATRA disminuye la expresión de factor tisular, *cancer procoagulant* y anexina II, y revierte la coagulopatía. Respecto a las complicaciones trombóticas, destaca: 1. Adhesión de las células leucémicas (fuerte expresión de CD11b) y producción, por parte de éstas, de TNF- α e IL-1 β , con aumento de expresión endotelial de las moléculas de adhesión. 2. El mayor riesgo en niños con LLA, debido a la utilización de catéteres centrales asociada a L-asparaginasa y corticoides. 3. A los agentes con efecto protrombótico, como eritropoyetina, G-CSF, GM-CSF, ciclosporina y tacrolimus, debemos añadir ATRA, con un riesgo trombótico en torno al 9%, y nuevos fármacos, como gemtuzumab e inhibidores de VEGF.

La comunicación de M. Vega *et al.* incide en las complicaciones trombóticas que acontecen en los pacientes sometidos a trasplante alogénico de intensidad reducida. Mediante un estudio retrospectivo de los 195 pacientes tratados entre 1999 y 2007, se observa un 7% de trombosis, que los autores relacionan con EICH crónico, cifras de plaquetas superiores a $50 \times 10^9/L$, utilización de catéteres y esteroides.

La Dra. E. Bermejo, al presentar la amplia experiencia de su grupo en SMPC, señala que la trombosis es más frecuente en PV y TE, y la hemorragia, en MF y TE. Destaca que tanto en los episodios hemorrágicos como en los trombóticos las plaquetas cumplen un papel esencial. Se produce un déficit del *pool* de depósito y una enfermedad de von Willebrand adquirida con predominio de tipo 2, que favorecen la hemorragia. Por otra parte, se observa una mayor expresión de CD62 (selectina P), lo que justifica la propensión a la trombosis. En este caso, la citometría de flujo permite detectar grados menores de activación plaquetaria.

La comunicación de A. Álvarez *et al.* analiza una serie de 140 pacientes con TE con una supervivencia libre de trombosis tras 5 años de seguimiento del 88%. Es llamativo el hecho de que en los pacientes con leucocitosis superior a $15 \times 10^9/L$ la supervivencia libre de trombosis se reduce al 25%.

Las anemias hemolíticas presentan con frecuencia complicaciones trombóticas. La Dra. F. Ferrer analiza tanto anemias hemolíticas congénitas (talasemia, anemia de células falciformes) como adquiridas (HPN, microangiopatías trombóticas). En los diferentes tipos se detecta un estado de hipercoagulabilidad en el que se implican varios mecanismos fisiopatológicos comunes a todas ellas. La Hb libre en plasma presenta una gran afinidad por NO; su depleción produce activación plaquetaria y vasoconstricción. Además, la Hb libre estimula en las células endoteliales la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1 y selectina E), y aumenta la interacción eritrocito/leucocito-endotelio. Por último, la fragmentación eritrocitaria produce micropartículas que expresan factor tisular y exponen fosfolípidos aniónicos, con la consiguiente generación de trombina.

LEUCEMIAS AGUDAS: COMPLICACIONES HEMORRÁGICAS Y TROMBÓTICAS

M.^ªJ. PEÑARRUBIA PONCE

Servicio de Hematología.

Hospital Universitario Río Hortega. Valladolid

El mantenimiento de la hemostasia implica una compleja interacción entre los vasos sanguíneos, las plaquetas y los factores de la coagulación. La adecuada producción de fibrina y su posterior lisis van a depender de la correcta interrelación entre los factores de la coagulación, los mecanismos inhibidores y el sistema fibrinolítico.

En las leucemias agudas todos estos elementos se van a ver afectados en mayor o menor medida y van a contribuir a la aparición de fenómenos hemorrágicos y, en menor proporción, trombóticos. Así, se ha demostrado que las células leucémicas son capaces de interaccionar con las células endoteliales estimulándolas a producir factores procoagulantes. Sin embargo, el factor más frecuentemente implicado en las alteraciones hemostáticas en las leucemias agudas va a ser sin duda la trombocitopenia, que contribuye a los síntomas hemorrágicos comunes en los pacientes leucémicos.

Complicaciones hemorrágicas

Trombocitopenia

Tanto la infiltración medular por las células leucémicas como la mielosupresión producida por los agentes citotóxicos derivan en la presencia de trombocitopenia. La trombocitopenia es un hecho común en todos los pacientes con leucemia aguda en algún momento de su evolución y en muchos está ya presente en el momento del diagnóstico. Como consecuencia de ello, se observan con frecuencia en los pacientes leucémicos fenómenos hemorrágicos de diversa severidad.

Las manifestaciones hemorrágicas severas espontáneas son improbables con recuentos plaquetarios superiores a $30 \times 10^9/L$. Sin embargo, por debajo de $5 \times 10^9/L$ se observa un incremento significativo en las pérdidas sanguíneas a partir del tubo digestivo¹. Hay que tener en cuenta que mediante estudios de cinética plaquetaria se ha estimado que cada día se pierden $7,1 \times 10^9$ plaquetas/L para mantener la integridad de los vasos sanguíneos.

Tradicionalmente el umbral para la transfusión de plaquetas se consideró de $20 \times 10^9/L$. Sin embargo, un estudio observacional y tres ensayos clínicos aleatorizados demostraron a lo largo de los años noventa que no existían diferencias en el riesgo hemorrá-

co cuando el dintel de transfusión se situaba en $10 \times 10^9/L$ frente al clásico de $20 \times 10^9/L^2$. Por otra parte, esta política transfusional más restrictiva permitía un ahorro de costes superior, en algún caso, al 30%. Hoy día las recomendaciones de los grupos de consenso sitúan el umbral de transfusión profiláctica en $10 \times 10^9/L$ en aquellos pacientes leucémicos con trombocitopenia derivada del tratamiento quimioterápico o en el seno de un trasplante de progenitores hematopoyéticos³.

Hay que tener en cuenta, sin embargo, que el riesgo hemorrágico con cualquier nivel plaquetario se incrementa si concurren determinadas circunstancias. La presencia, por ejemplo, de fiebre alta, hiperleucocitosis, descenso rápido del recuento plaquetario o presencia de signos hemorrágicos se asocia con un incremento en el riesgo hemorrágico. En estos pacientes puede, por tanto, ser necesario transfundir con cifras más altas de plaquetas. Otros factores también pueden ser importantes a la hora de subir el umbral de transfusión, como, por ejemplo, la utilización de determinados fármacos como la anfotericina B. Es bien conocido que dicho fármaco puede afectar al funcionalismo plaquetario tanto *in vivo* como *in vitro*.

En determinadas circunstancias los pacientes leucémicos pueden requerir procedimientos diagnósticos o terapéuticos invasivos. Entre dichos procedimientos pueden encontrarse: la colocación de catéteres centrales temporales o permanentes, biopsias endoscópicas transesofágicas o transbronquiales, aspiraciones de senos paranasales y biopsias de médula ósea. A veces incluso puede ser necesaria una cirugía mayor. Los expertos coinciden en que un umbral en torno a $40-50 \times 10^9$ plaquetas/L puede ser suficiente para cualquiera de estas técnicas, siempre que no existan alteraciones de la coagulación asociadas. En algún caso, como el de la biopsia de médula ósea, se puede realizar con plaquetas inferiores a $20 \times 10^9/L$ sin especiales problemas. En todos los casos en que se deba realizar a un paciente un procedimiento invasivo es requisito indispensable disponer de plaquetas de reserva para tratar posibles complicaciones hemorrágicas.

Durante el tratamiento de los pacientes leucémicos pueden aparecer fenómenos de refractariedad a plaquetas. Los pacientes con trombocitopenia refractaria aloimmune deben recibir plaquetas compatibles. Estos pacientes no se benefician de transfusiones profilácticas de plaquetas no compatibles que no mejoran los recuentos y es recomendable en estos pacientes reservar las transfusiones de plaquetas para eventos hemorrágicos³.

Disfunción plaquetaria

Aunque, como mencionábamos anteriormente, las manifestaciones hemorrágicas en los pacientes leu-

cémicos son casi siempre debidas a trombocitopenia, hay que señalar que se han descrito también alteraciones en la función plaquetaria. Dichas anomalías se han observado en leucemias agudas mieloblásticas, especialmente en la leucemia aguda megacarioblástica, y en menor medida en las linfoblásticas. Las alteraciones han consistido fundamentalmente en una pérdida de gránulos densos que se ha atribuido a fenómenos de activación. Otros autores explican la disfunción por una alteración de los megacariocitos. Se ha descrito en las leucemias toda una serie de alteraciones funcionales, como disminución de la agregación a ADP o colágeno, liberación alterada de nucleótidos y disminución de la producción de tromboxano B₂⁴. Sin embargo, las anomalías bioquímicas subyacentes permanecen sin dilucidar.

Coagulopatías

Una importante proporción de pacientes con leucemias agudas presentan anomalías de la coagulación en el momento del diagnóstico, que contribuyen a su tendencia hemorrágica. Dichas alteraciones pueden estar presentes tanto en leucemias agudas mieloblásticas como linfoblásticas⁵. Sin embargo, el paradigma de los trastornos de la coagulación lo representa, sin duda, la leucemia promielocítica aguda (LPA).

Todos los pacientes con LPA presentan alteraciones de la coagulación en el momento del diagnóstico. Tradicionalmente la mortalidad hemorrágica precoz de estos pacientes se situaba en torno al 20%. Con la introducción del ácido retinoico y las estrategias actuales de tratamiento dicha mortalidad ha disminuido significativamente, pero todavía alrededor de un 5% de los pacientes fallecen en las primeras semanas por hemorragias, fundamentalmente pulmonares y del sistema nervioso central⁶.

La coagulopatía de la LPA se ha caracterizado como una forma de coagulación intravascular diseminada (CID). Sin embargo, los mecanismos implicados son mucho más complejos que los asociados a las CID de otras situaciones como la sepsis o las urgencias obstétricas.

Los pacientes con LPA presentan anomalías en las pruebas de coagulación compatibles con CID. Aparece en la circulación elevación de marcadores de activación de la coagulación: fragmento 1+2 de la protrombina, complejos trombina-antitrombina y fibrinopéptido A, indicando la existencia de generación de trombina y conversión de fibrinógeno a fibrina. El desarrollo de esta CID se ha asociado con dos factores: la expresión por parte de los promielocitos de factor tisular, que conduciría a la activación del factor VII, y de *cancer procoagulant*, una cisteinproteínasa que activaría directamente el factor X⁷.

No obstante, en el caso de la CID asociada a la LAP, las vías convencionales de activación de la coagulación parecen estar menos implicadas en la formación de fibrina que en otros casos. De hecho, estos pacientes tienden a preservar sus niveles de antitrombina III, lo que sugiere un menor grado de generación de trombina. Por otra parte, no es infrecuente en estos pacientes encontrar tiempos de protrombina y de tromboplastina parcial activada mínimamente alargados o incluso conservados, lo que indica unos buenos niveles de factores de la coagulación circulantes. Frente a esto, la generación de fibrina sí está claramente aumentada, como lo demuestran los altos niveles de dímero D. Se ha implicado la elastasa presente en los gránulos de los promielocitos en la generación de fibrina a partir de fibrinógeno, como mecanismo alternativo a la trombina.

El grado de hipofibrinogenemia y de elevación del dímero D sugiere asimismo la existencia de una respuesta fibrinolítica exagerada. Diversos estudios han demostrado la presencia de niveles plasmáticos disminuidos de plasminógeno, α_2 -antiplasmina libre e inhibidor de activador de plasminógeno 1 (PAI-1) y niveles elevados de complejos plasmina- α_2 -antiplasmina. Este incremento de la actividad fibrinolítica se ha puesto en relación con dos factores: la presencia de activador de plasminógeno tipo uroquinasa en los blastos de los pacientes con LPA y la elevada expresión de anexina II en la superficie de estas mismas células. La anexina II es una proteína de unión a fosfolípidos que actúa como receptor de superficie celular del plasminógeno y del activador del plasminógeno tisular (t-PA), facilitando así la conversión del primero a plasmina⁸.

Actualmente las recomendaciones en el tratamiento de la coagulopatía de la LPA incluyen⁹:

- El uso de ácido all-trans retinoico en la inducción a la remisión que conduce a la rápida resolución de la coagulopatía. Dicho fármaco es capaz de reducir las propiedades procoagulantes y fibrinolíticas de los blastos de la LPA de forma rápida y eficaz.
- La administración profiláctica de plaquetas para mantener unos recuentos entre $30 \times 10^9/L$ y $50 \times 10^9/L$.
- La administración de plasma fresco congelado y de crioprecipitados puede estar indicada cuando existe una importante prolongación de los tiempos de coagulación o una severa hipofibrinogenemia.
- Se ha sugerido el uso de agentes antifibrinolíticos: ácido ϵ -aminocaproico o ácido tranexámico en los pacientes con hemorragias severas basado en series cortas de pacientes. Sin embargo, no existen ensayos clínicos aleatorizados que demuestren la eficacia de estos agentes. Por otra parte, su uso rutinario no ha demostrado beneficio en grandes series⁸.

Complicaciones tromboticas

La morbimortalidad relacionada con las complicaciones hemorrágicas e infecciosas en los pacientes con leucemias agudas ha hecho que muchas veces se infravaloren las complicaciones tromboticas. La enfermedad tromboembólica se ha considerado tradicionalmente una complicación de los tumores sólidos. Estudios epidemiológicos recientes subrayan, sin embargo, la gran incidencia de eventos tromboembólicos en los pacientes con leucemias agudas, tanto mieloblásticas como linfoblásticas¹⁰.

No es de extrañar que los fenómenos tromboticos sean frecuentes en los pacientes leucémicos, si tenemos en cuenta que en estos pacientes podemos encontrar alteraciones a nivel de cualquiera de los elementos de la clásica tríada de Virchow: el flujo sanguíneo, la integridad vascular y los componentes sanguíneos. La interacción de factores derivados de las células leucémicas con otros relacionados con el tratamiento va a generar un estado de hipercoagulabilidad (Tabla 1).

Alteraciones en el flujo sanguíneo

La viscosidad sanguínea la determinan los componentes celulares y plasmáticos de la sangre. En el síndrome de hiperleucocitosis en las leucemias agudas se producen alteraciones reológicas en la microcirculación, con enlentecimiento de la misma y formación de microtrombos. Estos fenómenos conducen a trastornos en el funcionamiento de órganos como el cerebro, los ojos, el corazón, los riñones y los pulmones. Estos trombos pueden afectar a los grandes vasos y producir trombosis arteriales y venosas¹¹.

Se define la hiperleucocitosis como la presencia de más de 100×10^9 leucocitos/ μ L. Este fenómeno es más habitual en las leucemias agudas mieloblásticas que en las linfoblásticas, y dentro de las primeras en los subtipos M4, M5 y la forma microgranular de la M3. Los blastos, especialmente de los subtipos M4 y M5, son mayores y menos deformables, lo que conduciría a un bloqueo de la microcirculación, con la consiguiente disfunción orgánica.

Recientemente, sin embargo, otro mecanismo diferente al de la hiperviscosidad se ha implicado en los fenómenos de obstrucción de la circulación. Los mieloblastos, a través de la producción de citoquinas como el factor de necrosis tisular alfa (TNF- α) e interleuquina 1 β , conducen a la sobreexpresión de moléculas de adhesión por parte de las células endoteliales: ICAM-1, VCAM-1, selectina P y selectina E. Ello conlleva el reclutamiento de más mieloblastos que quedan atrapados en la microcirculación¹². Se sabe, por ejemplo, que los blastos de los subtipos M4 y M5 tienen una fuerte expresión del CD11b, que es

Tabla 1. Factores implicados en la hipercoagulabilidad

Células leucémicas	<ul style="list-style-type: none"> · Actividad procoagulante · Liberación de citoquinas · Interacción con otras células: <ul style="list-style-type: none"> - Células endoteliales - Monocitos y macrófagos - Plaquetas
Agentes terapéuticos	
Infecciones	
Catéteres intravenosos	

un receptor de ICAM-1 e ICAM-2. Este mecanismo explicaría mejor la fisiopatología del síndrome de hiperleucocitosis, dado que serían precisos recuentos leucocitarios mucho mayores para explicarlo todo por fenómenos de hiperviscosidad.

El tratamiento del síndrome de hiperleucocitosis consiste en la citorreducción rápida mediante leucaféresis y quimioterapia.

Pared vascular

En los pacientes leucémicos, el uso de catéteres intravenosos representa un factor de riesgo para la aparición de trombosis venosas, especialmente en los niños con leucemias agudas linfoblásticas. La incidencia de trombosis venosa profunda relacionada con el catéter en el grupo global de los pacientes con cáncer se sitúa en los últimos estudios entre un 4 y un 16%. En una serie reciente de pacientes hematológicos, en la que el 39% presentaba una leucemia aguda y un 81% del grupo global tenía una trombocitopenia severa, se objetivó un 12% de eventos tromboticos relacionados con el catéter¹³.

Los ensayos clínicos diseñados para estudiar en el beneficio de la tromboprolifaxis en los pacientes con cáncer portadores de catéteres venosos centrales no han podido demostrar su utilidad¹⁴. Tampoco se ha probado en los pacientes hematológicos. Aunque es cierto que no se ha observado en los mismos un aumento de las complicaciones hemorrágicas, debido al alto riesgo hemorrágico de estos pacientes en relación con trombocitopenia, el uso de terapia anticoagulante representa siempre un desafío.

Componentes sanguíneos

Células leucémicas

Las células leucémicas producen y expresan factores protromboticos, como el factor tisular y el *cancer pro-*

Tabla 2. Fármacos protrombóticos

L-asparaginasa	G-CSF/GM-CSF
Prednisona	Ciclosporina/Tacrolimus
ATRA	Gentuzumab
Eritropoyetina	

coagulant, tanto en las formas mieloblásticas como en las linfoblásticas. Estas células producen a su vez citoquinas como la interleuquina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral (TNF) que inducen una actividad procoagulante en las células endoteliales. Las células endoteliales activadas producen asimismo diversas citoquinas que incrementan la actividad procoagulante de las células tumorales. Todas estas interacciones conducen a un estado de hipercoagulabilidad¹⁵. Esta actividad procoagulante es más evidente en los subtipos M4, M5 y especialmente en M3. Probablemente por ello en estos subtipos se describen no sólo trombosis venosas, sino también arteriales.

La utilidad de la heparina no fraccionada en el seno de esta compleja coagulopatía, especialmente en el caso de la LPA, no ha podido ser demostrada¹⁶. Algunos autores han sugerido que las heparinas de bajo peso molecular o los nuevos anticoagulantes como el fondaparinux podrían jugar un papel en el tratamiento del síndrome trombohemorrágico de la leucemia promielocítica.

Agentes terapéuticos

Diversos agentes terapéuticos han mostrado su potencial protrombótico (Tabla 2).

L-asparaginasa

Entre todos los agentes terapéuticos conviene destacar, sin duda, la L-asparaginasa. Este fármaco produce una marcada disminución en la síntesis hepática de diversos factores implicados en la coagulación y fibrinólisis. Así, se observa una disminución de los niveles plasmáticos de: fibrinógeno, factores VII, IX, X y XI, glicoproteína rica en histidina, α 2-macroglobulina y α 2-antiplasmina, lo cual conlleva un aumento del riesgo hemorrágico. Sin embargo, la incidencia de manifestaciones hemorrágicas es baja debido a que simultáneamente existe un descenso en los niveles de proteínas anticoagulantes: antitrombina, proteína C, proteína S y plasminógeno. Tras el cese del tratamiento se observa una tendencia protrombótica derivada de una recuperación más rápida de los factores procoagulantes. Las complicaciones tromboembólicas en estos pacien-

tes se sitúan según las series entre un 1 y un 37%. Un metaanálisis reciente con 1.752 niños sitúa la incidencia de trombosis en un 5%¹⁷.

Los niveles de fibrinógeno en los pacientes tratados con L-asparaginasa pueden estar profundamente disminuidos, especialmente cuando se combina con prednisona. Se recomienda la administración de crioprecipitado cuando los niveles caen por debajo de 100 mg/dL. No obstante, el papel beneficioso de dicha terapéutica no se ha demostrado en ningún ensayo clínico. Tampoco se ha podido comprobar la eficacia de la profilaxis antitrombótica¹⁸.

El tratamiento recomendado de los episodios trombóticos es la heparina de bajo peso molecular 2 veces al día durante 1-3 meses. Está recomendada la profilaxis con HBPM una vez al día desde un día antes de la reexposición hasta una semana después¹⁸.

ATRA

Conduce a una rápida normalización de la tendencia hemorrágica de los pacientes con LPA, pero induce trombosis en un pequeño porcentaje de pacientes (8,8% en un estudio reciente)¹⁹. Se ha sugerido que una rápida corrección de la hiperfibrinólisis por parte del ATRA podría conducir a un estado de hipercoagulabilidad.

Enfermedad venooclusiva hepática

Ocurre en alrededor del 10% de los pacientes tratados con trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos con acondicionamiento mieloablativo. Puede aparecer también en el seno del trasplante autólogo y se han descrito casos asociados al uso de gentuzumab. Se caracteriza por una activación de la coagulación en relación principalmente con daño endotelial. Es una de las complicaciones más temidas del trasplante alogénico. El defibrótido, una mezcla de oligonucleótidos con efectos antitrombóticos y fibrinolíticos en el endotelio de la microvasculatura, ha demostrado eficacia en más del 30% de las formas severas.

Microangiopatía trombótica

Se ha descrito fundamentalmente en el seno del trasplante alogénico y se ha relacionado con los inhibidores de la calcineurina: ciclosporina y tacrolimus. En la patogenia parece estar implicada la lesión de las células endoteliales de la microcirculación, que conduce a la activación plaquetaria y de los factores de la coagulación con producción de microtrombos. Los niveles de ADAMS-13 son normales, y las plasmaféresis no son eficaces. El tratamiento pasa por la sustitución de estos fármacos y medidas conservadoras²⁰.

Conclusiones

Las leucemias agudas presentan en general un alto riesgo de complicaciones hemorrágicas derivado especialmente de la trombocitopenia secundaria a la propia enfermedad y a los efectos del tratamiento quimioterápico. No obstante, no hay que olvidar el importante papel que las alteraciones de los factores de la coagulación y la fibrinólisis juegan en determinados subtipos como es el caso de la LPA. La transfusión profiláctica de plaquetas y el advenimiento de nuevos fármacos como el ATRA han conseguido mejorar la incidencia y la mortalidad de las complicaciones hemorrágicas.

Muchas veces olvidamos que el porcentaje de complicaciones trombóticas no es desdeñable en este grupo de pacientes. La interacción de varios factores como son las propias células leucémicas, la actividad procoagulante de diversos agentes terapéuticos, el uso de catéteres intravenosos, así como situaciones de comorbilidad como las infecciones facilitan la aparición de trombosis. El tratamiento y la profilaxis de los eventos trombóticos representa siempre un desafío en los pacientes con leucemia aguda, y en el momento actual numerosas cuestiones continúan siendo objeto de estudio.

Bibliografía

- Slichter SJ, Harker LA. Thrombocytopenia: mechanisms and management of defects in platelet production. *Clin Haematol* 1978; 7 (3): 523-39.
- Slichter SJ. Relationship between platelet count and bleeding risk in thrombocytopenic patients. *Transfus Med Rev* 2004; 18 (3): 153-67.
- Schiffer CA, Anderson KC, Bennett CL, Bernstein S, Elting LS, Goldsmith M, et al. Platelet transfusion for patients with cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2001; 19 (5): 1519-38.
- Cowan DH, Graham RC Jr, Baunach D. The platelet defect in leukemia. Platelet ultrastructure, adenine nucleotide metabolism, and the release reaction. *J Clin Invest* 1975; 56 (1): 188-200.
- Yanada M, Matsushita T, Suzuki M, Kiyoi H, Yamamoto K, Kinoshita T, et al. Disseminated intravascular coagulation in acute leukemia: clinical and laboratory features at presentation. *Eur J Haematol* 2006; 77 (4): 282-7.
- Tallman MS, Brenner B, Serna JL, Dombret H, Falanga A, Kwaan HC, et al. Meeting report. Acute promyelocytic leukemia-associated coagulopathy, 21 January 2004, London, United Kingdom. *Leuk Res* 2005; 29 (3): 347-51.
- Arbuthnot C, Wilde JT. Haemostatic problems in acute promyelocytic leukaemia. *Blood Rev* 2006; 20 (6): 289-97.
- Tallman MS, Abutalib SA, Altman JK. The double hazard of thrombophilia and bleeding in acute promyelocytic leukemia. *Semin Thromb Hemost* 2007; 33 (4): 330-8.
- Sanz MA, Tallman MS, Lo-Coco F. Tricks of the trade for the appropriate management of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Blood* 2005; 105 (8): 3019-25.
- Khorana AA, Francis CW, Culakova E, Fisher RI, Kuderer NM, Lyman GH. Thromboembolism in hospitalized neutropenic cancer patients. *J Clin Oncol* 2006; 24 (3): 484-90.

- Porcu P, Cripe LD, Ng EW, Bhatia S, Danielson CM, Orazi A, et al. Hyperleukocytic leukemias and leukostasis: a review of pathophysiology, clinical presentation and management. *Leuk Lymphoma* 2000; 39 (1-2): 1-18.
- Stucki A, Rivier AS, Gikic M, Monai N, Schapira M, Spertini O. Endothelial cell activation by myeloblasts: molecular mechanisms of leukostasis and leukemic cell dissemination. *Blood* 2001; 97 (7): 2121-9.
- Cortezzi A, Moia M, Falanga A, Pogliani EM, Agnelli G, Bonizzoni E, et al. Incidence of thrombotic complications in patients with haematological malignancies with central venous catheters: a prospective multicentre study. *Br J Haematol* 2005; 129 (6): 811-7.
- Freytes CO. Thromboembolic complications related to central venous access catheters in cancer patients. *Semin Thromb Hemost* 2007; 33 (4): 389-96.
- Kwaan HC. Double hazard of thrombophilia and bleeding in leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007: 151-7.
- Rodeghiero F, Avvisati G, Castaman G, Barbui T, Mandelli F. Early deaths and anti-hemorrhagic treatments in acute promyelocytic leukemia. A GIMEMA retrospective study in 268 consecutive patients. *Blood* 1990; 75 (11): 2112-7.
- Caruso V, Iacoviello L, Di Castelnuovo A, Storti S, Mariani G, de Gaetano G, Donati MB. Thrombotic complications in childhood acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis of 17 prospective studies comprising 1752 pediatric patients. *Blood* 2006; 108 (7): 2216-22.
- Payne JH, Vora AJ. Thrombosis and acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2007; 138 (4): 430-45.
- Breccia M, Avvisati G, Latagliata R, Carosino I, Guarini A, de Propriis MS, et al. Occurrence of thrombotic events in acute promyelocytic leukemia correlates with consistent immunophenotypic and molecular features. *Leukemia* 2007; 21 (1): 79-83.
- Kojouri K, George JN. Thrombotic microangiopathy following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Oncol* 2007; 19 (2): 148-54.

TROMBOSIS EN ANEMIAS HEMOLÍTICAS

F. FERRER, M.^aJ. MORENO,
V. ROLDÁN, V. VICENTE

*Unidad de Hematología y Oncología Médica.
Hospital Universitario Morales Meseguer.
Centro Regional de Hemodonación. Murcia*

Introducción

Existe una mayor incidencia de trombosis en las diferentes anemias hemolíticas (AH), particularmente en la enfermedad de células falciformes (ECF), en la talasemia y en la hemoglobinuria paroxisítica nocturna (HPN). Aunque las diferentes AH tienen una diferente fisiopatología, la hemólisis por sí misma, independientemente de la causa responsable, es una condición procoagulante. Algunos de los mecanismos que facilitan la mayor incidencia de eventos trombóticos pueden ser comunes: pér-

dida de la asimetría de la membrana lipídica tanto en eritrocitos (ECF y talasemia) como en plaquetas (HPN); concentración incrementada de micropartículas procoagulantes en plasma; disminución de la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO) y disfunción endotelial¹. Además de la trombosis, una lista creciente de manifestaciones clínicas atribuibles a la hemoglobinemia como son las distonías que afectan al sistema gastrointestinal, cardíaco, pulmonar y urológico y que se manifiestan como hipertensión pulmonar (HTP), espasmos esofágicos, priapismo, etc., indican que la hemólisis podría ser considerada como un nuevo mecanismo independiente y relevante de la trombosis propiciada por la disfunción endotelial y la vasculopatía².

Etiopatogenia y manifestaciones trombóticas

Anemias hemolíticas hereditarias

La talasemia y la enfermedad de las células falciformes (ECF) representan los desórdenes genéticos más frecuentes de AH hereditaria. La talasemia es el resultado de la carencia parcial o total en la síntesis de una de las cadenas de globina α o β de la hemoglobina (Hb) A. Por el contrario, la ECF deriva del cambio de un aminoácido en la cadena β de la globina ($\beta^{Glu \rightarrow Val}$). A pesar de su diferente etiología, los pacientes con alguna de estas enfermedades presentan datos comunes de hipercoagulabilidad, con presencia de trombosis tanto arterial como venosa³.

El accidente isquémico cerebrovascular (ACV) es una complicación común en la ECF. También se presenta en pacientes con β -talasemia *major*, con una incidencia de entre el 2% y el 20%¹, siendo más frecuente en pacientes que no son transfundidos regularmente³.

Respecto a la enfermedad tromboembólica venosa (ETV), una serie reciente del National Hospital Discharge Survey de los Estados Unidos encontró que en pacientes afroamericanos menores de 40 años con ECF era más alta la prevalencia de embolia pulmonar (EP) que en aquéllos sin ECF (0,44% vs. 0,12%), aunque la prevalencia de trombosis venosa profunda (TVP) fue similar³. Por el contrario, en un estudio muy reciente caso-control en pacientes de raza negra con ETV, el estado de portador de ECF parece aumentar el riesgo de TVP por 2 veces y el riesgo de EP hasta 3,9 veces⁴. El embarazo supone un factor de riesgo de trombosis en esta población, con una *odds ratio* de 6,7. En la talasemia, la prevalencia de ETV en 8.860 pacientes con talasemia *major* (TM) e intermedia (TI) en el área mediterránea e Irán fue del 1,65%, siendo más de 4 veces mayor en la TI (4%) que en la TM (0,9%)³.

Hemoglobinuria paroxística nocturna

La HPN es una enfermedad genética adquirida ligada al cromosoma X, debida a la expansión clonal de células progenitoras hematopoyéticas que han adquirido una mutación somática en el gen PIG-A, el cual codifica la síntesis de grupos glicosilados fosfatidilinositol (GPI), necesarios para el anclaje de ciertas proteínas (proteínas GPI) a la membrana celular⁵. Entre estas proteínas GPI se encuentran los antígenos de membrana CD55 y CD59, responsables de modular la actividad lítica del complemento. La hemólisis de la HPN es consecuencia de esta actividad incontrolada de la cascada del complemento en la superficie de los eritrocitos por el déficit de proteínas GPI⁵.

La HPN se caracteriza por la tríada clásica de citopenias, trombosis, y hemólisis intravascular. La trombosis es la principal causa de muerte. Aunque la trombosis como primera manifestación de la HPN es infrecuente (5% de los casos), aproximadamente el 40% de los enfermos sufre una complicación trombótica en algún momento de su evolución². La complicación trombótica más frecuente es la trombosis de la vena hepática (síndrome de Budd-Chiari), seguida de la trombosis del seno y de la vena cerebral y hasta en el 20% de los casos se afecta más de un territorio⁶. Es importante resaltar que la probabilidad de un evento trombótico está directamente relacionada con el tamaño del clon celular anómalo HPN, y éste, a su vez, con el grado de hemólisis. Así, el riesgo de trombosis a los 10 años en pacientes con más de un 50% de granulocitos deficitarios en GPI es del 44%, frente al 5,8% para los pacientes con menos de un 50% de población celular anómala⁵. El eculizumab, un inhibidor de la fracción C5 del complemento, ha corroborado esta asociación ya que, además de prevenir eficazmente la hemólisis, se ha demostrado recientemente que disminuye el riesgo tromboembólico⁷.

Fisiopatología del sistema hemostático en las anemias hemolíticas

Independientemente de la causa primaria (Tabla 1), como consecuencia de la hemólisis se produce un exceso de Hb libre. La Hb libre en plasma dimeriza y se une a la haptoglobina, formándose un complejo Hb-haptoglobina que es retirado en el hígado. Cuando la capacidad de eliminación de la Hb libre se satura, sus niveles aumentan en plasma y en orina. El exceso de esta Hb libre tiene efectos tóxicos tanto directos (prooxidante, inflamatorio y citotóxico) como indirectos, muchos de ellos, mediados por su capacidad de inhibir el NO². La hemoglobinemia

Tabla 1. Condiciones clínicas asociadas a hemólisis intravascular importante

Enfermedad de células falciformes
Síndromes talasémicos
Esferocitosis y estomatocitosis hereditaria
Déficit de piruvato quinasa
Hemoglobinuria paroxística nocturna
Anemias hemolíticas microangiopáticas
Reacción transfusional por incompatibilidad ABO
Hemoglobinuria paroxística inducida por el frío
Anemia hemolítica autoinmune severa
Anemia inducida por infección
Malaria
Bypass cardiopulmonar
Anemia mecánica inducida por sustitución de válvulas cardiacas

también puede ser un factor que contribuya a explicar las manifestaciones clínicas en las anemias microangiopáticas trombóticas, no totalmente explicables por la deficiencia o inhibición de los niveles de ADAMTS 13^{1,8}.

Papel del óxido nítrico

El NO es una molécula gaseosa diatómica que, debido a su electrón no apareado, funciona como radical libre. Es producido en el endotelio por la sintetasa de NO, que convierte la L-arginina en citrulina (Figura 1). Una vez producido, difunde al músculo liso adyacente, donde se une con gran avidez a la fracción hemo de la guanilato ciclasa para activarla, la cual pasa de GTP a GMPc, activando las proteína quinasas dependientes de GMPc, produciendo vasodilatación. Además, se une al grupo hemo de la oxihemoglobina en una reacción, muy rápida e irreversible, en la que se produce metahemoglobina (HbFe^{III}) y nitrato (NO₃⁻)⁹. En condiciones normales, la reacción del NO con la Hb está limitada por la compartimentalización de la Hb dentro de la membrana eritrocitaria. Durante la hemólisis intravascular, esta barrera se rompe y la Hb libre en plasma consume el NO a una velocidad 1.000 veces superior a la Hb intraeritrocitaria⁹.

El NO también es consumido por reacciones con especies reactivas de oxígeno (ERO) (O₂⁻) producidas por los niveles altos de xantín-oxidasa y NADPH oxidasa, que producen radicales de oxígeno como el peroxinitrito (ONOO⁻). Una vez producido el daño oxidativo, la Hb y el Fe⁺³ interactúan con la membrana del hematíe y causan peroxidación lipídica y daño de la membrana¹⁰ (Figura 1).

Tabla 2. Efectos vasculares del óxido nítrico¹⁸

Vasodilatadores	· Relajación del músculo liso vascular · Disminución de la expresión de endotelina-1 y receptor de la endotelina
Antiadhesivos	· Disminución de la expresión de moléculas de adhesión
Antitrombóticos	· Disminución de la activación plaquetaria · Disminución de la actividad del factor tisular · Disminución de la generación de trombina
Antioxidante	· Inactivación de especies de oxígeno reactivas

Además, con la hemólisis se libera arginasa eritrocitaria, que convierte la L-arginina, sustrato para la hemólisis, en ornitina (Figura 1), disminuyendo así la capacidad de producción del NO. La ornitina a su vez inhibe la absorción celular de la arginina limitando aún más la biodisponibilidad de ésta para la NO sintetasa¹¹. Finalmente, la ornitina se convierte en prolina y poliaminas, que pueden también incrementar la proliferación del músculo liso vascular¹¹. Así, en pacientes con ECF, niveles de arginina bajos y de arginasa altos se correlacionan con el riesgo de HTP y muerte temprana. En resumen, durante la hemólisis no sólo se produce un descenso del NO por su mayor consumo, sino que además se produce un descenso en su producción.

Las funciones del NO son múltiples (Tabla 2)⁹. El NO es el principal regulador del tono vascular al producir vasodilatación mediante la relajación del músculo liso (mediada por el GMPc), y por la disminución de la expresión de endotelina 1 (el más potente vasoconstrictor endotelial) y su receptor. Así, por ejemplo, en la ECF, los niveles de endotelina 1 están incrementados tanto en las crisis como en la situación basal. La endotelina 1, además, activa los canales Gardos (canal de K⁺ activado por el Ca²⁺), permitiendo la efusión rápida de K⁺ desde el interior de los eritrocitos falciformes, lo que contribuye a la deshidratación de estas células⁹. El senicapoc, un inhibidor del canal Gardos, reduce el número de células deshidratadas, incrementa la Hb y reduce los marcadores de hemólisis¹².

El NO también tiene un efecto antiproliferativo y antiadhesivo al inhibir la expresión de moléculas de adhesión como la molécula de adhesión de las células vasculares 1 (VCAM-1), lo que facilita el reclutamiento de leucocitos en los sitios de inflamación vascular y la interacción reticulocito-endotelio¹¹.

Finalmente, el NO tiene un potente efecto anti-trombótico mediante la inhibición de la adhesión y la agregación plaquetaria y la supresión de la secreción de proteínas procoagulantes⁹. Así, se ha demostrado que fármacos liberadores de NO (S-nitrotiol) inhiben

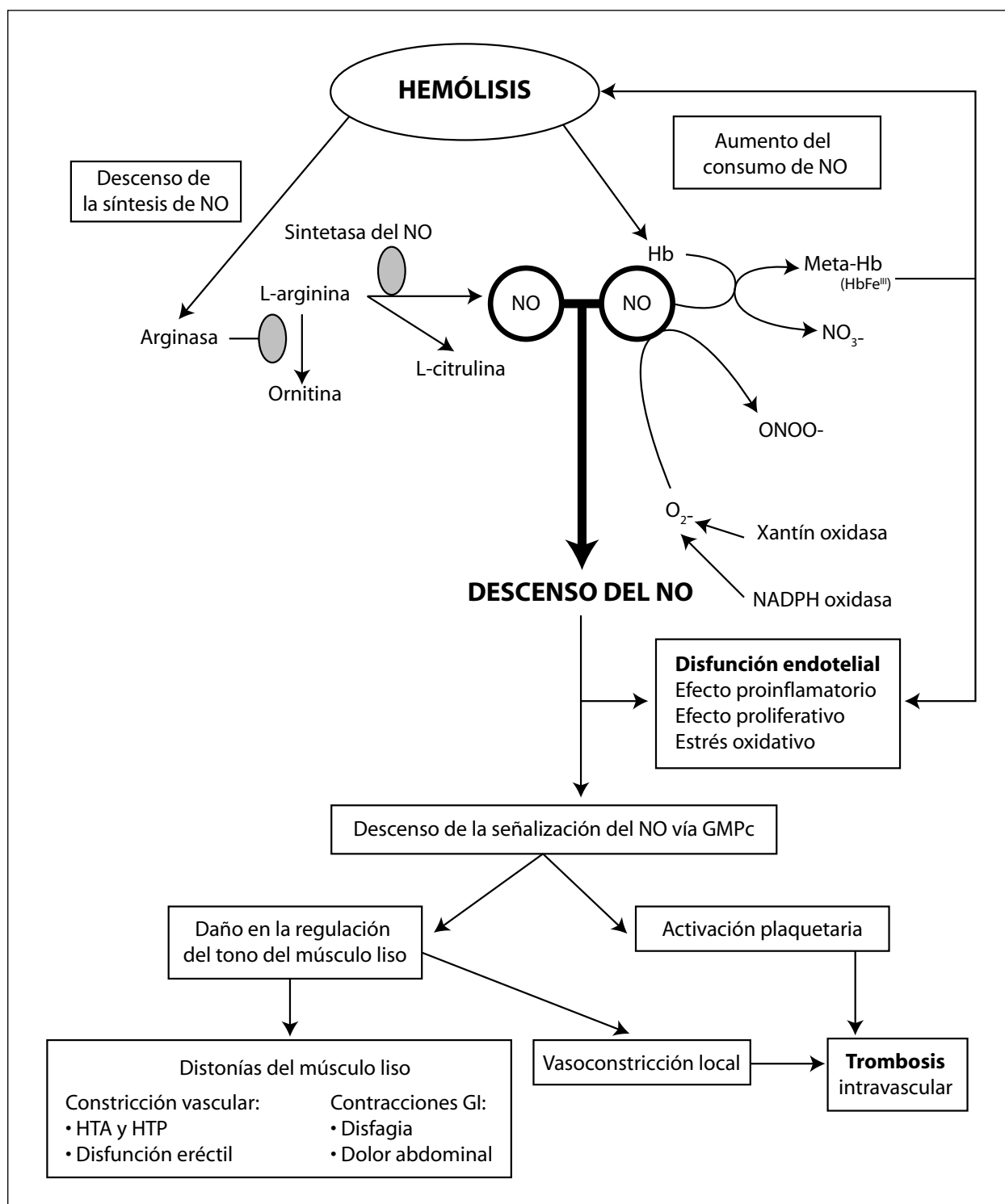


Figura 1. Activación hemostática asociada a la hemólisis. Durante la hemólisis intravascular, la Hb se libera al plasma. Cuando los mecanismos de eliminación de la Hb libre se saturan, se produce un aumento de los niveles de Hb y metahemoglobina en plasma, los cuales tienen un efecto proinflamatorio, proliferativo y prooxidante directo sobre las células endoteliales. Junto a este efecto, se produce un descenso de la biodisponibilidad del NO como consecuencia de un mayor consumo (por su unión rápida e irreversible a la oxihemoglobina o vía inducción de la xantín oxidasa y NADPH oxidasa), lo cual no se ve compensado con una mayor producción ya que, durante la hemólisis, también se libera arginasa, el sustrato para la síntesis de NO. La disminución del NO resulta en un descenso de la actividad de la guanilato ciclasa, y secundariamente del GMPC, principal regulador del tono del músculo liso, lo que produce vasoconstricción, distonías del músculo liso y activación y agregación plaquetarias, y contribuye, de esta manera, a la formación del coágulo.

la agregación plaquetaria¹³, mientras que este efecto es abolido por la infusión de niveles relevantes de Hb libre a la mezcla¹⁰. Además, el NO es capaz de modular la función del factor XIII, estabilizando el coágulo y reduciendo su disolución¹⁴, mientras que su efecto sobre el factor tisular es más controvertido¹⁵.

Todos estos mecanismos contribuyen a la progresión de la vasculopatía en la anemia hemolítica, caracterizada por vasoconstricción, hiperplasia del músculo liso y de la íntima, y trombosis *in situ*, y constituyen la base fisiopatológica de la HTP asociada a la hemólisis⁹.

Alteración de la membrana de los eritrocitos y de las plaquetas; formación de micropartículas

En condiciones normales los fosfolípidos que contienen colina predominan en la monocapa externa de la membrana plasmática celular, mientras que la fosfatidilserina (PS) se halla exclusivamente en la monocapa interna. El mantenimiento de esta asimetría en la estructura lipídica se debe al funcionamiento de una serie de enzimas: flipasa, flopasa (ambas dependientes de ATP) y escramblasa (enzima activada por calcio), que se ven moduladas por ERO o por el Ca²⁺ intracelular¹¹.

En la ECF, la sustitución de un glutámico por una valina en la posición 6 del gen de la cadena β (HbS) crea un punto de contacto hidrofóbico adhesivo. Mientras que la HbA normal del adulto cuando se desoxigena es soluble, la HbS cuando se desoxigena se hace insoluble y forma haces de fibrina tubulares responsables de la deformación en forma de hoz. Además, repetidos ciclos de falciformación-desfalciformación, como consecuencia de la polimerización-despolimerización de la Hb, contribuyen tanto a la exposición extracelular de epítopes proteicos y glicolípidos que normalmente se encuentran en la monocapa interna de la membrana lipídica como a la formación de microvesículas^{3,16}.

Igualmente, en la talasemia, existe un exceso de cadenas α y β que son inestables y tienden a oxidarse y a precipitar dentro de los eritrocitos transformándose en hemocromos. El grupo hemo y las proteínas desintegradas liberan especies tóxicas de Fe que catalizan la formación de ERO y dan lugar a cambios oxidativos en la membrana lipídica¹⁷.

En la HPN, las plaquetas, tras su estimulación, pierden la asimetría de su membrana lipídica y se produce la externalización de fosfolípidos procoagulantes y la generación de microvesículas¹⁸.

Las alteraciones en la membrana de los glóbulos rojos (GR) contribuyen al estado de hipercoagulabilidad por varios mecanismos, cada uno de los cuales se asocia a un fenotipo específico (Tabla 3)¹¹:

Tabla 3. Consecuencias de la exposición de la fosfatidilserina en la membrana de las células rojas falciformes⁵

Efecto	Fenotipo potencial
Reconocimiento macrofágico	Anemia
Adherencia al endotelio	Crisis vasooclusivas
Unión a la protrombinasa	ACV
Hidrólisis por la sPLA2	Síndrome pulmonar agudo

- El reconocimiento de estas células por los macrófagos contribuye a la anemia⁵.
- Adhesión al endotelio vascular a través de su unión a la trombospondina (TPS)¹⁹ o bien al –recientemente descubierto– receptor endotelial de la PS²⁰
- Unión al factor X y al complejo protrombinasa^{3,11}.
- Mayor vulnerabilidad a la acción de la fosfolipasa A2 (sPLA2), lo que induce la formación de mediadores inflamatorios y de la coagulación como el ácido araquidónico, ácidos grasos y lisofosfatídicos (LPA) que pueden contribuir al daño endotelial¹¹.
- Finalmente, en la ECF, los eritrocitos falciformes PS de tipo II (altos niveles de PS) en comparación con los PS de tipo I causan, *in vitro*, un incremento de 2 veces el factor tisular (FT) y tienen una mayor fragilidad osmótica. Todos estos mecanismos juntos pueden contribuir al síndrome pulmonar agudo (SPA), característico de los enfermos con ECF³.

De forma similar, las micropartículas (MP) producidas por fragmentación de hematíes durante la hemólisis, o derivadas de plaquetas, células endoteliales o monocitos tras la activación de éstos o durante la apoptosis, constituyen nichos polinegativos que activan la fase intrínseca de la coagulación y generan trombina²¹. En la ECF se han encontrado niveles elevados de MP, y su número aumenta durante los episodios de dolor³. La cantidad de MP está también aumentada en la β -talasemia/HbE³ y en la HPN, donde derivan fundamentalmente de plaquetas activadas¹⁸. Los marcadores de activación de la coagulación, como el dímero D, el complejo trombina-antitrombina (TAT) o el fragmento 1+2 (F1.2), parecen guardar relación con el número de MP y MP-FT positivas⁷.

Interacción eritrocito/leucocito-endotelio: activación endotelial

La hemoglobina libre y el grupo hemo¹, la disminución de la biodisponibilidad del NO⁹, y la exposición de fosfolípidos en la membrana de los hematíes¹¹ contribuyen a aumentar la adhesión de los hematíes al endotelio vascular, paso inicial en el mecanismo de vasooclusión. Entre los puentes de unión eritrocito-

endotelio ya caracterizados destaca la TPS, que sirve de unión entre el receptor CD36 del hematíe y el receptor endotelial $\alpha v \beta 3$, o la unión entre la integrina eritrocitaria $\alpha 4 \beta 1$ y el receptor endotelial VCAM-1, cuya expresión aumenta tras la exposición a citoquinas e hipoxia. Otro ligando importante es el FvW, que sirve de unión entre el receptor endotelial $\alpha v \beta 3$ o la glicoproteína GPIb-IX y el eritrocito¹⁹. Todas éstas serán, por tanto, potenciales dianas terapéuticas para reducir la vasooclusión. Así, la hidroxiurea, aprobada en el tratamiento de la ECF, además de aumentar los niveles de HbF y de NO y de reducir el recuento leucocitario¹⁶, modula la expresión de receptores de adhesión eritrocitarios (CD36, $\alpha 4 \beta 1$, VCAM-1), lo que puede contribuir a su eficacia en la disminución de las crisis vasooclusivas²².

También la adhesión de los leucocitos al endotelio puede desempeñar una función importante en los mecanismos de vasooclusión, al tratarse de células grandes, rígidas y no fácilmente deformables que disminuyen el calibre de los vasos. Recientes estudios de microscopía intracavitaria demuestran que los GR falciformes pueden adherirse directamente a los leucocitos en un modelo de vasooclusión de ratones inducido por cirugía o por TNF- α ²³.

Además, se han identificado células endoteliales circulantes tanto en la β -talasemia como en la ECF, y su número se incrementa durante las crisis de falciformación. Estas células tienen una expresión anormalmente alta de FT en su superficie, lo que puede jugar un papel en el reclutamiento de hematíes y leucocitos, y promover la trombosis en los sitios de inflamación vascular³.

Activación plaquetaria

Existe suficiente evidencia en las publicaciones que demuestra que las plaquetas de los pacientes con ECF, β -talasemia o HPN están crónicamente activadas. Durante los episodios de dolor de la ECF, disminuye el número de plaquetas circulantes debido posiblemente al depósito de éstas en los lugares de daño vascular. Así, en ambas AH hereditarias, se ha observado un incremento de la agregación plaquetaria, un aumento de la expresión de los marcadores de activación plaquetaria (P-selectina, CD63 y el factor plaquetario 3) y unos niveles de tromboxano A2 y prostaciclina en orina aumentados³.

En la HPN, además de la activación plaquetaria mediada por el estado de resistencia al NO, la carencia de proteínas reguladoras del complemento CD55 y CD59 en la superficie de las plaquetas hace a estas células más sensibles a la activación mediada por el complemento, lo que resulta en cambios morfológicos y en la liberación de MP procoagulantes¹³.

Alteraciones en los marcadores de generación de trombina y de las proteínas naturales anticoagulantes

Las concentraciones plasmáticas del F1.2 de la pro-trombina y del complejo TAT (ambos, marcadores de generación de trombina) están aumentadas tanto en la ECF como en la talasemia y, en concreto en la ECF, incluso en los estados de ausencia de crisis. En pacientes con ECF existe una correlación entre los niveles de F1+2 y el número de hematíes PS-positivos, lo que apoya el rol de la exposición de la PS en la activación de la coagulación³. De igual forma, durante los episodios de trombosis en pacientes con HPN se detectan niveles incrementados de TAT²⁴.

También se han confirmado elevaciones en plasma de marcadores de fibrinólisis como el dímero D, el complejo plasmina-antiplasmina y el fibrinopéptido A, relacionándose los niveles de dímero D con la frecuencia de las crisis de dolor en la ECF⁷. En la HPN, existe un incremento de la actividad fibrinolítica que se relaciona con el hecho de que el receptor del activador del plasminógeno es una proteína GPI cuyo déficit, al disminuir la fibrinólisis, favorece la aparición de complicaciones tromboembólicas¹³.

Esta activación de la coagulación parece tener un iniciador fisiológico común: el FT. Los niveles de FT están elevados tanto en la circulación como en las células endoteliales circulantes de pacientes con ECF³. Entre las causas que contribuyen al incremento de la expresión del FT en la ECF están el aumento de marcadores de inflamación (IL-1, TNF- α), los episodios de isquemia-reperfusión y la hemólisis inducida por células PS-positivas de tipo II⁷. En pacientes con trombosis y HPN los niveles de FT circulante están también elevados²⁴. Ello puede deberse tanto a la acción del complemento sobre monocitos y macrófagos deficitarios en CD-55 y CD-59²⁴ como a la presencia de anticuerpos antifosfolípido activadores del complemento¹³.

Además del incremento de marcadores de generación de trombina y la disminución de la actividad fibrinolítica, en las AH hereditarias se ha sugerido la existencia de un descenso de dos proteínas anticoagulantes naturales (la proteína S y la proteína C) en los estados de no crisis, descenso que se intensifica aún más durante la crisis. Su descenso puede producirse bien como consecuencia de un consumo crónico o bien por el aumento de la unión de la proteína S a los hematíes PS-positivos. Se han encontrado niveles descendidos de ambas proteínas en adultos con ECF que han sufrido un ACV en comparación con niños con ECF neurológicamente sanos³.

Finalmente, se detectan con relativa frecuencia anticuerpos antifosfolípidos en pacientes con ECF ho-

mocigotos (HbSS), sobre todo aquéllos dirigidos contra la PS⁷.

Otros mecanismos posiblemente implicados

Esplenectomía/Anesplenía funcional

La hipoesplenía o anesplenía funcional o quirúrgica de los enfermos con β -talasemia o con ECF podría contribuir al estado de hipercoagulabilidad visto en estos enfermos^{1,3}. Aunque la trombocitosis que sigue a la esplenectomía podría contribuir a la hipercoagulabilidad, el mecanismo que más participa es el incremento de células rojas anómalas en la circulación, con la subsiguiente activación de las plaquetas y del sistema de la coagulación. Esto también explicaría por qué las transfusiones repetidas en ambas enfermedades descienden el riesgo de complicaciones trombóticas³.

Inflamación

Recientes estudios han demostrado unos niveles más altos de ciertas citoquinas (IL-6, IL-8 y TNF- α) y marcadores de activación de la coagulación (TAT, dímero D, F 1.2) en pacientes con ECF y HTP respecto a aquéllos con ECF sin HTP²⁵.

Conclusión

La Hb libre en plasma caracteriza varias enfermedades con un fenotipo clínico común: trombosis, vasculopatía y disfunción endotelial. En las diferentes AH se detecta un estado de hipercoagulabilidad en el que se han implicado varios mecanismos fisiopatológicos, comunes en todas ellas, siendo el consumo de NO la llave central de los mismos. El mayor conocimiento de la fisiopatología de la trombosis en las AH es el punto de partida para la mejora en la prevención y el tratamiento de la enfermedad tromboembólica que aparece en los cuadros hemolíticos.

Bibliografía

- Cappellini MD. Coagulation in the pathophysiology of hemolytic anemias. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007; 2007: 74-8.
- Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA* 2005; 293: 1653-62.
- Ataga KI, Cappellini MD, Rachmilewitz EA. Beta-thalassemia and sickle cell anaemia as paradigms of hypercoagulability. *Br J Haematol* 2007; 139: 3-13.
- Austin H, Key NS, Benson JM, Lally C, Dowling NF, Whitsett C, et al. Sickle cell trait and the risk of venous thromboembolism among blacks. *Blood* 2007; 110: 908-12.
- Parker C, Omine M, Richards S, Nishimura J-I, Bessler M, Ware R, et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2005; 106: 3699-709.
- Ziazas PD, Poulou LS, Rokas GI, Bartzoudiss D, Voulgarelis M. Thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: sites, risks, outcome. An overview. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 642-5.
- Hillmen P, Muus P, Dúrsen U, Risitano AM, Schubert J, Luzzatto L, et al. Effect of the complement inhibitor eculizumab on thromboembolism in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2007; 110: 4123-8.
- Thachil J. Thrombotic thrombocytopenic purpura: is there more than ADAMTS-13? *J Thromb Haemost* 2007; 5: 634-5.
- Gladwin MT, Kato GJ. Cardiopulmonary complications of sickle cell disease: role of nitric oxide and hemolytic anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005; 51-7.
- Gladwin MT, Kato GJ. Hemolysis-associated hypercoagulability in sickle cell disease: the plot (and blood) thickens! *Haematologica* 2008; 93: 1-3.
- Hagar W, Vichinsky E. Advances in clinical research in sickle cell disease. *Br J Haematol* 2008; 141: 346-56.
- Ataga KI, Smith WR, De Castro LM, Swerdlow P, Sauntharajah Y, Castro O, et al. Efficacy and safety of the Gardos channel blocker, senicapoc (ICA-17043), in patients with sickle cell anemia. *Blood* 2008; 111: 3991-7.
- Stephen AH, Hillmen P. Recent developments in the understanding and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Br J Haematol* 2007; 137: 181-92.
- Catani MV, Bernassola F, Rossi A, Melino G. Inhibition of clotting factor XIII activity by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 249: 275-8.
- Dusse LM, Cooper AJ, Lwaleed BA. Tissue factor and nitric oxide: a controversial relationship! *J Thromb Thrombolysis* 2007; 23: 129-33.
- Frenette PS, Atweh GF. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *J Clin Invest* 2007; 117: 850-8.
- Rund D, Rachmilewitz E. Beta-thalassemia. *N Engl J Med* 2005; 353: 1135-46.
- Hugel B, Socié G, Vu T, Toti F, Gluckman E, Freyssonnet J-M, Scrobohaci M-L. Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and aplastic anemia. *Blood* 1999; 93: 3451-6.
- Setty BNY, Kulmani S, Stuart MJ. Role of erythrocyte phosphatidylserine in sickle red cell-endothelial adhesion. *Blood* 2002; 99: 1564-71.
- Setty BNY, Betal SG. Microvascular endothelial cells express a phosphatidylserine receptor: a functionally active receptor for phosphatidylserine-positive erythrocytes. *Blood* 2008; 111: 905-14.
- Horne MK 3rd, Cullinane AM, Merryman PK, Hoddeson EK. The effect of red blood cells on thrombin generation. *Br J Haematol* 2006; 133: 403-8.
- Johnson C, Telen MJ. Adhesion molecules and hydroxiurea in the pathophysiology of sickle cell disease. *Hematologica* 2008; 93: 481-6.
- Turhan A, Weiss LA, Mohandas N, Coller BS, Frenette PS. Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: a new paradigm. *PNAS* 2002; 99: 3047-51.
- Liebman HA, Feinstein DI. Thrombosis in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria is associated with markedly elevated plasma levels of leukocyte-derived tissue factor. *Thrombosis Research* 2003; 111: 235-8.
- Ataga KI, Moore CG, Hillery CA, Jones S, Whinna HC, Strayhorn D, et al. Coagulation activation and inflammation in sickle cell disease-associated pulmonary hypertension. *Haematologica* 2008; 93: 20-6.

PARADOJA ENTRE ACTIVACIÓN Y FALLO DE LA FUNCIÓN PLAQUETARIA EN SÍNDROMES MIELOPROLIFERATIVOS

E. BERMEJO, M.F. ALBERTO,
S.S. MESCHENGIESER,
A. SÁNCHEZ LUCEROS, M.A. LAZZARI
*Departamento de Hemostasia y Trombosis.
Instituto de Investigaciones Hematológicas
Mariano R. Castex. Academia Nacional
de Medicina de Buenos Aires (Argentina)*

Paradoja entre activación y fallo de la función plaquetaria en síndromes mieloproliferativos

Los síndromes mieloproliferativos (SMP) pertenecen a un grupo diverso de enfermedades clonales que se originan en la célula madre pluripotencial y están caracterizadas por la excesiva proliferación de células de una o más líneas mieloides¹. Esta proliferación se relaciona con una maduración normal y efectiva cuyo resultado es el aumento del número de granulocitos, plaquetas y/o hematíes.

Dentro de todos los grupos pertenecientes a los SMP, la policitemia vera (PV) y la trombocitemia esencial (TE) son, desde el punto de vista del laboratorio, los más estudiados en la búsqueda de una explicación a los eventos trombohemorrágicos².

La trombosis es más frecuente en la PV y en la TE, y la hemorragia se presenta sobre todo en mielofibrosis primaria (MF) y en TE, siendo muy bajo el riesgo tanto de trombosis como de hemorragias en la LMC.

Tefferi y Elliot reportaron un análisis de varios trabajos sobre los eventos trombóticos y hemorrágicos al momento del diagnóstico con porcentajes que varían del 9,7 al 29,4% para TE y del 34 al 38,6% para PV en el caso de trombosis, y del 3,6 al 37% en TE y del 1,7 al 20% en PV para los eventos hemorrágicos³.

Los síntomas trombóticos incluyen trombosis tanto arteriales como venosas, de grandes vasos o de microcirculación (eritromelalgia, trastornos visuales y neurológicos) y, de forma característica, trombosis en sitios inusuales (mesentérica, suprahepática, porta, esplénica). Los síntomas hemorrágicos incluyen equimosis, epistaxis, menorragia, gingivorragia y, con menor frecuencia, hemorragias gastrointestinales⁴.

Si bien las manifestaciones trombóticas han sido atribuidas a alteraciones de la función plaquetaria, la activación leucocitaria en PV y TE se ha descrito en asociación a marcadores trombofílicos plasmáticos⁵. La leucocitosis ha sido identificada como factor de

riesgo trombótico en PV⁶ y también la formación de agregados mixtos circulantes (plaquetas-leucocitos) como marcadores de posible recurrencia de eventos trombóticos⁷.

Las plaquetas cumplen un papel importante en ambos eventos. Las anomalías más frecuentes se expresan a nivel morfológico, con presencia de macroplaquetas, heterogeneidad en forma y tamaño, dilatación y desorganización del sistema canalicular abierto y tubular denso, reducción en el número de gránulos α y densos, y reducción en las mitocondrias.

Con respecto a su funcionalidad, en la agregación plaquetaria, la respuesta puede estar disminuida (con ADP, colágeno o epinefrina), aumentada o bien puede observarse agregación espontánea en plasma rico en plaquetas sin diluir. La agregación plaquetaria inducida por epinefrina puede estar ausente o disminuida. Esta alteración no es patognomónica pero puede definir el diagnóstico como cuadro primario o secundario.

También se han descrito anomalías en los receptores plaquetarios como disminución en las GP IIb-IIIa, GP Ib, GP Ia-IIa, en la fijación del fibrinógeno y en el receptor de la prostaglandina D2⁸.

A nivel del metabolismo de las prostaglandinas, puede haber aumento en la producción de tromboxano A2 (TXA2), reducción en los productos de lipooxigenasa y déficit de lipooxigenasa leucocitaria. Otras alteraciones de la función plaquetaria incluyen anomalías en la movilización del calcio, una señalización defectuosa a partir del receptor de TXA2 y una fosforilación deficiente⁹.

Algunos SMP se asocian a enfermedad de von Willebrand (VWD) de tipo adquirido. En estados de trombocitosis, las plaquetas están comprometidas en el incremento de la proteólisis de las formas multiméricas grandes e intermedias del factor von Willebrand (VWF). Es probable que el incremento en el número de plaquetas facilite la interacción entre el receptor GPIb y el VWF, favorezca el cambio conformacional del VWF, permita una mejor exposición del sitio de clivaje para la proteasa ADAMTS-13 y contribuya al incremento de los fragmentos proteolíticos^{10,11}.

Distintos estudios fueron realizados en pacientes con SMP en el Departamento de Hemostasia y Trombosis de nuestro instituto, el primero, de Meschengieser *et al.*, con 94 pacientes¹². Los hallazgos más relevantes fueron:

1. La ausencia de agregación con adrenalina se observó en el 53% de los casos, siendo más frecuente en TE (71%) y más rara en LMC (19%).
2. La depleción de los gránulos densos, estimada por el patrón de liberación de ATP, se presentó en el 67% de los casos, siendo más común en MF (70%).
3. La depleción de los gránulos α , diagnosticada por el contenido intraplaquetario de fibrinógeno y VWF,

se observó en el 58% de los casos, oscilando entre el 95% en TE y el 33% en LMC.

4. Las evidencias de activación plaquetaria expresadas como microagregados plaquetarios circulantes fueron más frecuentes en TE (22%), seguidas por 9,5% en LMC y 4,7% en PV.
5. La agregación espontánea se presentó en el 28,5% de los pacientes con TE, en el 16,6% de LMC y en el 14% de PV. Los pacientes con MF no mostraron ninguna manifestación de hiperrespuesta plaquetaria.

En el segundo de los trabajos, Sánchez Luceros *et al.* estudiaron la incidencia en los eventos trombohemorrágicos en VWD adquirida en 75 pacientes SMP¹³.

Los resultados más relevantes fueron:

1. El patrón de VWD fue frecuente en TE (55%), en todos los casos fue de tipo 2 (VWF:RCo/VWF:Ag < 0,6); en PV fue del 55%, pero sólo la mitad tuvo patrón de tipo 2, y en las LMC fue del 15%, siendo del tipo 2 el 86%.
2. En los pacientes con VWD adquirida se detectó activación plaquetaria con más frecuencia (34%) que en aquéllos sin evidencias de VWD (19%).
3. Los pacientes con patrón de VWD fueron más sintomáticos en cuanto a fenómenos isquémicos y hemorrágicos que aquéllos sin evidencias de VWD.

Esta observación permite suponer que tanto la depleción de gránulos α como la aparición de VWD adquirida, especialmente en TE y PV, podrían resultar de una activación plaquetaria con degranulación y liberación de proteasas responsables de la proteólisis del VWF.

En el último de los trabajos pertenecientes a nuestro grupo, Bermejo *et al.* aplicaron las técnicas de citometría de flujo al estudio de un pequeño grupo de pacientes con SMP¹⁴. Se evaluó la presencia de déficit de *pool* de depósito adquirido por marcación de gránulos densos con mepacrina y la activación plaquetaria mediante la marcación con CD62 (P-selectina del gránulo α expuesto), CD63 (membrana del lisosoma) y fijación del fibrinógeno. Los resultados hallados en 28 pacientes (TE: 7; PV: 13; LMC: 8) fueron:

1. La marcación con mepacrina estaba disminuida en el 39% de los SMP, lo que sugiere que menos de la mitad tenía realmente déficit del contenido de los gránulos densos.
2. La marcación con CD62 y CD63 se hallaba aumentada en TE y PV; la fijación del fibrinógeno estuvo aumentada, sobre todo en TE y en menor grado en PV.
3. En comparación con las técnicas tradicionales, la citometría de flujo permitió detectar grados menores o más tempranos de activación plaquetaria.
4. No se encontró correlación entre los eventos trombóticos o hemorrágicos.

Conclusiones

Podemos concluir que en los SMP estudiados por nuestro grupo el papel que cumplen las plaquetas en los eventos de sangrado podría estar basado en: 1) deficiencia del *pool* de depósito, y 2) VWD adquirida, mientras que la predisposición a la trombosis podría depender de la hiperactividad plaquetaria. El comportamiento paradójico de la plaqueta (activación con hiperreactividad o degranulación con hipofuncionalidad), sumado a otras anomalías plasmáticas y/o genéticas que ocurren en los SMP¹⁵⁻¹⁷, podría ser una de las explicaciones de los eventos trombohemorrágicos que ocurren en estas patologías.

Agradecimientos

La Dra. Emilse Bermejo ha sido merecedora de una Beca de la Fundación René Barón. El presente trabajo ha sido realizado gracias al financiamiento de la Fundación René Barón.

Bibliografía

1. Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* 2008; 22: 14-22.
2. Tefferi A. Essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis: current management and the prospect of targeted therapy. *Am J Hematol* 2008; 83: 491-7.
3. Tefferi A, Elliot M. Thrombosis in myeloproliferative disorders: prevalence, prognostic factors, and the role of leukocytes and JAK2V617F. *Semin Thromb Haemost* 2007; 33: 313-20.
4. Wehmeier A, Sidhoff T, Meierkord T. Relation of platelet abnormalities to thrombosis and hemorrhage in chronic myeloproliferative disorders. *Semin Thromb Haemost* 1997; 23: 391-402.
5. Falanga A, Marchetti M, Evangelista V, Vignoli A, Licini M, Balicco M, et al. Polymorphonuclear leukocyte activation and hemostasis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* 2000; 96: 4261-6.
6. Landolfi R, Di Gennaro L, Barbui T, De Stefano V, Finazzi G, Marfisi R, et al.; European Collaboration on Low-Dose Aspirin in Polycythemia Vera (ECLAP). Leukocytosis as a major thrombotic risk factor in patients with polycythemia vera. *Blood* 2007; 109: 2446-52.
7. Maugeri N, Giordano G, Petrilli MP, Fraticelli V, de Gaetano G, Cerletti C, et al. Inhibition of tissue factor expression by hydroxyurea in polymorphonuclear leukocytes from patients with myeloproliferative disorders: a new effect for an old drug? *J Thromb Haemost* 2006; 4: 2593-8.
8. Mazzucato M, De Marco L, De Angelis V, De Roca D, Bizzaro N, Casonato A. Platelet membrane abnormalities in myeloproliferative disorders: decrease in glycoproteins Ib and IIb/IIIa complex is associated with deficient receptor function. *Br J Haematol* 1989; 733: 369-74.
9. Landolfi R, Marchioli R, Patrono C. Mechanisms of bleeding and thrombosis in myeloproliferative disorders. *Thromb Haemost* 1997; 78: 617-21.
10. López-Fernández MF, López-Berges C, Martín R, Pardo A, Ramos FJ, Batlle J. Abnormal structure of von Willebrand

- factor in myeloproliferative syndrome is associated to either thrombotic or bleeding diathesis. *Thromb Haemost* 1987; 58: 753-7.
11. Levy GG, Nichols WC, Lian EC, Foroud T, McClintick JN, McGee BM, et al. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature* 2001; 413: 488-94.
 12. Meschengieser S, Blanco A, Woods A, Maugeri N, Fernandez J, Dupont J, Lazzari MA. Intraplatelet levels of vWF:Ag and fibrinogen in myeloproliferative disorders. *Thromb Res* 1987; 48: 311-9.
 13. Sánchez-Luceros A, Meschengieser SS, Woods AI, Blanco AN, Kempfer AC, Casais P, et al. Acquired von Willebrand factor abnormalities in myeloproliferative disorders and other hematologic diseases: a retrospective analysis by a single institution. *Haematologica* 2002; 87: 264-70.
 14. Bermejo E, Alberto MF, Meschengieser SS, Lazzari MA. Assessment of platelet activation in myeloproliferative disorders with complementary techniques. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2004; 15: 235-40.
 15. Kornblihtt LI, Heller PG, Correa G, et al. Associated thrombophilic defects in essential thrombocythaemia: their relationship with clinical manifestations. *Thromb Res* 2003; 112:131-5.
 16. De Stefano V, Za T, Rossi E, Vannucchi AM, Ruggeri M, Elli E, et al.; GIMEMA CMD-Working Party. Recurrent thrombosis in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia: incidence, risk factors, and effect of treatments. *Haematologica* 2008; 93: 372-80.
 17. Michiels JJ, Berneman Z, Schroyens W, Finazzi G, Budde U, van Vliet HH. The paradox of platelet activation and impaired function: platelet-von Willebrand factor interactions, and the etiology of thrombotic and hemorrhagic manifestations in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Semin Thromb Hemost* 2006; 32: 589-604.

Avances en hematimetría

COORDINADORA: T. MOLERO. *Las Palmas de Gran Canaria*

Resumen del simposio

La tecnología en los autoanalizadores hematológicos mejora y se renueva constantemente aplicándose a las tres series del hemograma. Desde que Wallace Coulter describió la técnica de impedancia para el recuento celular en 1956 hasta nuestros días, ésta ha sido mejorada a la vez que se han introducido otras metodologías más sofisticadas como la citometría de flujo (dispersión de luz y fluorescencia con la aplicación de anticuerpos monoclonales).

Los distintos contadores han incorporado nuevos parámetros como son, en la serie roja, el contenido de la hemoglobina reticulocitaria (CHR) o la hemoglobina reticulocitaria equivalente (RET-He), de gran utilidad en el diagnóstico y seguimiento de las anemias producidas por enfermedad crónica o ferropénica, y aplicable en la detección del déficit funcional de hierro, en pacientes tratados con eritropoyetina o con insuficiencia renal crónica y sometidos a diálisis. Se han introducido otros parámetros, como el porcentaje de la hemoglobina de baja densidad (*low hemoglobin density* o %LHD), que resulta del porcentaje de hematíes hipocromos, el FRC obtenido en el canal de los reticulocitos y capaz de detectar los esquistocitos, la hemoglobina equivalente de los hematíes (RBC-He), y la hemoglobina δ equivalente (DELTA-He). Otros contadores definen el VCM de los reticulocitos (MRV) y el índice medio de fluorescencia (MFI), capaces de detectar el momento del implante de los progenitores en el periodo de recuperación del trasplante.

Junto con los modernos sistemas de impedancia, en el marco de las plaquetas cabe destacar el conteo por sistemas de dispersión de luz y el recuento inmunológico automatizado con el anticuerpo monoclonal CD61, que ayudan de forma más precisa a la toma de decisiones de transfusión en cifras límite de plaquetas. La detección de plaquetas reticuladas o *immature platelet fraction* (IPF) aporta una importante información con respecto al origen central o periférico de las de trombocitopenias, además del volumen plaquetario (VMP) y las plaquetas de gran tamaño (*large platelets*). Se ha demostrado que otros parámetros de investigación, como la masa media plaquetaria (MPM) y el componente medio plaquetario (CMP), correlacionan con la activación de las plaquetas, dato a tener en cuenta en la patología tromboembólica, la enfermedad coronaria y el infarto de miocardio.

En lo que se refiere al recuento y diferencial leucocitario, la tecnología está orientada hacia la discriminación extendida de la fórmula leucocitaria mediante la detección automatizada de los granulocitos inmaduros (IG), de los progenitores hematopoyéticos (IMI) y de los blastos, ofreciendo alarmas de sospecha en la pantalla de investigación.

El uso de anticuerpos monoclonales ha logrado separar de forma semiautomatizada no sólo las poblaciones linfocitarias, sino también los granulocitos inmaduros o activados, los monocitos y los eritroblastos. Los contadores que incorporan citoquímica pueden discriminar las células mieloides de las linfoides, de utilidad en el diagnóstico inicial de las leucemias agudas.

Los eritroblastos se cuentan actualmente con buena precisión mediante la tinción con colorantes vitales como el naranja de tiazol o el yoduro de propidio.

Siguiendo la misma filosofía, han sido muchos los intentos de incorporar un recuento expandido y automatizado de la médula ósea, aunque los resultados ofrecidos por los contadores son todavía variables e imprecisos.

Otros parámetros, como el volumen medio de los neutrófilos (VMN), la dispersión media de luz (DMN) y el ancho de distribución del volumen de los neutrófilos (ADVN), han demostrado mayor utilidad que el recuento de bandas en pacientes con sepsis o con síndromes mielodisplásicos.

En este simposio los ponentes describen detalladamente los últimos avances en hematimetría, tratando de actualizar las aplicaciones en el recuento y expansión de los parámetros hematológicos automatizados, con el objetivo de conseguir un acercamiento diagnóstico cada vez más preciso y fiable.

Se incluyen, asimismo, en el simposio dos comunicaciones seleccionadas cuyos autores explican su experiencia de la aplicación de las reglas CAR del sistema PSM para hematimetría, coagulación y VSG, y la utilidad de la determinación de las plaquetas reticuladas para distinguir las trombocitopenias centrales de las periféricas y en recuperación hematológica postrasplante o quimioterapia.

APLICACIÓN DIAGNÓSTICA DE LOS NUEVOS PARÁMETROS DE SERIE ROJA EN LOS AUTOANALIZADORES HEMATOLÓGICOS

J.M.^a JOU

Servei d'Hemoteràpia i Hemostasia.

Laboratori Core.

Hospital Clínic. Universitat de Barcelona

Introducción

La primera observación de los hematíes se remonta al siglo XVII y fue realizada por Swammerdan. En el año 1674, Antonie van Leeuwenhock determinó por primera vez el diámetro de los hematíes de pollo. El hematí humano no tuvo una medida precisa hasta que Jurin lo calculó en 7,9 μm en el año 1718. Hasta el año 1773 se había considerado que el hematí tenía forma esférica, y fue Hewson quien demostró que era tan plano como una moneda. Sin embargo, posteriormente, se siguió considerando que era un glóbulo esférico, hasta que en 1827 Hodgkin y Lister establecieron claramente que la forma del hematí era la de un disco bicóncavo. En 1846, Gulliver¹ editó los trabajos de Hewson y asimismo publicó una serie de interesantes notas en las que refería sus propias observaciones en la determinación del tamaño de las células sanguíneas. Así, estableció el diámetro de los hematíes en 1/3.200 pulgadas (7,9 μm), y su grosor, en 1/2.400 pulgadas (2,0 μm); el diámetro de los neutrófilos, en 1/2.666 pulgadas (9,5 μm), y el de los linfocitos, en 1/4.600 pulgadas (5,5 μm).

Los progresos en los estudios de óptica y diseño de microscopios permitió que los contajes celulares progresaran y así, en 1852, Vierordt² diseñó un método que hacía más real el contaje celular. La introducción de las cámaras de contaje por parte de Thoma³ en 1881, de Türk en 1904⁴ y en 1907⁵, y de Bürker en 1905⁶ y en 1913⁷, así como los métodos de dilución por parte de Hayem⁸ en 1875 significaron un avance en el contaje celular. El trabajo en los laboratorios se volvió más accesible y menos tedioso, lo cual, no obstante, no supuso que los recuentos fueran más exactos⁹.

Las plaquetas fueron descritas por primera vez en 1842 por Donné¹⁰, y los primeros recuentos de dicho tipo celular fueron publicados por Hayem¹¹ en 1878. Los primeros contajes de leucocitos fueron realizados por Malassez¹² en 1874, y la tinción de la fórmula leucocitaria o recuento diferencial leucocitario fue descrito por Ehrlich en 1879¹³ y en 1880¹⁴.

El diseño y la descripción de los primeros contadores de partículas por el método fotoeléctrico fueron hechos por Moldavan en 1934¹⁵, por Langerkrantz en 1948¹⁶, por Fricke en 1953¹⁷ y por Crosland-Taylor en 1958¹⁸. Al mismo tiempo, W. Coulter describió la metodología de la impedancia en 1956¹⁹, que ha sido la más usada hasta la actualidad.

La descripción del hematocrito fue realizada en el siglo XIX por Hedin²⁰ y Daland²¹. En el siglo XX, varios autores realizaron notables mejoras en la determinación de este parámetro mediante centrifugación, como Wintrobe²² en 1929, Guest y Siler en 1934²³ y Strumia en 1954²⁴. Los primeros intentos de determinar la hemoglobina los llevaron a cabo, diluyendo la sangre en líquidos de referencia y efectuando las lecturas por método visual, autores como Gowers en 1878²⁵, Hoppe-Seyler en 1883²⁶, Shali en 1895²⁷ y Haldane en 1901²⁸. De todos estos métodos, el más usado, incluso en la actualidad, es el método de Shali²⁹. El método de la determinación por medio de la cianmetahemoglobina o hemoglobincianida fue introducido por Stadie en 1920³⁰.

El siguiente avance en el cálculo de magnitudes celulares sanguíneas corresponde a Price-Jones³⁰⁻³³. Este autor determinaba el diámetro de los hematíes extendidos, fijados y teñidos sobre un portaobjetos, empleando, para su medida, un ocular micrométrico y, posteriormente, elaboraba la gráfica de distribución de frecuencia en función del diámetro celular. Desde entonces, dicho análisis se utilizó como método de diagnóstico diferencial de las anemias³⁴.

Un gran avance en la utilización de los resultados de las medidas hasta entonces disponibles de la sangre periférica fue la descripción en 1930 por parte de M.M. Wintrobe³⁵ de los denominados índices eritrocitarios (Tabla 1). Dicho autor propuso la primera clasificación de las anemias en base al tamaño y el contenido de hemoglobina de los hematíes^{36,37}. Ello supuso un gran avance en la utilización de los resultados derivados del laboratorio para su aplicación clínica en el diagnóstico de las anemias.

Como ya se ha mencionado anteriormente, Wallace Coulter³⁸ introdujo en el año 1956 el concepto de la medida del tamaño de las células suspendidas en medio líquido, mediante la teoría de la impedancia eléctrica. Este descubrimiento hizo posible que, por vez primera, se pudiera contar y determinar el tamaño de las células y de las partículas industriales en general, a la velocidad de varios miles de células por segundo.

Tabla 1. Índices eritrocitarios (Wintrobe)

Volumen corpuscular medio (VCM) (fl)	Hematocrito (L/L)/hematíes ($\times 10^{12}$ /L)
Hemoglobina corpuscular media (HCM) (pg)	Hemoglobina (g/L)/hematíes ($\times 10^{12}$ /L)
Concentración corpuscular media de hemoglobina (CCMH) (g/L)	Hemoglobina (g/L)/hematocrito (L/L)

Desde entonces hasta la actualidad, el gran avance tecnológico ha permitido el desarrollo de analizadores automáticos para los recuentos y la medida del tamaño celular, basados en el método descrito por este autor y posteriormente, en otros principios físicos.

Los primeros sistemas que se introdujeron eran exclusivamente contadores de partículas, pues únicamente registraban el número de impulsos que se detectaban al pasar partículas o células a través de un transductor. Luego, al acoplar a estos sistemas los analizadores de intensidad de impulsos, se pudo determinar el volumen celular (VC). El VC obtenido correspondería al valor medio de la totalidad de las células analizadas. Este parámetro no indica la existencia de anisocitosis en la población celular estudiada o la existencia de dos o más subpoblaciones celulares de distinto VC. Este hecho ha sido subsanado gracias al desarrollo de analizadores capaces de proporcionar la curva de distribución de frecuencias según el volumen celular.

El otro método que tiene una vigencia actual en el conteo, la medida del VC y la clasificación de los distintos tipos de células es el principio de la medida mediante la dispersión de la luz halógena o del haz de la luz láser. Esta última medida es mucho más precisa que la anterior debido a su gran fiabilidad al tener una longitud de onda lumínica mucho más corta³⁹⁻⁴¹.

En la presente revisión se analizará la utilidad diagnóstica, contrastada o posible, de los nuevos parámetros de serie roja que han sido incorporados a los analizadores hematológicos más destacados que existen en el mercado mundial en el momento de esta publicación. Dichos parámetros, que están presentes en los sistemas más sofisticados y complejos de cada casa comercial, los podemos resumir en:

1. Abbott: Cell-Dyn 4000 y Zafiro
2. Beckmann-Coulter: Gen's, LH-750
3. Sysmex: XE-2100, XE-5000
4. Siemens: ADVIA 120, 2120, 2120i
5. Horiba-ABX: Pentra 120 DX

Metodología utilizada para serie roja y recuento de reticulocitos

1. Cell-Dyn 4000 y Zafiro (Abbott). La serie roja es determinada mediante la tecnología de impedancia. Los reticulocitos son medidos mediante lectura con un láser de argón por su tamaño y fluorescencia específica en un canal determinado.
2. Gen's, LH-750 (Beckman-Coulter). La serie roja es determinada mediante la tecnología de impedancia. Los reticulocitos son teñidos con nuevo azul de metileno y leídos con la tecnología VCS (impedancia, conductividad y láser).
3. XE-2100, XE-5000 (Sysmex). La serie roja es determinada mediante la tecnología de impedancia.

Los reticulocitos son teñidos con oxacina 750 y leídos mediante luz láser.

4. ADVIA 120, 2120, 2120i (Siemens). La serie roja es leída mediante luz láser. La tecnología proporciona la lectura del recuento de hematíes, su volumen y la concentración de hemoglobina de cada una de ellos. Mediante umbrales de límites de normalidad y la combinación de las dos lecturas, proporciona la denominada fórmula eritrocitaria de 9 poblaciones. Los reticulocitos son teñidos con oxacina 750 y leídos mediante luz láser.

5. Pentra 120 DX (Horiba-ABX). La serie roja es determinada mediante la tecnología de impedancia. Los reticulocitos son teñidos con naranja de tiazol y leídos mediante luz láser.

Nuevos parámetros y su posible aplicación al diagnóstico

Cell-Dyn 4000 y Zafiro (Abbott)

Los parámetros de serie roja de los citados contadores celulares han sido los convencionales del hemograma. Una descripción de su posible mejora fue publicada en el año 2003 por parte de YR Kim⁴², que fue el que describió la utilidad del láser para la detección mejorada de los hematíes en los contadores Technicon en 1986⁴⁰, en el cual, y mediante la lectura tridimensional a dos longitudes de onda del láser, se describía en el Cell-Dyn 4000 la realización de un diferencial de serie roja. Por desgracia, dicha mejora no ha sido aplicada en dichos analizadores. En un póster muy reciente, A. Huisman *et al.*⁴³ han descrito la utilización de la lectura de la serie roja en el canal de reticulocitos del analizador Zafiro. En dicho trabajo se detalla la posibilidad de determinar en dicho analizador el volumen corpuscular de los reticulocitos, así como el contenido de hemoglobina tanto en hematíes como en reticulocitos.

La detección de infecciones por malaria mediante estos analizadores fue descrita por Mendelow *et al.*⁴⁴ en 1999. Dicha detección se basa en el canal de luz polarizada y despolarizada a 90°. Varios trabajos han corroborado su utilidad^{45,46}. También se ha descrito la detección de filarias mediante la misma metodología⁴⁷.

Además de los reticulocitos, los analizadores proporcionan la fracción reticulocitaria inmadura (IRF), que ha sido considerada desde hace mucho tiempo⁴⁸ como un marcador de recuperación tanto en los trasplantes como en la clasificación de las anemias.

Gen's, LH-750 (Beckman-Coulter)

La serie roja de los analizadores Coulter han proporcionado tradicionalmente los parámetros clásicos del he-

mograma. En un póster presentado en el Congreso de la AEHH en 2001⁴⁹ se describió el índice medio de conductividad (VCS) de los hematíes como un valor que correlacionaba ($r = 0,589$) con la medida directa de la hemoglobina (HDW) de los analizadores H-3 (Siemens), con un valor predictivo positivo (VPP) del 85,7% y un valor predictivo negativo (VPN) del 53,8%.

En un póster⁵⁰ se ha descrito:

1. La HCM tradicional como valor que correlaciona (0,876) con el contenido de hemoglobina reticulocitaria (CHr).

2. Un nuevo parámetro denominado *low hemoglobin density* (%LHD), que es una derivación matemática a partir de la CCMH tradicional que correlaciona (0,730) con el % Hipo (% de hematíes hipocromos) de los sistemas Siemens.

La detección de la presencia de esferocitos fue descrita⁵¹ cuando el VCM de los hematíes tenía un valor superior al VCM esferocitado, que se obtiene en la reacción para analizar los reticulocitos y que en condiciones normales es superior al VCM pero que en estos casos es inferior. Cuando la diferencia es superior a 10 fL, el VPP es del 91,8% y el VPN del 94,7%.

Los parámetros proporcionados por el analizador Gen's han demostrado su utilidad para el diagnóstico de las anemias por enfermedad crónica⁵². En dichos casos, los factores discriminantes fueron: la IRF, que estaba aumentada, el canal medio de conductividad de los reticulocitos y el canal medio de dispersión de los reticulocitos, que también estaban aumentados, con sensibilidades entre el 73% y 94%. Asimismo, se ha detectado⁵³ la disminución del VCM esferificado después de los entrenamientos de jugadores de *rugby* en los que se pudo constatar hemólisis con los parámetros convencionales.

Presentaciones en póster muy recientes han descrito la detección de ovalocitos y eliptocitos. Cuando están presentes en poca cantidad, lo mejor es utilizar la dispersión media de la media de los reticulocitos y el RDW. Cuando son abundantes, es mejor usar la CCMH y la desviación estándar de la dispersión de reticulocitos⁵⁴. Los mismos autores⁵⁵ han presentado otro póster donde se pueden detectar los dianocitos mediante la media y la desviación estándar de la conductividad de los reticulocitos.

XE-2100, XE-5000 (Sysmex)

El parámetro denominado hemoglobina reticulocitaria equivalente (RET-He) se obtiene en el canal de reticulocitos del sistema, por la lectura de la dispersión de luz de los reticulocitos. Posee una correlación curvilínea con la CHr de los Siemens y, por una transformación matemática, ha demostrado tener un valor superponible al citado⁵⁶. Ambos parámetros, que

se expresan en picogramos (pg), han demostrado ser muy útiles para el diagnóstico de la anemia por enfermedad crónica y detectan el déficit funcional de hierro en pacientes tratados con eritropoyetina y en especial en los que padecen insuficiencia renal crónica (IRC) en diálisis⁵⁷ con VPP y VPN sobre el 85%^{58,59}. Los sistemas proporcionan además la hemoglobina equivalente de los hematíes (RBC-He), que es el mismo valor pero de los hematíes maduros, y la hemoglobina δ equivalente (DELTA-He), que es la diferencia entre RET-He y RBC-He.

Otro parámetro que ha demostrado utilidad clínica es la detección de fragmentos de hematíes (esquistocitos), que se describe como FRC⁶⁰. Se obtiene en el canal de reticulocitos y corresponde a los eventos comprendidos entre la población de plaquetas y la de hematíes maduros clasificados según su tamaño y fluorescencia⁶¹. Ha demostrado tener una correlación de 0,852 a 0,902 con el sistema manual, y presenta un VPP del 61% y un VPN del 89%⁶².

En los prospectos explicativos de la casa comercial se detalla una nueva alarma denominada sospecha de malaria (paludismo) cuando existe un aumento de reticulocitos con una IRF normal, y/o una interferencia en los eosinófilos o alarma de linfocitos atípicos en el canal de fluorescencia del diferencial.

Dentro de las especificaciones del nuevo sistema XE-5000, en el apartado de investigación, aparecen nuevos parámetros como el Micro[®](%) y Macro[®](%), que corresponden al porcentaje de hematíes microcíticos y macrocíticos obtenidos en el canal de reticulocitos y que se leen con láser y fluorescencia. También el sistema proporciona resultados de “% Hipo-He” y de “% Hiper-He”, que corresponde al porcentaje de hematíes hipocromos e hiperocromos de contenido de hemoglobina (pg), pero no se corresponde con los porcentajes de hematíes hipocromos e hiperocromos de los analizadores Siemens, que son de concentración de hemoglobina (g/L). Ambos tipos de parámetros no presentan ninguna correlación.

Estos sistemas también dan la IRF de los reticulocitos y su significado se ha explicado con anterioridad en otros equipos. Los valores de referencia de este parámetro, por su método de detección y cálculo, son distintos en todos los analizadores.

ADVIA 120, 2120, 2120i (Siemens)

La metodología por lectura con luz láser y detección a dos ángulos de la dispersión y refracción de luz fue descrita en los años ochenta³⁹. En 1983 se produjo un gran avance en la tecnología de detección de luz láser con la publicación por parte de Kim *et al.*⁴² de sus experiencias con la utilización de las medidas isovolumétricas del VCM de los hematíes mediante dicho método.

Posteriormente, Tycko *et al.*⁴¹ aplicaron dicha tecnología a la detección simultánea del VCM y de la CCMH directa (densidad interna del hematíe y que es calibrada como concentración de hemoglobina). La aplicación definitiva de este tipo de lectura a los analizadores automáticos fue realizada por Mohandas *et al.*⁴⁰. La innovación fue que los contajes y las medidas de los volúmenes celulares eran realizados por un haz de luz láser de helión-neón con dos ángulos de lectura. Esta tecnología permitió realizar la lectura simultánea del VCM y de la CCMH directamente, y no por cálculo matemático como hasta entonces, incluyendo la viscosidad interna del hematíe en el cálculo del VCM que, como hemos descrito antes, tiene una acción fundamental.

Estos analizadores proporcionan la CCMH tradicional (Hb/Hem \times VCM) y la denominada CHCM, que es de lectura directa y que mediante comparación informa de las posibles anomalías de lectura de los canales tradicionales⁴⁰. Además, son los únicos analizadores que proporcionan la curva de distribución por concentración de hemoglobina de los hematíes, siendo su medida de dispersión el denominado HDW (*hemoglobin distribution width*), que informa de la anisocromía. Todos los sistemas proporcionan el denominado RDW (*red distribution width*), que informa del grado de anisocitosis y que es el CV% de la curva de distribución del VCM, si bien existen valores de referencia distintos para cada tipo de analizador. Al establecer umbrales de límites de normalidad, informan del porcentaje (%) de hematíes: microcíticos, macrocíticos, normocíticos, hipocrómicos, normocrómicos e hiperocrómicos. La combinación de ambas medidas proporciona la denominada "fórmula eritrocitaria" de 9 poblaciones distintas. Numerosos trabajos han demostrado su utilidad clínica⁶³⁻⁶⁵, y ha sido una herramienta muy utilizada para el diagnóstico diferencial de las anemias durante 25 años. Los índices que han demostrado más utilidad han sido el porcentaje de hiperocrómicos para el diagnóstico de esferocitosis⁶⁶, el porcentaje de hipocrómicos para el diagnóstico de la anemia ferropénica⁶⁷, el porcentaje de microcíticos e hiperocrómicos para el diagnóstico diferencial entre talasemias y ferropenia^{68,69}, y todas las distintas combinaciones en el diagnóstico diferencial de todas las anemias⁶⁹.

Otro de los parámetros que han demostrado utilidad clínica es el contaje de esquistocitos que proporcionan los sistemas⁷⁰ y que ha resultado ser más exacto y reproducible que el recuento manual⁷¹.

En los sistemas ADVIA, en el año 1994 fue descrito por C. Brugnara⁷² un nuevo parámetro, el CHr, que es la cantidad de hemoglobina media por cada reticulocito, y que se expresa en pg y procede de multiplicar el VCM reticulocitario por la concentración de hemoglobina reticulocitaria. La CHr ha demostrado ser muy útil para el diagnóstico de las anemias ferropé-

nicas y su tratamiento⁷³, en la ferropenia de los recién nacidos⁷⁴, en la respuesta a la eritropoyetina en los pacientes con IRC⁷⁵ y en otras situaciones, ya que existen más de 35 publicaciones sobre el tema. También se ha demostrado su gran utilidad en el diagnóstico de la anemia por enfermedad crónica⁷⁶, donde se ha descrito su excelente utilidad para el diagnóstico y seguimiento⁵⁸. Los porcentajes hipocrómicos y la CHr han sido introducidos en las guías clínicas internacionales de anestesia y de nefrología para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes.

Estos sistemas fueron pioneros y han sido referencia de los parámetros de serie roja durante más de 20 años. Como vemos en este artículo, los demás tipos de contadores están empezando a proporcionar parámetros semejantes y cuya referencia son los descritos en estos analizadores.

Pentra 120 DX (Horiba-ABX)

Los parámetros de serie roja de los citados contadores celulares han sido los convencionales del hemograma, si bien en la actualidad están ya en fase de evaluación nuevos parámetros que no puedo describir por estar pendiente de patente.

Los parámetros reticulocitarios de este sistema, que son leídos mediante láser y teñidos con naranja de tiazol, como se ha descrito, han generado bastantes publicaciones y trabajos. En el año 2001, A. Torres⁷⁷ describió la utilidad del VCM de los reticulocitos (MRV) y el índice medio de fluorescencia (MFI) como parámetros muy útiles en la detección del éxito o fracaso de los implantes de médula ósea tras los trasplantes. En el año 2003, R. Borba⁷⁸ demostró que los parámetros reticulocitarios, y en especial el MRV y el MFI, eran de gran utilidad para seguir el tratamiento y evolución en pacientes con hemoglobinopatía S que eran tratados con hidroxiurea. Otro parámetro utilizado con éxito en los trasplantes de médula ósea ha sido el cociente entre MRV y MCV⁷⁹ para detectar el implante de la nueva médula. También se ha demostrado⁸⁰ muy útil el MFI para el diagnóstico diferencial de la anemia ferropénica con los distintos tipos de talasemia y las hemoglobinopatías estructurales y en casos de α -talasemia⁸¹. El MRV⁸² ha demostrado tener una correlación muy buena (0,96) con la CHr de los sistemas Siemens, y los autores del póster, pendiente de publicación, sugieren que posee el mismo valor diagnóstico.

Bibliografía

1. Gulliver G. The works of William Hewson, FRS. London: Sydenham Society; 1864.
2. Vierordt K. Zählungen der Blutkörperchen des Menschen. Archiv Physiologie und Heilkunde 1852; 11: 546-58.

3. Lyon JF, Thoma R. Ueber die Methode der Blutkörperchenzählung. *Virchow's Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medizin* 1881; 84: 131-42.
4. Türk W. Vorlesungen über Klinische Hämatologie. Wien: Braunmüller; 1904.
5. Türk W. Ueber den Farbeindex der roten Blutkörperchen. *Münchener Medizinische Wochenschrift* 1907; 54: 220-32.
6. Bürker K. Eine neue Form der Zählkammer. *Pfügers Archiv für Gesante Physiologie* 1905; 107: 426-51.
7. Bürker K. Zur Technik der Feineren Erythrozytenzählung. *Pfügers Archiv für Gesante Physiologie* 1913; 153: 128-36.
8. Hayem G. Recherches sur l'évolution des hématies dans le sang de l'homme et des vertébrés. *Arch Physiology Norm Path* 1878; 5: 692-734.
9. Berkson J, Magath TB, Hum M. The error of estimate of blood cell count as made with hemocytometer. *American Journal of Physiology* 1940; 128: 309-23.
10. Donné A. De l'origine des globules du sang, de leur mode de formation et leur fin. *C R Academie de Science* 1842; 14: 366-8.
11. Hayem G, Nacket A. Sur un nouveau procédé pour compter les globules rouges du sang. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences* 1875; 80: 1083-8.
12. Malassez LC. Nouvelle méthode de numération des globules rouges et des globules blancs du sang. *Arch Physiol Norm Path* 1874; (2) i: 32-52.
13. Ehrlic P. Methodologische Beiträge zur Physiologie und Pthologie der verschiedenen Formen der Leukocyten. *Zeitschrift für Klinische Medizin* 1879; (1): 553-60.
14. Ehrlic P. Methodologische Beiträge zur Physiologie und Pthologie der verschiedenen Formen der Leukocyten. *Zeitschrift für Klinische Medizin* 1880; 1: 553-60.
15. Moldavan A. Photo-electric technique for the counting of microscopical cells. *Science* 1934; 80: 188-9.
16. Langercrantz C. Photo-electric counting of individual microscopic plant and animal cells. *Nature* 1948; 161: 25-6.
17. Fricke H. Relation of permittivity of biological cell suspensions to fractional cell volume. *Nature* 1953; 172: 731-2.
18. Crosland-Taylor PJ, Stewart JW, Haggis G. An electronic blood counting machine. *Blood* 1958; 13: 398-409.
19. Coulter WH. High speed automatic blood cell counter and cell size analyser. *Proceedings of the National Electronics Conference* 1956; 12: 1034-40.
20. Hedin SG. Der Hämatokrit, ein neuer apparat zur untersuchen des Blutes. *Scandinavishe Archiv für Physiologie* 1890; 2: 134-40.
21. Daland J. Ueber das Volumen der roten und weissen Blutkörperchen in Blute des gesunden und kranken Menschen. *Fortschritte der Medizin* 1891; 9: 87-101.
22. Wintrobe MM. Simple and accurate hematocrit. *J Lab Clin Med* 1929; 15: 287-9.
23. Guest GM, Siler V. Centrifuge method for determination of volume of cells in blood. *J Lab Clin Med* 1934; 19: 757-68.
24. Strumia MM, Sample AB, Hart ED. An improved hematocrit method. *Am J Clin Pathol* 1954; 24: 1016-24.
25. Gowers J. En: Meeting Clinical Society of London. *Lancet* ii; 1878: 882-3.
26. Hoppe-Seyler F. *Handbuch der Physiologisch-und Pathologisch Chemisten Analyse für Aertzte und Studirende*. Berlin: Hoischwald; 1883. p. 435-40.
27. Sahli H. Bestimmung des Hämoglobingehaltes des Blutes. En: *Lehnbuch der Klinischen Untersuchungsmethoden*. Leipzig, Deuticke 1895; Vol II: 361-73.
28. Haldane J. The colorimetric determination of haemoglobin. *J Physiol* 1901; 26: 497-502.
29. Stadie WC. A method for the determination of methemoglobin in blood. *J Biol Chem* 1920; 41: 237-41.
30. Price-Jones C. The variation in sizes of red blood cells. *Br Med J* 1910; 2: 1418-20.
31. Price-Jones C. *Blood pictures: an introduction to clinical haematology*. Bristol: JS Wrigt and Jons; 1920. p. 62-4.
32. Price-Jones C. The diameter of the red cells in pernicious anaemia and in anaemia following haemorrhage. *J Pathol Bacteriol* 1922; 24: 487-90.
33. Price-Jones C. *Red blood cells diameters*. London: Oxford University Press; 1933.
34. Jou JM. Índices eritrocitarios: concepto y utilidad. *Lab* 2000 1985; 1: 7-12.
35. Wintrobe MM. Classification of the anaemias on the basis of differences in the size and hemoglobin of the red corpuscles. *Proc Soc Exp Biol Med* 1930; 27: 1071-6.
36. Wintrobe MM. *Clinical Hematology*. London: Henry Kimpton; 1942.
37. Wintrobe MM. Discussion. *Blood Cells* 1980; 6: 312.
38. Coulter WH. Génesis la búsqueda comienza. *Izasa Lab* 1989; 4-6.
39. Groner W, Epstein E. Counting and sizing of blood cells using light scattering. En: van Assendelft OW, England JM. *Advances: hematological methods: the blood count*. Boca Raton, Fla: CRC Press; 1982. p. 73-85.
40. Mohandas N, Kim YR, Tycko DH, Wyatt J, Groner W. Accurate and independent measurement of volume and hemoglobin concentration of individual red cells by laser light scattering. *Blood* 1986; 68: 506-13.
41. Tycko DH, Metz MH, Epstein EA, Grinbaum A. Flow-cytometric light scattering measurement of red cell volume and hemoglobin concentration. *J Appl Optics* 1985; 24: 1355-66.
42. Kim YR, van't Oever R, Landayan M, Bearden J. Automated red blood cell differential analysis on a multi-angle light scatter/fluorescence hematology analyzer. *Cytometry B Clin Cytom* 2003; 56 (1): 43-54.
43. Huisman A, Stokwielder R, Kendall R, Krokenberger M, Roche J. A feasibility study of simultaneous optical/fluorescence erythrocyte analysis using the Abbott CELL-DYN Sapphire. *Int Jnl Lab Hem* 2008; 30 (Suppl 1): 66-7.
44. Mendelow BV, Lyons C, Nhlangothi P, Tana M, Munster M, Wypkema E, et al. Automated malaria detection by depolarization of laser light. *Br J Haematol* 1999; 104 (3): 499-503.
45. Crabbe G, Van Poucke M, Cantinieaux B. Artefactually-normal automated platelet counts due to malaria-infected RBC. *Clin Lab Haematol* 2002; 24 (3): 179-82.
46. Scott CS, van Zyl D, Ho E, Meyersfeld D, Ruivo L, Mendelow BV, et al. Automated detection of malaria-associated intraleucocytic haemozoin by Cell-Dyn CD4000 depolarization analysis. *Clin Lab Haematol* 2003; 25 (2): 77-86.
47. Crespo S, Palacios G, Scott S, Lago M, Puente S, Martínez M, et al. Abnormal depolarizing patterns in three patients with filarial infection. *Ann Hematol* 2004; 83 (5): 313-5.
48. D'Onofrio G, Kim YR, Schulze S, Lorentz T, Dörner K, Goossens W, et al. Evaluation of the Abbott Cell Dyn 4000 automated fluorescent reticulocyte measurements: comparison with manual, FACScan and Sysmex R1000 methods. *Clin Lab Haematol* 1997; 19 (4): 253-60.
49. Gómez-Arbonés X, Teixidó M, Gallart M, Luaña A, Maciá P, Ortiz, et al. ¿Permite la impedancia o conductividad valorar la anisocromía en el estudio de los síndromes mielodisplásicos? *Haematologica* 2001; 86 (Supl 2): 253.
50. Zini G, Machin S, Briggs C, Preloznik-Zupan I, Junca J, Romero S, et al. Multicenter evaluation of Coulter MCH and the new derived LDH% parameters versus CHr and %Hypo for the assessment of iron metabolism disturbances. *Lab Hematol* 2006; 12 (3): 184-5.
51. Chiron M, Cynober T, Mielot F, Tchernia G, Croisille L. The Gen's: a fortuitous finding of a routine screening test for hereditary spherocytosis. *Hematol Cell Ther* 1999; 41 (3): 113-6.
52. Rodrigues A, Ortega C, Santos L, Teixeira A, Dinis MJ, Vasconcelos I, et al. Clinical utility of Beckman-Coulter Gen's re-

- ticulocyte analysis in the study of anemia of chronic disease (ACD). *Lab Hematol* 2007; 13 (3): 85-92.
53. Banfi G, Di Gaetano N, López RS, Melegati G. Decreased mean spheroid cell volume values in top-level rugby players are related to the intravascular hemolysis induced by exercise. *Lab Hematol* 2007; 13 (3): 103-7.
 54. Inbakumar D, Radhakrishnan S, Sitaram U, Payannavar C, Simón R. Reticulocyte research population data for the detection of ovalocytes and elliptocytes on Beckman-Coulter LH750. *Int Jnl Lab Hem* 2008; 30 (Suppl 1): 67-8.
 55. Radhakrishnan S, Inbakumar D, Sitaram U, Payannavar C, Simón R. Utility of RPD conductivity data in identifying target cells on LH750. *Int Jnl Lab Hem* 2008; 30 (Suppl 1): 75.
 56. Buttarello M, Temporin V, Ceravolo R, Farina G, Bulian F. The new reticulocyte parameter (RET-Y) of the Sysmex XE 2100: its use in the diagnosis and monitoring of posttreatment sideropenic anemia. *Am J Clin Pathol* 2004; 121 (4): 489-95.
 57. Thomas L, Franck S, Messinger M, Linssen J, Thomé M, Thomas C. Reticulocyte hemoglobin measurement--comparison of two methods in the diagnosis of iron-restricted erythropoiesis. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43 (11): 1193-202.
 58. Thomas C, Thomas L. Anemia of chronic disease: pathophysiology and laboratory diagnosis. *Lab Hematol* 2005; 11 (1): 14-23.
 59. Brugnara C. Iron deficiency and erythropoiesis: new diagnostic approaches. *Clin Chem* 2003; 49 (10): 1573-8.
 60. Banno S, Ito Y, Tanaka C, Hori T, Fujimoto K, Suzuki T, et al. Quantification of red blood cell fragmentation by the automated hematology analyzer XE-2100 in patients with living donor liver transplantation. *Clin Lab Haematol* 2005; 27 (5): 292-6.
 61. Jiang M, Saigo K, Kumaga S, Imoto S, Kosaka Y, Matsumoto H, et al. Quantification of red blood cell fragmentation by automated haematology analyser XE-2100. *Clin Lab Haematol* 2001; 23 (3): 167-72.
 62. Saigo K, Jiang M, Tanaka C, Fujimoto K, Kobayashi A, Nozu K, et al. Usefulness of automatic detection of fragmented red cells using a hematology analyzer for diagnosis of thrombotic microangiopathy. *Clin Lab Haematol* 2002; 24 (6): 347-51.
 63. Watson JS, Richard AD. Evaluation of Technicon H*1 hematology system. *Lab Med* 1987; 18: 316-22.
 64. Ross DW, Bentley SA. Evaluation of an automated hematology system. *Arch Path Lab Med* 1986; 110: 803-8.
 65. Jou JM, Pastor C, Aymerich M, Villamor N, Vives Corrons JL. Primera evaluación del analizador hematológico Technicon H*2. *Sangre* 1990; 35: 357-62.
 66. Gilsanz F, Ricard MP, Millan I. Diagnosis of hereditary spherocytosis with dual-angle differential light scattering. *Am J Clin Pathol* 1993; 100: 119-22.
 67. Han P, Fung KP. Discriminant analysis of iron deficiency anaemia and heterozygous thalassaemia traits: a 3-dimensional selection of red cell indices. *Clin Lab Haematol* 1991; 13: 351-62.
 68. D'Onofrio G, Zini G, Ricerca BM. Automated measurement of red blood cell microcytosis and hypochromia in iron deficiency and β -thalassaemia trait. *Arch Pathol Lab Med* 1992; 116: 84-9.
 69. Jou JM. Contribución de la citometría de flujo mediante luz láser al estudio y diagnóstico de las anemias. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona; 1994.
 70. Lesesve JE, Salignac S, Lecompte T, Borgioni P. Comparative evaluation of schistocyte counting by an automated method and by microscopic determination. *Am J Clin Pathol* 2004; 121 (5): 739-45.
 71. Lesesve JE, Salignac S, Alla F, Defente M, Benbih M, Borgioni P, et al. Automated measurement of schistocytes after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2004; 34 (4): 357-62.
 72. Brugnara C, Laufer MR, Friedman AJ, Bridges K, Blast O. Reticulocyte hemoglobin content (CHr): early indicator of iron deficiency and response to therapy. *Blood* 1994; 83 (10): 3100-1.
 73. Mast AE, Blinder MA, Lu Q, Flax S. Clinical utility of the reticulocyte hemoglobin content in the diagnosis of iron deficiency. *Blood* 2002; 99 (4): 1489-91.
 74. Brugnara C, Zurakowsky D, DiCanzio J, Boyd T, Platt O. Reticulocyte hemoglobin content to diagnose iron deficiency in children. *JAMA* 1999; 281 (23): 2225-30.
 75. Fishbane S, Shapiro W, Dutka P, Venezuela OF, Faubert J. A randomized trial of iron deficiency testing strategies in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2001; 60 (6): 2406-11.
 76. Thomas C, Thomas L. Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency. *Clin Chem* 2002; 48 (7): 1066-76.
 77. Torres A, Sánchez J, Lakomsky D, Serrano J, Álvarez MA, Martín C, et al. Assessment of hematologic progenitor engraftment by complete reticulocyte maturation parameters after autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2001; 86 (1): 24-9.
 78. Borba R, Lima CS, Grotto HZ. Reticulocyte parameters and hemoglobin F production in sickle cell disease patients undergoing hydroxyurea therapy. *J Clin Lab Anal* 2003; 17 (2): 66-72.
 79. Noronha JFA, De Souza CA, Vigorito AC, Aranha FJP, Zulli R, Miranda ECM, et al. Immature reticulocytes as an early predictor of engraftment in autologous and allogeneic bone marrow transplantation. *Clin Labor Haematol* 2003; 25 (1): 47-54.
 80. Cortellazzi LC, Teixeira SM, Borba R, Gervasio S, Cintra CS, Grotto HZW, et al. Reticulocyte parameters in hemoglobinopathies and iron deficiency anemia. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2003; 25 (2): 97-102.
 81. Krüger F, Zaccariotto TR, Rosim ET, Costa FF, Grotto HZ, Sonati MF. Reticulocyte evaluation in alpha(+)-thalassaemia. *Am J Hematol* 2006; 81 (1): 68-70.
 82. Roderick AH, Jou JM, Rees WGB, Thomas E. The mean reticulocyte volume (MRV) on the ABX Pentra 120 DX as an alternative measurement to the reticulocyte haemoglobin content (CHr). XXth International Symposium on Technological Innovations in Laboratory Hematology 2007; 29 (Suppl 1): 99.

AVANCES EN AUTOMATIZACIÓN DEL RECUENTO DIFERENCIAL LEUCOCITARIO

J.R. FURUNDARENA

Laboratorio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Donostia. Gipuzkoa

En nuestro medio el recuento diferencial leucocitario automatizado forma parte del hemograma solicitado habitualmente. Su utilidad es muy amplia para despistaje, diagnóstico y monitorización de múltiples trastornos hematológicos y no hematológicos.

Los principios básicos empleados por los distintos autoanalizadores en el recuento automático de leucocitos y el diferencial leucocitario son los siguientes:

- Impedancia eléctrica: sirve para contar el número de leucocitos y su volumen. De forma gráfica se puede expresar en forma de histograma.
- Dispersión de luz: las células van en un líquido envolvente y son canalizadas de una en una haciéndolas pasar por un punto donde incide un haz de luz láser. Un sensor colocado por detrás (*forward*) recoge la dispersión de luz causada a dicho nivel, que informa sobre el volumen de la célula. Un sensor situado en otros ángulos puede recoger la refringencia en ese ángulo, que informará sobre el contenido celular en cuanto a forma del núcleo y contenido en gránulos, es decir, de su complejidad. De forma gráfica se expresa en forma de citogramas o escatergramas.
- Fluorescencia mediante el uso de fluorocromos, sustancias fluorescentes que en contacto con el láser emiten energía lumínica en forma de color cuya longitud de onda puede ser registrada por el contador. Se utiliza para la distinción de determinadas poblaciones celulares.
- Citoquímica: se utilizan reactivos que tiñen componentes celulares y permiten su distinción.

Cuando el analizador detecta resultados inesperados porque son discordantes con la programación del fabricante o con lo configurado por el usuario, generará una alarma o *flag*. Las alarmas son variadas y pueden referirse a posibles blastos, granulocitos inmaduros, desviación izquierda, linfocitos atípicos, presencia de eritroblastos, etc.

En estos casos, lo habitual es proceder a un recuento diferencial leucocitario manual, método que requiere mucho tiempo y es una de las tareas más laboriosas del laboratorio de hematología. Por ello es importante que el analizador afine bien con las alarmas, de tal manera que consiga el menor número de falsos negativos sin aumentar mucho los falsos positivos. Si hace un buen conteo de eritroblastos, puede disminuir la necesidad de un conteo manual. Lo mismo ocurre con los granulocitos inmaduros.

Conviene que cada laboratorio tenga creadas unas reglas de validación de hemogramas en las que se especifique también cuándo es necesario leer una fórmula leucocitaria manual.

En esta revisión vamos a describir los principales avances de los analizadores hematológicos en los últimos años con respecto al conteo automatizado de leucocitos y la fórmula leucocitaria, evitando referencias históricas poco actuales. Tampoco se van a revisar las alarmas que generan ni las reglas de validación.

Contaje de leucocitos y diferencial leucocitario en los diferentes analizadores

Consideramos las diferentes tecnologías existentes tomando como referencia el analizador más avanza-

do de cada fabricante. De esta manera, se han recogido datos de los siguientes modelos: *Abbott Cell-Dyn Sapphire* y *Cell-Dyn 4000*, *ABX Pentra DF120*, *Bayer ADVIA 2120*, *Coulter LH 750* y *Sysmex XE-2100*. En la Tabla 1 se reúnen datos de los propios fabricantes sobre diversas variables que sirven para comparar las ventajas de cada tecnología.

En la Tabla 2 vemos la información obtenida en diferentes evaluaciones publicadas sobre estos analizadores referidos a los leucocitos y a la fórmula leucocitaria¹⁻⁹. Como puede verse, los diferentes analizadores obtienen unos niveles de imprecisión buenos tanto para los leucocitos como para los neutrófilos, linfocitos, monocitos y eosinófilos, siendo difícil la valoración en cuanto a los basófilos.

La linealidad ha sido evaluada a niveles variables pero podemos señalar que en general se mantiene hasta niveles por encima de los especificados por el fabricante, de tal manera que muy pocas veces tendremos que diluir una muestra para obtener una cifra fiable de leucocitos. Cuando ha sido evaluado el arrastre, se han obtenido cifras muy bajas o nulas.

Cuando se compara el recuento diferencial leucocitario de los analizadores con el conteo manual, siguiendo el protocolo NCCLS H20-A¹⁰, en la mayoría de los casos, la correlación es muy buena para los neutrófilos, linfocitos y eosinófilos, y menor para los monocitos. La valoración de los basófilos es difícil teniendo en cuenta que está presente en el hemograma a niveles muy bajos. La correlación para los eritroblastos también es muy buena.

En la Tabla 3 se han recogido evaluaciones que comparan varios de los analizadores citados. Sin entrar a valorar la eficiencia de las alarmas morfológicas, en el resto de parámetros leucocitarios valorados se obtienen cifras similares en cuanto a imprecisión, linealidad, arrastre y correlación con el conteo manual del diferencial leucocitario y de los eritroblastos^{11,12}.

Contaje de eritroblastos

El eritroblasto (NRBC) no se detecta en la sangre periférica del adulto normal pero sí en el feto y en el recién nacido, desapareciendo usualmente en la primera semana tras el nacimiento.

Hasta hace unos años los autoanalizadores daban una alarma de sospecha que obligaba a revisar la extensión. Se realizaba un conteo de eritroblastos en el microscopio que se expresaba como porcentaje por cada 100 leucocitos. Era un método muy impreciso y según algunos autores se informaba si se detectaba una cifra superior al 2%, y se corregía la cifra total de leucocitos si la cifra era superior al 10%. Recientemente se han desa-

Tabla 1. Características de los analizadores hematológicos

Fabricante	Bayer-Siemens	Sysmex	Beckman Coulter	ABBOTT	ABX
Modelo	ADVIA 2120	XE-2100	LH 750	Cell-Dyn Sapphire	Pentra DF120
Muestras/hora	120	150		106	120
Leucocitos totales y separación de poblaciones. Técnica	Canal de peroxidasa: distingue poblaciones leucocitarias excepto basófilos. Mide tamaño celular y absorbancia. Canal de lobularidad/densidad nuclear: separa mononucleadas, polimorfonucleares y basófilos	Basado en citometría de flujo, fluorescencia y dispersión del láser en dos ángulos. En el canal WBC/BASO hemoliza todas las células excepto basófilos, y cuenta leucocitos totales: núcleos + basófilos. En el canal WBC/DIFF distingue el resto de poblaciones	VCS: volumen por impedancia, conductividad por radiofrecuencia y Scatter de luz láser a 10 y 70°	Basado en citometría de flujo, fluorescencia y dispersión del láser en cuatro ángulos	Canal de leucocitos: distingue poblaciones leucocitarias excepto basófilos. Reactivo de citoquímica: negro de clorazol E. Mide tamaño celular y absorbancia de luz policromática. Canal específico de basófilos: destruye la membrana de todos los leucocitos excepto basófilos
Imprecisión (CV)					
· Leucocitos		< 3%		< 2,7	< 2%
· Neutrófilos		< 8%			< 3%
· Linfocitos		< 8%			< 5%
· Monocitos		< 20%			< 10%
· Eosinófilos		< 25%			< 15%
· Basófilos		< 40%			< 20%
Linealidad ($\times 10^9/L$)		0-170	0-400	0-250	0-150
Arrastre		< 1%	< 2%	< 1%	< 2%
Recuento diferencial ampliado		En pantallas de investigación cuenta granulocitos inmaduros y linfocitos atípicos		En pantallas de investigación cuenta cayados, granulocitos inmaduros, blastos y linfocitos variantes	Contaje de LIC, IMG, IMM, IML y ALY
Eritroblastos	Tiene algoritmos que miden NRBC en los dos canales de leucocitos sin necesidad de más reactivos. Da resultado positivo si nivel > 2/100 leucocitos o > 200/ μ L. Corrige las cifras de leucocitos y el diferencial	Canal específico para eritroblastos. Si en una muestra da alarma de posibles NRBC, hay que reprocesar en modo CBC-DIFF-NRBC. Utiliza como colorante fluorescente un derivado de la polimetina. La cifra de leucocitos totales y de linfocitos es corregida por el analizador	Sin canal específico ni reactivos adicionales. Análisis automático en todas las muestras por tecnología VCS. Corrige la cifra de leucocitos	Por fluorescencia (yoduro de propidio) y dispersión del láser. Medición en todos los hemogramas sin reprocesar. La cifra de leucocitos totales y de linfocitos es corregida por el analizador. Da alarma FP? cuando hay una población fluorescente anormal que no coincide con el área de NRBC	Por fluorescencia (tiazol naranja) y citoquímica. Si en una muestra da alarma de posibles NRBC, hay que reprocesar en modo NRBC (modelo DX120). La cifra de leucocitos totales y de linfocitos es corregida por el analizador
Contajes en líquidos biológicos	Lee leucocitos y fórmula en LCR (con un kit de reactivos)	El nuevo modelo XE-5000 permitirá leer leucocitos y fórmula en líquidos biológicos (software específico)			
Otras aportaciones	Permite el diagnóstico de deficiencias de mieloperoxidasa	Contaje de HPC en el canal IML que puede tener alguna utilidad para decidir el mejor momento para iniciar las aféresis de recogida de progenitores hematopoyéticos	Se pueden configurar reglas de validación automática	Se pueden procesar muestras en modo de eritrocitos resistentes a la lisis. Se pueden usar monoclonales para medir poblaciones linfocitarias. Da un índice de viabilidad celular de los leucocitos	Se pueden configurar reglas de validación automática

ALY: linfocitos atípicos; IMG: immature granulocytes; IML: immature lymphocytes; IMM: immature monocytes; LIC: large immature cells

Tabla 2. Evaluaciones de los analizadores hematológicos

Autor	Müller	Grimaldi	Siekmeier	Harris	Fernández	Aulesa	Ruzicka	Walters	Stamminger
Referencia	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Analizador	Cell-Dyn Sapphire	Cell-Dyn 4000	Pentra 120	ADVIA 2120	LH 750	LH 750	XE-2100	XE-2100	XE-2100
Muestras (n)	521	112	308	750		380	544	200	194
Imprecisión^a									
<i>Intraserie:</i>									
· Leucocitos	1,5-2	2,44	1,1	1,6-2,4	1,38	0,99		1,4	1,22
· Neutrófilos		1,32	0,8	0,7-1,4	1,11	1,37		1,78	1,4
· Linfocitos		1,55	4,1	2,3-2,8	1,57	1,71		3,9	2,33
· Monocitos		3,8	7,2	5,2-7,3	3,62	3,55		9,98	7,82
· Eosinófilos		3,32	18,5	8,8-10,8	14,11	11,46			5,66
· Basófilos		24,8	48,6	14-73,3	18,93	31,9			26,49
<i>Interserie:</i>									
· Leucocitos		2,47	1,8			1,03		1,2	
· Neutrófilos		1,34	1			0,88		2,2	
· Linfocitos		1,53	1,8			2,64		1,1	
· Monocitos		3,93	4,5			6,6		10,3	
· Eosinófilos		4,9	2,2			8,75			
· Basófilos		21,33	2,7			34,85			
Linealidad ($\times 10^9/L$)	0,4-280	0,15-100	1,7-50		0-400	0,3-380		0-400	0-500
Arrastre		0,05	No relevante		0-0,68	0,27		0	0
Correlación con conteje manual^b:									
· Neutrófilos	0,97	0,992	0,946	0,948		°	0,925	0,97	0,996
· Linfocitos	0,959	0,971	0,939	0,953		°	0,922	0,97	0,937
· Monocitos	0,818	0,83	0,564	0,693		°	0,756	0,85	0,911
· Eosinófilos	0,877	0,888	0,963	0,877		°	0,877	0,9	0,998
· Basófilos		En rango bajo: -0,02		0,311		°	0,763	0,65	0,67
		En rango alto: 0,94							
· Eritroblastos					0,939		0,97	0,992	

^a La imprecisión se expresa como coeficiente de variación en %

^b Expresado como coeficiente de correlación r

^c Por análisis Passing-Bablok: neutrófilos y linfocitos: no diferencia; monocitos y eosinófilos: el analizador da valores significativamente más altos; basófilos: no valorables

rollado métodos que dan un conteje automatizado. En la Tabla 1 se especifica el método utilizado por cada analizador.

Se han publicado múltiples trabajos que evalúan el conteje automatizado de los eritroblastos^{1,6,7,12-21}. En algunos casos se incluyen únicamente muestras de adultos, mientras que en otros casos se han incluido muestras de neonatos e incluso muestras de cordón umbilical. Existen varias publicaciones que comparan varios analizadores (datos recogidos en las Tablas 2-4). En general, no se reflejan las cifras de falsos positivos y negativos ni de sensibilidad y especificidad, ya que se han evaluado de forma muy diferente y la comparación resulta muy difícil. La gran mayoría de

los falsos negativos se producen cuando la cifra manual se sitúa entre el 0 y el 2%.

A pesar de usar diferentes métodos de conteje, la correlación con el recuento manual y con el conteje por citometría de flujo es buena. Los analizadores que incluyen un método específico para el conteje de eritroblastos tienden a aportar mejores resultados. La imprecisión y la linealidad del método se han recogido en muy pocos trabajos. Todos los modelos corrigen la cifra de leucocitos cuando detectan la presencia de eritroblastos.

En conclusión, podemos señalar que con los analizadores citados podemos prescindir del conteje manual de eritroblastos.

Tabla 3. Evaluaciones comparativas de analizadores hematológicos

Autor	Johnson			Uptmore	
Referencia	11			12	
Analizador	Cell-Dyn 4000	LH 750	XE-2100	Cell-Dyn 4000	XE-2100
Muestras (n)	100	100	100	251	251
Imprecisión ^a					
Intraserie:					
· Leucocitos	1,41	1,6	1,6		
· Neutrófilos					
· Linfocitos					
· Monocitos					
· Eosinófilos					
· Basófilos					
Interserie:					
· Leucocitos	1,69	1,28	1,6		
· Neutrófilos	2,59	2,99	2,1		
· Linfocitos	4,27	3,16	3,6		
· Monocitos	11,3	7,12	4,2		
· Eosinófilos	9,78	13,84	6,5		
· Basófilos	130	29,4	2,4		
Linealidad ($\times 10^9/L$)	0,35-264	0,46-255	0,45-272		
Arrastre	0,01	0	0		
Correlación con contaje manual ^b :					
· Neutrófilos	0,982	0,946	0,95	0,96	0,96
· Linfocitos	0,966	0,963	0,965	0,93	0,95
· Monocitos	0,745	0,679	0,69	0,86	0,85
· Eosinófilos	0,864	0,948	0,936	0,83	0,94
· Basófilos	0,016	0,526	0,169	0	0,26
· Eritroblastos	0,897	0,995	0,953	0,93	0,96

^a La imprecisión se expresa como coeficiente de variación en %

^b Expresado como coeficiente de correlación *r*

Utilidad clínica del contaje automatizado de los eritroblastos

En la Tabla 5 se han recogido varias referencias que han analizado la influencia que tiene la detección de eritroblastos en sangre periférica en la mortalidad de los pacientes hospitalizados²²⁻²⁵. Éstas son las principales conclusiones a las que se ha llegado:

- En diferentes unidades hospitalarias donde se han elaborado estos estudios, la detección de eritroblastos en algún hemograma se asocia a mayor mortalidad intrahospitalaria.
- Se registra mayor mortalidad cuanto mayor es el nivel de detección y cuanto mayor es el número de días en que se viene detectando.
- No hay relación con ninguna causa de muerte.

- Habría que valorar si la detección de eritroblastos en el hemograma puede añadir valor a *scores* de riesgo vital utilizados actualmente en diferentes servicios.
- En pacientes que reciben trasplante de células hematopoyéticas la detección de eritroblastos tras el premdimiento podría asociarse a mayor mortalidad.

Diferencial leucocitario ampliado

Las posibilidades para un diferencial ampliado también son diferentes entre unos analizadores y otros.

El analizador *Sysmex XE-2100* tiene un canal IMI para el contaje de leucocitos inmaduros (Figura 1). Los diferentes tipos de leucocitos inmaduros reaccionan de forma desigual a los reactantes ocupan-

Tabla 4. Evaluaciones del conteo automatizado de eritroblastos

Ref	Autor	Analizador	Muestras	Correlación con conteo manual ^a	Correlación con citómetro de flujo ^a	Comentarios
1	Müller	CD Sapphire	521			Hubo un 0,9% de falsos positivos y un 14% de falsos negativos para NRBC \geq 1%
13	Bowen	CD4000	636	0,96 y 0,99 para % y #		
14	Kratz	ADVIA 2120	965	0,93		Imprecisión < 10% en general
6	Aulesa	LH 750	39			El LH 750 contó menos NRBC con diferencia estadística. Límite de detección: 3,6%. Varios con agregados de plaquetas dan falsos NRBC (4-7%)
15	Chin-Yee	LH 750	263 adultos	0,8	0,781	En muestras de cordón el LH 750 da conteos más bajos
			51 cordón	0,687	0,710	
7	Ruzicka	XE-2100	544	0,97		En conteos > 15/100 leucocitos la estimación manual es superior a la del analizador
16	Briggs	XE-2100	465	0,97		En conteos altos la estimación manual es superior a la del analizador
17	Fernandes	XE-2100	262 adultos 121 neonatos	0,99 y 0,97 para % y #	0,98	Imprecisión nivel medio: 1,84%. Linealidad: 0-140%
18	Fernandes	XE-2100	104 cordón	0,99	0,99	Se encontró una cifra media de $1,05 \times 10^9/L$ y $0,54 \times 10^9/L$ en sangre de cordón y en sangre periférica, respectivamente, en niños nacidos a término
			98 neonatos	0,96 y 0,87 para % y #	0,96 y 0,92 para % y #	
19	Gulati	XE-2100	460	0,98		En conteos > 10/100 leucocitos la estimación manual es superior a la del analizador, con una desviación clínicamente insignificante
12	Uptmore	XE-2100	251			
		CD4000	251			
20	Li	XE-2100	115	0,97		Imprecisión: 6,49%. Linealidad: $0-15,27 \times 10^9/L$. Sensibilidad y especificidad: 100% y 30% para alarma NRBC
		ADVIA 120	115			Sensibilidad y especificidad: 50% y 96% para alarma NRBC
21	Keijzer	XE-2100	139 neonatos	0,97 ^b		En el análisis de Bland-Altman las diferencias medias fueron de -1,4 y 1,7 entre el XE-2100 y el CD4000 frente al recuento manual, respectivamente
		CD4000		0,98 ^b		

^a Expresado como coeficiente de correlación *r*

^b Método de Passing-Bablok

do distintas áreas en el gráfico, con lo que podemos distinguir entre cayados (*left shift*), mielocitos, metamielocitos y promielocitos (*immature granulocytes*).

El número de granulocitos inmaduros (IG) en porcentaje y en cifras absolutas aparece en las pantallas de investigación. Este parámetro está aprobado por la FDA. Los resultados pueden aparecer como aceptados por el analizador o bien con resultado marca-

do con un asterisco (*) anexo que obliga a una valoración por el usuario.

La correlación del conteo automático de granulocitos inmaduros con el conteo manual ha sido buena en diferentes trabajos²⁶⁻³⁰, tal como puede apreciarse en la Tabla 6. Incluso en muestras con resultados que incluyen asterisco, la correlación sigue siendo buena.

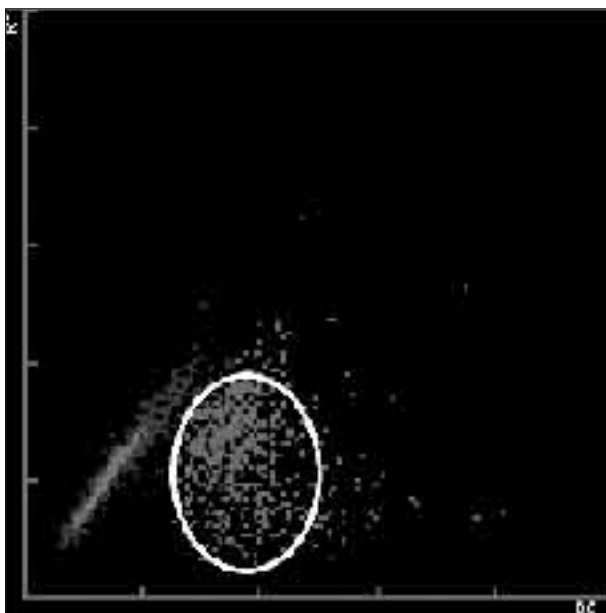


Figura 1. Canal IMI del analizador Sysmex XE2100. El círculo señala los granulocitos inmaduros.

Hay dos trabajos que evalúan la correlación del conteo de granulocitos inmaduros en el analizador Sysmex XE 2100 y en un citómetro de flujo utilizando marcadores CD45, CD16 y CD11b^{26,31}. En ambos casos la correlación es muy buena y los autores plantean la posibilidad de que el conteo por citometría de flujo pueda ser un método de referencia.

La imprecisión se ha analizado en varios estudios. El publicado por Briggs²⁶ daba un coeficiente de variación del 7,02 y el 6,93% para cifras en porcentaje y absolutos, y en el de Frankie²⁹ el coeficiente de variación fue del 4,1 y 4,5 respectivamente incluyéndose en este estudio muestras con IG > 2%. Este último autor obtu-

vo una linealidad de $0,25-2,57 \times 10^9/L$. Fernandes³¹ obtiene una imprecisión de entre el 3,5 y el 8,24% para contajes en porcentaje.

Recientemente, Krnjak³² ha comparado el conteo de granulocitos inmaduros en analizador *Coulter GEN-S y Cell-Dyn Sapphire* entre sí y con el conteo manual, con buenos resultados.

Valores de referencia de granulocitos inmaduros

Bruegel³³ analiza los valores de referencia de IG en 156 donantes de sangre (80 hombres y 76 mujeres) con una edad media de 38 años (19-69). Se excluyeron aquéllos con un nivel de proteína C reactiva superior a 5 mg/L. Los percentiles 5 y 95 fueron de 0 a 0,5% y de 0 a 0,03 $\times 10^9/L$ para todo el grupo. No hubo diferencias significativas por sexo ni por edad.

Gadalla³⁰ procesa los datos de 4.403 hemogramas (1.422 adultos masculinos, 1.670 mujeres no embarazadas y 1.311 embarazadas) para calcular valores de referencia. Los valores de referencia en tanto por ciento fueron, para hombres adultos, de 0-0,7%, para mujeres adultas no embarazadas, de 0-0,5%, y para mujeres embarazadas, de 0,1-2,1%.

Fernandes³¹ analiza 60 muestras y obtiene unos valores de referencia de 0 a 0,44% y de 0 a $0,03 \times 10^9/L$.

Utilidad clínica del conteo automatizado de granulocitos inmaduros

La presencia de granulocitos inmaduros (metamielocitos, mielocitos y promielocitos) en el hemograma es normal en el recién nacido, pero en el adulto será indicativa de diversas patologías: infección (principalmente bacteriana), enfermedad inflamatoria, enfermedad hematológica (síndrome mielodisplásico,

Tabla 5. Utilidad clínica del conteo automatizado de eritroblastos

Ref	Autor	n	Servicios	Detección NRBC	Mortalidad intrahospitalaria (%)	Comentarios
22	Stachon	421	UCI	Sí: 81 (19,2%) No: 340 (80,8%)	42* 5,9	Mayor mortalidad cuanto mayor nivel de NRBC
23	Stachon	4.173	Cirugía general y torácica Med. Interna y Neurología	Sí: 313 (7,5%) No: 3.860 (92,5%)	21,1* 1,2	Mayor mortalidad cuanto mayor nivel de NRBC
24	Otsubo	44	Trasplante de médula (posprendimiento)	Sí: 35 (79,5%) No: 9 (20,5%)	66,7 0	Mayor mortalidad cuanto mayor nivel de NRBC
25	Lehnhardt	464	Quemados	Sí: 53 (11,4%) No: 411 (88,6%)	56,6* 12,4	

* $p < 0,05$

Tabla 6. Evaluaciones del conteje automatizado de granulocitos inmaduros

Ref	Autor	Analizador	Muestras totales	Muestras con *	Correlación con conteje manual ^a	Comentarios
16	Briggs	XE-2100	465		0,81	En contajes altos la estimación manual tiende a ser superior a la del analizador
9	Stamminger	XE-2100	367		0,8363	La estimación manual suele ser superior a la del analizador. Mejores resultados para valores absolutos
26	Briggs	XE-2100	54		0,78	Correlación con citómetro de flujo r: 0,96 (usan anti-CD16, anti-CD11b y anti-CD45)
27	Field	XE-2100	149		0,83	
28	Weiland	XE-2100	258	72	Global: 0,90	Analizando aparte 24 muestras de neonatos, la r fue de 0,884
					Sin *: 0,868	
					Con *: 0,881	
29	Frankie	XE-2100	244	71	Global: 0,72	
					Sin *: 0,81	
					Con *: 0,67	
30	Gadalla	XE-2100	256		0,966	El analizador da contajes algo superiores
31	Fernandes	XE-2100	263		0,82	Correlación con citómetro de flujo r: 0,93 (usan anti-CD16, anti-CD11b y anti-CD45)

^a Expresada como coeficiente de correlación r

síndrome mieloproliferativo crónico...) o metástasis medulares.

El estudio de laboratorio de pacientes con sospecha de infección o sepsis ha cambiado poco en los últimos años y se basa en el hemograma con un diferencial leucocitario (para ver si hay desviación izquierda), VSG, proteína C reactiva (PCR) y cultivos microbiológicos. Más recientemente se ha introducido la procalcitonina como otro reactante de fase aguda que podría elevarse con mayor especificidad en infecciones bacterianas en comparación con las víricas, pero no tiene una aceptación universal.

Se define la desviación izquierda como una elevación de la presencia de cayados o de granulocitos inmaduros. Su validez como predictivo de sepsis sigue siendo controvertido debido en parte a criterios poco claros sobre la definición de sepsis y de cayados.

Varios estudios³⁴⁻³⁶ han examinado la utilidad del conteje de IG como marcador de infección. De dichos estudios podríamos destacar los siguientes puntos:

- El conteje manual de IG es laborioso y presenta una gran variabilidad e imprecisión. El conteje automatizado en analizadores *Sysmex XE2100* aumenta la precisión, con buena linealidad y estabilidad de la muestra de 48 horas.
- Con resultados sin asterisco y si no hay otras alarmas, podrían informarse los resultados sin hacer conteje manual. Para ello habría que informar a los clínicos sobre su significado.
- El conteje de leucocitos, neutrófilos, cayados e IG son poco específicos como indicativos de infección o

asociación a hemocultivos positivos, ya que pueden elevarse en situaciones muy variadas.

En una reciente publicación, Fernández³⁷ analiza 698 hemogramas en embarazadas para saber el significado que puede tener la detección de IG. Un 14,33% de dichas embarazadas tenían alarma IG, y la mayoría de ellas estaban en el tercer trimestre del embarazo. No se encontró ninguna asociación entre el tipo de parto o complicaciones periparto y ningún parámetro clínico analizado con la presencia de IG. El segundo y tercer trimestres se asociaron a un mayor número de leucocitos, neutrófilos y monocitos, y a menor número de linfocitos, eosinófilos, basófilos y plaquetas. Se concluye que la alarma de IG en la embarazada es frecuente pero no tiene trascendencia clínica y no obliga a la realización de una fórmula manual.

Aplicaciones de la inmunofluorescencia en el conteje de poblaciones leucocitarias

El *Cell-Dyn 4000* y *Sapphire* utilizan una fuente de láser cuya dispersión se mide en 4 puntos (0°, 7°, 90° polarizada y 90° despolarizada) y 3 canales para detección de fluorescencia para separar poblaciones leucocitarias (FL1, FL2 y FL3).

En un principio, se desarrolló la posibilidad de leer subpoblaciones de linfocitos T en estos analizadores. Para ello se cargan en el *rack* 3 tubos: a) en primera posición la muestra en un tubo con EDTA; b) en segundo lugar, un tubo que contiene CD3/CD4, y c) en

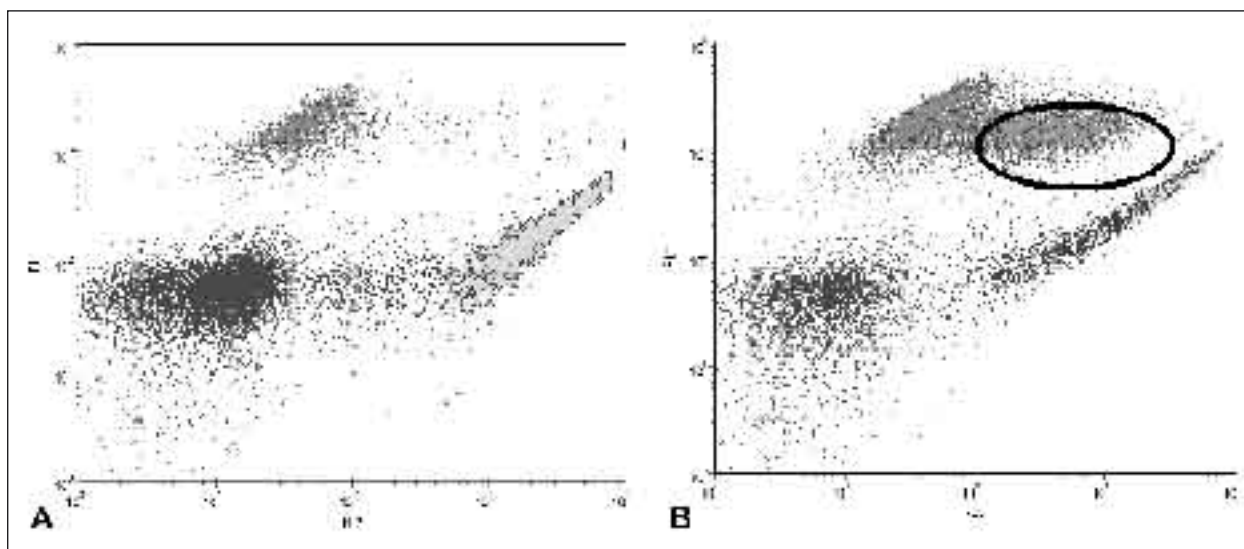


Figura 2. Contaje de subpoblaciones linfocitarias en un analizador *Cell-Dyn Sapphire*. A: Población linfocitaria T (FL2) con aumento de linfocitos B (FL1). B: Linfocitosis reactiva. En el círculo se sitúan los linfocitos T reactivos CD3+/DR+.

tercer lugar, un tubo que contiene CD3/CD8. En el menú del analizador se elige el modo CD3/4/8, con lo que el equipo dispensa un volumen predeterminado de muestra y diluyente en los tubos siguientes y los va mezclando mientras se incuban. Posteriormente aspira muestras de los 3 tubos e interpreta los resultados mediante la información recogida sobre la dispersión óptica del láser a 0° y 7° junto a los canales de fluorescencia y con ello puede medir subpoblaciones de linfocitos T (CD3/4/8). El tiempo de contaje es de unos 7 minutos. La lisis de hematíes está automatizada, no hace falta hacer lavados y la técnica puede ser realizada por un técnico de laboratorio mínimamente cualificado.

Marshall³⁸ evalúa los resultados del contaje de subpoblaciones de linfocitos T en un *Cell-Dyn 4000* en 4 centros diferentes. Sobre 436 muestras, al compararlo con un contaje por citometría de flujo, el coeficiente de correlación r global para los 4 centros fue de 0,995, 0,995 y 0,986 para linfocitos T totales, CD4+ y CD8+, respectivamente.

No se detectó arrastre. La imprecisión varió de un 3 a un 10%, dependiendo del nivel medido. La medición fue lineal por encima de 20 células y hasta 4.433 linfocitos T CD3+ por microlitro.

Molero³⁹ evaluó el contaje de subpoblaciones linfocitarias T, B y NK en un analizador *Cell-Dyn 4000*. La metodología es similar a la publicada por Marshall³⁸, pero poniendo en un tubo CD3/CD56, y en otro, anti-Ia/CD19 e incubándose con sangre total en EDTA a temperatura ambiente durante 10 minutos. Los datos del analizador hay que transportarlos a un PC y transformarlos con un *software* para poder hacer

la lectura. Como referencia, se utilizó un citómetro de flujo. Se procesaron 66 muestras variadas en cuanto a número de linfocitos y en cuanto a diagnósticos. En el estudio comparativo hubo muy buena correlación para la población de linfocitos T CD3+ (r : 0,97) y de linfocitos B CD19+ (r : 0,97). Los resultados no fueron tan buenos para la población CD3-CD56+ (r : 0,72) y la población CD3+CD56+ (r : 0,91), con tendencia a lecturas más altas en el citómetro de flujo. Cuando la población de linfocitos T corresponde a células activadas, las gráficas de dispersión del analizador son diferentes a aquellos casos con otras linfocitosis no reactivas. En los laboratorios con difícil acceso a un citómetro de flujo o bien cuando éste tiene sobrecarga de muestras, el analizador *Cell-Dyn 4000* permite estudios inmunológicos semiautomatizados de poblaciones linfocitarias que junto a la morfología manual orientan en el diagnóstico diferencial.

En otro estudio de Molero⁴⁰ se utilizó la misma metodología que en el trabajo previo pero con un analizador *Cell-Dyn Sapphire*. De un total de 97 muestras (94 valorables) con linfocitosis entre $6,0$ y $15,0 \times 10^9/L$ de causa desconocida, 35 fueron de niños menores de 13 años y 62 de personas mayores de dicha edad.

En primer lugar, combina CD3, CD19 y HLA-DR (Ia) y, en un segundo lugar, en las linfocitosis T superiores a $3,0 \times 10^9/L$, utiliza CD4/CD8 y CD16/CD56. Con todos los datos cuantifica: linfocitos T CD3+, linfocitos T activados CD3+Ia+ (Figura 2), linfocitos T *helper* CD4+, supresores CD8+, linfocitos B CD19+ y células NK CD16/56+. Según referencia, un 1,4-3,0% de los hemogramas realizados en el laboratorio presentan linfocitosis entre $4,5$ y $10 \times 10^9/L$.

A veces con los datos clínicos disponibles y la morfología no es suficiente para establecer la causa. El analizador *Cell-Dyn Sapphire* ofrece un modo rápido, con tecnología no muy sofisticada, de orientar el tipo de linfocitosis en tres grupos: linfocitosis no específicas sin evidencia de malignidad, linfocitosis T reactivas a procesos infecciosos, y linfocitosis malignas. Cuando hiciera falta se completaría el estudio con un citómetro de flujo.

Johannessen⁴¹ utiliza una extensa gama de reactivos monoclonales comerciales que, una vez incubados con la muestra durante 2 minutos, son procesados en un analizador *Cell-Dyn Sapphire* utilizando el modo automatizado CD3/4/8 en tubo abierto, y se obtienen los resultados tras otros 8 minutos. No hace falta lavado de células, y la lisis de hematíes ya está incorporada al procedimiento automatizado del analizador. Utiliza marcadores linfocitarios (CD2/3/4/8/19/22/16/56), mieloides (CD11b/13/14/33/64), miscelánea (HLA-DR/1a/34/45), plaquetarios y eritroides, y describe los gráficos obtenidos con la separación de las diferentes poblaciones leucocitarias. Con un entrenamiento mínimo del operario, este analizador permite ampliar el potencial de un laboratorio de hematología.

Siguiendo sistemáticas similares con determinados anticuerpos, Cantinieux⁴² demuestra la utilidad del analizador *Cell-Dyn Sapphire* para la detección y filiación de blastos en sangre periférica.

Utilidad de los parámetros de investigación de los autoanalizadores

El analizador *Coulter LH 750* mide como parámetros de investigación el volumen medio, la conductividad media y dispersión de luz láser media de las subpoblaciones leucocitarias, y la desviación estándar de cada uno de ellos. Estos parámetros pueden servir para distinguir diferentes patologías⁴³.

Chaves⁴⁴ estudia la utilidad de estos parámetros en los neutrófilos como indicadores de infección aguda bacteriana. Para ello valora 69 casos con hemocultivo positivo para una bacteria frente a un grupo control con edad media similar y hemograma dentro de los límites normales. Valora la cifra de leucocitos, el porcentaje de neutrófilos, el volumen medio de los neutrófilos (VMN), la conductividad media de los neutrófilos (CMN) y la dispersión media de la luz en los neutrófilos (DMN). No se hicieron contajes manuales. El VMN fue significativamente mayor en el grupo de infectados (156 frente a 143), mientras que la cifra de DMN fue significativamente menor (140 frente a 146). No hubo diferencias en la cifra media de CMN. Un umbral de VMN de 150 tendría una sensibilidad del 70% y una especificidad del 91% para asociarse a una infección bacteriana con hemocultivo positivo.

Miguel⁴⁵ analiza si el estudio de estos parámetros en el neutrófilo puede ser útil para la detección de displasia de los neutrófilos. Para ello analizan un grupo de 54 muestras de síndromes mielodisplásicos (SMD) que incluían todos los tipos morfológicos y 18 de leucemias mielomonocíticas crónicas (LMMC) junto a una población control de 59 muestras. Se hicieron extensiones manuales para valorar la granularidad de los neutrófilos como nivel 1 (hipogranularidad ausente o ligera) y nivel 2 (hipogranularidad moderada o severa). Las cifras de DMN y CMN fueron significativamente menores en el grupo de SMD en cualquiera de los tipos morfológicos y en las LMMC con respecto a los controles. Un DMN < 139,3 tuvo una sensibilidad del 71,8% y una especificidad del 86,4% para detectar displasia de los neutrófilos, y un CMN < 150,9, una sensibilidad del 70,4% y una especificidad del 76,3%.

Chaves⁴⁶ estudia la utilidad del parámetro de investigación ancho de distribución de los neutrófilos (ADN) en el analizador Coulter LH 750 en 70 pacientes infectados con hemocultivo positivo a bacterias en comparación con un grupo control de 35 personas sanas. La cifra media de ADN fue de 24,7 y 19,0, respectivamente ($p < 0,001$). La diferencia estaba presente incluso en muestras sin leucocitosis y con un porcentaje de neutrófilos < 85%. A mayor leucocitosis y neutrofilia, mayor era la cifra media de ADN. Usando un punto de corte de 23, la sensibilidad fue del 69% y la especificidad del 100%.

Silva⁴⁷ y Baron⁴⁸ estudian los parámetros de investigación volumen medio y desviación estándar de los linfocitos (VML y DSVL), así como la conductividad media y su desviación estándar en los linfocitos (CML y DSCL), determinados en el analizador *Coulter LH 750* o *Coulter GEN-S*. En ambos casos se incluyen muestras de personas sanas junto a pacientes con diferentes síndromes linfoproliferativos, leucemias agudas e infecciones virales. Los autores sugieren que la incorporación de estos parámetros de investigación a las reglas de validación puede tener utilidad clínica.

Bagdasarian⁴⁹ analiza 242 muestras de adultos divididos en tres grupos: sin evidencia de infección (54) con infección localizada (70) y con infección generalizada (118). Estudia diferentes parámetros que pueden relacionarse con la infección: leucocitos absolutos, neutrófilos en tanto por ciento y en cifras absolutas, porcentaje de cayados, nivel PCR, y dos parámetros de investigación del analizador Coulter LH 750 como son el volumen medio de los neutrófilos (VMN) y el ancho de distribución del volumen de los neutrófilos (ADVN). Todas las cifras son más elevadas en los grupos 2 y 3 respecto al 1, sobre todo al comparar los grupos 1 y 3. Las cifras de VMN y de ADVN presentaron mejores ni-

veles de sensibilidad y especificidad que el resto de parámetros.

Cymbalista⁵⁰ hace un estudio del parámetro NEUT-X que aparece en la pantalla de investigación del analizador Sysmex XE-2100 en un grupo de pacientes con síndromes mielodisplásicos (SMD). Este parámetro es indicativo de la estructura de los neutrófilos y puede ser usado como un índice del contenido granular. En la población normal la cifra media de NEUT-X fue de 1.330, mientras que en el grupo con SMD la media fue de 1.241. En muestras con anemia la asociación de un nivel bajo de NEUT-X podría utilizarse como alarma para la revisión de la muestra al microscopio. En su grupo detectaron el 96% de los casos con SMD, lo que les llevaría a revisar sólo un 2% más de extensiones en anemias sin SMD.

Conclusiones

Podemos señalar que en los últimos años se han producido importantes avances en el recuento automatizado y diferencial leucocitario, que han permitido ampliar el conteo de cinco poblaciones a conteos que pueden incluir granulocitos inmaduros o poblaciones linfocitarias. Por otro lado, permiten una medición fiable de los eritroblastos que además son descontados de la cifra total de leucocitos, con lo que no se hacen necesarias fórmulas previas leucocitarias manuales por alarma cualitativa de eritroblastos. Por último, se está haciendo hincapié en parámetros medidos por los analizadores que quedan ocultos en pantallas de investigación y que podrían ser de utilidad en algunas entidades clínicas. Fuera de los objetivos de esta revisión queda la opción real que existe ya para la realización de fórmulas leucocitarias por tratamiento computarizado de imágenes digitales, que será de gran ayuda en la tarea laboriosa de la valoración microscópica de las extensiones de sangre periférica.

Bibliografía

- Müller R, Mellors I, Johannessen B, Aarsand AK, Kiefer P, Hardy J, et al. European multi-center evaluation of the Abbott Cell-Dyn sapphire hematology analyzer. *Lab Hematol* 2006; 12: 15-31.
- Grimaldi E, Scopacasa F. Evaluation of the Abbott CELL-DYN 4000 hematology analyzer. *Am J Clin Pathol* 2000; 113: 497-505.
- Siekmeier R, Bierlich A, Jaross W. The white blood cell differential: three methods compared. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39: 432-45.
- Harris N, Jou JM, Devoto G, Lotz J, Pappas J, Wranovics D, et al. Performance evaluation of the ADVIA 2120 hematology analyzer: an international multicenter clinical trial. *Lab Hematol* 2005; 11: 62-70.
- Fernández T, Domack LB, Montes D, Pineiro R, Landrum E, Vital E. Performance evaluation of the Coulter LH 750 hematology analyzer. *Lab Hematol* 2001; 7: 217-28.
- Aulesa C, Pastor I, Naranjo D, Piqueras J, Galimany R. Validation of the Coulter LH 750 in a hospital reference laboratory. *Lab Hematol* 2003; 9: 15-28.
- Ruzicka K, Veitl M, Thalhammer-Scherrer R, Schwarzingler I. The new hematology analyzer Sysmex XE-2100: performance evaluation of a novel white blood cell differential technology. *Arch Pathol Lab Med* 2001; 125: 391-6.
- Walters J, Garrity P. Performance evaluation of the Sysmex XE-2100 hematology analyzer. *Lab Hematol* 2000; 6: 83-92.
- Stamminger G, Auch D, Diem H, Sinha P. Performance of the XE-2100 leucocyte differential. *Clin Lab Haematol* 2002; 24: 271-80.
- International Council for Standardization in Haematology. Reference leukocyte differential count (proportional) and evaluation of instruments methods. Villanova, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Instruments Methods; 1992. NCCLS document H20-A.
- Johnson M, Samuels C, Jozsa N, Gorney K. Three-way evaluation of high-throughput haematology analyzers - Beckman Coulter LH 750, Abbott Cell-Dyn 4000 and Sysmex XE-2100. *Lab Hematol* 2002; 8: 230-8.
- Uptmore C, Connell B, Hart D, Helms D. Comparison of the Sysmex XE-2100 to the Abbott Cell-Dyn 4000 automated haematology analyzer. *Sysmex J Int* 2001; 11: 22-6.
- Bowen KL, Procopio N, Wystepek E, Glazier J, Mattson JC. Platelet clumps, nucleated red cells, and leukocyte count: a comparison between the Abbott CELL-DYN 4000 and Coulter STKS. *Lab Hematol* 1998; 4: 7-16.
- Kratz A, Maloum K, O'Malley C, Zini G, Rocco V, Zelmanovic D, et al. Enumeration of nucleated red blood cells with the ADVIA 2120 hematology system: an international multicenter clinical trial. *Lab Hematol* 2006; 12: 63-70.
- Chin-Yee I, Brown W, Hohson K, Keeney M, Steele B, Wolfe N, et al. Identification and enumeration of nucleated red blood cells on the Coulter LH 750. *Lab Hematol* 2002; 8: 210-7.
- Briggs C, Harrison P, Grant D, Staves J, Machin SJ. New quantitative parameters on a recently introduced automated blood cell counter - the XE 2100™. *Clin Lab Haem* 2000; 22: 345-50.
- Fernandes BJ. Identification and enumeration of nucleated red blood cells in peripheral blood. *Sysmex J Int* 2002; 12: 56-62.
- Fernandes B, Bergeron N, Hamaguchi Y. Automated nucleated red blood cell counting in the perinatal period. *Lab Hematol* 2002; 8: 179-88.
- Gulati G, Behling E, Kocher W, Schwarting R. An evaluation of the performance of Sysmex XE-2100 in enumerating nucleated red cells in peripheral blood. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 1077-83.
- Li J. The preliminary study of nucleated red blood cell counting by automated hematology analyzer. *Sysmex J Int* 2004; 14: 13-7.
- de Keijzer MH, van der Meer W. Automated counting of nucleated red blood cells in blood samples of newborns. *Clin Lab Haem* 2002; 24: 343-5.
- Stachon A, Holland-Letz T, Krieg M. High in-hospital mortality of intensive care patients with nucleated red blood cells in blood. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 933-8.
- Stachon A, Sondermann N, Imohl M, Krieg M. Nucleated red blood cells indicate high risk of in-hospital mortality. *J Lab Clin Med* 2002; 140: 407-12.
- Otsubo H, Kaito K, Asai O, Usui N, Kobayashi M, Hoshi Y. Persistent nucleated red blood cells in peripheral blood is a poor prognostic factor in patients undergoing stem cell transplantation. *Clin Lab Haem* 2005; 27: 242-6.

25. Lehnhardt M, Katzy Y, Langer S, Druelcke D, Homann HH, Steintraesser L, et al. Prognostic significance of erythroblasts in burns. *Plast Reconstr Surg* 2005; 115: 120-7.
26. Briggs C, Kunka S, Fujimoto H, Hamaguchi Y, Davis BH, Machin S. Evaluation of immature granulocyte counts by the XE-IG master: upgraded software for the XE-2100 automated haematology analyzer. *Lab Hematol* 2003; 9: 117-24.
27. Field D, Taube E, Heumann S. Performance evaluation of the immature granulocyte parameter on the Sysmex XE-2100 automated haematology analyzer. *Lab Hematol* 2006; 12: 11-4.
28. Weiland T, Kalkman H, Heihn H. Evaluation of the automated immature granulocyte count (IG) on Sysmex XE-2100 automated haematology analyser vs visual microscopy (NCCLS H20A). *Sysmex J Int* 2002; 12: 63-70.
29. Frankie I, Yi Ning. Comparison of automated immature granulocyte (IG) count on Sysmex XE-2100 analyser with manual microscopy. *Sysmex J Int* 2006; 16: 12-6.
30. Gadalla S. Evaluation and reference ranges of the automated immature granulocyte count on the Sysmex XE-2100 haematology analyser. *Lab Hematol* 2006; 12 (2): 103.
31. Fernandes B, Hamaguchi Y. Automated enumeration of immature granulocytes. *Am J Clin Pathol* 2007; 128: 454-63.
32. Krmjak L, Kavcic M, Skitek M. Comparison of immature granulocytes count on Coulter GEN-S and Abbott Cell-Dyn Sapphire analysers with manual microscopy. *Int Jnl Lab Hem* 2008; 30 (Suppl 1): 70.
33. Bruegel M, Fiedler GM, Matthers G, Thiery J. Reference values for immature granulocytes in healthy blood donors generated on the Sysmex XE-2100 automated haematology analyser. *Sysmex J Int* 2004; 14: 5-7.
34. Ansari-Lari A, Thomas S, Kickler S, Borowitz MJ. Immature granulocyte measurement using the Sysmex XE-2100. *Am J Clin Pathol* 2003; 120: 795-9.
35. Frings DP, Montag B, Heydorn A, Friedemann M, Pothmann W, Nierhaus A. Immature granulocytes, immature myeloid cells and outcome in adult severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Medicine* 2003; 29 (Suppl 1): S32.
36. Nigro KG, O'Riordan MA, Molloy EJ, Walsh MC, Sandhaus LM. Performance of an automated immature granulocyte count as a predictor of neonatal sepsis. *Am J Clin Pathol* 2005; 123: 618-24.
37. Fernández-Suarez A, Pascual VT, Giménez MTF, Hernández JFS. Immature granulocyte detection by the SE-9000 haematology analyser during pregnancy. *Clin Lab Haem* 2003; 25: 347-51.
38. Marshall P, Hung D, Yuan J, Kim YR. Rapid, automated, closed-tube quantisation of CD4+ and CD8+ T-cell populations on the Cell-Dyn 4000 hematology analyzer. *Lab Hematol* 2000; 6: 137-43.
39. Molero T, Roemer B, Perera Álvarez M, Lemes A, De la Iglesia S, Palacios G, et al. Analysis and enumeration of T cells, B cells and NK cells using the monoclonal antibody fluorescence capability of a routine haematology analyser (Cell-Dyn CD4000). *Clin Lab Haem* 2005; 27: 224-34.
40. Molero T, Lemes A, De la Iglesia S, Scott CS. Monoclonal antibody fluorescence for routine lymphocyte subpopulation analysis with the Abbott Cell-Dyn Sapphire haematology analyser. *Int Jnl Lab Hem* 2007; 29: 446-53.
41. Johannessen B, Roemer B, Flatmoen L, Just T, Aarsand AK, Scott CS. Implementation of monoclonal antibody fluorescence on the Abbott Cell-Dyn Sapphire haematology analyser: evaluation of lymphoid, myeloid and platelet markers. *Clin Lab Haem* 2006; 28: 84-96.
42. Cantinieaux B, Vanpoucke M, Janssens A, Gobin D, Bron D, Kerrels V. Monoclonal antibody fluorescence for blasts detection, quantification and lineage identification with an automated hematology analyser Abbott-CELL-DYN Sapphire: comparison with flow cytometry and morphology. *Int Jnl Lab Hem* 2008; 30 (Suppl 1) 59-60.
43. Bentahar A. Nuevas aplicaciones clínicas en los analizadores hematológicos de la serie LH. *Haematologica* 2006; 91 (Suppl 1): 146-9.
44. Chaves F, Tierno B, Xu D. Quantitative determination of neutrophil VCS parameters by the Coulter automated hematology analyzer. New and reliable indicators for acute bacterial infection. *Am J Clin Pathol* 2005; 124: 440-4.
45. Miguel A, Orero M, Simon R, Collado R, Pérez PL, Pacios A, et al. Automated neutrophil morphology and its utility in the assessment of neutrophil dysplasia. *Lab Hematol* 2007; 13: 98-102.
46. Chaves F, Tierno B, Xu D. Neutrophil volume distribution width. A new automated hematologic parameter for acute infection. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130: 378-80.
47. Silva M, Fourcade C, Fartoukh C, Lenormand B, Buchonnet G, Callat MP. Lymphocyte volume and conductivity indices of the haematology analyser Coulter GENS in lymphoproliferative disorders and viral diseases. *Clin Lab Haem* 2006; 28: 1-8.
48. Baron P, Andriolo K, Johnston L, Talaulikar D. Beckman Coulter LH750 VCS parameters evaluated for screening and detection of abnormal lymphocyte populations. *Int Jnl Lab Hem* 2008; 30 (Suppl 1) 58.
49. Bagdasarian R, Zhou Z, Tierno B, Rosenman D, Xu D. Neutrophil VCS parameters are superior indicators for acute infections. *Lab Hematol* 2007; 13: 12-6.
50. Cymbalista F. Usefulness of NEUT-X determination in routine procedures: application to myelodysplastic syndromes. *Sysmex European haematology symposium. Lisboa; 2007. Abstract.*

NUEVOS PARÁMETROS PLAQUETARIOS Y ANÁLISIS DE LA MÉDULA ÓSEA

L. GARCÍA ALONSO

Servicio de Hematología.

Hospital Universitario de Getafe (Madrid)

Introducción

Los autoanalizadores hematológicos (AH) aprovechan las nuevas tecnologías aplicadas al estudio celular y los sistemas de *software* y de análisis de datos, a fin de mejorar la calidad y cantidad de parámetros que pueden medir o informar en el hemograma. Además de realizar el estudio descriptivo de la sangre, se aplican al estudio de líquidos biológicos y de suspensiones celulares o de alguna de sus fracciones. Gracias a estos equipos, disponemos de nuevas aplicaciones clínicas, analíticas o de investigación. Como hematólogos, nos centraremos en esta revisión en los avances producidos dentro del estudio de las plaquetas y en el análisis automatizado del aspirado de médula ósea, una aplicación de estos equipos aún poco desarrollada.

Parámetros plaquetarios

En los años setenta se incorporó la cuantificación de las plaquetas (PTL) al hemograma y se añadió el volumen plaquetario medio (VPM) y el ancho de distribución de éste (PDW). En los años ochenta estos datos se utilizaron para diferenciar las trombocitosis reactivas de las primarias¹. La variabilidad y falta de estandarización de estos parámetros impidieron que se pudieran utilizar en el diagnóstico de rutina. Ahora, con su mejora y con la incorporación de otros datos en los AH, han vuelto a ser objeto de interés². Además, la alarma de agregados plaquetarios, apoyada en la observación de las gráficas y en los sistemas delta-check, facilita la demostración de pseudotrombocitopenias producidas por EDTA y la validación de resultados. Aún así, habrá casos en que las plaquetas deberán ser comprobadas por otros medios u observadas al microscopio.

La cuantificación de las plaquetas en los nuevos AH es más exacta y resuelve en parte los problemas de interferencias y de linealidad que obligaban en el pasado a realizar numerosas comprobaciones. Su recuento en los rangos de normalidad presenta coeficientes de variación (CV) inferiores al 5%, aunque en cifras muy altas o muy bajas existe una mayor imprecisión y una falta de correlación importante entre métodos y equipos. Con la mejora de los sistemas ópticos la linealidad puede alcanzar cifras PTL de $3-5 \times 10^{12}/L$, siendo algo menor para los AH que utilizan sistemas modernos de impedancia³. También ha mejorado su recuento en rangos bajos, si bien, debido al pequeño tamaño de las plaquetas, los CV son mayores, y debe extremarse el cuidado de los AH y de sus reactivos para reducir el ruido de fondo. Por ello, la citometría de flujo (CF) con anticuerpos monoclonales (AcMo) es el método de referencia. Los equipos CELL-DYN de Abbott disponen de un método inmunoplaquetario para la cuantificación "exacta" de plaquetas. Estos equipos determinan las PTL de rutina por un método óptico PTL_o y otro de impedancia PTL_i, y los comparan. Además, ofrecen un tercer método adicional mediante anti-CD61, inmunoplaquetas o PTL_{imm}, que debe procesarse por separado en un tubo especial y cuyo resultado se obtiene en sólo 4 minutos. Esta técnica sería la de elección, dada su exactitud en el rango bajo desde cero plaquetas⁴. Existe un debate abierto, que sólo apuntaremos, sobre si el paciente se beneficia realmente de este método. Quizás sólo se conteste si se realizan las PTL_{imm} de forma rutinaria en las unidades oncohematológicas y se evalúa su relación coste-beneficio. Antes de indicar una transfusión debemos conocer las guías clínicas y los AH que realizan el hemograma urgente de nuestros pacientes, ya que éste no siempre será óptimo. En general, los AH de gama alta informan con bastante precisión de las

cifras de plaquetas de entre 5 y $20 \times 10^9/L$ cuando el equipo está en condiciones óptimas⁵. Otros parámetros, como el PDW o la fracción de plaquetas inmaduras (IPF), que se desarrollará más adelante, pueden ayudarnos a tomar la decisión de esperar o transfundir a un paciente⁶.

Análisis de subpoblaciones plaquetarias

Una vez superados los problemas asociados al recuento plaquetario, la tendencia actual con las nuevas tecnologías es buscar subpoblaciones plaquetarias que, en función de su tamaño, de su contenido o de su situación funcional, permitan ayudar en el diagnóstico e investigar nuevas aplicaciones de los AH.

Tamaño plaquetario. Plaquetas grandes

Actualmente casi todos los equipos alertan sobre la posibilidad de que existan plaquetas grandes que emitan una alarma morfológica, L-PTL o *large platelets*, que procede del análisis de la curva o del gráfico del volumen plaquetario². El rango de medición clásico de 2-20 fL ha sido ampliado hasta los 0-60 fL en los AH con análisis óptico bidimensional³. En los AH con impedancia sólo aumenta hasta 30 fL cuando la curva reúne ciertas condiciones estadísticas que prevén la suficiencia de eventos y una ausencia de agregados plaquetarios o de microcitos. La medición de plaquetas grandes por métodos ópticos es más segura, ya que la densidad de éstas permite diferenciarlas de los fragmentos de hematíes y ampliar este umbral sin recurrir a artificios matemáticos para corregirlas. Es posible que estos sistemas lleguen a determinar plaquetas gigantes de más de 80-100 fL.

El parámetro más adecuado para evaluar la anisotropía es el PDW. A pesar de su falta de estandarización, este parámetro es más sensible que el VPM para detectar la presencia de plaquetas grandes regenerativas². En nuestra experiencia el seguimiento del PDW en los pacientes con aplasia posquimioterapia nos ayuda a señalar el inicio de la recuperación de la megacariopoyesis.

Las plaquetas pueden clasificarse en función de su tamaño. Las microplaquetas fueron descritas en el síndrome de Wiskott-Aldrich. Las trombocitopenias con VPM bajo se observan frecuentemente en las aplasias. Por el contrario, las trombocitopenias agudas con VPM alto suelen ser regenerativas. Las macrotrombopenias familiares presentan VPM alto o muy alto que dificulta el recuento PTL y aporta cifras normales o moderadamente bajas que pueden oscilar en función del AH. La evaluación de analíticas previas del paciente y de sus familiares permite

sospechar esta situación. Los pacientes mantienen la masa plaquetaria o plaquetocrito (PCT) y se comportan con normalidad en la mayoría de los casos.

El tamaño plaquetario se relaciona con la calidad de la megacariopoyesis y con las situaciones de destrucción o activación plaquetaria. La definición de estas subpoblaciones y su análisis clínico pueden facilitar el diagnóstico de las trombocitopenias y/o pancitopenias, y ayudar a diferenciar una trombocitosis reactiva de otra clonal. Las plaquetas grandes y la anisotrombia se observan en los síndromes mielodisplásicos (SMD) y en algunos síndromes mieloproliferativos crónicos (SMPC) con independencia de su cifra plaquetaria, y estos hallazgos son relativamente estables. Sin embargo, las situaciones de activación plaquetaria por patología vascular o por extracciones dificultosas y las situaciones inmunes dan medidas de VPM alto más variables o aleatorios, que pueden tener valor en el seguimiento de estos procesos. La presencia de L-PTL o el aumento del VPM se han señalado como factores de riesgo en los pacientes con HTA⁷ y en IAM⁸.

Densidad plaquetaria. Plaquetas hipogranuladas

La tecnología óptica bidimensional desarrollada por los equipos ADVIA 2120 mide el contenido de las plaquetas en función de su capacidad de refractar la luz del láser y detectarla en dos ángulos de dispersión, 2-3° y 5-15°. La masa plaquetaria media MPM en pg y el componente medio plaquetario CMP expresado en g/dL se relacionan con la granularidad y el tamaño de la plaqueta, y disminuyen cuando se provoca la activación y desgranulación plaquetaria. Los valores de CMP inferiores a 21 g/dL se asocian con la presencia de plaquetas activadas. Su descenso se relaciona con el aumento de la expresión de P-selectina, un marcador de activación plaquetario medido por CF, o de su factor soluble en el suero. Estos datos se han observado en situaciones isquémicas donde la activación plaquetaria se considera un factor de riesgo^{3,8,9}. Asimismo, habrá que analizar si hay subpoblaciones hipodensas en SMD o en trombopatías. Otros parámetros relacionados son la desviación estándar de la distribución de la masa plaquetaria (PMDW) y la de su concentración (PCDW). En pacientes con CID, los valores de PCDW > 5,1 g/dL y de PMDW > 0,89 pg se asociaron con una mortalidad 3 veces superior⁹.

Plaquetas reticuladas.

Destrucción y regeneración plaquetaria

Las plaquetas jóvenes o "reticuladas" (PR), con alto contenido en ARN, fueron descritas con tinciones de

azul de metileno hace años y posteriormente contadas por CF con naranja de tiazol, en ambos casos con escasa reproducibilidad. Los equipos XE-2100 de Roche han conseguido la aprobación de la FDA para dar un parámetro que cuenta las PR en el canal de reticulocitos marcándolas con polimetina, una sustancia fluorescente que tiñe el ARN. Mediante un *software* especial, se calcula la fracción de plaquetas con alto contenido en ARN conocida como IPF. Este parámetro ha despertado un gran interés al clasificar las trombocitopenias en hipo o hiperregenerativas y probablemente, al igual que ocurrió con los reticulocitos, se extienda a otros equipos aprovechando otras tinciones¹⁰.

El IPF ha sido propuesto por varios grupos como un parámetro fiable de regeneración medular, tanto en situación de trombocitopenias inmunes como en la salida de aplasia posquimioterapia⁶. El grupo del hospital Dr. Negrín de Las Palmas de Gran Canaria presentó en el Congreso Nacional de 2007 un trabajo en el que estudiaron muestras normales y de trombocitopenia inmune (PTI). Un IPF > 8,6% permitió discriminar las PTI. Otros grupos han presentado también cortes para el IPF del 8-10%. El VPP es mayor cuanto más activo es el proceso, llegando al 100% en la PTI con PLT < 50 × 10⁹/L. Otras situaciones en que pueden verse IPF altos son la PTT, los SMD y algunos SMPC. Por otra parte, en el caso de trombocitopenias con IPF bajo, se debería considerar la realización de un medulograma, ya que podría señalar un origen central.

Plaquetas funcionales.

Hiperactividad/Hiporreactividad

La presencia de agregados plaquetarios, en ciertas condiciones y aunque no trasciende al hemograma, puede ser un dato indirecto de hiperagregabilidad¹¹. En un futuro los equipos podrían analizar situaciones funcionales mediante marcadores monoclonales como el CD62P o las glicoproteínas de membrana. También podrían incorporar técnicas automatizadas funcionales plaquetarias como el tiempo de obturación (PFA-100) u otras ya propuestas para la monitorización de antiagregantes. Por otro lado, estos equipos podrían elaborar versiones más especializadas para el laboratorio de coagulación o las unidades clínicas que deban atender patologías isquémicas agudas o monitorizar los tratamientos antiagregantes. En el mercado existe un equipo que puede dar PTL y el PFA-100. Parece natural incorporar a los AH pruebas funcionales para mejorar las puramente descriptivas y desarrollar equipos completos o versiones más especializadas de éstos.

Análisis automatizado del aspirado de médula ósea

La incorporación de la CF al estudio del aspirado de médula ósea (aMO) creó la necesidad de su análisis en los autoanalizadores hematológicos. Al principio se procesaba una fracción celular obtenida mediante eritrólisis, lavados y resuspensión. El producto se pasaba por un AH para obtener la concentración de células totales nucleadas (CCTN). Posteriormente, Terstappen desarrolló su estudio en muestras completas, a fin de evitar la pérdida de poblaciones celulares¹². Todo ello condujo a incorporar los AH al estudio rutinario del aMO.

El aMO consiste en la obtención de células y de fragmentos de tejido hematopoyético. Se trata de una mezcla de sangre, grasa, células precursoras, estroma y detritus en proporción muy variable. La distribución del tejido hematopoyético, que varía con la edad, puede ser en damero. Por ello se precisa evaluar la calidad del aMO antes de decidir si la muestra es adecuada para la realización de técnicas especiales. El paso del aMO a través de una aguja disgrega los grumos medulares y aumenta la celularidad. La predilución puede mejorar los recuentos y la discriminación del mielograma (RDLm) en muestras muy celulares. El estudio conjunto de la sangre y del aMO en los AH permite comparar algunos parámetros, como la Hb o la cifra absoluta de leucocitos (LEU) y de eritroblastos (NRBC), que ayudarán a conocer la dilución y la CCTN (LEU + NRBC) del aMO.

Con todo, la CCTN del primer aMO sin exceso de dilución se relaciona con el grado de celularidad, hipo o hiperplasia, de la MO¹³. En el caso de muestras escasas, puede ser difícil distinguir entre una mala extracción y una causa medular. La distribución de los gráficos y los resultados en sangre periférica del paciente pueden orientarnos^{14,15}.

Los AH realizan el análisis de elementos inmaduros eritroides y granulocíticos en sangre y disponen de regiones para detectar la presencia de blastos. Además, la grasa muestra curvas características que permitiría cuantificarla (% o #) o estimarla (+/-) ajustando el equipo y evitando que interfiera en la CCTN y el RDLm. Por tanto, los AH pueden calcular la relación mieloeritroide (RME) y de celularidad/grasa que, de acuerdo con la edad y la situación clínica del paciente, nos informen de su reserva medular. Estos ratios deben compararse con la biopsia de MO. En el informe manual del aMO se realiza una descripción general, un recuento de las series hematopoyéticas (RDLm) y el análisis de su maduración, distribución y morfología. Además, se buscan alteraciones extramedulares que pueden afectarla. La mejora tecnológica de los AH permite estudiar alguna de estas características dentro del complejo entramado celular del aMO, aunque siempre de forma incompleta o

inexacta. Por ejemplo, los megacariocitos no pueden ser analizados, pero podremos obtener información sobre su producto, las plaquetas.

El estudio de la serie eritroide nucleada (NRBC) está en sus comienzos. Con la impedancia sólo se podía evaluar el tamaño celular. La sofisticación de las técnicas ópticas y la separación de los núcleos eritroides y su tinción con naranja de tiazol, o yoduro de propidio, ha permitido una mejor cuantificación de los NRBC¹⁶. Estos métodos de fluorescencia nuclear discriminan los NRBC de los eritrocitos y de los linfocitos, y evitan la interferencia de la grasa o de los agregados plaquetarios. El %NRBC del aMO es menor en el AH y en la CF que al microscopio, posiblemente debido al tipo de muestra que estudiamos. El tamaño nuclear, el contenido de ARN y de Hb en los eritroblastos podría medirse en el AH e informar, como en citología, sobre el grado de maduración de los elementos de la serie¹⁰.

El estudio del mielograma requiere separar las poblaciones leucocitarias según su línea celular y grado de diferenciación. Los AH utilizan técnicas combinadas para establecer el RDL. En algunos AH se encuentran canales específicos para el estudio de los granulocitos inmaduros, como el canal IG de Sysmex y regiones para el análisis de blastos. Habrá que diseñar *software*, gráficas y algoritmos apropiados para aplicarlos al aMO y estudiar sus rangos de normalidad en los AH. Por ejemplo Yamamura, en un trabajo realizado con AH Cell Dyn, propone revisar las muestras de aMO con más de un 3% de blastos¹⁶. Sería interesante reconocer algunos elementos del estroma medular como los histiocitos, los mastocitos y las células plasmáticas, separándolas en el RDLm de los linfocitos y de las series hematopoyéticas, ya que su aumento se asocia con patología medular. Por otro lado, habrá que explorar la maduración o la patología de cada serie en los AH; por ejemplo, la expresión de MPO o del CD64 que ya se ha estudiado en la sangre, o la distribución de las poblaciones en los citogramas, a fin de distinguir situaciones reactivas o patológicas. Las técnicas citométricas simplificadas y combinadas con estos avances abrirán la posibilidad de automatizar un mielograma inmune RDLimm en los AH y aportarán una información más exacta y precisa. En todo caso, el análisis del RDL en los AH tendrá que compararse con métodos de CF, ya que el análisis citológico manual utiliza una muestra distinta, menos contaminada, el grumo aplastado, y se realiza en áreas seleccionadas de éste. Sólo los equipos de reconocimiento celular, como el DM96, con digitalización de imagen e inteligencia artificial podrán realizarlos¹⁷. Estas tecnologías podrían asociarse con los sistemas automatizados de extensión y tinción de algunos AH.

Asimismo tendrán que crearse nuevas alarmas ajustadas al estudio de las enfermedades que afecten a la

MO ya que este tipo de muestra se solicita siempre bajo condiciones patológicas. Debido a las características del aMO y al modo de obtenerlo, se plantea el problema de cómo analizar los rangos de normalidad y los umbrales para dichas alarmas en la población general.

Actualmente, un planteamiento más realista sería el análisis de patrones gráficos anómalos que nos permitieran, sobre la base de nuestra experiencia con el AH, orientar la patología o iniciar de forma urgente algún procedimiento¹⁵. Por ejemplo, el análisis morfológico o citoquímico de los blastos en el AH permite orientar o clasificar algunas leucemias¹⁴. La leucemia promielocítica es el paradigma de esta afirmación. Los equipos con peroxidasa dan un patrón prácticamente diagnóstico de esta grave enfermedad en la que una rápida actuación puede ser clave para el paciente. También los patrones de ciertos síndromes linfoproliferativos, o del mieloma podrían orientar el estudio en patologías no sospechadas por el petionario. Al disponer de la muestra de aMO en EDTA podremos solicitar pruebas especiales, como la biología molecular, y reorientar el estudio de CF, sin necesidad de realizar un segundo aMO.

¿Dónde estamos en el estudio automatizado del aspirado medular?

El estudio del aMO por los AH forma parte de nuestra rutina y debemos aprender a extraer más información de estos equipos. Se ha comunicado algún estudio del aMO con AH¹⁵⁻¹⁹. Además, algunos AH incorporan *software* para análisis de líquidos biológicos que podrían ayudar en el estudio del aMO. Los equipos de Sysmex han desarrollado un *software* específico aprovechando los canales de IG y NRBC, informando de la RME y de las ratios mieloide/CCTN y eritroide/CCTN¹⁹. Los AH ADVIA de Siemens, pioneros en el análisis de MPO, HCM directa y del LCR, están desarrollando *software* que permita analizar mejor las poblaciones eritroides y el aspirado medular²⁰. La línea ABX de Horiba comunicó en el Congreso Nacional de 2006 sus estudios con naranja de tiazol con la misma finalidad. El análisis de los parámetros de investigación VCS de Coulter y de sus gráficos puede orientarnos¹⁵. Por último, la empresa Abbott, pionera en el análisis de la RME, comunicó ya en 2002 la utilidad del equipo CD4000 en este tipo de muestra y podrían desarrollar alguna técnica específica con AcMO que mejorase el RDLm en sus equipos¹⁶.

Consideraciones finales

Actualmente se ha resuelto el problema de la cuantificación de las plaquetas con los AH al estar dis-

ponible la determinación de PTLimm para los casos necesarios. Se ha mejorado en la detección de muestras artefactadas y ha disminuido la interferencia que provocaban en su recuento otros elementos como los hematíes. No obstante, con los nuevos parámetros estaremos obligados a monitorizar las condiciones de extracción y procesado de la muestra, si queremos estudiar con garantía alguna de las aplicaciones que las nuevas subpoblaciones plaquetarias nos ofrecen.

En cuanto al estudio de las trombocitopenias, tanto el VPM y PDW como las L-PTL, y en especial el IPF, pueden orientar hacia su origen y ayudar en su diagnóstico y tratamiento. Es de esperar que estos datos permitan establecer diferenciales plaquetarios que enriquezcan el estudio de la patología hematólogica y de la medicina interna. El número de parámetros que se informa en el hemograma aumentará cuando se establezca la reproducibilidad y utilidad clínica de éstos.

Respecto al estudio del aMO, diremos que los nuevos AH orientarán sobre la situación medular del paciente y ayudarán a organizar el estudio de las pruebas especiales. Como hematólogos, debemos incorporar las herramientas que propicien el diagnóstico rápido de la situación hematopoyética del paciente.

Existe un bagaje suficiente para afrontar estos retos y obtener una información muy útil de una forma simple, rápida y reproducible en los laboratorios hematólogicos. Podemos apoyarnos en los AH como si de “microscopios multiparamétricos” se tratara, para avanzar en el estudio de la hematología. Es nuestra obligación exigir su mejora tecnológica, la de sus resultados y su adaptación a las nuevas aplicaciones. El especialista en citología debe interpretar los datos del AH, tanto en sangre como en médula ósea y quizás en otros fluidos. El estudio conjunto microscópico, citométrico, anatomopatológico y biológico de las muestras debe favorecer el desarrollo de estas nuevas aplicaciones a fin de realizar un mejor diagnóstico, más rápido y eficiente, en los pacientes que atendemos.

Bibliografía

1. Small BM, Bettigole RE. Diagnosis of myeloproliferative disease by analysis of the platelet volume distribution. *Am J Clin Pathol* 1981; 76 (5): 685-91.
2. Kaito K, Otsubo H, Usui N, Yoshida M, Tanno J, Kurihara E, et al. Platelet size deviation width, platelet large cell ratio, and mean platelet volume have sufficient sensitivity and specificity in the diagnosis of immune thrombocytopenia. *Br J Haematol* 2005; 128 (5): 698-702.
3. Harris N, Jou JM, Devoto G, Lotz J, Pappas J, Wranovics D, et al. Performance evaluation of the ADVIA 2120 hematology analyzer: an international multicenter clinical trial. *Lab Hematol* 2005; 11 (1): 62-70.

4. Johannessen B, Roemer B, Flatmoen L, Just T, Aarsand AK, Scott CS. Implementation of monoclonal antibody fluorescence on the Abbott CELL-DYN Sapphire haematology analyzer: evaluation of lymphoid, myeloid and platelet markers. *Clin Lab Haematol* 2006; 28 (2): 84-96.
5. Greeno E, McCullough J, Weisdorf D. Platelet utilization and the transfusion trigger: a prospective analysis. *Transfusion* 2007; 47 (2): 201-5.
6. Briggs C, Hart D, Kunka S, Oguni S, Machin SJ. Immature platelet fraction measurement: a future guide to platelet transfusion requirement after haematopoietic stem cell transplantation. *Transfus Med* 2006; 16 (2): 101-9.
7. Nadar SK, Blann AD, Kamath S, Beevers DG, Lip GY. Platelet indexes in relation to target organ damage in high-risk hypertensive patients: a substudy of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial (ASCOT). *J Am Coll Cardiol* 2004; 44 (2): 415-22.
8. Khandekar MM, Khurana AS, Deshmukh SD, Kakrani AL, Katdare AD, Inamdar AK. Platelet volume indices in patients with coronary artery disease and acute myocardial infarction: an Indian scenario. *J Clin Pathol* 2006; 59 (2): 146-9.
9. Kim HK, Kim JE, Ham CK, Lee DS, Park S, Cho HI. Prognostic value of platelet indices as determined by ADVIA 120 in patients suspected of having disseminated intravascular coagulation. *Int J Lab Hematol* 2008; 30 (2): 117-23.
10. Nagai Y, Kondo H, Yamamoto S, Tatsumi N. Determination of red cells, nucleic acid-containing cells and platelets (RNP Determination) by a crossover analysis of emission DNA/RNA light. *Int J Lab Hematol* 2008; 30 (Supl 1): 74.
11. Shimizu M, Yamamoto M, Miyachi H, Shinohara Y, Ando Y. Simple, rapid, and automated method for detection of hyperaggregability of platelets using a hematology analyzer. *Am J Hematol* 2003; 72 (4): 282-3.
12. Terstappen LW, Levin J. Bone marrow cell differential counts obtained by multidimensional flow cytometry. *Blood Cells* 1992; 18 (2): 311-30; discussion 331-2.
13. Kim M, Kim J, Lim J, Kim Y, Han K, Kang CS. Use of an automated hematology analyzer and flow cytometry to assess bone marrow cellularity and differential cell count. *Ann Clin Lab Sci* 2004; 34 (3): 307-13.
14. Gibbs GJ. Peroxidase activity and nuclear density analysis (PANDA) in the diagnosis of haematological malignancy. *Br J Biomed Sci* 2005; 62 (3): 142-4.
15. Zini G, Garzia M, Di Mario A, Rossi E, D'Onofrio G. Automated Bone Marrow Fluid (BMF) analysis using the coulter LH 750 hematology analyser. *Lab Hematol* 2004; 10 (4): 221-51.
16. Yamamura R, Yamane T, Hino M, Ohta K, Shibata H, Tsuda I, et al. Possible automatic cell classification of bone marrow aspirate using the CELL-DYN 4000 automatic blood cell analyzer. *J Clin Lab Anal* 2002; 16 (2): 86-90.
17. Liu B, Yin C, Liu Z, Zhang Y. Automatic segmentation on cell image fusing gray and gradient information. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2007: 5624-7.
18. Sakamoto C, Yamane T, Ohta K, Hino M, Tsuda I, Tatsumi N. Automated enumeration of cellular composition in bone marrow aspirate with the CELL-DYN 4000 automated hematology analyzer. *Acta Haematol* 1999; 101 (3): 130-4.
19. Mori Y, Mizukami T, Hamaguchi Y, Tsuruda K, Yamada Y, Kamihira S. Automation of bone marrow aspirate examination using the XE-2100 automated hematology analyzer. *Cytometry B Clin Cytom* 2004; 58 (1): 25-31.
20. Kratz A, Maloum K, O'Malley C, Zini G, Rocco V, Zelmannovic D, et al. Enumeration of nucleated red blood cells with the ADVIA 2120 Hematology System: an International Multicenter Clinical Trial. *Lab Hematol* 2006; 12 (2): 63-70.

La última hora terapéutica

COORDINADORES: E. ROCHA. *Pamplona*
J. CORRAL. *Murcia*

Resumen del simposio

En el congreso conjunto de la AEHH y la SETH, que se celebra este año de 2008, hemos tenido el honor de presidir el Comité Científico. Este Comité, ya en su primera reunión, decidió introducir una serie de modificaciones en la estructura del congreso con respecto a los congresos anteriores, la principal de las cuales fue la reducción del número de ponentes de los simposios, lo que nos ha permitido incluir en los mismos dos comunicaciones orales, de manera que se ha dado la oportunidad a todos los congresistas de participar en los simposios oficiales del congreso en función de la calidad de sus aportaciones al mismo. Otra innovación importante ha sido la de preparar el programa con la suficiente antelación como para poder presentarlo, totalmente terminado y cerrado, con un año de antelación en el congreso del año 2007. Con estas innovaciones, y algunas otras, hemos tratado de hacer el congreso más participativo, más dinámico, más formativo y más atractivo.

Sin embargo, en cuanto a la antelación en la presentación del programa definitivo, con el paso del tiempo fuimos conscientes de que podía implicar una limitación relevante, por otra parte, común a la mayoría de los congresos, pese a que el cierre del programa se haga con menos tiempo de antelación. Esta limitación consistía en que el disponer del programa con más de un año de antelación, pese a sus ventajas indudables, llevaba consigo el inconveniente de impedir ocuparse de temas de muy reciente actualidad. Este aspecto nos pareció que era especialmente relevante en el caso de las innovaciones terapéuticas, dado el vertiginoso avance en el potencial farmacológico que, con mucha frecuencia, se produce en nuestras especialidades. Por este motivo, no es habitual que se analicen en nuestro congreso con detalle los nuevos fármacos que acaban de aprobarse o que presumiblemente se aprobarán en un futuro próximo. Ello lleva consigo que se desaproveche la oportunidad de una reunión de los miembros de nuestras sociedades para discutir, de la forma más objetiva posible, las potencialidades y limitaciones de los avances terapéuticos que estarán disponibles en los próximos meses. Por esta razón, y siguiendo el modelo de otros congresos internacionales, una vez presentado el programa preliminar en Pamplona en 2007, el Comité Científico del Congreso de Murcia aprobó con ilusión la inclusión de un nuevo simposio titulado "La última hora terapéutica". Este simposio contiene varias peculiaridades, aparte del hecho de haber sido diseñado sólo unos meses antes de su realización para conseguir la mayor actualidad posible en los temas a tratar.

Como ya hemos dicho, se han seleccionado los avances terapéuticos que acaban de ser implantados en nuestro país o lo serán en los próximos meses, tras la realización de ensayos clínicos en fases II-III y su aprobación por agencias controladoras europeas o americanas, y que pueden suponer un avance significativo en el tratamiento de importantes patologías hematológicas, o trastornos hemorrágicos o trombóticos.

El simposio es además más amplio en cuanto al número de ponencias –aunque más breve en cuanto a su duración– que el resto de simposios oficiales, para poder abarcar el máximo número de avances, lo que implica un importante esfuerzo por parte de los ponentes a la hora de sintetizar en 12 minutos lo más relevante de cada tratamiento. En un intento de dotar a este simposio de la máxima trascendencia, hemos solicitado a quienes –en nuestra opinión– son grandes especialistas en la materia que ejerzan como responsables de dichas sesiones. Además, les hemos pedido que realicen el esfuerzo de sintetizar los ensayos clínicos más relevantes de cada uno de los fármacos que serán objeto de estudio en cada ponencia y, al mismo tiempo, que analicen los resultados de los mismos con una actitud crítica. De esta manera, los congresistas podrán obtener una idea real de las posibilidades que dichos fármacos pueden ofrecer en la mejora terapéutica de determinados procesos, así como de sus posibles limitaciones.

Agradecemos profundamente la generosidad de los ponentes del simposio, quienes, además de aceptar la invitación con entusiasmo y de manera inmediata, han realizado el gran esfuerzo de preparar, con escaso margen de tiempo, los resúmenes de sus ponencias, y tendrán que resumir lo más destacado y práctico de estos tratamientos en sus presentaciones.

Por último, pensamos que este simposio era una buena ocasión para tratar, de manera conjunta, aspectos que afectan a ambas sociedades y, por ello, los fármacos elegidos, todos ellos de muy reciente aparición o a punto de aparecer, se han seleccionado tratando de abarcar diferentes ámbitos de nuestras especialidades.

En primer lugar, el Prof. Vicente (Murcia) presentará los resultados obtenidos en un proceso hemorrágico de origen inmune (la púrpura trombocitopénica idiopática) con los nuevos peptidomiméticos de la trombopoyetina. El tratamiento de esta enfermedad es muchas veces difícil por su resistencia a los distintos fármacos utilizados y quizá estos nuevos productos puedan aportar una nueva visión del manejo de estos pacientes.

A continuación, y siguiendo en el ámbito de la hemostasia, el Prof. Monreal (Badalona, Barcelona) analizará el papel que pueden tener en el tratamiento antitrombótico, sobre todo en la enfermedad tromboembólica venosa, los nuevos inhibidores orales del FXa y FIIa. En el momento presente existe una gran expectación por la mejora que el uso de estos fármacos puede implicar en el tratamiento tanto de la trombosis venosa (en los ensayos ya finalizados) como de la arterial (en los que se están realizando en la actualidad).

Posteriormente, el Prof. Urbano (Sevilla) se ocupará de analizar los resultados que se han obtenido con el uso de eculizumab en una enfermedad para la que hasta ahora disponíamos de un escaso arsenal terapéutico, como es la hemoglobinuria paroxística nocturna, enfermedad que, por otra parte, se podría considerar el paradigma de un proceso hematológico con implicaciones de todas las áreas de nuestra especialidad.

En cuarto lugar, el Dr. Alegre (Madrid) revisará el papel que puede jugar el AMD 3100, un nuevo agente movilizador de progenitores hematopoyéticos, en la obtención de dichas células. Todos sabemos sobradamente las dificultades que encontramos con determinados pacientes para obtener material suficiente para poder realizar un trasplante; de aquí la gran importancia que puede tener este fármaco.

El simposio finalizará con la participación del Prof. San Miguel (Salamanca), que expondrá, de una forma más genérica, el proceso de obtención de nuevos fármacos en oncología, contemplando su desarrollo desde el laboratorio a su uso en la clínica. Éste es un campo apasionante en el que se están produciendo grandes avances y en el que se trata de conseguir fármacos capaces de actuar sobre dianas moleculares, con las ventajas que esto implica en cuanto a mayor eficacia y menor toxicidad.

Animamos a los miembros de nuestras sociedades a que revisen previamente los manuscritos de cada ponencia para conseguir sacar el mayor provecho de la asistencia al simposio. Pedimos, especialmente, que los socios retrasen unas horas la finalización del congreso y acudan a este simposio, que intentará ser lo más participativo y práctico posible.

Finalmente, dado que el programa estaba cerrado, ha sido difícil buscar el momento adecuado para el desarrollo de este simposio. Ha quedado relegado a, quizás, el peor momento del congreso, la última hora del sábado por la tarde; pero nuestra idea es que puede ser un broche digno e interesante para finalizar el congreso. Somos conscientes del riesgo de esta decisión, pero a la vez estamos convencidos de que el atractivo del simposio, la excelencia de los ponentes, y el aspecto más práctico del mismo, conseguirán una afluencia masiva al mismo. Éste es un simposio que nace con ánimo de perdurar, pero del éxito de este experimento en su primer año dependerá en gran medida que esta iniciativa se consolide en futuros congresos.

ANÁLOGOS DE LA TROMBOPOYETINA EN PÚRPURA TROMBOCITOPÉNICA INMUNE

V. VICENTE, V. PÉREZ-ANDREU,
J. RIVERA, M.L. LOZANO

*Servicio de Hematología y Oncología Médica.
Hospital Universitario Morales Meseguer.
Centro Regional de Hemodonación. Murcia.*

El cuadro clínico de la púrpura trombocitopénica idiopática (PTI) es conocido desde hace mucho tiempo. En un intento de aclarar su patogenia, en 1950 se realizó un experimento que posiblemente constituye uno de los más brillantes realizados en la historia de la hematología. Los hematólogos W.J. Harrington y J.W. Hollinsworth, del Barnes Hospital de San Luis (Estados Unidos), comprobaron la aparición de una intensa trombocitopenia que tardaba en desaparecer cinco días al infundirse uno de ellos una unidad de sangre de una paciente diagnosticada de PTI. La confirmación del fenómeno se realizó cuando diferentes compañeros del mismo servicio de hematología recibieron plasma de otro paciente afecto de PTI y reprodujeron la observación previa¹. Estos hallazgos condicionaron el cambio del término *idiopática* por el de *inmune*, debiendo realmente considerar este término como *autoinmune*. De esta forma la PTI quedó definida durante muchos años como aquella entidad donde existe una trombocitopenia que es producto de una destrucción de plaquetas por autoanticuerpos, si bien la causa que motiva la aparición de los anticuerpos continúa siendo desconocida².

La idea de enfermedad autoinmune ha sostenido la base racional para plantear la terapia en la PTI, que ha sido precisamente limitar o abolir el mecanismo inmune responsable de la trombocitopenia. Ello justifica que la terapia fundamental de los pacientes con PTI se realice con esteroides, esplenectomía, inmunosupresores y moduladores de la respuesta inmunitaria³.

Es cierto que durante estos más de cincuenta años la experiencia adquirida con el tratamiento de la PTI es un poco desconcertante, pues el curso de la enfermedad es muy irregular y caprichoso, con oscilaciones notables en la cifra de plaquetas e incluso con remisiones espontáneas. Las hemorragias severas, aunque en ocasiones pueden aparecer y ocasionar la muerte, no son frecuentes, y en muchas ocasiones el miedo de someter a los pacientes a un potencial riesgo hemorrágico difícilmente predecible ha motivado un uso posiblemente excesivo e inadecuado de medidas terapéuticas que no están exentas de ocasionar iatrogenia, como es la aparición de osteoporosis y diabetes, desencadenadas por la toma prolongada de esteroides, o las infecciones ligadas a una esplenectomía o a la in-

dicación de inmunomoduladores. La frecuencia de estas complicaciones es similar al riesgo que se pretende evitar, el de una severa hemorragia severa potencialmente vital.

Todo ello justifica que el tratamiento de la PTI exige que la persona que vaya a realizarlo disponga de varios requisitos importantes, como es, por un lado, experiencia personal en el tratamiento de esta enfermedad y, por otro, tener bien claro que el objetivo del tratamiento es impedir o yugular las complicaciones hemorrágicas, hecho que en numerosas ocasiones no coincide con el que se persigue, que es el de corregir exclusivamente, sea como sea, la trombocitopenia. Es importante tener presente que la frecuencia de muertes relacionadas con el tratamiento utilizado en la PTI es similar a la de muertes por hemorragia, y en numerosas ocasiones el tratamiento podría haber sido injustificado³.

La gran heterogeneidad clínica de la PTI se ve acompañada de falta de puntos de referencia claros y nítidos para valorar con detalle la respuesta terapéutica. Seguimos sin contar con un claro consenso de conceptos imprescindibles para valorar la gravedad de la PTI y su respuesta terapéutica, como es el recuento plaquetario que define la enfermedad, referencias estables para establecer grados de severidad, elementos que permitan concluir de forma inequívoca que nos encontramos ante una PTI crónica, criterios para sentar el inicio o el cambio de tratamiento, definición de la respuesta terapéutica o el concepto de refractariedad, entre otros. En definitiva, en la PTI se mantiene una terminología confusa que dificulta la toma de decisiones terapéuticas y el establecimiento de criterios pronósticos precisos⁴.

Recientemente han surgido numerosos datos que muestran que el aclaramiento de plaquetas recubiertas por anticuerpos no es el único mecanismo responsable de la PTI. Se ha comprobado que muchos de estos enfermos tienen una megacariocitopoyesis inadecuada, con baja producción de plaquetas⁵, apoptosis incrementada de megacariocitos⁶ y niveles plasmáticos de trombopoyetina (TPO) –curiosamente– no elevados⁷. Estas observaciones abrieron hace algunos años la posibilidad de explorar nuevas vías terapéuticas para la PTI; en concreto, se planteó aumentar la síntesis de plaquetas.

Primera generación de factores trombopoyéticos

En 1994, tras la purificación y clonación de la TPO humana, se consiguieron dos moléculas recombinantes: la conocida como trombopoyetina recombinante humana (rhTPO) y el factor de crecimiento recombinante pegilado de los megacariocitos (PEG-rHuMGDF)^{8,9}.

A partir de ese momento las expectativas de aplicación terapéutica de estos nuevos factores de crecimiento fue muy importante, iniciándose ensayos clínicos donde se pretendía regularizar el recuento plaquetario. Los datos generales observados fueron muy buenos, pero en 1998 hubo que suspender radicalmente la utilización de ambos productos al comprobarse que 13 individuos, de un total de 538 sujetos sanos a los que se les estaba administrando PEG-rHuMGDF, desarrollaron intensas trombocitopenias debidas a la aparición de un anticuerpo contra el factor de crecimiento trombopoyético y que a su vez interaccionaba con la trombopoyetina endógena. Dicha experiencia fue documentada en una época en la que se estaban alcanzando resultados de gran interés con las trombopoyetinas recombinantes (Tabla 1)⁹.

Segunda generación de factores trombopoyéticos. Características y mecanismos de acción

Los buenos resultados conseguidos con la rhTPO y PEG-rHuMGDF como estimuladores de la trombopoyesis empujaron a buscar sustancias que ejercieran una acción similar a la TPO evitando sus efectos inmunológicos indeseables. En estos últimos años han aparecido dos nuevos productos con características fisicoquímicas y aspectos funcionales distintos, con capacidad de estimular la trombopoyesis, que indudablemente vuelven abrir la puerta cerrada pocos años atrás (Tabla 1).

En la búsqueda de los nuevos preparados se han seguido diferentes estrategias, que se pueden agrupar en tres bloques: 1) péptido-miméticos de la TPO; 2) agentes no péptido miméticos; y 3) anticuerpos agonistas del receptor de la TPO. Hay un buen número de estudios en marcha con diferentes sustancias,

pero en estas páginas nos centraremos exclusivamente en los dos que parece estar más próximos a su uso clínico, como es el caso del romiplostin (AMGEN) y del eltrombopag (GSK). La Tabla 1 resume las características más importantes de estos dos productos y las compara con las de los agentes trombopoyéticos de primera generación.

Péptido-miméticos de la TPO

Siguiendo una aproximación habitual para la búsqueda de nuevos factores de crecimiento, se examinaron librerías de péptidos con diferentes secuencias con capacidad de estimular líneas celulares dependientes de TPO. Dichos péptidos no debían tener homología en su secuencia con la TPO. De esta forma se han conseguido diferentes secuencias de péptido-miméticos de TPO capaces de estimular de forma relevante una línea celular sensible a rhTPO.

El **romiplostin** (AMG 531) está formado por dos secuencias peptídicas idénticas, que no guardan homología alguna en su secuencia a la TPO, unidas a dos fragmentos Fc de IgG1, lo que prolonga notablemente su vida media en la circulación^{10,11}. Estudios *in vitro* demostraron que romiplostin se une al receptor de la TPO compitiendo con el rhTPO. Su unión, al igual que ocurre con la molécula recombinante, induce el crecimiento y maduración de los megacariocitos vía JAK2, STAT5, P38 MAPK y AKT^{12, 15}. Estudios experimentales también demostraron que una sola dosis, independientemente de su administración por vía intravenosa o subcutánea, es capaz de producir un aumento de plaquetas que se inicia al quinto día de la inyección, alcanzando el máximo pico de los 7 a los 9 días. La vida media de romiplostin oscila entre 110 y 160 horas.

En los últimos años se han realizado diferentes estudios en fase 1 y 2 de romiplostin, habiéndose

Tabla 1. Características de los factores trombopoyéticos

Trombopoyetinas recombinantes	Vida media (horas)	Respuesta a dosis única	Inicio de respuesta (días)	Máxima respuesta (días)	Vía de administración	Desarrollo de anti-TPO
PRIMERA GENERACIÓN						
· rhTPO	30-40	Sí	5	10-14	i.v.	No
· PEG-rHuMDGF	25-30	Sí	5	10-14	s.c.	Sí
SEGUNDA GENERACIÓN						
TPO péptido-miméticos						
· Romiplastin (Amgen)	110-160	Sí	5	12-15	s.c	No
TPO no péptido-mimético						
· Eltrombopag (GSK)	—*	No*	7	16	Oral	No

* No hay respuesta a una única dosis; debe mantenerse dosis diaria.

PEG-rHuMGDF: factor de crecimiento recombinante pegilado de los megacariocitos; rhTPO: trombopoyetina recombinante humana; TPO: trombopoyetina.

comprobado una respuesta dosis-dependiente y la ausencia de reacciones adversas severas^{10,11,15}. Más adelante comentamos los datos obtenidos en pacientes con PTI.

No péptido-miméticos de la trombopoyetina

Otro camino seguido para buscar un nuevo factor estimulante de la trombopoyesis ha sido buscar moléculas no polipeptídicas que tuviesen la propiedad de estimular genes implicados en la activación de la trombopoyesis dependiente de TPO, como pueden ser sustancias con capacidad de iniciar la vía STAT. Investigaciones en este campo han encontrado un considerable número de sustancias no peptídicas con actividad mimética a la TPO.

Dos de estas sustancias, eltrombopag y AK-501, pueden ser administradas por vía oral y están siendo estudiadas por su capacidad de estimular la trombopoyesis. Ya disponemos de resultados clínicos, especialmente con eltrombopag, de ahí que nos detengamos específicamente en este nuevo fármaco.

El **eltrombopag** (SB497115) es una molécula pequeña (hidrazona) cuyo peso molecular es de 546 D¹³. Al igual que los otros no péptido-miméticos de la trombopoyetina, eltrombopag es altamente específico de especie; la activación del receptor de la TPO la realiza de forma diferente a la rhTPO y a los péptido-miméticos, incluido romiplostin, y ejerce un efecto aditivo al propio efecto estimulador de la TPO^{10,14}.

El modo de acción que se ha sugerido para eltrombopag se basa en su unión al receptor de la TPO en un dominio transmembrana, no al dominio de unión a rhTPO, causando dimerización del receptor y dando lugar a un mecanismo inmediato de transmisión de señal. Ello justifica que el efecto observado en estudios *in vitro* en líneas celulares sea independiente al de la TPO y tenga un efecto aditivo. Las vías de señalización y estimulación celular también parecen estar relacionadas con JAK2, STAT, P38 MAPK, pero no por activación de la vía AKT^{13, 15}.

Eltrombopag se administra por vía oral, siendo necesaria solamente una toma diaria, y la correcta absorción del fármaco exige estar en ayunas, teniendo presente que la ingesta de otros fármacos puede modificar su absorción. Para verificar su efecto, se necesita mantener la dosis diaria durante cinco días; al séptimo día se puede registrar un aumento del recuento plaquetario, mientras que la máxima respuesta se alcanza, aproximadamente, a los dieciséis días del inicio del tratamiento (Tabla 1)^{10,15}.

Algunos datos obtenidos recientemente muestran que eltrombopag aumenta los niveles de plaquetas en sujetos sanos, sin que en contrapartida presente efectos adversos llamativos¹⁶.

Segunda generación de factores trombopoyéticos: efecto en pacientes con PTI

Aunque hay datos de la utilización de los nuevos agentes análogos de la trombopoyetina en diferentes situaciones donde es necesario aumentar el recuento plaquetario, nos centraremos específicamente en la experiencia alcanzada en pacientes con PTI.

Romiplostin (AMG 531): hay datos provenientes de estudios en fase 1 y 2 que demuestran aumentos significativos del recuento de plaquetas en pacientes con PTI, en ausencia de efectos adversos relevantes^{17,18}. El requerimiento para la inclusión de estos pacientes en el estudio era que presentaran recuentos plaquetarios inferiores a 30.000/ μ L, pudiendo los pacientes mantener la dosis de esteroides inalterada prescrita al inicio del estudio. Se consideró respuesta si el recuento plaquetario superaba las 50.000 plaquetas/ μ L o duplicaba el recuento plaquetario inicial. En estos estudios se incluyeron pacientes que habían sido refractarios a la esplenectomía. Se comprobó que una inyección subcutánea semanal de romiplostin a una dosis no inferior a 1 μ g/kg era eficaz para alcanzar el objetivo perseguido. El fármaco fue bien tolerado, siendo solamente una cefalea leve el efecto adverso más llamativo. No se detectaron anticuerpos anti-TPO^{17,18}.

Hace unos meses se publicaron los datos conseguidos con el tratamiento de romiplostin a largo plazo, 22 semanas, de pacientes con PTI refractarios a diferentes esquemas terapéuticos¹⁹. Ante la posibilidad de que existiese diferente comportamiento entre pacientes esplenectomizados o no, se realizaron dos grupos, de 42 y 41 pacientes respectivamente. Si bien la estratificación de pacientes y el análisis de respuestas pueden ser complicados en la PTI, este estudio muestra una respuesta duradera –38%– en los pacientes esplenectomizados (ninguna respuesta en el grupo placebo, 21 pacientes), y del 56% en los pacientes que no habían sido sometidos a una intervención quirúrgica (una respuesta en 21 pacientes del grupo placebo). Si se consideraba una respuesta global (duradera o transitoria), en el grupo de no esplenectomizados fue del 88% (36/41), y del 79% en esplenectomizados (33/42). El 87% de los pacientes que recibieron romiplostin redujeron o interrumpieron la terapia que estaban tomando para la PTI, comparado con el 38% de pacientes en el grupo control (6/16). Las complicaciones hemorrágicas disminuyeron en el grupo tratado con el péptido-mimético. Las reacciones adversas fueron similares en el grupo de romiplostin y placebo. La Tabla 2 resume los datos de efectos adversos. No se detectaron anticuerpos contra romiplostin o TPO.

Se han comunicado dos efectos adversos severos diferentes coincidiendo con el uso de romiplostin. En dos pacientes se detectó incremento de reticulina en médula ósea, que mejoró al suspender el fármaco.

Tabla 2. Efectos adversos frecuentes referidos en ensayos clínicos recientes con romiplostin¹⁹ y eltrombopag²¹

	Estudio de romiplostin		Estudio de eltrombopag	
	Placebo (n = 41)	Romiplostin (n = 84)	Placebo (n = 29)	Eltrombopag (75 mg/día) (n = 28)
Cefalea	13 (22%)	29 (35%)	6 (21%)	6 (21%)
Astenia	12 (29%)	28 (33%)	5 (17%)	2 (7%)
Artralgia	8 (20%)	22(26%)	3 (10%)	–
Diarrea	6 (15%)	14 (17%)	2 (7%)	1 (4%)
Exantema	N.R.	N.R.	1 (3%)	2 (7%)
Insomnio	3 (7%)	13 (16%)	N.R.	N.R.
Mialgia	1 (2%)	12 (14%)	N.R.	N.R.
Náuseas	4 (10%)	11 (13%)	N.R.	N.R.
Ansiedad	5 (12%)	9 (11%)	N.R.	N.R.
Dolor/Distensión abdominal	0 (0%)	9 (11%)	2 (7%)	0 (0%)

N.R.: no referido en este estudio.

Dicho hallazgo podría estar relacionado con un aumento en la síntesis y en la liberación por parte de los megacariocitos del factor de crecimiento β . Por otra parte, dos pacientes añosos, con historia previa de enfermedad vascular, experimentaron un evento tromboembólico arterial asociado al aumento del recuento plaquetario secundario al consumo del fármaco. Realmente existe una duda razonable de vincular estos eventos al tratamiento, teniendo en cuenta que romiplostin parece que no es capaz de inducir activación plaquetaria^{10,11}.

Actualmente se está realizando un nuevo estudio longitudinal en 137 pacientes que habían participado en ensayos previos, con el objetivo de determinar la seguridad a largo plazo de romiplostin, incluyendo la aparición de reticulina en médula ósea, tiempo de duración de la respuesta de plaquetas y proporción de pacientes que reducen o abandonan, por innecesaria, la terapia de la PTI. Los resultados definitivos estarán disponibles en pocos meses.

Eltrombopag (SB497115): este fármaco corresponde a un no péptido-mimético análogo de la trombopoyetina. A diferencia del romiplostin, su administración se efectúa por vía oral y diaria. Tras haberse

estudiado en dosis de 30 mg, 50 mg y 75 mg durante seis semanas, demostró su capacidad dosis-dependiente para aumentar el recuento plaquetario en pacientes con PTI²⁰.

En un reciente estudio en fase II (TRA 100773) se ha investigado el efecto de las tres dosis anteriores en pacientes con PTI con recuentos celulares inferiores a 30.000 plaquetas/ μ L²¹. Todos los pacientes eran refractarios por lo menos a una línea de tratamiento. El objetivo primario era verificar un recuento de plaquetas superior a 50.000/ μ L en el día 43 desde el inicio del tratamiento. Si la respuesta plaquetaria excedía las 200.000 plaquetas/ μ L, se interrumpía el tratamiento para impedir el riesgo de trombosis. El estudio verificó una mayor repuesta plaquetaria vinculada a la dosis del fármaco, y el objetivo planteado fue alcanzado por el 28%, 70% y 81% de los pacientes que integraban cada uno de los grupos a los que se administró 30 mg, 50 mg y 75 mg de eltrombopag, respectivamente. El 37% de los pacientes que tomaban una dosis de 50 mg alcanzaron un recuento plaquetario superior a 200.000/ μ L, hecho que de forma más precoz sucedió en el 50% de los que tomaban la dosis de 75 mg. Como muestra la Tabla 3, el recuento de plaquetas encontrado en el día 43 también estuvo relacionado con la dosis del fármaco. La máxima respuesta se observó en el día 15 en el 80% de los pacientes que recibieron 50 mg y 75 mg de eltrombopag. La incidencia de hemorragias también fue inferior en estos dos grupos respecto al grupo placebo. La respuesta al tratamiento por parte de los pacientes esplenectomizados fue similar a la de los no esplenectomizados²¹.

La incidencia y severidad de efectos adversos fue similar entre los tres grupos que recibieron eltrombopag así como el grupo placebo. La cefalea, como sucedió con romiplostin, fue la complicación más frecuente. En cuanto a reacciones adversas severas coincidentes con la toma de eltrombopag, hay que señalar a una paciente que sufrió cataratas en el día 181 después de terminar el tratamiento. En estudios con roedores también se había observado esta complicación, aunque a dosis más elevadas. La paciente en la que se detectaron las cataratas era fumadora y consumidora crónica de esteroides. El efecto adverso no quedó asociado por el investigador del estudio a la toma

Tabla 3. Respuesta plaquetaria a eltrombopag en pacientes con PTI²¹

Dosis (v.o./día)	Eltrombopag			Placebo
	30 mg	50 mg	75 mg	
Pacientes (n.º) (Análisis de eficacia)	29	27	26	27
Pacientes con recuento de plaquetas > 50.000/ μ L	28%	70%	81%	11%
Pacientes (Completaron tratamiento)	22	23	17	12
Día 43 (Recuento de plaquetas/ μ L)	26.000	126.000	183.000	16.000

Tabla 4. Efectos adversos potenciales a largo plazo de los nuevos agentes trombopoyéticos

Derivados del aumento excesivo de plaquetas y de su posible activación

Aumento de riesgo de oclusión vascular especialmente en pacientes con enfermedad cardiovascular activa. *Riesgo teórico, ausencia de datos*

Estimulación de progenitores hematopoyéticos en pacientes con hemopatías malignas

Riesgo de reactivación de la hemopatía (leucemia aguda, SMD, etc). *Riesgo teórico, ausencia de datos*

Aumento de fibrosis en médula ósea

Dos observaciones aisladas con Romiplostin. *Actualmente, estudio longitudinal en marcha*

del fármaco. La toma del análogo de la trombopoyetina no péptido-mimético no parece modificar los niveles plasmáticos de TPO²¹. Está actualmente en marcha el estudio *EXTEND* para valorar la seguridad y eficacia a largo plazo del tratamiento crónico con eltrombopag en PTI (fecha estimada de finalización, en el año 2010). Actualmente está vigente un programa de uso compasivo de eltrombopag para pacientes adultos con PTI crónica. Deben tener un recuento plaquetario inferior a 30.000 plaquetas/ μ L, ser refractarios a un tratamiento de primera línea con corticoides o inmunoglobulina intravenosa, o ser pacientes previamente tratados en recaída.

Recientemente, también han aparecido datos que muestran la eficacia de eltrombopag al aumentar el recuento de plaquetas en pacientes con trombocitopenia asociada a hepatitis C, lo que facilita el inicio de tratamiento con terapia antiviral²².

Conclusiones

Los datos mostrados de los nuevos agentes análogos de la trombopoyetina de segunda generación son de gran interés, y pueden ser una herramienta terapéutica muy útil para aquellos casos específicos de PTI con enfermedad refractaria y tendencia al sangrado. Los resultados conseguidos con romiplostin y eltrombopag pueden representar dos buenas aproximaciones para conseguir el objetivo que acabamos de plantear en cuanto a eficacia y seguridad. Sin embargo, en este último punto, es lógico que se requiera una mayor evidencia para demostrar definitivamente la ausencia de un mayor riesgo de eventos tromboembólicos, y descartar que se favorezca la aparición de fibrosis reticulínica en médula ósea (Tabla 4).

Al igual que ha sucedido en la trombocitopenia asociada a la hepatitis C, hay ensayos clínicos en marcha que aportarán información acerca de la utilidad de estos nuevos fármacos en diferentes situaciones clínicas que cursan con reducción en el número de plaquetas,

como trombocitopenias constitucionales, síndromes mielodisplásicos e incluso como inductor del aumento de plaquetas circulantes en donantes de aféresis.

Bibliografía

- Harrington WJ, Minnich V, Hollingsworth JW, Moore CV. Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura. *J Lab Clin Med* 1951; 38: 1-10.
- Roarck JH, Bussel JB, Cines DB, Siegel DL. Genetic analysis of autoantibodies in idiopathic thrombocytopenic purpura reveals evidence of clonal expansion and somatic mutation. *Blood* 2002; 100: 1388-98.
- George JN. Management of patients with refractory immune thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1664-72.
- Ruggeri M, Fortuna S, Rodeghiero F. Heterogeneity of terminology and clinical definitions in adult idiopathic thrombocytopenic purpura: a critical appraisal from a systematic review of the literature. *Haematologica* 2008; 93: 98-103.
- McMillan R, Wang L, Tomer A, et al. Suppression of in vitro megakaryocyte production by antiplatelet autoantibodies from adult patients with chronic ITP. *Blood* 2004; 103: 1364-9.
- Houwerzijl EJ, Blom NR, van der Want JJJ, et al. Ultrastructural study shows morphologic features of apoptosis and para-apoptosis in megakaryocytes from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2004; 103: 500-6.
- Emmons RV, Reid DM, Cohen RL, et al. Human thrombopoietin levels are high when thrombocytopenia is due to megakaryocyte deficiency and low when due to increased platelet destruction. *Blood* 1996; 87: 4068-71.
- Bartley TD, Bogenberger J, Hunt P, et al. Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell* 1994; 77: 1117-24.
- Kuter DJ, Begley CG. Recombinant human thrombopoietin: basic biology and evaluation of clinical studies. *Blood* 2002; 100: 3457-69.
- Kuter DJ. New thrombopoietic growth factors. *Blood* 2007; 109: 4607-16.
- Wang B, Nichol JL, Sullivan JT. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of AMG 531, a novel thrombopoietin receptor ligand. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 76: 628-38.
- Broudy VC, Lin NL. AMG 531 stimulates megakaryopoiesis in vitro by binding to Mpl. *Cytokine* 2004; 25: 52-60.
- Erickson-Miller CL, DeLome E, Tian SS, et al. Discovery and characterization of a selective, nonpeptidyl thrombopoietin receptor agonist. *Exp Hematol* 2005; 33: 85-93.
- Orita T, Tsunoda H, Yabuta N, et al. A novel therapeutic approach for thrombocytopenia by minibody agonist of the thrombopoietin receptor. *Blood* 2005; 105: 562-6.
- Andermarian B, Psaila B, Bussel JB. Novel Thrombopoietic agents. *American Society of Hematology. Educational Program Book. Hematology* 2007: 106-13.
- Jenkins J, Williams D, Deng Y, et al. Phase 1 clinical study of eltrombopag, an oral, nonpeptide thrombopoietin receptor agonist. *Blood* 2007; 109: 4739-41.
- Bussel JB, Kuter DJ, George JN, et al. AMG 531, a thrombopoiesis-stimulating protein, for chronic ITP. *N Engl J Med* 2006; 355: 1672-81.
- Newland A, Caulier MT, Kappers-Klunne M, et al. An open-label, unit dose-finding study of AMG 531, a novel thrombopoiesis-stimulating peptibody, in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2006; 135: 547-53.

19. Kuter DJ, Bussel JB, Lyons RM, et al. Efficacy of romiplostim in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura: a double-blind randomized controlled trial. *Lancet* 2008; 371: 395-403.
20. Bussel J, Chen G, Saleh M, et al. Analysis of bleeding in patients with immune thrombocytopenic purpura (ITP): a randomized, double-blind, placebo-controlled trial of eltrombopag, an oral platelet growth factor. *Blood* 2006; 108: 475 (abstract).
21. Bussel JB, Cheng G, Saleh M, et al. Eltrombopag for the treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 2007; 357: 2237-47.
22. McHutchinson JG, Dusheiko G, Shiffman M, et al. Eltrombopag for thrombocytopenia in patients with cirrhosis associated with hepatitis C. *N Engl J Med* 2007; 357: 2227-36.

INHIBIDORES ORALES DEL FXa Y FIIa EN LA ETEV

M. MONREAL

Servicio de Medicina Interna.

Hospital Germans Trias i Pujol. Badalona (Barcelona)

La enfermedad tromboembólica venosa (ETEV) es una complicación frecuente tras cirugía ortopédica mayor. En ausencia de profilaxis, la prevalencia de ETEV detectada por flebografía tras prótesis electiva de rodilla o de cadera es del 50-60%, con un 25% de trombosis venosa profunda proximal y un 5-7% de embolia pulmonar.

En España la profilaxis en estos pacientes se suele hacer mediante la administración de heparina de bajo peso molecular (HBPM) durante un periodo de tiempo que oscila entre los 10 días y las 4-6 semanas. Ello se justifica por los resultados de diversos ensayos clínicos que así lo muestran, y se explica porque estos pacientes persisten con diversos grados de inmovilización durante varias semanas tras el alta hospitalaria. En un estudio reciente de nuestro grupo, el 96% de los pacientes que sufrieron una ETEV tras cirugía ortopédica mayor habían recibido profilaxis con dosis y tiempo adecuados de HBPM.

Siendo las HBPM la profilaxis de elección, su forma de administración inyectable presenta limitaciones: en el hospital debe enseñarse a los pacientes para que se la autoadministren en casa tras el alta, y un porcentaje no despreciable de pacientes no son capaces de hacerlo, y pasan a depender de los centros de atención primaria. La forma de administración, la posibilidad de lesiones por el manejo de agujas y la aparición de hematomas en la zona de punción pueden afectar al cumplimiento de los pacientes, y verse así comprometida la eficacia de la profilaxis en el tratamiento ambulatorio.

Dabigatrán y rivaroxabán son dos nuevos anticoagulantes orales –inhibidor directo de la trombina uno, del factor X activo el otro– que no requieren monitorización ni ajuste de dosis. En los ensayos clínicos han

demostrado una eficacia similar o mejor a enoxaparina en la prevención de ETEV tras cirugía de reemplazo total de cadera o rodilla, y un perfil de seguridad también similar, tanto en la tasa de sangrados como en el resto de acontecimientos adversos. Su administración oral puede facilitar la profilaxis de la ETEV tras una cirugía de reemplazo total de cadera o rodilla, especialmente tras el alta del paciente.

ECULIZUMAB Y HEMOGLOBINURIA PAROXÍSTICA NOCTURNA

Á. URBANO ISPIZUA

Servicio de Hematología. Hospitales Universitarios Virgen del Rocío. Sevilla.

Introducción

La hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) está caracterizada por una hemólisis intravascular que da lugar a hemoglobinuria en forma de episodios de orinas oscuras. Aproximadamente la mitad de los pacientes fallecen debido a complicaciones derivadas de la enfermedad. Los síntomas de la HPN pueden ser particularmente incapacitantes e incluyen cansancio crónico desproporcionado al grado de anemia, dolor abdominal recurrente, disfagia y disfunción eréctil en el varón. Estos síntomas, así como la aparición de trombosis y aplasia medular, afectan de forma significativa a la calidad de vida de los pacientes; la trombosis es la causa principal de mortalidad precoz. Muchos pacientes con HPN son dependientes de transfusiones sanguíneas, en ocasiones durante décadas. El diagnóstico de la HPN puede hacerse con seguridad con una determinación de citometría de flujo; pero, en ocasiones, por no haber pensado el médico en esta enfermedad, la solicitud de este análisis se retrasa, incluso, durante años. Antes del reciente desarrollo del inhibidor del complemento eculizumab, los tratamientos habían sido meramente de soporte. En este documento se presentan los datos recientes sobre la patogénesis, los hallazgos clínicos, el diagnóstico, y el tratamiento de soporte de la HPN, y se hace un especial énfasis en el empleo del eculizumab.

Definición de la enfermedad

La HPN, o enfermedad de Marchiafava-Michelli, es una enfermedad relacionada con la expansión clonal de una o varias células progenitoras hematopoyéticas

portadoras de una mutación somática adquirida del gen *PIG-A* (fosfatidilinositol-glicano de clase A)¹.

Situado en el cromosoma X, este gen está implicado en la síntesis del glicosilfosfatidilinositol (GPI). El GPI sirve de anclaje a numerosas proteínas de la membrana celular, de las que dos (CD55 y CD59) son esenciales para proteger las células sanguíneas de la destrucción por el sistema del complemento. La mutación sufrida por este gen impide o limita la síntesis normal del GPI. De ello deriva un déficit, parcial o total, de CD55 y CD59 en la superficie de leucocitos, plaquetas y eritrocitos². Los eritrocitos muestran entonces una sensibilidad anormal a la acción lítica del complemento, origen de la hemólisis intravascular característica de la enfermedad¹⁻³.

Es una enfermedad poco frecuente, con una prevalencia comprendida entre 8-16 casos/millón al año. Se suele presentar por igual, tanto en hombres como en mujeres^{4,5}. La HPN puede aparecer *de novo*, pero es frecuente también en el curso de trastornos asociados a insuficiencias medulares, como una aplasia medular¹. La HPN se caracteriza por una evolución progresiva y crónica, y su repercusión a medio plazo sobre la esperanza de vida de los pacientes es importante^{1,2}.

Fisiopatología

La HPN aparece después de una mutación somática adquirida del gen *PIG-A*, localizado en el cromosoma X (Xp22) y que codifica la síntesis del primer paso del sistema de anclaje del GPI, la combinación de N-acetilglucosamina (GInAc) con el fosfatidilinositol (FI). Por tanto, la síntesis del sistema de anclaje de GPI es defectuosa en esta enfermedad^{1,2}. Las mutaciones encontradas son esencialmente pequeñas inserciones o deleciones. Hasta la fecha se han descrito más de un centenar². Estas mutaciones se han encontrado en sujetos sanos con elevada frecuencia, de 2 a 4 por cada 100.000 células. Parece que estas mutaciones son policlónicas en la población sana³.

Un cierto número de proteínas reguladoras de la acción del complemento se anclan normalmente a la membrana celular de los eritrocitos, leucocitos y plaquetas mediante el GPI¹. Dos de estas proteínas desempeñan un papel determinante:

1) La **CD55**, que controla la cascada del complemento regulando la actividad de las enzimas C3 y C5 convertasas¹⁻⁴.

2) La **CD59**, que inhibe la parte final de la cascada del complemento, evitando la incorporación del C9 al complejo C5b-8 e impidiendo la formación del “complejo de ataque a la membrana” (CAM o C5b-9)¹⁻⁴.

Desprovistas total o parcialmente de sus factores de protección CD55 y CD59, las células sanguíneas presentan mayor sensibilidad a la actividad lítica del com-

plemento activado, dando lugar a la lisis intravascular de los eritrocitos^{1,3,4}.

Entre las células progenitoras hematopoyéticas HPN, podemos distinguir clones que originarán células parcialmente deficientes en GPI (denominadas *de tipo II*) y clones que, durante el proceso de maduración celular, formarán células totalmente deficientes en GPI (*de tipo III*). Las células con niveles normales de GPI son denominadas células *de tipo I*². Un mismo paciente puede presentar simultáneamente los tres tipos de células². Los eritrocitos de tipo III (totalmente deficientes en GPI) son de 15 a 25 veces más sensibles a la acción lítica del complemento activado que las células normales. Las células de tipo II (parcialmente deficientes en GPI) son solamente de 3 a 5 veces más sensibles¹.

El mecanismo preciso de las trombosis sigue siendo desconocido hasta la fecha. Los accidentes tromboembólicos que acompañan la evolución de la enfermedad podrían explicarse por la hemólisis intravascular y la posible liberación a la superficie de las plaquetas de factores activadores de la coagulación^{2,3}. El aumento de la tasa de hemoglobina libre plasmática provoca un desajuste del metabolismo intravascular del óxido nítrico (ON) disminuyendo su biodisponibilidad. La menor biodisponibilidad del ON favorecería la activación plaquetaria y endotelial y podría ocasionar trombosis intravasculares^{1,3,5}. Este hecho provocaría alteraciones en la regulación del tono de la musculatura lisa de los pacientes afectados (en particular durante las crisis paroxísticas), con aparición de espasmos esofágicos, dolores abdominales, disfagia y disfunciones eréctiles.

También se ha demostrado en la HPN que las plaquetas podían presentar un nivel muy bajo de antígeno CD59, causante de una mayor sensibilidad a la activación del “complejo de ataque a la membrana”. De ello se derivaría un incremento en la producción de vesículas procoagulantes que podría explicar la aparición más frecuente de trombosis en estos pacientes³.

Principales manifestaciones de la enfermedad

- **Anemia hemolítica.** La hemólisis intravascular es el signo biológico principal de la HPN. Es crónica y se asocia a hemoglobinuria¹. La anemia, como consecuencia de la hemólisis, implica un estado de fatiga crónica invalidante¹.

- **Insuficiencia medular.** Entre un 20 y un 25% de los pacientes con aplasia medular pueden presentar un clon de HPN (síndrome de aplasia medular-HPN)⁶. La aplasia medular puede ser diagnosticada antes de la identificación de la clona HPN, o puede encontrarse concomitantemente con una HPN clásica⁶.

- **Signos funcionales.** Durante su evolución, la enfermedad provoca dolor abdominal, disfagia, espas-

mo esofágico, dolor esternal y disfunción eréctil, y se acompaña de astenia crónica³.

• **Trombosis.** Los episodios trombóticos representan un hecho característico y son de diagnóstico frecuente después de la hemoglobinuria. La trombosis es causa importante de mortalidad y de morbilidad. Las trombosis venosas se caracterizan por su recurrencia y su localización poco habitual⁷: suprahepáticas (síndrome de Budd-Chiari), esplénicas, cerebrales, mesentéricas, portales, renales, cava inferior. También se ha observado una incidencia aumentada de trombosis arteriales.

Diagnóstico

Métodos clásicos

Históricamente, el diagnóstico de la HPN se ha basado en métodos bioquímicos. Éstos consisten en medir la sensibilidad de los eritrocitos en un medio ácido frente a una cierta actividad del complemento (test de Ham y test de la sacarosa)¹. En la HPN, la sensibilidad de los eritrocitos está aumentada. En la actualidad, estas pruebas ya casi no se practican por:

- Falta de sensibilidad (incapacidad de medir pequeñas poblaciones o eritrocitos de pacientes que necesitan transfusiones periódicas)^{1,2}.
- Carácter limitado de la información que aportan, que sólo hace referencia a los eritrocitos².

Citometría de flujo

La citometría de flujo es el método de referencia porque es el más sensible y el más específico⁸⁻¹⁰, tanto desde el punto de vista cuantitativo como cualitativo. Este método utiliza anticuerpos específicos de los antígenos normalmente anclados por el GPI en la superficie de eritrocitos, polinucleares neutrófilos y monocitos. El diagnóstico se basa en la demostración de que una población de células sanguíneas es deficiente en al menos dos moléculas dependientes del GPI. Permite evitar los falsos positivos eliminando un déficit aislado de una de esas dos proteínas de superficie. Los resultados se expresan en porcentaje de células negativas. La evaluación del porcentaje relativo de células anormales (información de orden cuantitativo) permite definir el tamaño del clon. Estos datos parecen relacionados con la presentación clínica de la enfermedad. Dada la gran sensibilidad de esta técnica, el déficit se considera como significativo en la práctica corriente a partir de un porcentaje de células negativas superior al 5%. Para diagnosticar una HPN, la citometría de flujo debe realizarse sobre monocitos, neutrófilos y, ocasionalmente, sobre eritrocitos⁸⁻¹⁰.

La citometría de flujo utiliza Ac anti-CD55 y Ac anti-CD59, en poblaciones de eritrocitos (en pacientes no transfundidos), de monocitos (detección mediante Ac anti-CD14) y de neutrófilos (detección mediante anti-CD16, Ac anti-CD66 y Ac anti-CD24)⁸⁻¹⁰.

El estudio de la expresión de los antígenos en la superficie de los neutrófilos y de los monocitos aporta información indispensable para el diagnóstico de la HPN. La evaluación de la importancia de las poblaciones celulares afectadas representa una mejora, ya que el porcentaje de neutrófilos y monocitos deficientes en moléculas GPI-dependientes no se ve modificado ni por la lisis celular (la vida media es normal) ni por las transfusiones.

Riesgos evolutivos y complicaciones

• **Crisis paroxísticas y transfusión.** La evolución de la enfermedad está marcada por crisis hemolíticas recurrentes (con brotes de hemólisis intravascular más o menos graves) y, en ocasiones, por trombosis venosas o arteriales. Las crisis paroxísticas intermitentes precisan transfusión y pueden estar desencadenadas por infecciones.

• **Trombosis.** En un primer grupo de 80 pacientes (tratados entre 1940 y 1970), el 39% presentó uno o más episodios de trombosis venosa en el curso de su enfermedad. Algunos pacientes sufrieron accidentes trombóticos de repetición. Para un gran número de estos pacientes, los episodios trombóticos fueron graves o incluso fatales¹¹. En un segundo grupo de 49 pacientes (tratados entre 1995 y 2002), el 29% desarrolló una trombosis venosa. El tamaño del clon patológico de granulocitos y el riesgo de trombosis parecen estar relacionados. Analizando este mismo grupo de 49 pacientes, ninguno con menos del 61% de granulocitos con HPN había sufrido trombosis, mientras que más del 50% de los pacientes con una población clonal mutada mayor del 61% habían experimentado un episodio trombótico. Las localizaciones eran principalmente intracerebrales, intraabdominales (síndrome de Budd-Chiari, portal o sistémico) o en miembros inferiores¹¹. Hall *et al.* también observaron en 163 pacientes que una población clonal de granulocitos mayor del 50% podría ser un signo predictivo de mayor riesgo de trombosis¹².

• **Insuficiencia medular.** Existe una estrecha relación entre HPN y aplasia medular¹¹. Esta frecuente coexistencia se describió hace mucho tiempo. Entre un 10 y un 31% de los pacientes con una aplasia medular en tratamiento inmunosupresor desarrolla una HPN. Podría suceder que los clones mutados aventajaran en crecimiento o supervivencia a las células hematopoyéticas residuales no mutadas que permanecen en la médula de pacientes con anemia aplásica. Es probable

que la clona HPN tenga un crecimiento limitado en ausencia de insuficiencia medular.

• **Leucemia aguda.** La relación entre HPN y leucemia mieloide aguda parece bastante infrecuente. La leucemia mieloide aguda aparece aproximadamente en un 5% de los pacientes con aplasia medular; este porcentaje no se modifica en caso de HPN concomitante. En la mayor parte de las leucemias estudiadas en pacientes afectados de HPN, el clon leucémico derivaba del clon de HPN¹¹.

Excepcionalmente, se han descrito casos de **remisión espontánea** o de disminución en la actividad de la enfermedad con el tiempo¹¹. Una de las posibles explicaciones de estas remisiones se basa en la vida limitada de los clones mutados. La recuperación dependería de la presencia de células hematopoyéticas normales capaces de regenerar la médula ósea. Para los pacientes en remisión, la evolución de la enfermedad se caracteriza por una vuelta a la normalidad de los eritrocitos y de los neutrófilos.

Tratamiento

• **Transfusión de sangre.** Además de mejorar el síndrome anémico, mejora la hemólisis por el efecto inhibitorio de la eritropoyesis. Sin embargo, existe un riesgo infeccioso residual. La hemocromatosis, que podría ser una complicación en los casos politransfundidos, es muy infrecuente debido a que estos pacientes eliminan gran cantidad de hierro por orina. De hecho, con frecuencia presentan ferropenia¹.

• **Anticoagulantes.** La profilaxis primaria sigue siendo motivo de discusión. Teniendo en cuenta los recientes descubrimientos y la hipótesis de una relación entre el número de neutrófilos deficientes y la aparición de accidentes tromboembólicos, puede plantearse un cambio en el enfoque terapéutico. Algunos autores han aconsejado una profilaxis primaria en los pacientes con HPN y más del 50% de neutrófilos deficientes, en los que no exista contraindicación clínica. Antes de instaurar un tratamiento profiláctico, debe considerarse la edad, la actividad física, la capacidad de cumplimiento del tratamiento y la comorbilidad¹. Los accidentes agudos deben tratarse con heparina. La presencia de trombopenia, frecuente en los pacientes con HPN, es otro elemento a tener en cuenta. Una trombopenia es una contraindicación relativa pero no absoluta a la heparina. Los pacientes que han sufrido un accidente tromboembólico deben recibir tratamiento a largo plazo¹.

• **Inmunosupresores.** Están indicados en la aplasia medular grave¹. No obstante, este tratamiento puede aumentar el riesgo de infección.

• **Suplementos de hierro y ácido fólico.** La asociación de hemosiderinuria y hemoglobinuria en pa-

cientes con HPN suele ser responsable de una carencia de hierro. La administración de suplementos de hierro suele ir acompañada de una exacerbación de la hemólisis, ya que en un paciente ferropénico el aporte de hierro da lugar a una proliferación de la eritropoyesis, incluida la anómala¹. Se aconseja el tratamiento con folatos para contrarrestar su déficit por excesivo consumo¹.

• **Corticoides.** Los corticoides como tratamiento de la hemólisis aguda o crónica siguen siendo también motivo de discusión. Su utilización es empírica: ningún estudio ha demostrado el mecanismo por el cual los corticoides podrían mejorar la hemólisis en los pacientes con HPN. Sin embargo, los glucocorticoides han mostrado su eficacia y su rapidez de acción en cierto número de pacientes. Esta rapidez (menos de 24 horas) hace pensar que la inhibición del complemento es uno de los desencadenantes de la acción antihemolítica de los corticoides. Parece que estarían indicados en el tratamiento de los episodios agudos, reduciendo su gravedad y duración. Por otra parte, la evaluación del beneficio/riesgo en el tratamiento de la hemólisis crónica es importante por los efectos secundarios de esta medicación; por ejemplo, osteoporosis, síndrome de Cushing o amiotrofia¹.

• **Andrógenos.** Solos o asociados a corticoides, se han podido utilizar con éxito para tratar la anemia de los pacientes con HPN. Como en la corticoterapia, aunque su mecanismo de acción sea poco conocido, su rápido efecto hace pensar en una intervención en forma de inhibición del complemento¹. Los efectos secundarios no son menos importantes y deben tenerse en cuenta; por ejemplo, toxicidad hepática, aumento del riesgo trombótico o hirsutismo y virilización¹.

• **Trasplante de médula ósea.** Se consideran dos criterios para este procedimiento terapéutico, la aparición de accidentes trombóticos de repetición y la progresión a aplasia medular grave.

• **Eculizumab.** El anticuerpo monoclonal (AcMo) eculizumab es un anticuerpo humanizado de tipo IgG_{2/4} kappa que consiste en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras compuestas por 448 y 214 aminoácidos, respectivamente. Este AcMo se une específicamente y con elevada afinidad (120 pM) al componente C5 del complemento¹³. Esta unión previene la generación del subfragmento C5a y del complejo de ataque de membrana C5b-9. Cuando se administra por vía intravenosa, la semivida de eliminación de eculizumab es de 272 ± 82 h, permaneciendo fundamentalmente en el espacio vascular. El estado de equilibrio de las concentraciones plasmáticas de eculizumab se logra unos 150 días después de la primera administración. La farmacodinámica de eculizumab se correlaciona directamente con la concentración plasmática del medicamento, y el mantenimiento de concentraciones plasmáticas superiores a 35 µg/mL conlleva en la práctica

al bloqueo completo de la actividad hemolítica dependiente de la activación de C5. El eculizumab ha sido aprobado recientemente por la EMEA y la FDA, y se ha mostrado eficaz en disminuir la hemólisis, disminuir el requerimiento transfusional de eritrocitos, disminuir el riesgo de trombosis y mejorar la calidad de vida de los pacientes con HPN¹³.

Bibliografía

1. Parker C, et al. Diagnosis management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2005; 106: 3699-709.
2. Johnson RJ, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: nature's gene therapy? *J Clin Pathol* 2002; 55: 145-52.
3. Hall S, et al. The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1996; 12: 5332-40.
4. Rosse WF, et al. Immune mediated hemolytic anemia. *Hematology* 2004: 48-62.
5. Rother RP, et al. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin. A novel mechanism of human disease. *JAMA* 2005; 293: 1653-62.
6. Dunn DE, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells in patients with bone marrow failure syndromes. *Ann Intern Med* 1999; 131: 401-8.
7. Galnick HR, et al. Activated platelets in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *BJH* 1995; 91: 697-702.
8. Moyo V, et al. Natural history of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria using modern diagnostic assays. *BJH* 2004; 126: 133-8.
9. Socié G, et al. Diagnostic immunocytologique et moléculaire des hémoglobinuries paroxystiques nocturnes. *Hématologie* 1995; 1: 63-5.
10. Hall S, et al. The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1996; 12: 5332-40.
11. Hillmen P, et al. Natural History of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 1995; 333: 1253-8.
12. Hall C, et al. Primary prophylaxis with warfarin prevents thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood* 2003; 102: 3587-91.
13. Hillmen P, et al. Effect of eculizumab on hemolysis and transfusion requirements in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 2004; 350: 552-9.

AMD 3100, UN NUEVO AGENTE MOVILIZADOR DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS

ADRIÁN ALEGRE

Servicio de Hematología y Hemoterapia.

Hospital Universitario de La Princesa. Madrid.

Introducción

Los progenitores hematopoyéticos (PH) obtenidos mediante leucaféresis de la sangre periférica (SP) tras un esquema de movilización suponen en la actualidad

el soporte celular más empleado tanto en trasplante autólogo (TASPE) como alogénico (TALSP)¹. La facilidad de su obtención y una recuperación hematopoyética más rápida son los principales motivos para el desplazamiento de la médula ósea como fuente celular en la mayoría de los programas de TPH¹⁻⁴.

Los mecanismos de movilización de estas células progenitoras han sido recientemente revisados por varios grupos⁵⁻⁷. Los únicos fármacos aprobados para movilización de estos progenitores PHSP para trasplante autólogo son el G-CSF y el GM-CSF, de forma aislada o bien tras algún esquema de quimioterapia. En donantes sanos para trasplante alogénico el fármaco aprobado es el G-CSF. Estos agentes no están exentos de efectos adversos, y en el contexto del trasplante autólogo hay un subgrupo de pacientes en los que por diversos motivos, como puede ser un excesivo tratamiento previo con quimio/radioterapia, no hay un resultado satisfactorio de la movilización de PHSP²⁻⁷. Por estos motivos se ha tratado de mejorar estos resultados con diversas estrategias, incluyendo nuevas citoquinas o combinaciones existentes, con un resultado poco satisfactorio, no superando nunca los resultados obtenidos con el G-CSF^{6,7}. En los últimos años se ha dispuesto de un mejor conocimiento de los mecanismos de retención y liberación de las células progenitoras de la médula⁸⁻¹⁰ (Figura 1). Esto ha permitido el desarrollo reciente de nuevos agentes movilizadores, entre los que destaca el AMD 3100, también conocido como plerixafor¹¹⁻¹⁹ (Figura 2). En este trabajo revisamos el mecanismo de acción y los resultados clínicos del AMD3100, como nuevo agente movilizador de PH.

AMD 3100: mecanismo de acción de un nuevo agente movilizador

La interacción entre el factor derivado de células estromales (SDF-1) y su receptor, la quimioquina CXCR4, es fundamental para el anclaje y liberación de las célu-

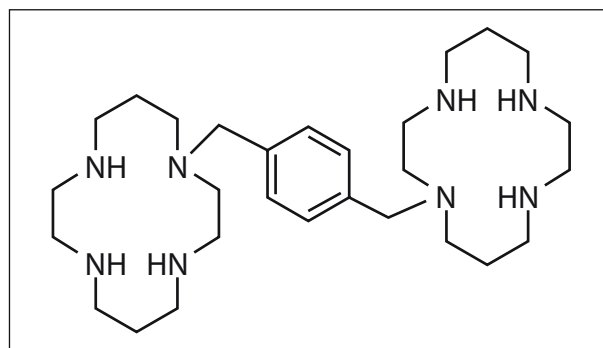


Figura 1. Estructura de la molécula del AMD 3100 (plerixafor) (Mozobil®).

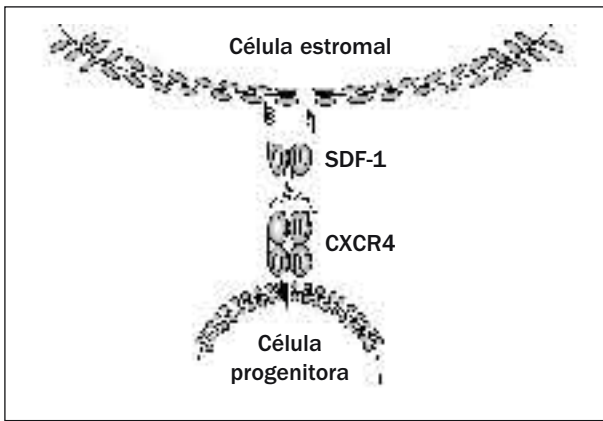


Figura 2. Esquema de la interacción entre SDF1 y CXCR4 en la médula ósea.

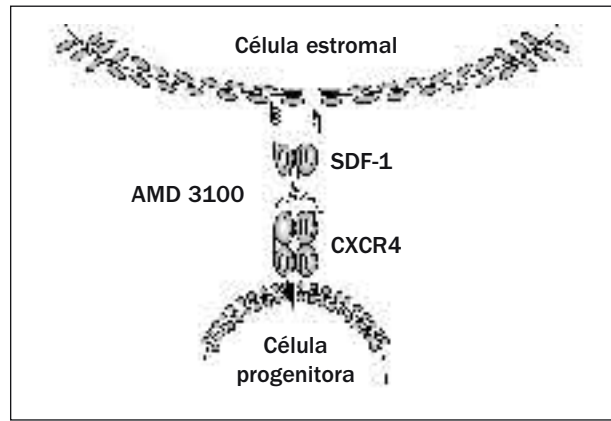


Figura 3. Esquema de acción del AMD 3100 sobre la interacción SDF1 y CXCR4 como mecanismo de movilización de células progenitoras CD34+ a la sangre periférica.

las progenitoras de la médula ósea (Figura 1). El AMD 3100 tiene como mecanismo principal la inhibición potente, selectiva e irreversible del CXCR4, originando la disrupción de SDF-1, lo que permite la liberación de las células progenitoras CD34+¹¹⁻¹² (Figura 2). Este agente, en diferentes estudios en modelo animal y posteriormente en estudios clínicos en humanos sanos y en pacientes con diversas patologías, se ha mostrado eficaz para movilizar células progenitoras CD34+, con su potencial aplicación para la obtención de progenitores para rescate celular tras terapias mieloablativas en los programas de trasplante hematopoyético^{11-19,21}.

Este mecanismo de inhibición del receptor CXCR4 ha mostrado sinergia cuando se asocia el AMD 3100 con el G-CSF^{11,14-19}. SDF-1 favorece la expresión de moléculas de adhesión como VLA-4, favoreciendo la adhesión de las células progenitoras al estroma. El mecanismo de acción del G-CSF implica la estimulación de la producción de células CD34+ en la médula, junto con proteólisis del ligando del VLA-4, el VCAM-1. En este sentido se ha postulado que la interacción CXCR4/SDF-1 sería también un mecanismo a través del cual actuaría el efecto movilizador del G-CSF, de ahí su efecto sinérgico con el AMD 3100¹¹⁻¹⁹.

El plerixafor (Mozobil®) (AMD 3100; JM 3100 o SID 791), cuya formulación puede ser subcutánea, pertenece a una serie de agentes inhibidores del receptor CXCR4 que han mostrado eficacia en la movilización de PH en sujetos sanos^{21,22} y en pacientes con diversas patologías como linfoma no Hodgkin (LNH), mieloma múltiple (MM) y linfoma de Hodgkin, como posteriormente revisaremos¹²⁻¹⁹.

El potencial de reconstitución hematopoyética de forma estable y completa de las células movilizadas con este nuevo agente ha sido demostrado en modelo animal en perros, en un trabajo reciente del grupo de Seattle²³, y en los trasplantes realizados en humanos¹³⁻¹⁹.

Estudios preclínicos del AMD 3100 como agente movilizador

El empleo inicial del AMD 3100 como agente anti-VIH mostró en los pacientes tratados una leucocitosis con aumento de células CD34+, lo que originó su descubrimiento como potencial movilizador. Los estudios preclínicos realizados con este agente desde hace algunos años confirmaron este efecto favorable como movilizador de PH en modelo animal, en ratones, con sinergia cuando se asociaba al G-CSF⁸⁻¹¹. Estos estudios conllevaron el desarrollo de ensayos en fase I y II en humanos, a diversas dosis, en general asociado a G-CSF en pacientes con LNH, EH y MM, con resultado favorable¹²⁻¹⁹.

En estudios de fase I piloto de escalada de dosis en sujetos sanos con diferentes cohortes de dosis de plerixafor: 240 µg/kg y 320 µg/kg (cohorte 1); 320 µg/kg y 400 µg/kg (cohorte 2); y 400 µg/kg y 480 µg/kg (cohorte 3), la mayor toxicidad incluyó diarrea, náuseas, taquicardia sinusal, eritema en el lugar de la inyección, parestesia perioral y cefaleas. No se objetivó una toxicidad limitante de dosis, pero se observaron los mayores efectos a dosis de 400 µg/kg^{11,21,22}.

Los estudios farmacocinéticos de plerixafor han mostrado una relación dosis-respuesta con un efecto máximo de vida media de entre 3 y 6 horas. Según datos obtenidos de estudios de fase I a dosis de 240 µg/kg la concentración máxima fue de 847 ng/mL⁸⁻¹¹.

En los estudios preclínicos con este agente se objetivó un número superior de células T CD3+ con una menor tasa de CD34+ comparado con productos movilizadores con sólo G-CSF (p = 0,0044). En contraste, la carga de células B CD19+ fue superior a los productos movilizadores con G-CSF (p = 0,014). Los nive-

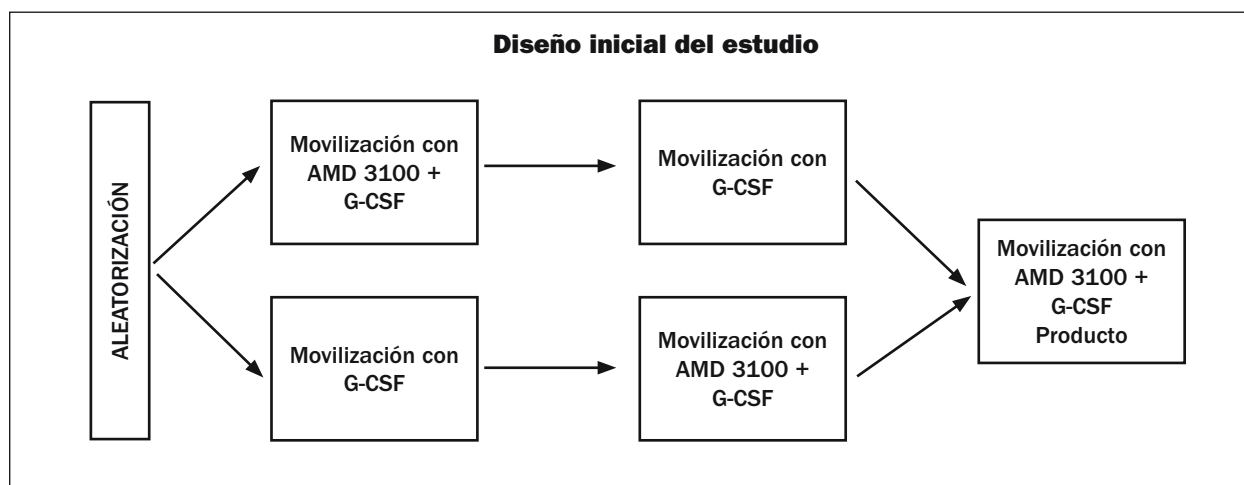


Figura 4. Estudio de superioridad de la asociación AMD + G-CSF vs. G-CSF solo. Esquema de tratamiento¹⁶.

les séricos de IL-4 fueron menores en los pacientes movilizados con plerixafor respecto al grupo de G-CSF^{3,11,18,21-23}.

Aunque no está establecido si estas células T tienen disminuida su capacidad de alorreactividad, una diferencia es que, al contrario que con el G-CSF, no se observó una reducción en la cantidad de células CD62+ en la población T obtenida de los donantes.

Por otra parte, en modelo animal se ha observado inducción de revascularización con las células mononucleadas obtenidas con este agente que tendrían un potencial angiogénico, lo que implicaría potencial terapéutico en el contexto de situaciones de isquemia²⁰.

Estudios clínicos del AMD 3100 como agente movilizador

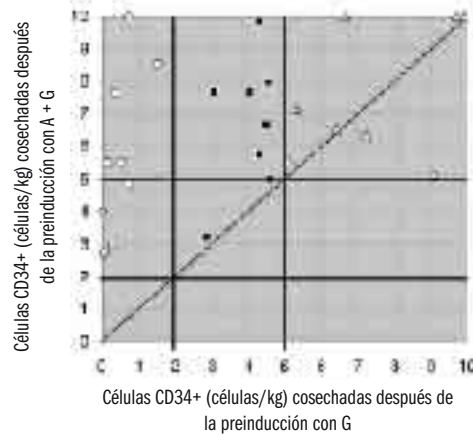
En un estudio inicial con 25 pacientes con MM y LNH se demostró la superioridad de la asociación de AMD 3100 + G-CSF vs. G-CSF solo¹⁶ (Figuras 4 y 5). Posteriormente se iniciaron en 2005 dos estudios en fase III de carácter internacional^{17,18} en pacientes con linfoma no Hodgkin (estudio 3101) y mieloma múltiple (estudio 3102). Estos estudios han finalizado recientemente con la inclusión de más de 600 pacientes. Se trataba de estudios aleatorizados, comparativos, multicéntricos doble ciego y controlados con placebo, en los que se comparaba la asociación de AMD 3100 más G-CSF vs. placebo + G-CSF. El objetivo primario en LNH y MM era la recolección de 5 y 6 × 10⁶ células CD34+/kg de peso del paciente, respectivamente, entre 2 y 4 sesiones de leucaféresis. Un resumen de estos estudios ha sido presentado en el congreso ASH de 2007, y sus principales resultados se describen a continuación.

En LNH, el 59% de los pacientes que recibieron plerixafor + G-CSF alcanzaron el objetivo de 5 × 10⁶ células CD34+/kg de peso del paciente con 4 o menos sesiones, comparado con sólo un 20% de los pacientes que recibieron placebo + G-CSF¹⁷ (Figura 6). Además, el 87% de los pacientes que recibieron plerixafor alcanzaron un número considerado como mínimo de seguridad para llevar a cabo el autotrasplante de 2 × 10⁶ células CD34+/kg. Por otra parte, el plerixafor también redujo el número de sesiones para alcanzar el mínimo fijado; y una vez infundido en el autotrasplante el producto movilizado, el injerto fue más rápido y estable durante los 100 primeros días. El fármaco fue bien tolerado en general¹⁷.

Los resultados del estudio realizado en pacientes con mieloma son muy similares¹⁸. Un 72% de los pacientes que recibieron plerixafor alcanzaron el objetivo de 6 × 10⁶ células CD34+/kg de peso del paciente con 2 o menos sesiones, comparado con sólo un 34% de los pacientes que recibieron placebo + G-CSF¹⁸ (Figura 7). Más de la mitad de los pacientes de la rama del plerixafor alcanzaron el objetivo mínimo con una sola sesión de aféresis. También en este estudio otros objetivos, como la rapidez del injerto y su durabilidad en los 100 primeros días, mostraron superioridad en el grupo que recibió AMD3100. Los efectos adversos más frecuentes con este agente fueron gastrointestinales y enrojecimiento en el lugar de la inyección¹⁸.

Respecto a su uso en donantes sanos como agente movilizador de progenitores de sangre periférica para trasplante alogénico, existe experiencia preliminar como agente simple^{21,22}. En un reciente estudio en 25 donantes sanos²¹ para hermanos HLA idénticos se administró una dosis de plerixafor 240 µg/kg s.c., realizándose la leucaféresis 4 horas después. La tolerancia fue aceptable, y en dos tercios bastó una sola

Comparación de la movilización con G y con A + G



Éxito de AMD 3100 + G-CSF en comparación con G-CSF solo para la movilización

Pauta de tratamiento	N.º de pacientes con movilización exitosa* cuando el otro brazo de tratamiento había fracasado	N.º de pacientes con un número menor de procedimientos de aféresis (n.º de pacientes con ≥ 50% más de células)			Mismo número de procedimientos de aféresis, pero mayor número de células
		1 menos	2 menos	3 menos	
A + G	0	6 (1)	4 (3)	2 (1)	3**
G solo	0	0	0	0	0
Total	9	6	4	2	3

El número total de pacientes es de menos de 25 debido a que un paciente (02-750) tuvo mayores números de células y de procedimientos de aféresis en el brazo de tratamiento "A + G", por lo que no es posible encuadrarlo en ninguna de las categorías de la tabla. En el mismo número de días de aféresis, en este paciente se cosecharon 10⁹ más células en el brazo de tratamiento "G solo".

*Definida por haberse cosechado ≥ 2 × 10⁶ células/kg.

**Los tres pacientes tenían entre un 14 y un 49% más de células.

Movilización de una dosis adecuada de CPH al cabo de 1 o 2 días de aféresis

Pauta de tratamiento	Células cosechadas en el día 1 (CD34+/kg)			Células cosechadas en los días 1 y 2 (CD34+/kg)		
	Menos de 2 × 10 ⁶	Entre 2 y 5 × 10 ⁶	Más de 5 × 10 ⁶	Menos de 2 × 10 ⁶	Entre 2 y 5 × 10 ⁶	Más de 5 × 10 ⁶
G solo	20	3	2	9	12	4
A + G	11	5	9	0	10	15

Figura 5. Estudio de superioridad de la asociación AMD 3100 + G-CSF frente a G-CSF solo. Resultados¹⁶.

inyección para obtener el objetivo de células CD34+. En 20 pacientes se realizó el alotrasplante, un injerto rápido de neutrófilos en el día +10 y plaquetas en el día +12. Se objetivó EICH aguda grado II-IV en el 35% de los casos. Estos resultados han sido similares en otros estudios con menor número de casos, pudiendo ser una alternativa más eficaz y cómoda que con G-CSF.

Existe una preocupación con este agente, pues en varios estudios se ha observado su poder movilizador de células de LMA, LLC y células plasmáticas leucémicas, por lo que estas patologías han sido excluidas de los estudios^{11,24}.

Existen muy pocos estudios de AMD 3100 en pobres movilizadores, entre los que se encuentran dos ensayos en fase II precoces AMD 3100-2101.10 y AMD 3100-2102.15. En AMD 3100-2101, 9 de 25 pacientes habían fallado a la movilización con G-CSF previamente, pero respondieron a la asociación de AMD 3100 + G-CSF¹¹.

De estos estudios se extrajo la conclusión de que este agente debería estar disponible para este tipo de pacientes si existía una indicación de TASPE mediante el esquema inicialmente conocido como *single patient use* (SPU) y posteriormente, de forma expandida, mediante el esquema *compassionate use protocol* (CUP).

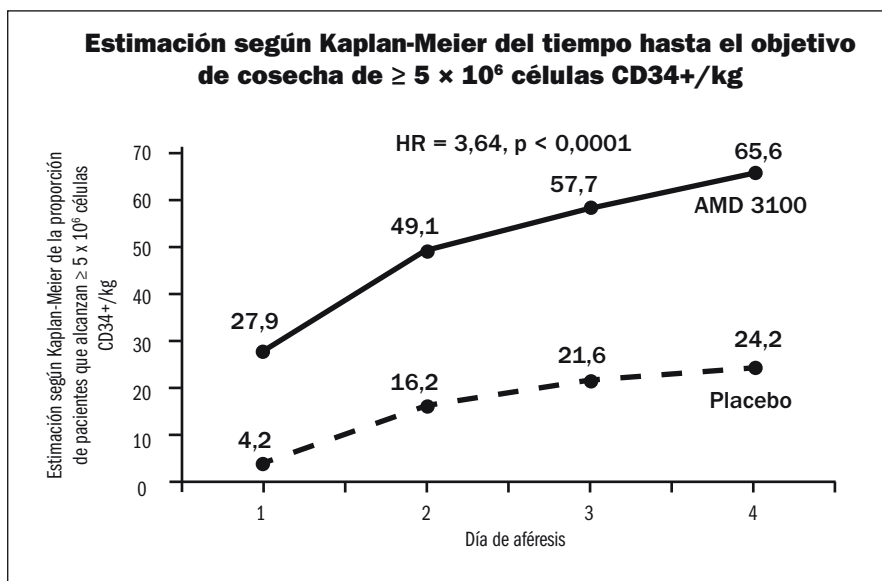


Figura 6. Resultados de la movilización de células CD34+ en LNH (estudio en fase III 3101)¹⁷.

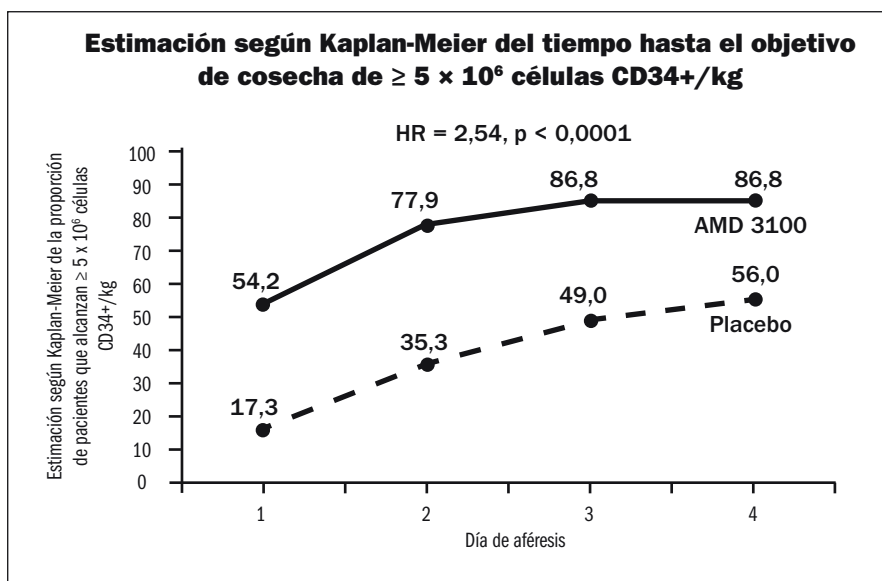


Figura 7. Resultados de la movilización de células CD34+ en mieloma múltiple (estudio en fase III 3102)¹⁸.

Ambos esquemas fueron aprobados por la FDA en este tipo de pacientes en EE UU y luego en Australia y Canadá, desarrollándose un estudio compasivo a realizar en 1 o 2 semanas tras constatar el fallo de movilización¹⁹.

El esquema *compassionate use protocol* (CUP) queda resumido en la Figura 8. En este estudio se incluyeron 115 pacientes con fracaso previo a diferentes esquemas estándares de movilización de PH. El objetivo era obtener 2×10^6 células CD34+/kg en pobres movilizadores empleando la combinación de

AMD 3100 + G-CSF. La tasa de respuesta favorable fue similar en los que fracasaron con quimioterapia y en los que lo hicieron con citoquinas. En los pacientes con LNH se consiguió el objetivo en un 60,3% de los casos; en pacientes con MM, en un 71,4%; y en pacientes con linfoma de Hodgkin, en un 76,5%. Tras el trasplante, la mediana de tiempo hasta recuperación de neutrófilos y plaquetas fue de 11 y 18 días, respectivamente, con un injerto estable en todos los casos. La tolerancia fue aceptable salvo en dos pacientes (1,6%) con cefalea y pesadillas. En el resto de pacientes los efectos adversos fueron leves (84,8%) o moderados (13,6%), destacando eritema en el lugar de punción, junto con alteraciones gastrointestinales. A pesar de las reservas metodológicas de un estudio multicéntrico en pacientes muy heterogéneos, en el trabajo se concluye que la asociación de AMD 3100 + G-CSF ofrece una alternativa de movilización en pacientes con fracaso a esquemas previos, con una tasa de resultados elevada y una tolerancia aceptable¹⁹ (Figura 8).

El potencial de reconstitución hematopoyética de forma estable y completa de las células movilizadas con este nuevo agente ha sido demostrado recientemente en modelo animal en perros sometidos a quimio/radioterapia mieloablativa en un trabajo reciente del grupo de Seattle²³.

AMD 3100: situación actual

Este fármaco está siendo desarrollado por la compañía AnorMED Inc, perteneciente al grupo Genzyme. Su principio activo es el plerixafor, y su nombre comercial es Mozobil^{®11}. En la actualidad se han completado los dos ensayos clínicos en fase III ini-

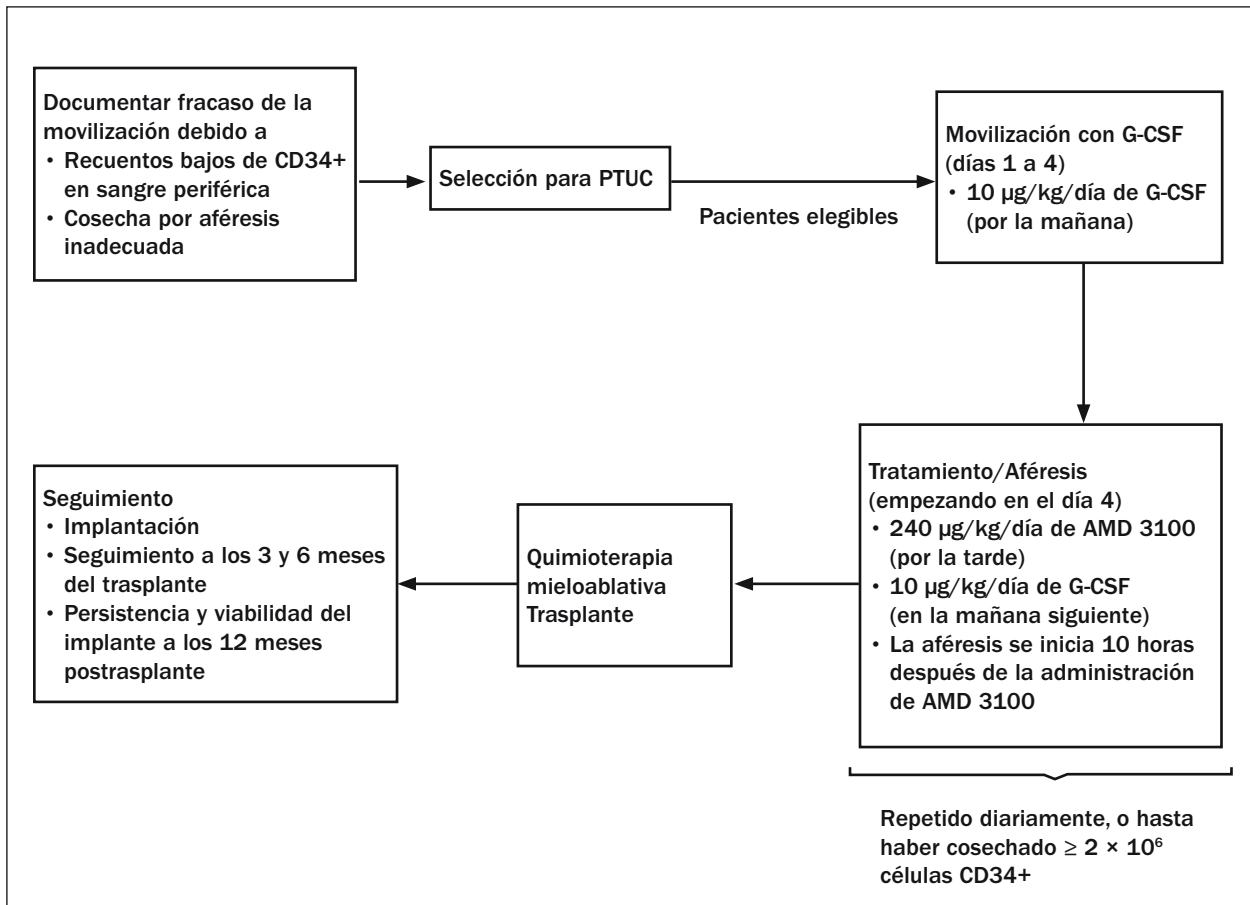


Figura 8. Protocolo de tratamiento de uso compasivo (PTUC) con AMD 3100 en pacientes con fracaso previo de movilización¹⁹.

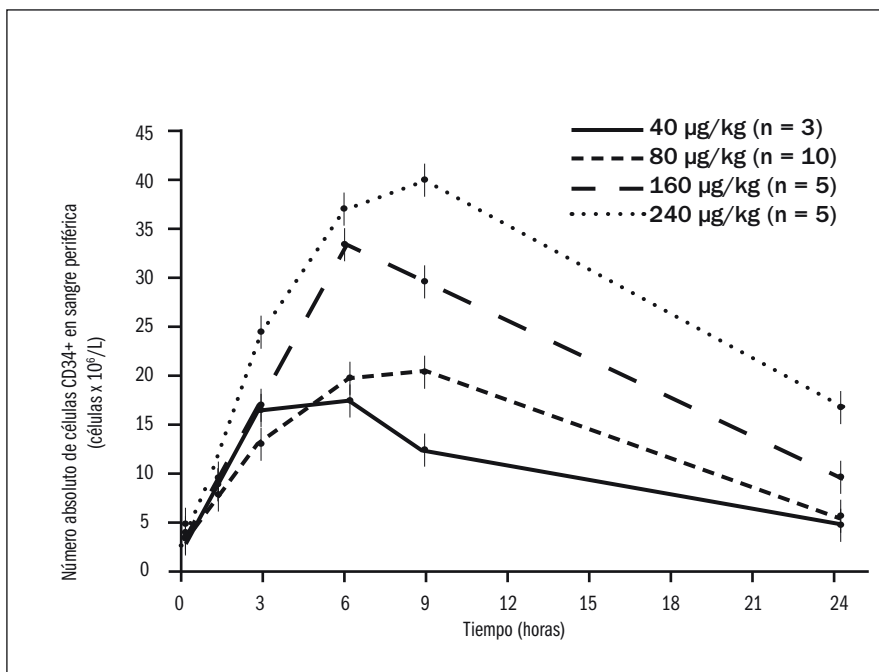


Figura 9. Análisis de dosis-respuesta de la movilización de progenitores CD34+ con AMD 3100 en voluntarios humanos sanos tras una inyección s.c. única²².

ciados en diciembre de 2004 y que han sido comentados anteriormente^{16,17}, estando pendiente de su aprobación. Por este motivo, a la hora de redactar esta revisión se considera un fármaco huérfano para uso compasivo en pacientes que requieran recogida de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica y que hayan experimentado un fallo de movilización con esquemas previos¹¹. Este agente tiene también propiedades cardioprotectoras, antiinflamatorias y antineoplásicas, por lo que se está desarrollando, además, en pacientes con infección por VIH, leucemia mieloide aguda, infarto agudo de miocardio y artritis reumatoide¹¹.

Tabla 1. Resumen de las principales características del AMD 3100 (plerixafor) (Mozobil®)

· Una dosis subcutánea varias horas antes de la leucaféresis
· Efecto sinérgico con el G-CSF en TASPE
· Asociado a G-CSF superior vs. G-CSF en TASPE en LNH y MM
· Mayor recolección de células progenitoras CD34+ en TASPE
· Eficaz para movilizar CD34+ en sanos con una sola dosis sin G-CSF
· Recuperación hematopoyética completa y estable en TASPE y TALSP
· Toxicidad aceptable en pacientes y sujetos sanos

Otra propiedad recientemente investigada de este agente es su potencial efecto quimiosensibilizador, que está aún en desarrollo clínico en algunas neoplasias hematológicas, como LMA^{11,24}.

Su potencial movilizador y tolerancia en sujetos sanos también es una posible aplicación de este agente de forma única en los programas de TALSP^{21,22} (Figura 9).

Resumen y conclusiones

El AMD 3100 o plerixafor (Mozobil®) es un nuevo agente movilizador de PHSP para los programas de trasplante hematopoyético, cuyo mecanismo se basa en la inhibición del receptor CXCR4. Su asociación con G-CSF obtiene mejores resultados que los esquemas de movilización estándar de G-CSF solo, con una tolerancia aceptable. Tras los estudios controlados de fase III realizados en pacientes con LNH y MM, este agente está pendiente de aprobación para su uso en trasplante autólogo en estas patologías. Su empleo en pacientes con pobre movilización previa también ha mostrado eficacia, lo que ofrecería una opción terapéutica en estos pacientes. Su papel como movilizador único en donantes sanos para trasplante alogénico de sangre periférica está en estudio. Un resumen de las características generales de este producto se refleja en la Tabla 1.

Bibliografía

1. Gratwohl A, Baldomero H, Frauendorfer K, Urbano-Ispizua A; Joint Accreditation Committee, International Society for Cellular Therapy; European Group for Blood and Marrow Transplantation. EBMT activity survey 2004 and changes in disease indication over the past 15 years. *Bone Marrow Transplant* 2006; 37 (12): 1069-85.
2. To LB, Roberts MM, Haylock DN, et al. Comparison of hematological recovery times and supportive care requirements of autologous recovery phase peripheral blood stem cell transplants, autologous bone marrow transplants and allogeneic bone marrow transplants. *Bone Marrow Transplant* 1992; 9: 277-84.
3. Bensinger W, Singer J, Appelbaum F, et al. Autologous transplantation with peripheral blood mononuclear cells collected after administration of recombinant granulocyte stimulating factor. *Blood* 1993; 81: 3158-63.
4. Bensinger WI, Martin PJ, Storer B, et al. Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers. *N Engl J Med* 2001; 344: 175-81.
5. Cashen AF, Lazarus HM, Devine SM. Mobilizing stem cells from normal donors: is it possible to improve upon G-CSF? *Bone Marrow Transplant* 2007; 39: 577-88.
6. Alegre A, Tomás JF, Martínez-Chamorro C, Gil-Fernández JJ, Fernández-Villalta MJ, Arranz R, et al. Comparison of peripheral blood progenitor cell mobilization in patients with multiple myeloma: high-dose cyclophosphamide plus GM-CSF vs G-CSF alone. *Bone Marrow Transplant* 1997; 20 (3): 211-7.
7. Stiff PJ. Management strategies for the hard-to-mobilize patient. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23 (Suppl 2): S29-S33.
8. Kollet O, Petit I, Kahn J, et al. Human CD34(+)CXCR4(-) sorted cells harbor intracellular CXCR4, which can be functionally expressed and provide NOD/SCID repopulation. *Blood* 2002; 100: 2778-86.
9. Wang J-F, Liu Z-Y, Groopman JE. The chemokine receptor CXCR4 is expressed on the megakaryocytic lineage from progenitor to platelets and modulates migration and adhesion. *Blood* 1998; 92: 756-64.
10. Lapidot T. Mechanism of human stem cell migration and repopulation of NOD/SCID and B2m null NOD/SCID mice. The role of SDF-1/CXCR4 interactions. *Ann NY Acad Sci* 2001; 938: 83-95.
11. Genzyme Corp & AnorMed Inc. Internal Information on AMD3100. February 2008.
12. Broxmeyer HE, Orschell CM, Clapp DW, et al. Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *J Exp Med* 2005; 201: 1307-18.
13. Devine SM, Flomenberg N, Vesole DH, et al. Rapid mobilization of CD34+ cells following administration of the CXCR4 antagonist AMD3100 to patients with multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1095-102.
14. Stiff PJ, Micallef I, McCarthy P, Magalhaes-Silverman M, et al. AMD3100 combined with standard doses of G-CSF leads to rapid, consistent mobilization of hematopoietic progenitor cells in patients with non-Hodgkin's lymphoma (NHL) and multiple myeloma. *Blood* 2004; 104: 778a.
15. Ehninger G, Fruehauf S, Hubel K, Platzbecker U, Badel K, Calandra G. Steady state mobilization of autologous blood-stem cells using G-CSF and AMD3100 in patients with multiple myeloma (MM). *Blood* 2006; 108: 396a.
16. Flomenberg N, Devine SM, DiPersio JF, et al. The use of AMD3100 plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization is superior to G-CSF alone. *Blood* 2005; 106: 1867-74.
17. DiPersio J, Micallef I, Stiff PJ et al, for the 3101 Investigators A Phase III, Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Comparative Trial of AMD3100 (Plerixafor)+G-CSF vs. G-CSF+Placebo for Mobilization in Non-Hodgkins Lymphoma (NHL) Patients for Autologous Hematopoietic Stem Cell (aHSC) Transplantation *Blood* 2007, 110, 445a.
18. Di Persio J, Stadtmauer EA, Auayporn P, et al.; for the 3102 Investigators. A phase III, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, comparative trial of AMD 3100 (plerixafor) + G-CSF vs. G-CSF + placebo for mobilization

- in multiple myeloma (MM) patients for autologous hematopoietic stem cell (aHSC) transplantation. *Blood* 2007; 110: 601a.
19. Calandra G, J McCarty, J McGuirk J, et al. AMD 3100 plus G-CSF can successfully mobilize CD34⁺ cells from non-Hodgkin's lymphoma, Hodgkin's disease and multiple myeloma patients previously failing mobilization with chemotherapy and/or cytokine treatment: compassionate use data. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41 (4): 331-8.
 20. Shepherd RM, Capoccia BJ, Devine SM, et al. Angiogenic cells can be rapidly mobilized and efficiently harvested from the blood following treatment with AMD 3100. *Blood* 2006; 108: 3662-7.
 21. Devine SM, Vij R, Rettig M, Todt L, et al. Rapid mobilization of functional donor hematopoietic cells without G-CSF using plerixafor, an antagonist of the CXCR4/SDF-1 interaction. *Blood* 2008 Apr 21. [Epub ahead of print]
 22. Liles WC, Rodger E, Broxmeyer HE, et al. Augmented mobilization and collection of CD34⁺ hematopoietic cells from normal human volunteers stimulated with granulocyte-colony-stimulating factor by single-dose administration of AMD 3100, a CXCR4 antagonist. *Transfusion* 2005; 45: 295-300.
 23. Burroughs, L; Mielcarek M, Little MT, et al. Durable engraftment of AMD3100-mobilized autologous and allogeneic peripheral-blood mononuclear cells in a canine transplantation model. *Blood* 2005; 106: 4002-8.
 24. Andreeff M, Konoplev S, Wang R-Y, et al. Massive mobilization of AML cells into circulation by disruption of leukemia/stroma cell interactions using CXCR4 antagonist AMD 3100: first evidence in patients and potential for abolishing bone marrow microenvironment mediated resistance. *Blood* 2006; 108: 176a.

NUEVOS FÁRMACOS EN ONCOLOGÍA: DESARROLLO DEL LABORATORIO A LA CLÍNICA

P. MAISO¹, E.M. OCIO^{1,2}, M. GARAYOA¹,
M.V. MATEOS², A. PANDIELLA¹,
J.F. SAN MIGUEL^{1,2}

¹Centro de Investigación del Cáncer (CIC).
IBMCC (CSIC-USAL). Salamanca.

²Hospital Universitario de Salamanca.

La mayoría de estas dianas representan genes y proteínas implicados en transformación tumoral, progresión y metástasis. Así, los nuevos agentes están principalmente dirigidos al bloqueo del ciclo celular y a la inducción de apoptosis, de forma selectiva en las células neoplásicas. Ambos procesos están regulados por un amplio número de factores, como las citoquinas, hormonas o factores de crecimiento, que también pueden ser objeto del tratamiento antitumoral.

La validación de un nuevo agente frente a neoplasias hematológicas consta de diferentes etapas desde que el fármaco llega al laboratorio hasta que puede ser utilizado en pacientes. Durante la fase preclínica, se comprueba su especificidad para la diana molecular frente a la que ha sido diseñada y su actividad antitumoral. Para ello, se realiza un amplio estudio de eficacia en líneas celulares de la patología que se quiere estudiar, y posteriormente se analiza su efecto *ex vivo*, sobre muestras tumorales humanas procedentes de pacientes con dichas enfermedades. Una vez demostrada su eficacia como agente único, se comprueba si es capaz de potenciar el efecto de los tratamientos clásicos; posteriormente se analiza su mecanismo de acción en ensayos *in vitro*. Aquellos fármacos que presenten unas mejores perspectivas clínicas en los estudios *in vitro* se llevarán al modelo animal para analizar estos mismos parámetros *in vivo*. Aquellos fármacos o combinaciones de fármacos que demuestran eficacia en estos estudios *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* son candidatos a ser evaluados en pacientes en ensayos clínicos en fase I. Para llevar a cabo todo este proceso es imprescindible la integración de grupos básicos, traslacionales y clínicos.

En el presente trabajo se resumen, en primer lugar, las principales dianas terapéuticas que están siendo utilizadas en el tratamiento del cáncer y los fármacos diseñados frente a ellas. En un segundo apartado se esquematiza el proceso de desarrollo de un nuevo fármaco antitumoral, desde su diseño en el laboratorio hasta su aprobación clínica.

Introducción

En los últimos años estamos asistiendo a una auténtica revolución en el diseño de nuevos fármacos en oncología. Los avances en la biología del cáncer y el conocimiento cada vez más profundo de las vías de señalización implicadas en la patogénesis y progresión tumoral han conducido a que, tras la era de la quimioterapia, la investigación farmacológica se haya centrado en el desarrollo de nuevos agentes dirigidos frente a dianas moleculares específicas de la célula tumoral y, por tanto, potencialmente más eficaces y con menor toxicidad sobre células normales.

Mecanismos de proliferación y supervivencia celular

La transformación de una célula normal en tumoral requiere la acumulación sucesiva de mutaciones que provocan tanto la activación de oncogenes como la inactivación de genes supresores tumorales. Estas alteraciones desencadenan un desequilibrio entre la proliferación y la muerte celular que conduce a la acumulación de células tumorales¹. Estas anomalías moleculares específicas de cada neoplasia y las vías que desregulan constituyen las potenciales dianas terapéuticas.

Las alteraciones en el control del ciclo celular son especialmente importantes en la patogenia del cáncer. Este control está principalmente regulado por los complejos CDK-ciclinas, que son los encargados de impulsar el desarrollo del ciclo. Los componentes de la familia KIP: p21, p27 y p57 son capaces de inhibir todos los complejos CDK-ciclina de la fase G1 y S²; por otro lado, p15, p16, p18 y p19 son inhibidores específicos de los complejos CDK4/6-ciclina D². Los nuevos fármacos dirigidos contra dianas moleculares implicadas en ciclo celular incluyen inhibidores de CDK (flavopiridol, PD0332991, seliciclib), inhibidores de ciclinas (P-236-00) o inhibidores de aurora quininas (VE-465, VX680)³.

Sin embargo, el bloqueo del ciclo celular generalmente no es suficiente para erradicar el clon tumoral, ya que los mecanismos de supervivencia de la célula permitirían, al finalizar el tratamiento, la reparación del daño sufrido. Esto hace que la inducción directa de apoptosis para provocar la muerte de la célula tumoral sea un mecanismo imprescindible en todos estos tratamientos.

La apoptosis es un proceso activo en el que inicialmente las células reaccionan ante un estímulo, ejecutando ellas mismas el proceso de muerte programada. Este tipo de muerte celular se lleva a cabo principalmente por dos vías distintas: 1) apoptosis mediada por receptores de muerte expresados en la superficie celular o vía extrínseca; y 2) apoptosis mediada por la mitocondria o vía intrínseca. La inducción de ambas vías provoca una cascada de señalización que converge en la activación de las caspasas. Además, la vía intrínseca puede también inducir muerte celular a través de una vía independiente de caspasas⁴. Los nuevos agentes capaces de regular la apoptosis están dirigidos tanto a la activación de genes proapoptóticos como a la supresión de genes antiapoptóticos. Entre ellos destacan los agonistas de FAS (APO010) y TRAIL^{5,6} (mapatumumab y lexatumumab) y los inhibidores de la familia de Bcl-2⁷ (oblimersen, obatoclax).

Existen otros agentes diseñados contra vías de señalización que inducen supervivencia, proliferación o resistencia a fármacos, como los inhibidores del proteasoma⁸ (carfilzomib, NPI-0052), de STAT3⁹ (atiprimod), AKT¹⁰ (perifosina), mTOR¹¹ (rapamicina, RAD001), p38¹² (SCIOS469), MEK¹³ (AZD-6244) o inhibidores de HSP¹⁴ (*heat shock proteins*) (alvespimicina, tanespimicina).

Muchas de estas proteínas también son susceptibles de modificaciones postraduccionales por fosforilación, metilación o acetilación. El empleo de inhibidores de la actividad tirosina quinasa de algunos receptores como FGFR3¹⁵ (PD173074, CHIR-258), IGF-IR¹⁶ (AEW541, ADW742), c-KIT¹⁷ (dasatinib, imatinib) o VEGF¹⁸ (pazopanib, bevacizumab); o de agentes desmetilantes¹⁹, como 5-azacitidina, y de in-

hibidores de desacetilasas²⁰, como LBH589 o SAHA, son capaces de desencadenar los mecanismos de muerte celular y podrían ser de gran utilidad en el tratamiento del cáncer.

Modelo de investigación “metodología de estudio de nuevos fármacos”

Estudio de la eficacia in vitro en líneas celulares

Para determinar la eficacia y potencia de la nueva droga, en primer lugar se realizan ensayos de dosis y tiempo respuesta mediante la técnica del MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-dipheniltetrazolium bromide) en diferentes líneas celulares. Este método colorimétrico mide cuantitativamente la actividad metabólica de las células viables. Las líneas celulares utilizadas son representativas de cada patología e incluyen tanto líneas sensibles como resistentes a los tratamientos clásicos. Este estudio permite comparar los valores de las concentraciones inhibitorias al 50% (IC₅₀) para cada fármaco en los distintos tipos celulares.

Análisis del efecto en células procedentes de pacientes

Una vez comprobado que el fármaco es eficaz en líneas celulares, se evalúa su efecto en células procedentes de pacientes obtenidas tanto en el momento del diagnóstico como en situación de enfermedad refractaria.

Mediante citometría de flujo se realiza un marcaje multiparamétrico, que permite la medida simultánea del porcentaje de muerte celular, a través de marcaje con anexina V, y la identificación de las diferentes poblaciones celulares con marcadores específicos de membrana en la misma muestra. Esta técnica permite analizar por separado la eficacia del agente en estudio sobre la población tumoral del paciente y la toxicidad de dicho fármaco sobre las células no tumorales residuales (linfocitos y granulomonocitos).

Optimización combinaciones

El tratamiento oncológico habitual se basa en la combinación de diferentes quimioterápicos; por ello, es muy importante evaluar si el nuevo agente es capaz de potenciar la acción de fármacos clásicamente utilizados en las diferentes enfermedades. El efecto individual inicialmente descrito es clave para determinar los parámetros de dosis y tiempo en las combinaciones dobles y triples. Estas combinaciones se investi-

gan tanto en líneas sensibles como resistentes, y su potencial sinergismo se analiza con el programa Calculusyn, que en función de índice de combinación (CI) calculado en base a la eficacia individual determina si el efecto es sinérgico, aditivo o antagonístico.

Mecanismo de acción

Existe una marcada tendencia hacia el uso de combinaciones de agentes con diferentes mecanismos de acción. Por este motivo es imprescindible describir el mecanismo de acción de cada nuevo fármaco para buscar aquellas combinaciones óptimas que permitan alcanzar una máxima eficacia con una menor dosis y, por tanto, con menor toxicidad. Para evaluar el efecto que tiene el tratamiento en las diferentes vías de señalización se utilizan numerosas técnicas que incluyen desde los arrays genómicos hasta los estudios funcionales.

Los fármacos pueden afectar a la viabilidad celular mediante el bloqueo del ciclo celular o por inducción de apoptosis. Para diferenciar entre ambos procesos, se examinan mediante citometría de flujo los perfiles de apoptosis y ciclo celular en las células tratadas. Este análisis determina el efecto de la droga, el tipo de muerte celular y la fase del ciclo donde se detienen las células.

El empleo de microarrays de ARN permite, de una forma rápida y reproducible, la identificación de un elevado número de genes cuya expresión se modifica tras la exposición al fármaco. Los arrays de expresión también han acelerado el descubrimiento de marcadores moleculares de utilidad en medicina clínica. En el campo de la farmacogenómica, nuestro objetivo es identificar genes singulares que son desregulados por el fármaco motivo de investigación. Dichos genes podrían ayudar a entender el mecanismo de acción del fármaco y a abrir nuevas vías de intervención terapéutica.

Para profundizar en el mecanismo de acción, se realizan estudios bioquímicos más específicos, como Western blot, con el que se detectan cambios en los niveles de proteínas implicadas en las distintas fases del ciclo celular alteradas, como p21, p27, p53, p16, Rb CDK4, CDK6 o diferentes ciclinas. También se analiza la expresión de proteínas implicadas en apoptosis, entre las que se incluyen: PARP, caspasas 3, 7, 8, 9, factores antiapoptóticos como Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, IAP o factores proapoptóticos: Bad, Bak, Bim, Bid. Esta técnica también permite comprobar la liberación y transporte de diversos factores apoptóticos que regulan los procesos de muerte celular desde diferentes orgánulos hasta el núcleo, e identificar mediante anticuerpos específicos las vías de señalización que se activan o se inhiben tras el tratamiento.

Una vez definidas las dianas moleculares del nuevo compuesto, la realización de ensayos funcionales, como la inducción o represión de genes mediante el uso de vectores retrovirales, dominantes negativos o ARN de interferencia, delinearán con mayor precisión el mecanismo de acción.

Modelo in vivo

Los modelos animales son cruciales en el desarrollo de nuevos fármacos antitumorales. La generación de modelos que repliquen de manera más próxima el comportamiento clínico de las distintas neoplasias es esencial para potenciar la capacidad traslacional en oncología.

Los fármacos con mejores resultados *in vitro* y que tengan posibilidades de ser llevados a la clínica serán analizados en el modelo animal con los siguientes objetivos: 1) análisis de la eficacia del fármaco *in vivo* mediante el estudio de la reducción de la masa tumoral y mediante un análisis de supervivencia de animales tratados frente a controles; 2) determinación de parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos que orienten en las dosis y esquemas de tratamiento que se deben utilizar en la clínica; 3) estudio de la toxicidad del fármaco; y 4) análisis del mecanismo de acción en el animal para corroborar los resultados obtenidos en los estudios *in vitro*.

Ensayos en fase I/II

Una vez identificado un fármaco como eficaz tanto *in vitro* como *in vivo*, y con un perfil de toxicidad aceptable en el modelo animal, se promueven los ensayos de fases I y II. El objetivo inicial es la seguridad, y por ello los ensayos en fase I se centran en identificar la dosis máxima tolerable y el perfil de toxicidad, estando generalmente abiertos a distintas patologías. Una vez superada esta prueba se ponen en marcha ensayos en fase II, en los que el objetivo pasa a ser la eficacia antitumoral. Se debe insistir en la importancia de estimular a los médicos y a los pacientes para la participación en ensayos en fase I/II. Sin ellos, ninguno de los nuevos fármacos estarían disponibles y seríamos todos responsables de "acortar" la vida de nuestros pacientes. España, por desgracia, es generalmente un país de consumo y no de generación del conocimiento.

Conclusiones

La combinación entre la investigación preclínica y clínica es la llave que mejor conduce al éxito en la terapéutica oncológica. La aparición de nuevos fárma-

cos está cambiando las perspectivas del tratamiento de los procesos neoplásicos, permitiendo la curación de algunas enfermedades, la cronificación de otras y abriendo una puerta de esperanza en las restantes.

Bibliografía

1. Malumbres M, Hunt SL, Sotillo R, et al. Driving the cell cycle to cancer. *Adv Exp Med Biol* 2003; 532: 1-11.
2. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999; 13: 1501-12.
3. Besson A, Dowdy SF, Roberts JM. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell* 2008; 14: 159-69.
4. Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssiere JL, Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J* 1995; 9: 1277-87.
5. Greaney P, Nahimana A, Lagopoulos L, et al. A Fas agonist induces high levels of apoptosis in haematological malignancies. *Leuk Res* 2006; 30: 415-26.
6. Mitsiades CS, Treon SP, Mitsiades N, et al. TRAIL/Apo2L ligand selectively induces apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood* 2001; 98: 795-804.
7. Papadopoulos K. Targeting the Bcl-2 family in cancer therapy. *Semin Oncol* 2006; 33: 449-56.
8. Kuhn DJ, Chen Q, Voorhees PM, et al. Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma. *Blood* 2007; 110: 3281-90.
9. Neri P, Tassone P, Shammas M, et al. Biological pathways and in vivo antitumor activity induced by Atiprimod in myeloma. *Leukemia* 2007; 21: 2519-26.
10. Hideshima T, Catley L, Yasui H, et al. Perifosine, an oral bioactive novel alkylphospholipid, inhibits Akt and induces in vitro and in vivo cytotoxicity in human multiple myeloma cells. *Blood* 2006; 107: 4053-62.
11. Ikezoe T, Nishioka C, Tasaka T, et al. The antitumor effects of sunitinib (formerly SU11248) against a variety of human hematologic malignancies: enhancement of growth inhibition via inhibition of mammalian target of rapamycin signaling. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 2522-30.
12. Navas TA, Nguyen AN, Hideshima T, et al. Inhibition of p38alpha MAPK enhances proteasome inhibitor-induced apoptosis of myeloma cells by modulating Hsp27, Bcl-X(L), Mcl-1 and p53 levels in vitro and inhibits tumor growth in vivo. *Leukemia* 2006; 20: 1017-27.
13. Tai YT, Fulciniti M, Hideshima T, et al. Targeting MEK induces myeloma-cell cytotoxicity and inhibits osteoclastogenesis. *Blood* 2007; 110: 1656-63.
14. Davenport EL, Moore HE, Dunlop AS, et al. Heat shock protein inhibition is associated with activation of the unfolded protein response pathway in myeloma plasma cells. *Blood* 2007; 110: 2641-9.
15. Trudel S, Li ZH, Wei E, et al. CHIR-258, a novel, multitargeted tyrosine kinase inhibitor for the potential treatment of t(4;14) multiple myeloma. *Blood* 2005; 105: 2941-8.
16. Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, et al. Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies, and solid tumors. *Cancer Cell* 2004; 5: 221-30.
17. Pandiella A, Carvajal-Vergara X, Tabera S, et al. Imatinib mesylate (STI571) inhibits multiple myeloma cell proliferation and potentiates the effect of common antimyeloma agents. *Br J Haematol* 2003; 123: 858-68.
18. Podar K, Catley LP, Tai YT, et al. GW654652, the pan-inhibitor of VEGF receptors, blocks the growth and migration of multiple myeloma cells in the bone marrow microenvironment. *Blood* 2004; 103: 3474-9.
19. Kihlslinger JE, Godley LA. The use of hypomethylating agents in the treatment of hematologic malignancies. *Leuk Lymphoma* 2007; 48: 1676-95.
20. Maiso P, Carvajal-Vergara X, Ocio EM, et al. The histone deacetylase inhibitor LBH589 is a potent antimyeloma agent that overcomes drug resistance. *Cancer Res* 2006; 66: 5781-9.

CASOS CLÍNICOS

COORDINADORES: E. LUÑO. *Oviedo*
M.L. PÉREZ-SIRVENT. *Valencia*

Caso 1

MASTOCITOSIS SISTÉMICA AGRESIVA ASOCIADA A SMD/SMPC Y MIELOMA MÚLTIPLE

L. FLORENSA^{1,2}, L. ARENILLAS^{1,2}, A. FERRER^{1,2}, E. PÉREZ-VILA^{1,2}, C. PEDRO³, E. GIMENO³, C. TEODÓSIO⁴, M. JARA⁴, A. RASILLO⁴, S. WOESSNER², A. ORFAO⁴

¹ Laboratori de Citologia Hematològica.

Servei de Patologia. ² Escola de Citologia Hematològica Soledad Woessner. Servei de Hematologia.

Hospital del Mar. Barcelona. ⁴ Servicio de Citometría.

Hospital Clínico de Salamanca

Historia clínica. Paciente varón de 82 años de edad que ingresó en mayo de 2008 para estudio de ascitis. Presentaba un síndrome tóxico y diarrea sin productos patológicos de 4 meses de evolución.

Antecedentes personales. Vitíligo. Leucemia mielomonocítica crónica variante displásica (FAB)/tipo 1 (OMS) y mieloma múltiple no secretor diagnosticados en 1998, motivo por el que seguía controles en nuestro centro.

Exploración física. Ascitis a tensión. Hepatoesplenomegalia. El resto de la exploración no mostró hallazgos destacables.

Exploraciones complementarias:

Hemograma: Hb: 12,8 g/dL; VCM: 110,9 fL; leucocitos: $16,83 \times 10^9/L$; plaquetas: $149 \times 10^9/L$. Fórmula leucocitaria: 71% neutrófilos polisegmentados, 4% eosinófilos, 9% linfocitos, 16% monocitos (cifra total: $2,5 \times 10^9/L$). Rasgos de dismielopoyesis: anisopoiquilocitosis, macrocitos, cuerpos de Howell-Jolly, plaquetas desgranuladas, neutrófilos con desgranulación e hiposegmentación, monocitos asincrónicos (Figuras 1 y 2).

Bioquímica: perfil hepático normal; creatinina: 1,45 mg/dL; β_2 -microglobulina: 5,66 mg/L; proteínas totales: 5,0 g/L; albúmina: 26 g/L. No se demostró banda monoclonal por electroforesis ni inmunofijación en suero y orina. Triptasa sérica: > 200 ng/mL (normal < 13 ng/mL).

Hemostasia: tasa de protrombina: 51%, sin otros hallazgos patológicos.

Serologías víricas: VHB, VHC y VIH negativos.

Ecografía abdominal: hígado de contorno irregular sugestivo de hepatopatía crónica con ecoestructura conservada sin lesiones focales. Esplenomegalia homogénea de 15 cm. Ascitis. Derrame pleural izquierdo.

Mielograma: celularidad abundante con abundantes megacariocitos en todos los estadios madurativos. Rasgos de dismegacariopoyesis en < 10% de los

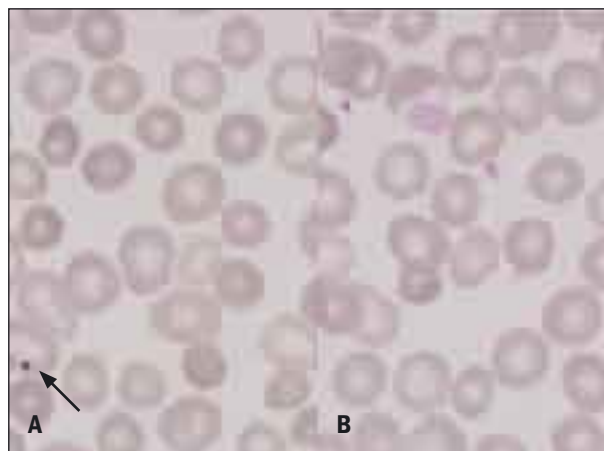


Figura 1. Frotis de sangre periférica. A: Se observa hematíes macrocíticos, uno de ellos con un cuerpo de H. Jolly. B: Plaqueta desgranulada (May-Grünwald-Giemsa).

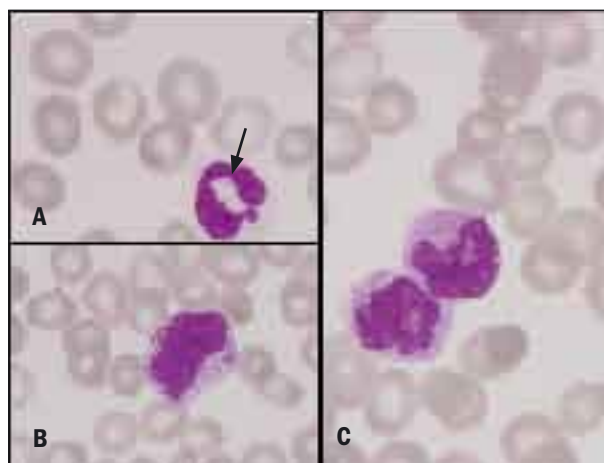


Figura 2. Frotis de sangre periférica. A: Se observa un neutrófilo hipogranulado con un bolsillo nuclear (flecha). B: Mielocito. C: Dos monocitos asincrónicos (May-Grünwald-Giemsa).

elementos (núcleos dispersos). Serie eritroblástica del 14%, en todos los estadios madurativos y con rasgos de diseritropoyesis: asincronismo madurativo. Serie granulopoyética del 47% en todos los estadios madurativos con rasgos de disgranulopoyesis en el 43% de los elementos (hipogranulación, desgranulación e hiposegmentación). Se observan un 2% de blastos de tipo I, un 9% de linfocitos y un 19% de células plasmáticas con marcadas atipias: anisocitosis, pérdida de excentricidad nuclear y arcoplasma, multinuclearidad, alguna célula flameada. Se observaron además células plasmáticas con eritrofagocitosis. Sistema mononuclear fagocítico abundante con promonocitos (4%) y monocitos (7%). Presencia de abundantes mastocitos aislados y formando agregados de 3 o más células, con

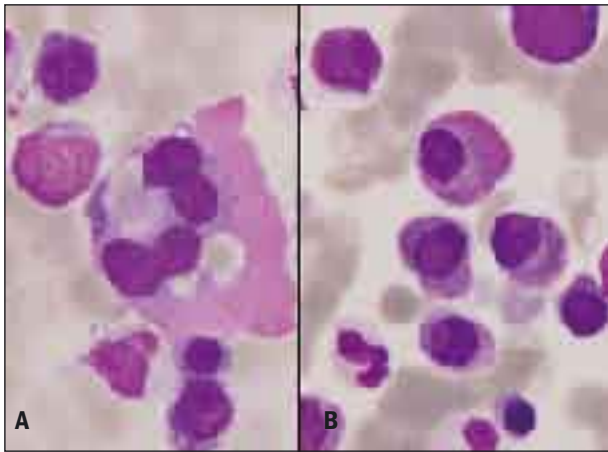


Figura 3. Frotis de médula ósea. A: Célula plasmática de gran tamaño, flameada, multinucleada y con eritrofagocitosis. B: células plasmáticas de distintos tamaños, una de ellas flameada (May-Grünwald-Giemsa).

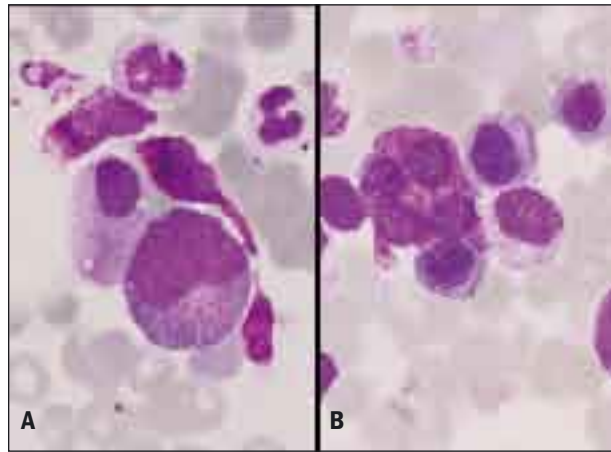


Figura 4. Frotis de médula ósea con una célula plasmática y dos mastocitos. B: Dos células plasmáticas y un mastocito con 4 núcleos (May-Grünwald-Giemsa).

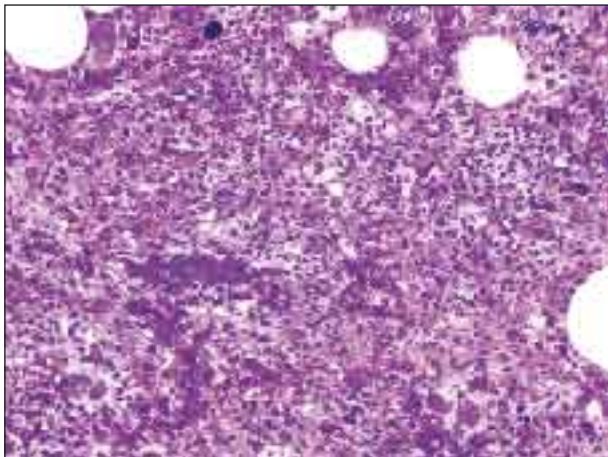


Figura 5. Corte histológico de medula ósea. Se observan agregados de mastocitos (Giemsa).

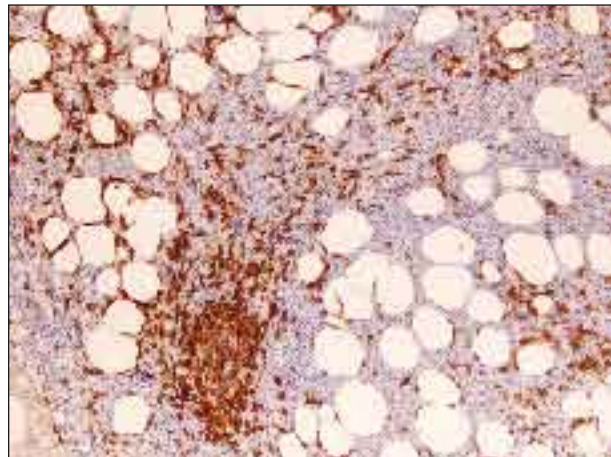


Figura 6. Corte histológico de medula ósea. Se observan agregados de mastocitos positivos para c-kit (PAP).

marcadas atipias (hipo y desgranulación; elementos con 2 o más núcleos). Tinción de Perls: hierro macrofágico abundante y 46% de sideroblastos de tipo I y II (Figuras 3 y 4).

Biopsia de médula ósea: se observó una médula ósea hiper celular con presencia de las distintas series hematopoyéticas e incremento de las células plasmáticas, en las que no se pudo demostrar la expresión de cadenas ligeras de inmunoglobulinas. Las tinciones de hematoxilina-eosina y Giemsa, y el estudio de c-KIT por inmunohistoquímica pusieron de manifiesto la presencia de múltiples focos de mastocitos atípicos de localización para e intertrabecular (15-20% de celularidad medular global). Se detectó un aumento de la trama de reticulina en estas zonas (Figuras 5 y 6).

Inmunofenotipo de médula ósea: se detectó un 5,3% de mastocitos (CD117++/CD45++/CD203c+débil) con características de célula inmadura (bajo tamaño y complejidad interna por características de dispersión de luz, CD203c+débil, cyB12+débil, cyG4+débil/++het [ambos clones evalúan triptasa total], CD123+) y fenotipo aberrante (CD25++). Asimismo, se detectó la presencia en el aspirado medular de un 4,7% de células plasmáticas (CD38++) con fenotipo aberrante (CD45-, CD19-, CD56+/++het) en todas ellas. Además, se observó la presencia de un 0,76% de células inmaduras (CD34 y/o CD117, CD45+), el 58% de las cuales eran CD34+. Fenotípicamente estas células se dividían entre precursores de serie granulocito-neutrófilo (19%), serie eritroide (41%) y mastocito

(3%). El resto de los precursores CD34+ (37%) exhibían características fenotípicas de célula precursora indiferenciada. Las células inmaduras granulocíticas CD34+ mostraban asincronismo en la adquisición de cyMPO y CD15.

Dentro de los demás compartimentos medulares de células maduras se observó un 5,3% de eosinófilos, con características de célula madura (CD34-, CD45++, CD117-, CD64-), aunque hipogranulares (baja complejidad interna por características de dispersión de luz - SSC) y con expresión heterogénea de cytPeroxidasa de eosinófilo (ePO). La serie de granulocito-neutrófilo CD34- representaba el 55% de la celularidad global con patrón de maduración alterado para CD11b y CD13 (expresión anormalmente elevada de CD13 en metamielocito y expresión débil de CD11b en metamielocito y neutrófilo cayado/maduro). La expresión anormalmente débil para CD11b se detectaba también al nivel de la serie monocítica, que representaba el 5,0% de la celularidad total. Se detectó un 12% de precursores eritroides CD34- con anomalías fenotípicas, destacando expresión parcialmente positiva y heterogénea de CD36 y CD71 (positivos únicamente en el 80% y el 70% de los precursores eritroides CD34- respectivamente).

Inmunofenotipo de sangre periférica: se detectó la presencia de un 0,4% de mastocitos con fenotipo aberrante similar al detectado en médula ósea.

Cariotipo: 46,XY [20].

FISH: se realizó separación celular y se aplicaron las sondas dirigidas a las regiones cromosómicas 7q31, 5q3, 20q12 y 13q14, los centrómeros de los cromosomas 8 e Y, y para la t(11;14). En los granulocitos, neutrófilos, eosinófilos, precursores eritroides y en las células CD34+ se observó una proporción variable de células con trisomía 8, siendo los monocitos, negativos para esta alteración cromosómica. En las células plasmáticas se demostró la presencia de t(11;14), asociada en el 92% de estas células a la presencia de una sola copia del gen Rb1.

Biología molecular: se detectó la mutación D816V (A7176T) de c-KIT en mastocitos, células CD34+, serie eritroide, neutrófilos, eosinófilos, monocitos, linfocitos y células plasmáticas. Asimismo, se demostró la presencia de esta mutación a nivel del ADN purificado a partir de mucosa bucal. El estudio de la mutación JAK2 V617F en sangre periférica fue negativo.

Biopsia hepática: se objetivó una marcada expansión portal y periportal con reacción ductal y fibrosis provocada por la infiltración por mastocitos (c-kit positivos) que se localizaban alrededor de los conductos biliares, centrolobulillares y de la rama venosa portal, y producían una marcada reducción de su luz.

Biopsia colónica: mostró infiltración parcheada por mastocitos (c-kit positivos).

Diagnóstico. Mastocitosis sistémica de tipo mastocitosis sistémica asociada a hemopatía clonal mielóide (SMD/SMP de tipo LMMC) y linfóide (mieloma múltiple).

Evolución. A su ingreso requirió paracentesis evacuadoras cada 4 o 5 días. Una vez realizado el diagnóstico de mastocitosis sistémica, se inició tratamiento con hidroxurea, prednisona, cromoglicato disódico y ácido zoledrónico, con lo que presentó buena evolución, con mejoría del estado general y desaparición de la ascitis.

Discusión. La mastocitosis es una enfermedad heterogénea incluida dentro de los síndromes mieloproliferativos crónicos en la clasificación de la OMS, y caracterizada por la acumulación de mastocitos en uno o varios órganos. Su expresividad clínica es variable, con casos prácticamente asintomáticos junto a otros muy agresivos. La sintomatología se produce como consecuencia de la infiltración orgánica por los mastocitos patológicos y/o por liberación aguda o crónica de los mediadores que éstos contienen.

Según los criterios de la OMS, la mastocitosis se clasifica en tres grupos:

a) Mastocitosis cutánea.

b) Mastocitosis sistémica, que incluye la mastocitosis sistémica indolente, la mastocitosis asociada a otra hemopatía clonal, la mastocitosis sistémica agresiva y la leucemia de mastocitos y el sarcoma de mastocitos.

c) Mastocitosis extracutánea.

La mastocitosis cutánea es una de las variantes clínicas más frecuentes de mastocitosis en la infancia y suele tener un curso clínico benigno, en forma de urticaria pigmentosa; con frecuencia suele regresar de forma espontánea en la pubertad.

La mastocitosis sistémica aparece generalmente en la edad adulta y suele tener un curso clínico más agresivo. Los órganos más frecuentemente afectados son la médula ósea, piel, hígado, intestino, pulmón y hueso.

Los criterios diagnósticos que definen la mastocitosis sistémica están recogidos en la Tabla 1.

Los mastocitos atípicos presentan una morfología fusiforme, citoplasma amplio e hipogranular y un núcleo lobulado, de cromatina poco condensada y que puede mostrar pequeños nucleolos. En ocasiones, se observa bi o multinuclearidad. Los mastocitos ofrecen metacromasia con la tinción de azul de toluidina a pH alcalino y son positivos para la cloacetato esterasa y la ϵ -amino-caproato-esterasa. La infiltración en médula ósea no suele superar el 20% de la totalidad celular. Al igual que los mastocitos normales, los mastocitos neoplásicos expresan CD117 de forma elevada, aunque se diferencian de los primeros en que presentan expresión aberrante de un amplio abanico de marcadores, de los que CD25

Tabla 1. Criterios diagnósticos de la mastocitosis según la OMS

Criterios diagnósticos*	
Mayores	
Presencia de agregados de mastocitos (> 15 mastocitos) en la biopsia de médula ósea o en otros tejidos	
Menores	
· > 25% de mastocitos con morfología anormal en la extensión de médula ósea	
· Expresión de los antígenos CD25 y/o CD2 por citometría de flujo	
· Triptasa sérica > 20 ng/mL (no válido si existe una hemopatía mieloide asociada)	
· Presencia de mutación activante de c-KIT en los mastocitos de médula ósea u otro tejido	

* Se establecerá el diagnóstico de mastocitosis sistémica si se cumplen 1 criterio mayor y 2 menores o 3 criterios menores.

y CD2 resultan particularmente útiles para su identificación.

La mayoría de los pacientes con mastocitosis sistémica presentan mutaciones de c-KIT, protooncogén que codifica un receptor tirosina quinasa, cuyo ligando es el del *stem cell factor* (SCF) o factor de crecimiento del mastocito. La mutación más frecuente en adultos es la mutación D816V, que provoca una activación espontánea de c-KIT.

Nuestro paciente cumplía desde hacía 10 años criterios diagnósticos de dos hemopatías malignas: por un lado, una leucemia mielomonocítica crónica (monocitosis persistente > $1 \times 10^9/L$, rasgos displásicos en las distintas series mieloides y trisomía 8) y un mieloma múltiple no secretor: infiltración medular por > 10% de células plasmáticas dismórficas, inmunofenotipo anómalo y t(11;14)(q13;q32). Ambas entidades se han mantenido durante estos años sin cambios clínicos ni morfológicos. Más recientemente, a raíz del estudio de ascitis, ha sido diagnosticado de una mastocitosis sistémica con infiltración de médula ósea, hígado y colon. Todo ello permite establecer el diagnóstico de mastocitosis sistémica agresiva asociada a dos hemopatías clonales, situación no comunicada en las revisiones bibliográficas hasta el momento.

La afectación hepática se produce en el 70% de los casos; sin embargo, sólo una minoría de ellos desarrollan hipertensión portal y ascitis. La mayoría de los pacientes no presentan cirrosis pero pueden desarrollar hipertensión portal, venopatía portal o enfermedad venooclusiva. La presentación de ascitis es un factor clínico de mal pronóstico.

El porcentaje de mastocitosis sistémicas asociadas a una hemopatía es muy variable en las series publicadas (4-20%). El pronóstico de las mastocitosis sistémicas asociadas a hemopatía clonal depende básicamente del correspondiente a la hemopatía

acompañante. Generalmente, se asocian a neoplasias de origen mieloide, como leucemias agudas mieloides, síndromes mieloproliferativos y síndromes mielodisplásicos, fundamentalmente la LMMC, como en nuestro caso. Con mucha menos frecuencia, también se han descrito casos de mastocitosis sistémica asociados a procesos linfoproliferativos o discrasias de células plasmáticas. Los mastocitos son una fuente de múltiples citoquinas, como IL-1, IL-3, IL-6 y SCF, que pueden producir una proliferación reactiva de células plasmáticas. Sin embargo, se han comunicado varios casos en los que la proliferación de células plasmáticas es clonal.

En nuestro caso, junto a la demostración de la clonalidad de las células plasmáticas mediante inmunofenotipo y citogenética, hemos encontrado la mutación de c-KIT en esta población. Estos datos apuntan a un origen común de las células plasmáticas y la población mieloide (neutrófilo, eosinófilo, monocito y eritroblasto). Además, se detectó la mutación de c-KIT en las células de la mucosa bucal, lo que demuestra que ésta ya se produce en células germinales.

Recordar que:

1. La presencia de mastocitos con hipo y desgranulación en los frotis de médula ósea obliga a descartar el diagnóstico de mastocitosis.
2. Para el diagnóstico de la mastocitosis sistémica se aconseja, además del estudio morfológico, el inmunofenotipo de los mastocitos, el estudio de la mutación de c-KIT y la dosificación de triptasa sérica.
3. La mastocitosis sistémica se puede asociar a otras hemopatías, tanto mieloides como linfoides.

Bibliografía

- De la Hoz B, González de Olano D, Álvarez I, Sánchez L, Núñez R, Sánchez I, Escribano L. Guidelines for the diagnosis, treatment and management of mastocytosis. *An Sist Sanit Navar* 2008; 31 (1): 11-32.
- Donker ML, van Doornaal JJ, van Doornaal FF, Kluij PM, van der Veer E, de Monchy JG, et al. Biochemical markers predictive for bone marrow involvement in systemic mastocytosis. *Haematologica* 2008; 93 (1): 120-3.
- Escribano L, García Montero AC, Núñez R, Orfao A; Red Española de Mastocitosis. Flow cytometric analysis of normal and neoplastic mast cells: role in diagnosis and follow-up of mast cell disease. *Immunol Allergy Clin North Am* 2006; 26 (3): 535-47. Review.
- García-Montero AC, Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sánchez ML, Núñez R, Prados A, et al. KIT mutation in mast cells and other bone marrow hematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood* 2006; 108 (7): 2366-72.
- Hauswirth AW, Födinger M, Fritz M, Müllauer L, Simonitsch-Klupp I, Streubel B, et al. Indolent systemic mastocytosis as-

sociated with atypical small lymphocytic lymphoma: a rare form of concomitant lymphoproliferative disease. *Hum Pathol* 2008; 39 (6): 917-24.

Lanternier F, Cohen-Akenine A, Palmerini F, Feger F, Yang Y, Zermati Y, et al.; AFIRMM network. Phenotypic and genotypic characteristics of mastocytosis according to the age of onset. *PLoS ONE* 2008; 3 (4): e1906.

Lim KH, Pardanani A, Tefferi A. KIT and mastocytosis. *Acta Haematol* 2008; 119 (4): 194-8.

Orfao A, García-Montero AC, Sánchez L, Escribano L; REMA. Recent advances in the understanding of mastocytosis: the role of KIT mutations. *Br J Haematol* 2007; 138 (1): 12-30. Review.

Pullarkat ST, Sedarat F, Paquette R, Said J. Systemic mastocytosis with plasma cell dyscrasia: report of a case. *Leuk Res* 2008; 32 (7): 1160-3.

Sotlar K, Bache A, Stellmacher F, Bültmann B, Valent P, Horny HP. Systemic mastocytosis associated with chronic idiopathic myelofibrosis: a distinct subtype of systemic mastocytosis associated with a [corrected] clonal hematological non-mast [corrected] cell lineage disorder carrying the activating point mutations KITD816V and JAK2V617F. *J Mol Diagn* 2008; 10 (1): 58-66. Epub 2007 Dec 28. Erratum in: *J Mol Diagn* 2009; 10 (3): 276.

Takemoto CM, Lee YN, Jegga AG, Zablocki D, Brandal S, Shahlæe A, et al. Mast cell transcriptional networks. *Blood Cells Mol Dis* 2008; 41 (1): 82-90.

Tefferi A, Verstovsek S, Pardanani A. How we diagnose and treat WHO-defined systemic mastocytosis in adults. *Haematologica* 2008; 93 (1): 6-9.

Valent P, Akin C, Escribano L, Födinger M, Hartmann K, Brockow K, et al. Standards and standardization in mastocytosis: consensus statements on diagnostics, treatment recommendations and response criteria. *Eur J Clin Invest* 2007; 37 (6): 435-53. Review.

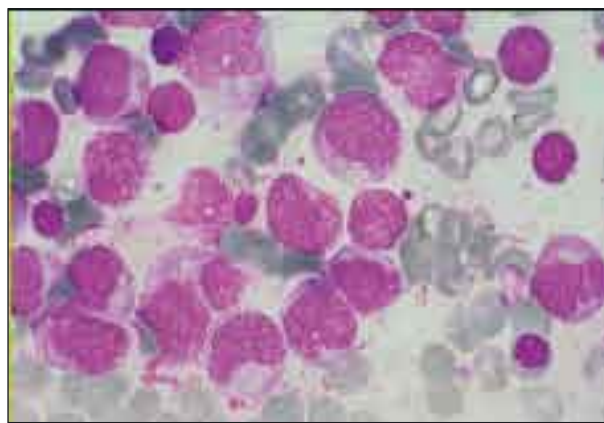


Figura 1. Aspirado de médula ósea (MGG \times 1.000). Promielocitos atípicos con astillas (*fagot cells*).

Caso 2

MUJER DE 48 AÑOS CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE Y LEUCEMIA AGUDA

M. MAS ESTEVE, J. MARCO BUADES,
R. GARCÍA BOYERO, E. DONATO MARTÍN,
E. BARRAGÁN, M.C. MAS OCHOA,
A. ESCOLÁ RIVAS, E. HERRERA DE PABLO,
P. MARTÍNEZ PONS, I. GARCÍA NAVARRO,
T. GOZALBO, M. GUINOT,
G. CAÑIGRAL FERRANDO

Servicio de Hematología. Hospital General de Castellón. Club Valenciano de Citología Hematológica

Motivo de consulta: Mujer de 48 años con antecedentes personales de hipertensión arterial y esclerosis múltiple (EM) diagnosticada en 1996 y en tratamiento actual con mitoxantrona 10 mg/m² subcutánea cada 3 meses durante 18 meses. Los parámetros hematológicos previos no mostraban alteraciones.

La paciente consulta por fiebre, hematomas espontáneos y epistaxis de reciente aparición.

Exploración física: Hematomas en tronco y extremidades, ausencia de esplenomegalia y adenopatías. ECOG 3.

Pruebas complementarias: *Hemograma:* leucocitos: 10,19 \times 10⁹/L (blastos: 82%; promielocitos atípicos: 10%), Hb: 110 g/L; plaquetas: 12 \times 10⁹/L. *Coagulación:* IQ: 84%; ratio cefalina: 0,87; fibrinógeno: 225; dímero D: 521 ng/mL. *Bioquímica:* urea: 14 mg/dL; creatinina: 0,64 mg/dL; bilirrubina total: 0,70 mg/dL; GOT: 16 UI/L; GPT: 21 UI/L; LDH: 469UI/L. *Serología virus:* VHB, VHC y VIH negativos.

Frotis de sangre periférica: presencia de células blásticas de tamaño mediano, núcleo convoluto, granulación azurófila abundante con formación de astillas en el citoplasma, e intensa clasmotosis (Figura 1). *Aspirado de médula ósea:* el aspirado medular fue dificultoso por la hipercoagulabilidad. Presenta una médula ósea hipocelular, con ausencia de serie mieloide y eritroide, y disminución de la serie megacariocítica. Se observan blastos de mediano tamaño e intensa clasmotosis, de núcleo convoluto y hendido, con nucleolo visible. Presencia de promielocitos atípicos, hipergranulares y con inclusiones citoplasmáticas en forma de astillas en empalizada (*fagot cells*) (Figura 2). *Citoquímica:* mieloperoxidasa: 100%. Intensamente positiva en mazacotes. Negro Sudán: 100%. Positivo intenso. ANAE: negativo. PAS: 80%. Positivo difuso. Fosfatasa ácida: negativa. *Estudio inmunofenotípico de médula ósea:* se analiza la población considerada patológica localizada por FW-Sc y RT-Sc en el área monocitaria. Dicha población representa el 86% de la celularidad total, y es CD34++, CD45+, CD117+, CD33++, CD13++, CD64+, MPO++, HLA-DR-, CD4- y CD14-. Anti-PML (PGM3) por inmunofluorescencia indirecta: mostró un patrón de positividad

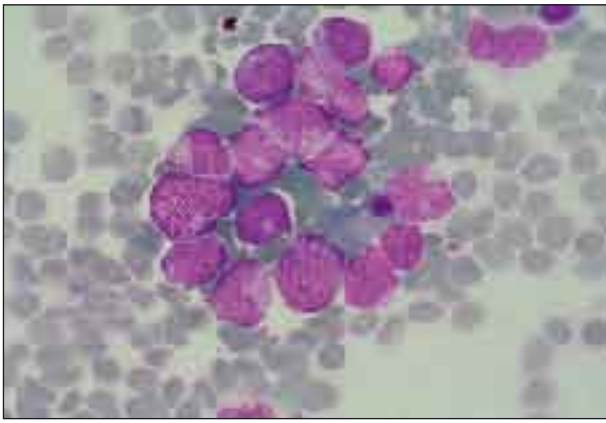


Figura 2. Aspirado de médula ósea (MGG \times 1.000). Promielocito hipergranular.



Figura 3. Citogenética convencional al diagnóstico: 46,XX, t(9;22)(q34;q11), t(15;17)(q22;q21)[14]/46,XX [6].

nuclear en múltiples gránulos finos (> 25), característico de leucemia promielocítica aguda. *FISH*: se utilizó la sonda LSI PML/RAR- α Dual Color Dual Fusion y se detectó la presencia del gen de fusión PML/RAR- α en el 80% de los núcleos analizados. *Biología molecular*: PML/RAR- α positivo (tipo BCR3, con una ratio de 379.304×10^4). El reordenamiento para WT1 presenta una hiperexpresión (ratio de 62.775×10^4). FLT3/D835 y FLT3/ITD negativos.

Diagnóstico: Leucemia promielocítica aguda, LAM con t(15;17)(q22;q21); (PML/RAR- α), variante clásica hipergranular (Organización Mundial de la Salud).

Evolución: Se inició tratamiento según protocolo PHETEMA LPA-2005. Destaca durante todo el periodo de tratamiento y aplasia una actitud depresiva de la paciente, negativa y con nula colaboración, que dificultó sobremedida el manejo de situaciones básicas como la higiene personal, así como el control de constantes, peso o diuresis. Tras varios días de síndrome febril, melenas y disminución del nivel de conciencia, la paciente entra en un cuadro de obnubilación sin focalidad neurológica y fallece de forma súbita durante el sueño. La familia denegó la autopsia y no fue posible realizar pruebas de imagen.

A las 8 semanas de haber iniciado el tratamiento se informa el estudio citogenético convencional, que muestra la presencia de dos líneas celulares: una mayoritaria, que supone el 70% de la población con fórmula cromosómica 46,XX, t(9;22)(q34;q11), t(15;17)(q22;q21), y otra minoritaria, que supone el 30% de la población con una fórmula cromosómica 46,XX (Figura 3).

En ese momento completamos el estudio de FISH con la sonda LSI t(9;22) BCR/ABL Dual Color Dual Fusion y se detectó la presencia en el 80% de los núcleos estudiados del gen de fusión BCR/ABL. Se am-

plió el estudio de biología molecular y se analizó el reordenamiento BCR/ABL, siendo positivo con una ratio de $4.390,244 \times 10^4$.

Conclusión: La EM se caracteriza por inflamación crónica y destrucción selectiva de la mielina del SNC. Se piensa que la etiología de la enfermedad es autoinmune. Se caracteriza por periodos de recaída-remisión de los síntomas neurológicos y progresión de la incapacidad a lo largo del tiempo.

La mitoxantrona es un inhibidor de la topoisomerasa II. En 2002 el Ministerio de Sanidad y Consumo aprobó la indicación para el tratamiento de la EM. Está indicado en pacientes con EM recurrente-remiteinte o secundaria progresiva con ataques intermitentes, que presenten elevada actividad clínica evidenciada por una progresiva incapacidad debida a la aparición de brotes frecuentes. Los pacientes deben haber mostrado falta de respuesta al tratamiento inmunomodulador convencional, así como signos de actividad en la exploración mediante resonancia magnética (RMN).

La LAM relacionada con un tratamiento previo puede presentarse de 2 formas:

- Precedida por un SMD de larga evolución, normalmente asociada a agentes alquilantes o radiación ionizante, y con alteraciones citogenéticas.
- Asociada a un corto periodo de latencia, inicio agudo y alteraciones citogenéticas similares a las de las leucemias *de novo*. Suele asociarse con el uso de inhibidores de la topoisomerasa II.

En los 7 casos de leucemia promielocítica aguda secundaria publicados en la bibliografía, se ha observado un tiempo de latencia desde el inicio del tratamiento con mitoxantrona hasta la aparición de la

leucemia aguda que va desde 5 meses a 5 años, con una mediana de 17,8 meses. En nuestro caso, el tiempo de latencia fue de 18 meses. El riesgo de desarrollar una LPA en pacientes con EM tratados con mitoxantrona es del 0,8% en una serie publicada de 250 pacientes. No existe en la bibliografía ningún caso publicado de leucemia promielocítica aguda con translocación BCR/ABL *de novo*. Hasta la fecha sólo se han descrito casos como crisis blásticas promielocíticas de una leucemia mieloide crónica, donde coexisten la t(15;17) y la t(9;22). En nuestro caso, el hecho de que la paciente mantuviera analíticas completamente normales y la ausencia de organomegalias hasta el diagnóstico de su leucemia nos hacen pensar que estamos ante un caso *de novo*. Es, por tanto, el primer caso publicado con ambas alteraciones, con la particularidad de ser precedido por una EM tratada con mitoxantrona.

Recordar que:

1. Es imprescindible la realización de un análisis genético amplio al diagnóstico que incluya estudios citogenéticos y moleculares de las leucemias agudas para su correcta caracterización.
2. Se debe incluir en todo protocolo diagnóstico de leucemia aguda la detección de la translocación BCR/ABL, puesto que tenemos un inhibidor específico y eficaz dirigido contra esta alteración genética.

Bibliografía

- Arruda WO, Montú MB, de Oliveira Mde S, Ramina R. Acute myeloid leukaemia induced by mitoxantrone. *Arq Neuropsiquiatr* 2005; 63: 327-9.
- Beaumont M, Sanz M, Carli PM, Maloisel F, Thomas X, Detournignies L, et al. Therapy-related acute promyelocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2003; 11: 2123-37.
- Brunning RD, Matutes E, Flandrin G, Vardiman J, Bennet J, Head D, et al. Acute myeloid leukaemias and myelodysplastic syndromes, therapy related. En: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (eds.). *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon: IARC press; 2001. p. 89-91.
- Cattaneo C, Almici C, Borlenghi E, Motta M, Rossi G. A case of acute promyelocytic leukemia following mitoxantrone treatment of multiple sclerosis. *Leukemia* 2003; 17: 986-7.
- Ledda A, Caocci G, Spinicci G, Cocco E, Mamusa E, La Nasa G. Two new cases of acute promyelocytic leukemia following mitoxantrone treatment in patients with multiple sclerosis. *Leukemia* 2006; 20: 2217-8.
- Novoselac AV, Reddy S, Sanmugarajah J. Acute promyelocytic leukemia in a patient with multiple sclerosis following treatment with mitoxantrone. *Leukemia* 2004; 18: 1561-2.
- Vicari AM, Ciceri F, Folli F, Lanzi R, Colombo B, Comi G, et al. Acute promyelocytic leukemia following mitoxantrone as single agent for the treatment of multiple sclerosis. *Leukemia* 1998; 12: 441-2.

Caso 3

PACIENTE CON BICITOPENIA, HEPATOESPLENOMEGALIA Y COMPONENTE IGM

V. PÉREZ ANDRÉU¹, M.L. LOZANO¹, M.M. OSMA¹, A. JEREZ¹,

J.J. SÁNCHEZ BLANCO¹, J. SOLA², P. GIRALDO³, F.J. ORTUÑO, V. VICENTE

¹ Servicio de Hematología y Oncología Médica. Hospital Morales Meseguer. Murcia

² Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. Murcia

³ Servicio de Hematología. Hospital Miguel Servet. Zaragoza

Motivo de consulta: Mujer de 65 años de edad que consulta en febrero de 2007 por síndrome constitucional con astenia, anorexia y pérdida de peso asociado a epistaxis y dolores óseos difusos de 4 meses de evolución.

Antecedentes patológicos: Apendicectomía a los 30 años. Diagnosticada de artritis reumatoide en su juventud por dolores osteoarticulares; no confirmada en la edad adulta. Hepatitis no catalogada en su juventud. Diagnosticada de osteoporosis por su médico de cabecera 10 años antes. Clínica de insuficiencia vascular periférica. Hipertensa irregularmente controlada; diabetes mellitus de tipo 2 controlada con dieta; reflujo gastroesofágico. Desde 7 años antes, estaba siendo controlada por el Servicio de Digestivo de otro centro por hepatopatía crónica con esplenomegalia y trombocitopenia de etiología no filiada.

Exploración física: Paciente con excelente estado general aparente. Hepatomegalia de 4 cm y esplenomegalia de 5 cm. Ningún otro hallazgo destacable.

Pruebas complementarias: *Hemograma:* leucocitos: $4,4 \times 10^9/L$ (neutrófilos: $3,2 \times 10^9/L$; linfocitos: $0,9 \times 10^9/L$; monocitos: $0,2 \times 10^9/L$); hemoglobina: 111 g/L; plaquetas: $55,0 \times 10^9/L$. *Frotis de sangre periférica:* linfocitos activados de manera aislada y fenómeno de "Rouleaux". VSG: 31 mm. *Bioquímica:* GOT: 31 UI/L; ácido úrico: 7,3 mg/dL; bilirrubina: 1,39 mg/dL; bilirrubina esterificada: 0,53 mg/dL; proteínas: 8,3 g/dL; proteinograma: gamma-globulina: 23,8%; α 1-globulina: 3,3%; α 2-globulina: 6,8%; β 1-globulina: 4,3%; β 2-globulina: 4,8%; IgM: 7,2 g/L; banda monoclonal IgM- λ en suero; ferritina: 690 ug/L; resto de los parámetros, incluyendo estudio de autoinmunidad, función tiroidea y marcadores tumorales (Ca15.3, α -fetoproteína y CEA), dentro de la normalidad. Análisis básico de orina sin hallazgos anómalos. *Serologías:* VHC, VHB y VIH 1 y

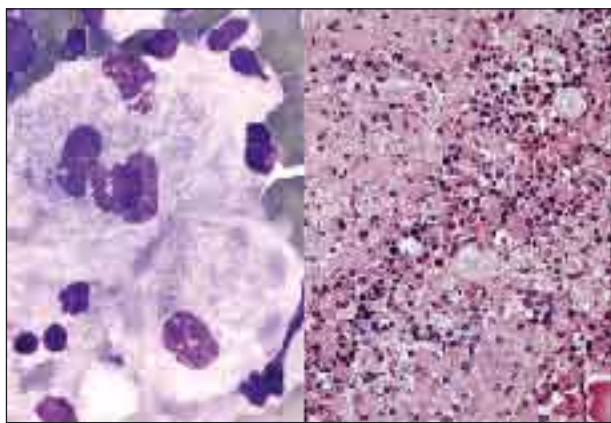


Figura 1. Izquierda: células de Gaucher en aspirado medular (May-Grünwald-Giemsa \times 1.000). Derecha: células de Gaucher en corte histológico de biopsia ósea (tricrómico de Masson \times 400).

2 negativas. *Ecografía abdominal*: hepatoesplenomegalia, lesiones focales hepáticas y esplénicas. *Tomografía computarizada abdominal*: hepatomegalia de 16 cm y esplenomegalia de 18 cm. Lesiones focales hepatoesplénicas compatibles con metástasis (la lesión esplénica de mayor tamaño de 30 mm y lesión hipodensa de 5 cm en cúpula hepática). *Resonancia magnética nuclear de columna lumbar*: hipercaptación de los cuerpos vertebrales lumbares y sacro compatible con proceso infiltrativo de médula ósea. *Seriada ósea*: múltiples lesiones líticas. *Aspirado de médula ósea*: médula hiper celular en la que se apreciaba la presencia de abundantes células anómalas de tamaño muy grande ($> 30 \mu\text{m}$), baja relación N/C y ocasionalmente binucleadas. Las cromatinas presentaban un aspecto maduro, apreciándose áreas de condensación muy desestructuradas y áreas de reticulación grosera junto a cromatinas claramente picnóticas. Los citoplasmas eran amplios y de coloración débilmente grisácea, y su contenido se ajustaba a la descripción clásica de “papel arrugado” de las células de Gaucher (Figura 1, izquierda). *Estudio inmunofenotípico en médula ósea*: el 2,5% de las células presentaban CD19+, descartándose monoclonalidad al presentar una ratio CD19+ kappa+/CD19+ lambda+ de 1,5. *Biopsia de médula ósea, hepática y esplénica*: infiltración por células de Gaucher (Figura 1, derecha), depósitos de hierro (Perls) en el rango de la normalidad. *Estudio por microscopía electrónica*: células de gran tamaño, con citoplasma repleto de inclusiones fusiformes con estructura tubular característica de la enfermedad de Gaucher (EG). *Estudio de la actividad enzimática*: β -glucosidasa ácida: 1,3 nM/mgprot/h, actividad del 10%. Quitotriosidasa: 10.696 nM/mL/h. CCL18: 2.289 ng/mL. *Análisis molecular*: gen de GBA: mutaciones N370S y R120W. Gen de quitotriosidasa *wild type*.

Diagnóstico: EG de tipo I con afectación hepática, esplénica, ósea y de médula ósea. *Score* 11 en la esca-

la Zimran (por pancitopenia, visceromegalias moderadas y enfermedad ósea avanzada).

Evolución: Se inició tratamiento enzimático sustitutivo con imiglucerasa a dosis de 49 mg/kg cada 15 días. Un año después de iniciar el tratamiento, la paciente presenta buen estado general, su cifra de plaquetas ha aumentado ($122 \times 10^9/\text{L}$), la concentración de ferritina ha descendido a 429 $\mu\text{g}/\text{L}$, y la de IgM, a 4,70 g/L, con desaparición del componente monoclonal. Una nueva RMN de columna objetiva hipointensidad de los cuerpos vertebrales dorsales, lumbares y sacro sugestivos de esclerosis/fibrosis. No ha habido cambios ecográficos en las lesiones hepática y esplénica. La concentración plasmática de CCL18 ha descendido a 1.727 ng/mL, y la actividad quitotriosidasa, a 4.347 nM/mL/h.

Discusión: La EG se origina por alteraciones del metabolismo de los esfingolípidos y se caracteriza clínicamente por hepatoesplenomegalia, afectación hematológica con anemia y trombocitopenia, y lesiones óseas con diversos grados de gravedad. Se transmite por herencia autosómica recesiva. De los datos disponibles podría inferirse una frecuencia de 1/200.000-1/400.000 en España. Su diagnóstico se basa en la identificación de las características células histiocitarias espumosas de 20 a 80 μm de diámetro, con baja relación núcleo/citoplasma, con núcleo de aspecto picnótico, excéntrico, único o múltiple, y un citoplasma grande con aspecto apergamado o de “papel de seda arrugado”. El estudio con microscopía electrónica de transmisión es característico, ya que se aprecian claramente unas estructuras tubulares típicas y numerosas microvellosidades. Dependiendo de la presencia o ausencia de afectación neurológica y de su gravedad, la EG se clasifica en la actualidad en tres tipos. En el tipo 1 –no neuropático, el más frecuente y que cursa con supervivencias prolongadas–, no existen trastornos del sistema nervioso central. En el tipo 2, la afectación neurológica es extraordinariamente grave y precoz, y desencadena la muerte de los niños afectados antes de los 2 años de vida. El tipo 3, intermedio entre ambos, se presenta con afectación visceral y con trastornos neurológicos precoces, pero menos graves que los del tipo 2. La existencia de hipergammaglobulinemia monoclonal u otras manifestaciones de estimulación de la línea linfóide B se ha relacionado con la elevación de determinadas citocinas como IL-1 β , TNF- α e IL-6 y, en el primer caso, se recomienda su seguimiento como el de otras gammapatías monoclonales de significado incierto. Bioquímicamente, la EG se caracteriza por una deficiencia de la enzima lisosomal glucosilceramida- β -glucosidasa (β -glucosidasa ácida). La disminución en la actividad enzimática está, en última instancia, causada por mutaciones en el gen de la glucocerebrosidasa. En la actualidad hay descritas unas

200, de las cuales la más frecuente en nuestro medio es la N370S. Para el diagnóstico definitivo se precisa demostrar la disminución de la actividad enzimática. Ante la heterogeneidad clínica de la EG se ha propuesto un sistema de puntuación según criterios clínicos, conocido como *Severity Score Index*. El tratamiento de la enfermedad persigue la mejora de la calidad de vida y la prevención de daños irreversibles. Hay dos tipos de terapias específicas:

- El tratamiento enzimático sustitutivo (TES), indicado en las formas no neuropáticas, en niños sintomáticos y en pacientes con enfermedad severa.
- La terapia de reducción de sustrato, en pacientes que no son candidatos a recibir el TES.

Recordar que:

La EG:

1. Cursa con alteraciones hematológicas, como anemia, trombocitopenia, neutropenia y coagulopatía. El secuestro esplénico da lugar a una mayor reducción de los niveles de plaquetas y eritrocitos, y la hepatopatía a disminución de los factores de coagulación, por lo que ante síntomas como fácil sangrado, aparición frecuente de hematomas y dolor óseo debemos sospechar esta entidad.
2. Es una de las pocas alteraciones metabólicas para las que se dispone de tratamiento sustitutivo enzimático.

Bibliografía

- Alfonso P, Aznarez S, Giralto M, Pocovi M, Giraldo P. Spanish Gaucher's Disease Registry. Mutation analysis and genotype/phenotype relationships of Gaucher disease patients in Spain. *J Hum Genet* 2007; 52: 391-6.
- Choy FY, Zhang W, Shi HP, Zay A, Campbell T, Tang N, Ferreira P. Gaucher disease among Chinese patients: review on genotype/phenotype correlation from 29 patients and identification of novel and rare alleles. *Blood Cells Mol Dis* 2007; 38: 287-93.
- Costello R, O'Callaghan T, Sébahoun G. Gaucher disease and multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 2006; 47: 1365-8.
- Davies EH, Surtees R, DeVile C, Schoon I, Vellodi A. A severity scoring tool to assess the neurological features of neuropathic Gaucher disease. *J Inher Metab Dis* 2007; 30: 768-82.
- Hughes D, Cappellini MD, Berger M, Van Droogenbroeck J, de Fost M, Janic D, et al. Recommendations for the management of the haematological and onco-hematological aspects of Gaucher disease. *Br J Haematol* 2007; 138: 673-5.
- Schmitz J, Poll LW, vom Dahl S. Therapy of adult Gaucher disease. *Haematologica* 2007; 92: 148-52.
- Trindade e Silva LP, Silva H, Cabrera H. Gaucher disease. *Acta Med Port* 2007; 20: 175-8.

Caso 4

TRICOLEUCEMIA VARIANTE CON INMUNOFENOTIPO ATÍPICO

L. GARCÍA-ALONSO¹, F.I. CAMACHO², J.A. GARCÍA VELA¹, M.A. PIRIS³

¹ Servicio de Hematología. Hospital Universitario de Getafe (Madrid). ² Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario de Getafe (Madrid). ³ Grupo de Linfomas. Programa de Patología Molecular CNIO

Introducción: Los síndromes linfoproliferativos con expresión en sangre y afectación predominante de bazo constituyen un 3-5% de los linfomas. Se calcula que la tricoleucemia variante (HCL-V) descrita por Cawley en 1980¹ constituye el 10% de las tricoleucemias (HCL). El diagnóstico de sospecha es citológico y se apoya en el estudio del inmunofenotipo (IF) con un panel de marcadores por citometría de flujo (CF)^{2,3}. Aun así, no siempre es definitivo en las HCL ni en sus variantes⁴. Presentamos un caso de HCL-V cuyo IF denominamos "atípico", ya que no apoyaba este diagnóstico.

Historia clínica: Varón de 79 años que acude a urgencias por náuseas, vómitos y dolor en hipocondrio izquierdo, donde se palpaba una masa abdominal. Presentaba astenia y pérdida de peso. No sudoración ni fiebre. Ingresó con sospecha de leucemia aguda desde la urgencia. *Antecedente de interés:* en un ingreso hospitalario por neumonía 7 años antes se objetivó una esplenomegalia de 13 cm, sin otros datos relevantes.

Exploración física: Adenopatías axilares e inguinales bilaterales de unos 2 cm de diámetro. Masa abdominal que ocupaba el hemiabdomen izquierdo. RX tórax normal. *TAC toracoabdominal:* esplenomegalia masiva y adenopatías abdominales, retroperitoneales, mediastínicas y axilares de 1-2 cm.

Pruebas complementarias: *Hemograma:* leucocitos: $30 \times 10^9/L$; Hb: 9,6 g/dL; plaquetas: $98 \times 10^9/L$; neutrófilos: $1,9 \times 10^9/L$; monocitos: $1,0 \times 10^9/L$; linfocitos: $25 \times 10^9/L$, que en el autoanizador se distribuían como linfocitos $8 \times 10^9/L$ y LUC $18 \times 10^9/L$. *Frotis de sangre:* un 62% de células de tamaño grande, aspecto blástico o prolinfocitoide, a veces monocitoide, con núcleo ovalado o redondo de cromatina reticulada, con un gran nucleolo central y citoplasma amplio con basofilia moderada (Figura 1). Dichas células mostraban prolongaciones citoplasmáticas (PC) cortas poco abundantes, de distribución irregular a veces en el contorno citoplásmico, otras veces de distribución más polar, únicamente visibles en algunas zo-

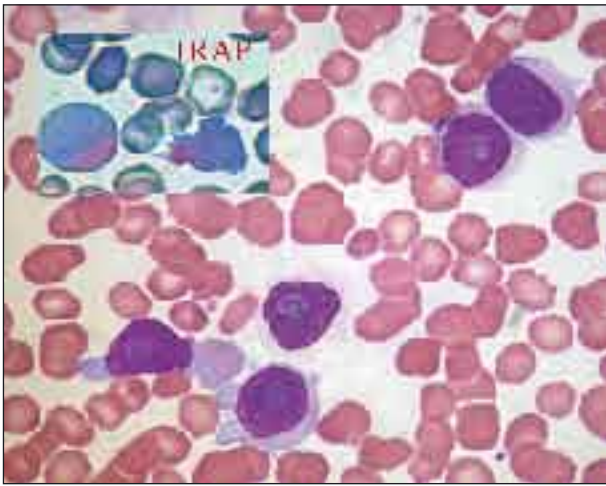


Figura 1. Sangre: predominio de la población grande con nucleolo y detalle (arriba a la izquierda) de TRAP insertado.

nas de la extensión (Figura 1). Un 30% de los linfocitos eran de talla pequeña, con cromatina más madura y alguna prolongación en la periferia del citoplasma. No se observaron elementos hendidos ni en boca de pez. La serie eritroide mostraba equinocitos sin presencia de dacriocitos o esquistocitos. Plaquetas de morfología normal. *Estudio de coagulación*: normal. *Bioquímica general*: LDH: 1.002 U/L; ácido úrico: 8,3 mg/dL; urea: 54 mg/dL; creatinina: 1,7 mg/dL. Proteínas totales: 5,4 g/dL; albúmina: 2,8 g/dL. Proteinograma sin componente monoclonal. Pruebas de función hepática normales. *Serologías* negativas para VHB, VHC, VIH, VEB y CMV. *Citoquímica*: 7% de células cloracetato esterasa (neutrófilos), 3% de butirato esterasa con positividad difusa (monocitos). El resto de las poblaciones positivas presentaban patrón granular múltiple. Fosfatasa ácida positiva con patrón tartrato-resistente en las células linfoides. *Citometría de flujo (CF)*: población linfocítica B con restricción lambda de alta intensidad. 12% de CD24 intenso y 60% de mayor FSC/SSC con CD24 débil, FMC7, CD79b, CD11c. *Citogenética*: Deleción de 17p en el 45% de los elementos analizados mediante sonda para p53 por FISH. *Médula ósea*: *Aspirado* con grumo escaso fino y celularidad suelta un tanto escasa que corresponde con infiltración masiva por las dos poblaciones linfoides en proporción inversa a la sangre, 55% de células pequeñas, 38% de grandes con nucleolo y PC, y un 7% de hematopoyesis en maduración (Figura 2). *Biopsia medular*: infiltración difusa por proceso linfoproliferativo B (Figura 2). *Citometría*: dos poblaciones con diferente FSC/SSC, ambas positivas para CD19, CD79b, CD20, CD22 débil, CD23 heterogéneo, FMC7 intenso, CD24, CD11c débil, con restricción de cadenas ligeras lambda y negatividad para CD43, CD38, CD25, CD103, CD10, CD123. *Esple-*

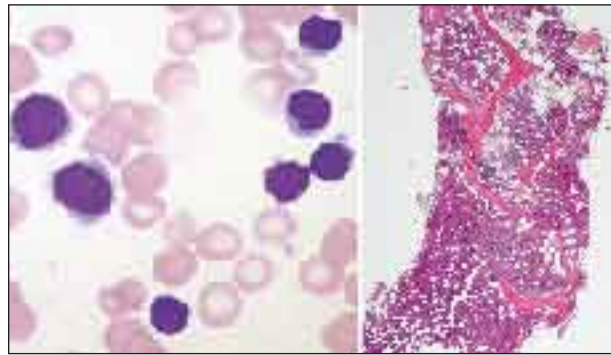


Figura 2. Médula: celularidad del aspirado escasa, con predominio de célula pequeña, y biopsia (derecha) con patrón de infiltración difuso.



Figura 3. Bazo: infiltración mixta de pulpa roja y blanca. Detalle ad hoc de la celularidad (derecha).

nectomía: *Histología*: bazo de 2.500 g con arquitectura micronodular. Patrón de infiltración difuso linfocítico de pulpa blanca y roja. Se distinguían las dos poblaciones celulares, y las de mayor talla mostraban núcleos grandes, vesiculosos, con nucleolo prominente de aspecto prolinfocitoide (Figura 3). *Inmunohistoquímica*: CD20+, Bcl2+, IgD+ y restricción de cadenas ligeras lambda. Resto de los marcadores linfocíticos realizados, negativos, incluyendo Bcl-6, ciclina D1, p53 y anexina 1. Ki67+/++ de moderada intensidad. *Citometría*: se detectaron dos poblaciones B con diferente complejidad (alta y baja, 38% y 19%, respectivamente). Ambas poblaciones eran lambda con negatividad para CD5, CD30, CD43, CD123, CD103, CD25, expresión débil de CD11c y CD22, moderada de CD23, con positividad intensa para CD24, HLA-DR, CD79B. *Citogenética*: la deleción del brazo largo del cromosoma 7 fue negativa por FISH.

Evolución: El paciente recibió un ciclo de CHOP ante el deterioro clínico, y 3 semanas después se le realizó una esplenectomía. Posteriormente recibió 5 ciclos de rituximab y CHOP y se consiguió una remisión completa. No se detectaron células linfocíticas B

por CF en sangre. El estudio de EMR por CF de la médula tras finalizar el tratamiento encontró un 0,1% de linfocitos CD19/lambda de intensidad moderada. El paciente se encuentra bien tras un año de evolución manteniendo la respuesta.

Diagnóstico: Proceso linfoproliferativo B con expresión en sangre y afectación difusa de médula ósea y del bazo, compatible, en primer lugar, con tricoleucemia variante (HCL-V) con IF atípico.

Discusión: Se trata de un paciente con un linfoma B con expresión en sangre y con una situación de compromiso clínico, síntomas B y deterioro, que obligó a iniciar tratamiento quimioterápico antes de completar el diagnóstico. Los datos citológicos y citométricos eran poco específicos y un tanto discordantes, dejando abierto el diagnóstico diferencial entre los SLPC con PC. La presencia de un *nucleolo* muy llamativo podía plantear el diagnóstico de leucemia prolinfocítica LPL-B. La ausencia de ciclina D1 y la presencia de PC, aunque escasas, la descartaban. Tampoco mostraba una leucocitosis extrema, mayor de $100 \times 10^9/L$, típica de este cuadro. Nuestro caso mostraba positividad para la *fosfatasa ácida* y presentaba tartrato-resistencia (TRAP). Este patrón es típico de la HCL pero se puede ver de forma ocasional en otros linfoproliferativos, como en algunos casos de HCL-V⁵. El IF y la presencia de monocitos descartaba una HCL^{2,3}.

La CF y la IHQ son grandes herramientas diagnósticas. Sin embargo, existen escasos patrones patognomónicos. El IF descartó el linfoma de manto, la leucemia linfoide crónica (LLC) y los linfomas foliculares. El estudio citológico e inmunofenotípico en sangre y médula centró el diagnóstico diferencial entre los SMZL y la HCL-V. No se observaron datos que sugirieran otro tipo de linfomas en los estudios de histología, IHQ, genéticos y de biología molecular.

La edad de presentación tan avanzada y el grado de leucocitosis coincide con los casos descritos de HCL-V^{6,7}. Los pacientes con HCL-V se presentan con aumento de leucocitos en torno a $30 \times 10^9/L$ ⁸. Su morfología se define por la presencia de un gran nucleolo central y de PC. A diferencia de la HCL, el aspirado medular se obtiene con facilidad. La morfología no es tan homogénea como en la HCL y su identificación puede ser más o menos difícil. Además, de forma infrecuente muestra positividad para la TRAP⁵. Se han descrito diversas variantes, que junto con la expresión de linfomas marginales con PC amplían el elenco de entidades con las que realizar el diagnóstico diferencial^{5-7,9,10}.

El IF "más típico" propuesto para la HCL-V es de línea B madura, con expresión de CD11c y CD103 y, a diferencia de la HCL, CD25, HC2, es negativo. La expresión de CD123 o de la anexina A1, positivas en la HCL, también es negativa, pero estos marcadores

no permiten diferenciarlas de los SMZL. La negatividad para CD103 y la débil expresión del CD11c junto con la expresión intensa de CD24 orientó el caso hacia un SMZL con expresión de linfocitos vellosos. En contra de este IF estaba únicamente la ausencia de CD25. Sin embargo, el patrón de infiltración difuso de la médula iba más a favor de una HCL-V, ya que los SMZL suelen afectarla con patrones intersticiales y con nódulos linfoides. A diferencia de la HCL, la fibrosis no es importante⁷. En nuestro caso se pudo obtener aspirado con escasa celularidad, lo que demuestra infiltración masiva por ambas poblaciones linfoides, grande y pequeña, con una relación inversa a la descrita en sangre. Este patrón se confirmó en el cilindro de biopsia medular.

El estudio histopatológico del bazo mostró una infiltración difusa y extensa de la pulpa roja, con afectación menos predominante de pulpa blanca, apoyando una infiltración por HCL-V, dado que los SMZL suelen mostrar un patrón nodular, con afectación mixta pero fundamentalmente de pulpa blanca. Por el contrario, las HCL muestran una afectación difusa de pulpa roja con obliteración de la pulpa blanca. La afectación predominante de pulpa roja también se ha comunicado recientemente en algunos casos aún no bien clasificados^{11,10}. No se identificó delección de la región cromosómica 7q31, que está descrita en algunos casos de SMZL con peor pronóstico¹². La IHQ del bazo demostró ausencia de p53. En sangre se informó de una del17p en el 50% de la población con sonda FISH para p53. Es probable que una alteración molecular, como la disfunción del p53, explicase la agresividad clínica del caso, el aumento de LDH y los síntomas B. El tratamiento con esplenectomía y rituximab asociado a CHOP ha sido efectivo en nuestro paciente y coincide con algunas publicaciones que preconizan su utilización en primera línea en los pacientes con HCL-V^{6,8}.

Recordar que:

1. Aunque el inmunofenotipo es una ayuda imprescindible en la clasificación de los síndromes linfoproliferativos B, el diagnóstico siempre debe ser integrado con los datos morfológicos, clínicos e histológicos del paciente.
2. El patrón de infiltración esplénico es fundamental para estudiar estos casos, poder clasificarlos y avanzar en su conocimiento.
3. Existe un solapamiento entre los SLPC-B con PC del tipo HCL-V y SMZL que deberá ser desglosado mediante nuevos estudios biológicos.
4. El tratamiento de estos cuadros, cuando presentan signos clínicos y biológicos agresivos, con esplenectomía, CHOP y rituximab podría ser de elección.

Bibliografía

1. Cawley JC, Burns GF, Hayhoe FG. A chronic lymphoproliferative disorder with distinctive features: a distinct variant of hairy cell leukemia. *Leuk Res* 1980; 4: 547.
2. Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankomah K, Houlihan A, Meeus P, Catovsky D. The immunophenotype of hairy cell leukemia (HCL). Proposal for a scoring system to distinguish HCL from B-cell disorders with hairy or villous lymphocytes. *Leuk Lymphoma* 1994; 14: 57-61.
3. Del Giudice I, Matutes E, Morilla R, Morilla A, Owusu-Ankomah K, Rafiq F, et al. The diagnostic value of CD123 in B-cell disorders with hairy or villous lymphocytes. *Haematologica* 2004; 89 (3): 303-8.
4. Chen YH, Tallman MS, Goolsby C, Peterson L. Immunophenotypic variations in hairy cell leukemia. *Am J Clin Pathol* 2006; 125 (2): 251-9.
5. Dunphy CH. Reaction patterns of TRAP and DBA.44 in hairy cell leukemia, hairy cell variant, and nodal and extranodal marginal zone B-cell lymphomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2008; 16 (2): 135-9.
6. Robak T. Current treatment options in hairy cell leukemia and hairy cell leukemia variant. *Cancer Treat Rev* 2006; 32 (5): 365-76.
7. Foucar K, Catovsky D. Mature B-cell neoplasms: hairy cell leukaemia. En: Jaffe ES HN, Stein H, Vardiman JW (eds.). *Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. World Health Organization Classification of Tumours. Lyon: IARC Press; 2001. Capítulo 6. p. 138.
8. Narat S, Gandla J, Dogan A, Mehta A. Successful treatment of hairy cell leukemia variant with rituximab. *Leuk Lymphoma* 2005; 46 (8): 1229-32.
9. Matutes E, Oscier D, Montalbán C, Berger F, Callet-Bauchu E, Dogan A, et al. Splenic marginal zone lymphoma proposals for a revision of diagnostic, staging and therapeutic criteria. *Leukemia* 2008; 22: 487-95.
10. Traverse-Glehen A, Baseggio L, Bauchu EC, Morel D, Gazzo S, Ffrench M, et al. Splenic red pulp lymphoma with numerous basophilic villous lymphocytes: a distinct clinicopathologic and molecular entity? *Blood* 2008; 111 (4): 2253-60.
11. Mollejo M, Algara P, Mateo MS, Sánchez-Beato M, Lloret E, Medina MT, Piris MA. Splenic small B-cell lymphoma with predominant red pulp involvement: a diffuse variant of splenic marginal zone lymphoma? *Histopathology* 2002; 40 (1): 22-30.
12. Solé F, Salido M, Espinet B, García JL, Martínez Climent JA, Granada I. Splenic marginal zone B-cell lymphomas: two cytogenetic subtypes, one with gain of 3q and the other with loss of 7q. *Haematologica* 2001; 86 (1): 71-7.

Caso 5

PANCITOPENIA Y FIBROSIS MEDULAR

A. LEMES¹, T. MOLERO¹, N. NAVARRO¹, S. DE LA IGLESIA¹, J. LÓPEZ¹, J.C. RIVERO², C. RODRÍGUEZ¹, C. CAMPO¹

¹ Servicio de Hematología y Hemoterapia; ² Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín. Las Palmas de Gran Canaria

Motivo de consulta: Mujer de 65 años que es admitida en el hospital por un cuadro de deposiciones melánicas en las últimas 24 horas.

Historia clínica: Paciente portadora de un síndrome plurimetabólico (obesidad mórbida, diabetes mellitus, hipertensión arterial) de larga evolución, con actividad limitada para la vida diaria por su obesidad y artrosis del esqueleto de carga, en tratamiento habitual con insulina, metformina y AINE a demanda. Refiere que encontrándose previamente asintomática comienza con astenia de 1 o 2 meses de evolución y en la última semana aumenta la toma de AINE por incremento de las algias articulares.

Exploración física: Consciente, orientada, palidez cutáneo-mucosa. Obesidad mórbida. No se palpan adenopatías. *ACP:* taquicárdica; el resto, dentro de los límites normales. *Abdomen:* difícil valorar visceromegalias, dada la obesidad de la paciente. Tacto rectal positivo para melenas. Insuficiencia venosa en miembros inferiores. Resto de la exploración, anodina.

Pruebas complementarias: *Hemograma:* Hb: 3,6 g/dL; VCM: 86,9 fL; plaquetas $17 \times 10^9/L$; leucocitos: $2,2 \times 10^9/L$ (PMN: $0,8 \times 10^9/L$). *Índice de plaquetas reticuladas (IPF):* 35% (valor de referencia: 9%). *Bioquímica elemental:* glucosa 212 mg/dL; LDH: 1.270 U/L; resto: normal. *Serología infecciosa vírica:* VEB, VHS, VVZ, CMV: positivas; VIH, VHB, VHC, parvovirus B19, HHV8: negativas. *Serología parasitaria (toxoplasma):* positiva.

Endoscopia digestiva alta: hemorragias submucosas múltiples en cuerpo y antro (en probable relación con la toma de AINE). Una vez estabilizada la paciente, se procede al estudio de la pancitopenia. *Eco abdominal:* esplenomegalia homogénea de 15 cm de diámetro longitudinal. *Estudio de anemia:* anemia arregenerativa con patrón de hierro sérico de sobrecarga.

Frotis de SP: presencia de PMN desgranulados y con *clumping* cromatínico (Figura 1). *Aspirado de médula ósea:* dificultad de extracción. En el escaso material obtenido se observan numerosos megacariocitos, algunos de gran tamaño, núcleos fragmentados poliploides y con tendencia a la agregación (Figura 2A y B); también se encuentran ocasionales elementos monolobulados (Figura 2C). La serie roja y la granulopoyética están escasamente representadas, presentando esta última rasgos displásicos. Asimismo, se evidencian aislados blastos con alta relación núcleo/citoplasma, algunos con gemaciones citoplasmáticas. *Biopsia ósea:* hiperplasia intensa de las series mieloides y megacariocítica, esta última con signos evidentes de displasia (elementos hiper e hipolobulados, algunos con fragmentación nuclear) (Figura 3A) que se marcaban para la GpIIIa (Figura 3B). Presencia de precursores mieloides inmaduros CD117+ CD34-. Hipoplasia de la serie roja e intensa fibrosis reticulínica (Figura 4A). *Inmunofenotipo:* el 4% de la celulari-

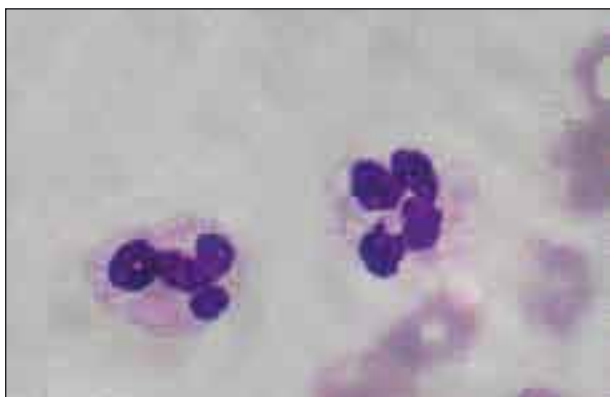


Figura 1. Frotis de sangre periférica con PMN desgranulados y clumping cromatinico (May-Grünwald-Giemsa).

dad expresa marcadores de blastos mieloides CD34/MPO/CD45d/CD33. El resto de los marcadores de línea fueron negativos. *Cariotipo en MO*: 46,XX, del(5)(q15q33) [10]; 46,XX [3]. *Estudio molecular*: BCR-ABL, JAK2-V617F y MPLW515L negativos.

Diagnóstico: SMD hiperfibrótico vs. SMPc/SMD con del(5q).

Evolución: La paciente presentó requerimientos transfusionales diarios de plaquetas a pesar de presentar un IPF alto al inicio del cuadro clínico, reflejando una trombopoyesis exaltada. Comenzó tratamiento con lenalidomida a dosis de 5 mg en ciclos de 21 días al mes, observándose una recuperación de plaquetas después de finalizado el primer ciclo y coincidiendo con la toma de decisión de abstención transfusional. Los neutrófilos y la hemoglobina se recuperaron después del segundo ciclo. Un nuevo *aspirado-biopsia* fue realizado tras el 5.º ciclo, observándose una franca mejoría del cuadro citológico (megacariocitos de pequeño tamaño con núcleos sin alteraciones morfológicas llamativas) y de la fibrosis (Figura 4B). *La citogenética y el FISH* resultaron negativos para la presencia de del(5q).

Discusión: La forma de presentación del caso no es consistente con el síndrome 5q- definido por la OMS. Por el contrario, las primeras posibilidades diagnósticas que se ofrecieron fueron las de un SMD hiperfibrótico¹ versus un SMPc/SMD. De esta manera, el estudio citogenético y molecular fue orientado a la búsqueda de marcadores de estas patologías. La observación de del(5q) en las escasas metafases referidas representó un hecho de suma casualidad, dada la pobreza de la celularidad obtenida en el aspirado medular.

Por otro lado, este hallazgo citogenético no es exclusivo de los SMD y/o LAM, sino que también podemos encontrarlo, entre otros, en un 7% de SMPc². Para complicar aún más el panorama diagnóstico y de clasificación, existen casos referidos de del(5q) co-

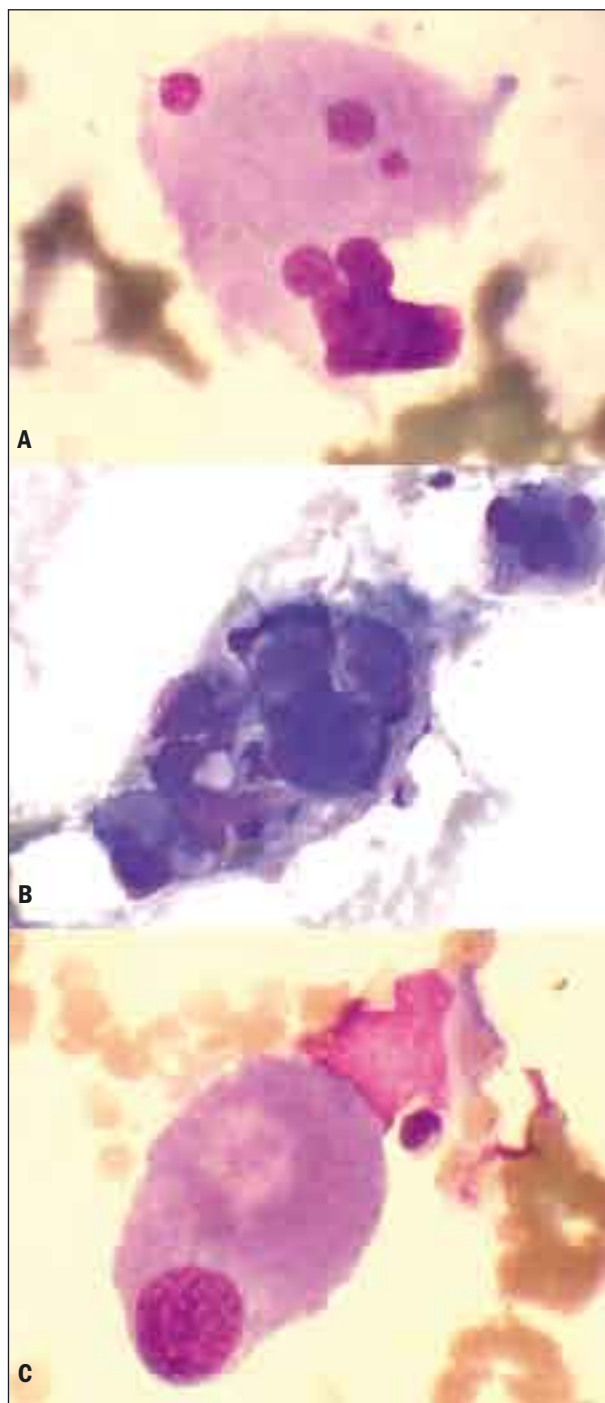


Figura 2. A: Medula ósea donde se observa un megacariocito displásico con fragmentación nuclear. B: Megacariocitos agrupados en la medula ósea. C: Megacariocito monolobulado en la medula ósea (May-Grünwald-Giemsa).

existiendo con la mutación del JAK, lo que podría identificar un subgrupo de SMD con comportamiento mieloproliferativo³. Aún está por demostrar si estos casos responden a la lenalidomida como los de la del(5q) aislada.

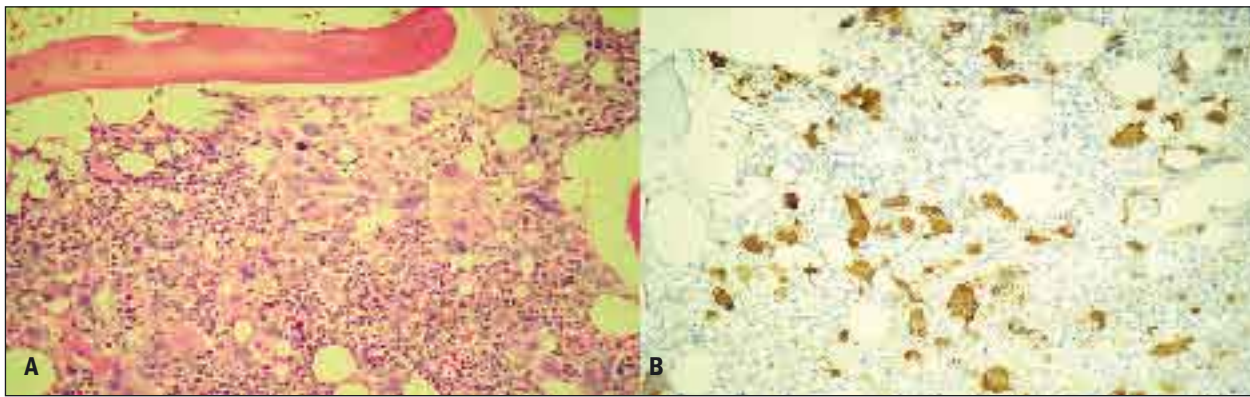


Figura 3. A: Corte histológico medular donde se observa hiperplasia de la serie mieloide y megacariocítica displásicas (hematoxilina-eosina). B: Tinción inmunohistoquímica con GpIIb/IIIa y positividad en la serie megacariocítica.

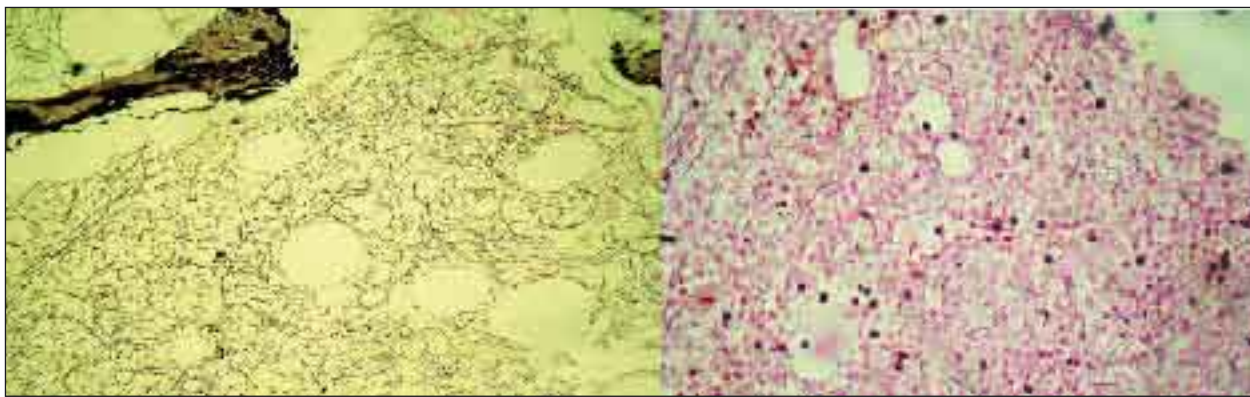


Figura 4. A: Tinción de reticulina en el momento del diagnóstico en el que se aprecia una fibrosis intensa. B: Tinción de reticulina en el que se observa una disminución de la fibrosis después del 5.º ciclo de lenalidomida.

El adverso pronóstico de la fibrosis medular en los SMD, con independencia de la anomalía cromosómica o molecular encontrada, que un grupo de autores⁴ ha discutido recientemente, resultaría contradictorio en nuestro caso, ya que la intervención farmacológica con lenalidomida remitió en gran medida el cuadro citohistológico. Mención aparte a considerar es la importancia de la determinación del IPF en la valoración de la trombopoyesis. Es conocido que esta actividad se ve frenada con las transfusiones plaquetarias, las cuales actuarían a través de una retroalimentación negativa sobre la función trombopoyética⁵. En nuestro caso la recuperación plaquetaria coincidió en el tiempo con la abstención transfusional, demostrando de forma efectiva este mecanismo.

Para finalizar, debemos puntualizar que, a pesar de las mejoras en las clasificaciones de las patologías hematológicas abordadas en los últimos años, aún quedan casos de difícil posicionamiento y que sin la ayuda de los marcadores clonales podrían no beneficiarse de los recursos terapéuticos adecuados.

Recordar que:

1. Deberíamos insistir en la búsqueda de marcadores clonales que podrían definir una estrategia terapéutica específica (5q-), aunque el cuadro citomorfológico así no lo sugiera.
2. La posible presencia de la mutación JAK2 V617F no excluye la presencia de marcadores clonales de más incidencia en los SMD.
3. La trombopoyesis puede ser inhibida con pautas transfusionales intensivas, retardando incluso el efecto terapéutico de los fármacos como la lenalidomida.

Bibliografía

1. Wöessner S, Florensa L. La citología óptica en el diagnóstico hematológico. 5.ª ed. Acción Médica y FEHH; 2006.
2. Santana-Dávila R, Holtan SG, Dewald GW, Ketterling RP, Knudson RA, Hanson CA, et al. Chromosome 5q deletion: specific diagnoses and cytogenetic details among 358 con-

secutive cases from a single institution. *Leuk Res* 2008; 32: 407-11.

3. Ingram W, Lea NC, Cervera J, Germing U, Fenaux P, Cassinat B, et al. The JAK2 V617F mutation identifies a subgroup of MDS patients with isolated deletion 5q and a proliferative bone marrow. *Leukemia* 2006; 20: 1319-21.
4. Buesche G, Teoman H, Wilczak W, Ganser A, Hecker H, Wilkens L, et al. Marrow fibrosis predicts early fatal marrow failure in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2008; 22: 313-22.
5. Briggs C, Hart D, Kunka S, Oguni S, Machin SJ. Immature platelet fraction measurement: a future guide to platelet transfusion requirement after haematopoietic stem cell transplantation. *Transfus Med* 2006; 16: 101-9.

Caso 6

LEUCEMIA AGUDA MIELOBLÁSTICA Y LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA T SINCRÓNICAS

J. MARTÍN SÁNCHEZ, M. ALCOCEBA SÁNCHEZ, E. COLADO VARELA, J. OLAZÁBAL HERRERO, M. DÍEZ CAMPELO, N.C. GUTIÉRREZ GUTIÉRREZ, J.M. HERNÁNDEZ RIVAS, M.D. CABALLERO BARRIGÓN, J.F. SAN MIGUEL IZQUIERDO, M. GONZÁLEZ DÍAZ, M.A. GARCÍA MARCOS
*Servicio de Hematología y Hemoterapia.
 Hospital Universitario de Salamanca*

Motivo de consulta: Presentamos el caso de una mujer de 23 años que, tras un cuadro clínico progresivo de 1 mes de evolución de neutropenia severa, linfadenopatía cervical y congestión nasal, es remitida a nuestro centro para valoración.

Historia clínica: Antecedentes personales: fumadora activa de 20 cigarrillos al día. Sin antecedentes médicos ni familiares de interés.

Exploración física: Adenopatías laterocervical derecha y submandibulares múltiples, de tamaño máximo 2 x 2 cm, no dolorosas. Hipertrofia amigdalar bilateral. Voz nasal. Resto de la exploración, sin interés.

Pruebas complementarias: Hemograma: hemoglobina: 10,2 g/dL; VCM: 107,6 fL; leucocitos: 2,4 x 10⁹/L (segmentados: 0,2 x 10⁹/L; linfocitos: 2,1 x 10⁹/L; monocitos: 0 x 10⁹/L); plaquetas: 144 x 10⁹/L. Estudio de coagulación: TP: 87%; TTPA: 28,2 s; fibrinógeno: 256 mg/dL. Frotis de sangre periférica: ma-

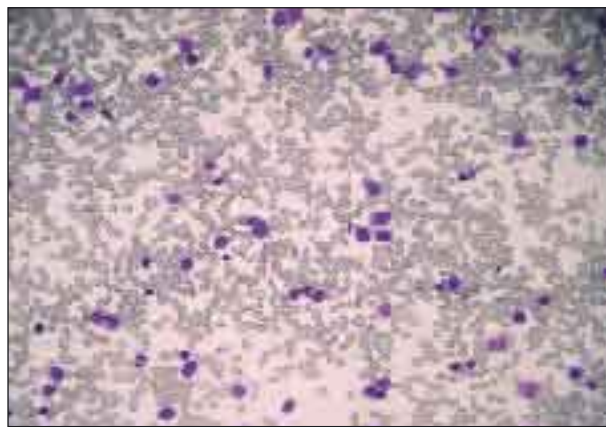


Figura 1. Extensión de médula ósea al diagnóstico: celularidad mediana con infiltración monomorfa y masiva por elementos blásticos sin maduración. Serie blanca residual escasa (May-Grünwald-Giemsa x 250).

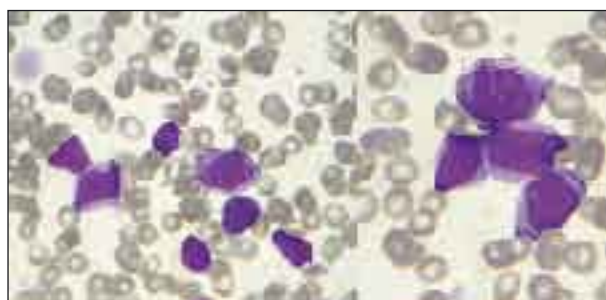


Figura 2. Detalle de la extensión de médula ósea: blastos indiferenciados de estirpe mieloide, citoplasma amplio, cromatina laxa y fina, granulación citoplasmática en algunos blastos (mieloperoxidasa positiva por citoquímica y citometría de flujo). Nucleolos evidentes (May-Grünwald-Giemsa x 1.000).

crocitosis. Presencia de agregados plaquetarios, sin objetivarse blastos y con recuento celular semejante al analizador automático. Bioquímica: glucemia, función renal, ionograma, pruebas de función hepática, proteinograma, estudio del metabolismo del hierro, reactantes de fase aguda (β2-microglobulina, proteína C reactiva, procalcitonina) y función tiroidea dentro de los rangos normales. Medulograma: infiltración por un 78% de blastos, compatible con leucemia aguda mieloblástica M1 FAB (Figuras 1 y 2). Inmunofenotipo: leucemia aguda mieloblástica con expresión T aberrante y una subpoblación con criterios de leucemia aguda bifenotípica (EGIL): 75% de infiltración por blastos mieloides TdT+, CD34+, HLADR+, cMPO+ (20%), CD117+, CD13+ (42%), CD33+^d, CD7+ (46%); subpoblación 8% CD19+, cCD79a+. Biopsia de *cavum* nasofaríngeo: afectación focal por proceso linfoproliferativo T compatible con leuce-

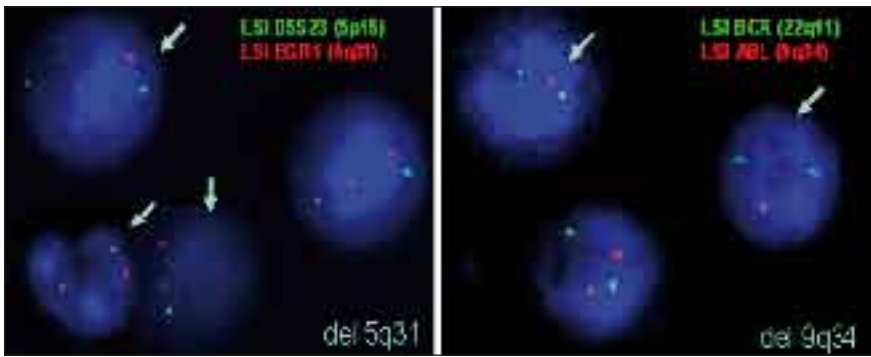


Figura 3. Hibridación *in situ* fluorescente en médula ósea al diagnóstico. Sondas para cromosoma 5 (izquierda) y para gen de fusión BCR/ABL, t(9;22) (derecha).

mia/linfoma linfoblástico pre-T. *Inmunofenotipo*: células tumorales CD3+, CD43+, CD4-, CD8-, mieloperoxidasa negativa, CD56-, CD20-, PAX5-, índice proliferativo (MIB-1) alto, p53+ en porcentaje significativo. TdT+ en células aisladas. *Citogenética*: *Médula ósea*: cariotipo (bandas G): 15 metafases: 46,XX [13]/46,XX, del(5)(q13q31) [2]. *Hibridación in situ fluorescente* (FISH) (Figura 3): del(5q)(q13q31): 40%. FISH (sonda BCR/ABL): del(9q34): 30,5% (no traslocación recíproca *BcrAbl*). *Ganglio*: no se obtuvo muestra suficiente. *Biología molecular* (médula ósea y tejido linfóide de adenopatía y *cavum*): *Reordenamiento de inmunoglobulinas* IgH, Igκ, Igλ, y TCR (γ,β): no se objetiva amplificación clonal. Ausencia de otros reordenamientos: PML/RAR-α, AML1/ETO, MLL (11q23) negativos. Negatividad para las mutaciones FLT3 (ITD) y NPM. *Análisis de regiones microsatélite* en médula ósea y ganglio linfático: STR (*short tandem repeats*) D5S818 (5q23.3-32) positiva; CSF1P0 (5q33.3-34) positiva. El porcentaje de pérdida de heterocigosidad para ambas regiones microsatélite es proporcional al porcentaje de infiltración de las muestras (Figura 4).

Diagnóstico: Leucemia de célula *stem*.

Evolución: La paciente recibió tratamiento de inducción según protocolo PETHEMA LMA99 < 65 años añadiendo profilaxis intratecal y corticoides durante 28 días a 1 mg/kg/día. Alcanzó remisión completa en el día +28, precisando reinducción, y con enfermedad mínima residual positiva al final de la misma (0,009%). Tras completar consolidación y con enfermedad mínima residual negativa, se realizó trasplante de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica de donante familiar HLA idéntico, con régimen mieloablativo. En el día +150, la paciente recayó con masa mediastínica y lesiones cutáneas infiltrativas, demostrándose en médula ósea infiltración por un 53% de linfoblastos T y un 2,4% de mieloblastos. El análisis mediante FISH objetivó la presencia de del(5q)(q13q31) en el 39,5% de las células analizadas (probablemente linfoblastos), y pudo realizarse cariotipo en 12 metafases: 46,XX [8]/42-44,XX [4]. A pesar de la suspensión de la

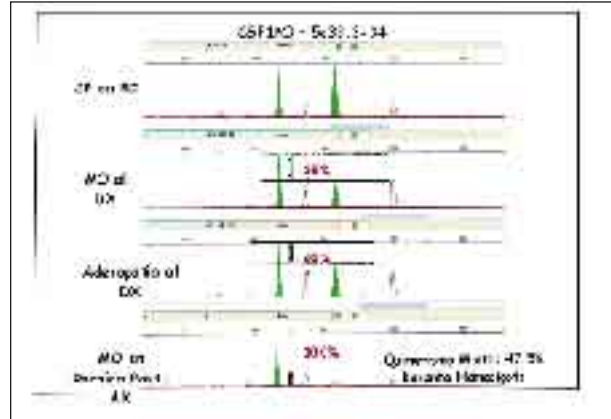


Figura 4. Análisis de pérdida de heterocigosidad mediante análisis de regiones microsatélite (STR, *short tandem repeats*) en 5q: D5S818 (5q23.3-32), CSF1P0 (5q33.3-34). De arriba abajo, muestras en remisión completa, médula ósea al diagnóstico, tejido linfóide al diagnóstico y médula ósea en recaída posttrasplante hematopoyético. La diferencia en la altura de los picos verdes (alelos) representa el porcentaje de pérdida de heterocigosidad.

inmunosupresión y de múltiples líneas de tratamiento de rescate, la paciente falleció a los 14 meses del trasplante de progenitores hematopoyéticos y 17 meses del diagnóstico.

Discusión: La presencia de una misma alteración citogenética en dos neoplasias hematológicas simultáneas con inmunofenotipo diferente indica que realmente la alteración clonal en el cromosoma 5 se encontraba presente desde el momento del diagnóstico de las dos hemopatías y que afectaba a un progenitor pluripotente linfomieloide, que dio lugar a las dos poblaciones tumorales con distinto inmunofenotipo correspondiente a poblaciones comprometidas a linaje mieloide y linfóide. Si bien la citogenética convencional y la FISH no detectaron en un principio la delección en 5q en la neoplasia linfóide, las técnicas moleculares de análisis de regiones microsatélite (pérdida de heterocigosidad) demostraron el desequilibrio alélico de material genético en dicho cromosoma y en ambas

poblaciones. La recaída de la enfermedad con un predominio de la leucemia linfoblástica T hizo posible la detección de la alteración en 5q en los linfoblastos, detectable al diagnóstico sólo en los mieloblastos por la infiltración escasa y focal del tejido linfoide. Por tanto, nuestra paciente presentaba una alteración clonal que afectaba a un progenitor hematopoyético pluripotente aún no comprometido a línea alguna y que dio lugar a dos proliferaciones blásticas de linajes diferentes, una leucemia aguda mieloblástica y una leucemia aguda linfoblástica de precursores T, que aparecieron a la vez en dos localizaciones diferentes, médula ósea y tejido linfoide de nasofaringe y ganglio linfático.

Estudios recientes han demostrado que las pérdidas en 5q de algunos síndromes mielodisplásicos tienen lugar en progenitores hematopoyéticos con un potencial mixto linfomieloide. Ilustramos así el concepto de leucemia de célula *stem*, documentado en pequeñas series de casos, todas ellas con un pronóstico infausto, y corroboramos la hipótesis de que las deleciones en el brazo largo del cromosoma 5 se producen en un progenitor con potencial linfomieloide, hecho ya conocido en los síndromes mielodisplásicos (si bien nuestra paciente no presentó en ningún momento rasgos de displasia). Del mismo modo, el presente caso apoya la veracidad del concepto de célula *stem* leucémica como la surgida de un progenitor hematopoyético normal por diversos mecanismos mutagénicos y que conserva la capacidad de autorrenovación y proliferación indefinidas de aquél, pudiendo perpetuar la hemopatía por dichas características y, además, dar lugar a clones tumorales con un fenotipo más o menos diferenciado. El concepto de célula *stem* leucémica está bien caracterizado en el caso de los síndromes mieloproliferativos, en los que se conoce que una alteración de un progenitor pluripotente puede dar lugar a la alteración de varias líneas hematopoyéticas. En nuestro caso, demostramos que existe una célula *stem* leucémica que es capaz de dar lugar a varias poblaciones tumorales con fenotipos distintos.

Recordar que:

1. La presentación conjunta de dos hemopatías malignas con fenotipo distinto debe hacer pensar en la existencia de una alteración clonal en un progenitor hematopoyético común.
2. Las deleciones en 5q afectan a un progenitor hematopoyético con potencial mixto linfoide y mieloide.

3. La leucemia de célula *stem* y la célula *stem* leucémica son dos entidades objetivables siguiendo una adecuada rutina diagnóstica.
4. El diagnóstico de las hemopatías malignas debe basarse en el conjunto de datos clínicos y de laboratorio. La secuencia lógica en la obtención de los primeros y la petición y análisis de los segundos es fundamental en el tratamiento y la orientación clínica de los pacientes.

Bibliografía

- Adolfsson J, Månsson R, Buza-Vidas N, Hultquist A, Liuba K, Jensen CT, et al. Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* 2005; 121: 295-306.
- Cuneo A, Ferrant A, Michaux JL, Bosly A, Chatelain B, Stul M, et al. Cytogenetic and clinicobiological features of acute leukemia with stem cell phenotype: study of nine cases. *Cancer Genet Cytogenet* 1996; 92: 31-6.
- Faderl S, Gidel C, Kantarjian HM, Manshouri T, Keating M, Albitar M. Loss of heterozygosity on chromosome 5 in adults with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 2001; 25: 39-43.
- Haas OA, Bettelheim P, Schmidmeier W, Gadner H, Ludwig H, Majdic O, Schulz U. 5q- chromosome in acute leukemia with lymphoid morphology and expression of myeloid membrane determinants. *Blood* 1985; 65: 1342-8.
- Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. *N Engl J Med* 2006; 355: 1253-61.
- Nilsson L, Astrand-Grundström I, Arvidsson I, Jacobsson B, Hellström-Lindberg E, Hast R, Jacobsen SE. Isolation and characterization of hematopoietic progenitor/stem cells in 5q-deleted myelodysplastic syndromes: evidence for involvement at the hematopoietic stem cell level. *Blood* 2000; 96: 2012-21.
- Nilsson L, Edén P, Olsson E, Månsson R, Astrand-Grundström I, Strömbeck B, et al. The molecular signature of MDS stem cells supports a stem-cell origin of 5q myelodysplastic syndromes. *Blood* 2007; 110: 3005-14.
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-11.
- Sun G, Wormsley S, Sparkes RS, Naeim F, Gale RP. Hybrid leukemia and the 5q-abnormality. *Leuk Res* 1991; 15: 351-6.
- Sun GX, Wormsley S, Sparkes RS, Naeim F, Gale RP. Where does transformation occur in acute leukemia? *Leuk Res* 1991; 15: 1183-9.
- Tan BT, Park CY, Ailles LE, Weissman IL. The cancer stem cell hypothesis: a work in progress. *Lab Invest* 2006; 86: 1203-7.
- Thomas ED, Blume KG, Forman SJ, Appelbaum FR. *Thomas' hematopoietic cell transplantation*. 3rd ed. Malden, Mass.: Blackwell Pub.; 2004.
- van den Berghe H, Michaux L. 5q-, twenty-five years later: a synopsis. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 94: 1-7.
- van den Berghe H, Vermaelen K, Mecucci C, Barbieri D, Tricot G. The 5q-anomaly. *Cancer Genet Cytogenet* 1985; 17: 189-255.

