

# 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 94, Extraordinario n.º 1, Noviembre 2009

[www.aehh.org](http://www.aehh.org) • [www.seth.es](http://www.seth.es)

## LI Reunión Nacional de la AEHH XXV Congreso Nacional de la SETH

Barcelona, 12-14 de noviembre de 2009

**PROGRAMA EDUCACIONAL**  
**XXII LECCIÓN CONMEMORATIVA ANTONIO RAICHS**  
**SIMPOSIOS**  
**CASOS CLÍNICO-CITOLÓGICOS**

# LI Reunión Nacional de la AEHH XXV Congreso Nacional de la SETH

Barcelona, 12-14 de noviembre de 2009

**PROGRAMA EDUCACIONAL**  
**XXII LECCIÓN CONMEMORATIVA ANTONIO RAICHS**  
**SIMPOSIOS**  
**CASOS CLÍNICO-CITOLÓGICOS**

*Editores:* Álvaro Urbano Ispizua  
Joan Carles Reverter

## **Agradecimientos**

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

AEAL (Asociación Española Afectados Linfoma), AECC (Asociación Española contra el Cáncer), Alexion, Amgen, Astellas, Baxter, Bayer Schering Farma, Binding Site, Bioser, Boehringer Ingelheim, Bristol Myers Squibb, Caridian BCT, Celgene, Cephalon, CircaGen, CSL Behring, EHA (European Haematology Association), Esteve, Fresenius, Genzyme, Gilead, GlaxoSmithKline, Grifols, Grupo Ferrer, Horiba ABX, Hospira España, Italfarmaco, Izasa, Janssen Cilag, Leo Pharma, Merck Sharp & Dohme, Miltenyi Biotech, Mundipharma, Novartis, Novo Nordisk, Octapharma, Pfizer, Pierre Fabre, Ratiopharm direct, Roche, Rovi, Sanofi-Aventis, Shering Plough, Shire Pharmaceuticals, Siemens, Swedish Orphan International, Uriach, Vivia Biotech, Wyeth Farma

# LI Reunión Nacional de la AEHH XXV Congreso Nacional de la SETH

Barcelona, 12-14 de noviembre de 2009

## COMITÉ ORGANIZADOR

*Presidente:* Jordi Sierra  
*Vicepresidente:* Jordi Fontcuberta  
*Vocales:* Alberto Altés  
Isabel Badell  
Carles Besses  
Salut Brunet  
Pere Domènech  
Jesús Estella  
Alberto Fernández  
Joan García  
Antonio Julià  
Ramón López  
Fuensanta Millá  
Emili Montserrat  
Ana Muntañola  
Josep Nomdedéu  
Immaculada Roig  
Miquel Rutllant  
Josep Sánchez de Toledo  
Joan Carles Souto  
Anna Sureda  
Aránzazu Ugarriza

---

## COMITÉ CIENTÍFICO

*Presidente:* Álvaro Urbano Ispizua  
*Vicepresidente:* Joan Carles Reverter  
*Vocales:* Carmen Burgaleta  
Joan Bargay  
Mercedes Corral  
José de Blas  
Ildefonso Espigado  
Jordi Esteve  
Lourdes Florensa  
Jorge Gayoso  
Ana Isabel Heiniger  
J.M. Martí Tutusaus  
Ángel Remacha  
Julia Rodríguez Villanueva  
José Román  
Josep M.<sup>a</sup> Ribera (coordinador del programa educacional)

*Presidente SETH:* Joan Carles Reverte  
*Vocales:* Javier Corral  
José Félix Lucía  
Pilar Llamas  
José Mateo  
José Antonio Páramo  
Dolors Tàssies (coordinadora del programa educacional)

## ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE HEMATOLOGÍA Y HEMOTERAPIA

*Presidente:* Evarist Feliu Frasnado  
*Vicepresidenta 1.<sup>a</sup>:* María Fernanda López Fernández  
*Vicepresidenta 2.<sup>a</sup>:* Carmen Burgaleta Alonso de Ozalla  
*Secretario general:* Alfonso José Santiago Marí  
*Secretario adjunto:* Ramon Salinas i Argente  
*Tesorero:* Rafael Martínez Martínez  
*Contador:* Rafael de la Cámara de Llanza  
*Vocales:* M.<sup>a</sup> Luz Amigo Lozano  
Lourdes Florensa Brichs  
Fernando A. González Fernández  
Ángel León Lara  
Joaquín Martínez López  
Teresa Molero Labarta  
Montserrat Rovira Tarrats  
Marta Torrabadella Reynoso  
*Ex presidentes:* Agustín Aznar Gerner  
Ricardo Castillo Cofiño  
Gonzalo Díaz de Iraola  
Pedro Farreras Valentí  
José M.<sup>a</sup> 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 Bañeres  
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  
*Tesorera:* M.<sup>a</sup> Ángeles Dasí Carpio  
*Vocales:* M.<sup>a</sup> Isabel Díaz Ricart  
Pere Domènech Santasusana  
Saturnino Haya Guaita  
Victor Jiménez Yuste  
José Mateo Arranz  
Juana Vallés Giner  
Virtudes Vila Liente  
*Ex presidentes:* Justo Aznar Lucea  
Francisco Javier Batlle Fonrodona  
Antonio López Borrasca  
Fernando Martínez Brotons  
Miguel Rutllant Bañeres  
Carlos Villaverde Grote

# haematologica

---

## Haematologica, Spanish Edition

### Edición y Publicidad:

ACCIÓN MÉDICA, S.A.

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

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

publicaciones@accionmedica.com • www.accionmedica.com

nviou@accionmedica.com (publicidad)

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

Tel.: 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.

## Sumario

### Programa Educativo

Coordinadores: J.M.<sup>a</sup> Ribera. Barcelona  
D. Tàssies. Barcelona

La anemia del anciano  
F.A. González Fernández, C. Benavente Cuesta

The WHO classification of acute myeloid leukaemias  
E. Matutes

Hemofilia adquirida  
J. Monteagudo Terrés

Resistencia y variabilidad en la respuesta a antiagregantes plaquetarios: diagnóstico, relevancia clínica y opciones terapéuticas  
V. Vicente, M.L. Lozano, V. Roldán, J. Rivera

Patología trombótica relacionada con la gestación: profilaxis y tratamiento  
A. Santamaría Ortiz

Citopenias autoinmunes corticorresistentes  
J.R. Cabrera Marín

Tratamiento de la leucemia aguda linfoblástica del adulto  
J.M. Ribera, A. Oriol, J.M. Sancho, M. Morgades, O. García, C. Ferrà, B. Xicoy, M. Batlle, A. Flores, S. Vives, M.J. Jiménez, J. Juncà, I. Granada, L. Zamora, F. Millá, E. Feliú

Linfomas cerebrales primarios  
F. Graus

Mieloma múltiple en pacientes de edad avanzada  
J. Bladé, L. Rosiñol, M.<sup>a</sup>T. Cibeira, C. Fernández de Larrea

Enfermedad injerto contra huésped crónica: fisiopatología, clasificación y tratamiento  
J.A. Pérez-Simón

### XXII Lección Conmemorativa Antonio Raichs

Coordinadores: E. Feliú. Barcelona  
A. Urbano Ispizua. Sevilla

Síndromes mieloproliferativos crónicos  
F. Cervantes

### SIMPOSIOS

#### Leucemia aguda

Coordinadores: J. Esteve. Barcelona  
J. Díaz-Mediavilla. Madrid

5 Identificación de mutaciones relevantes en leucemia mieloblástica aguda. Impacto clínico  
M. Camós, M. Torrebadell, M. Pratcorona, M. Rozman, J. Esteve 83

18 Epigenetic deregulation in myeloid malignancies  
M.E. Figueroa, A. Melnick 88

22 Allogeneic stem cell transplantation in younger patients with acute myeloid leukemia in first complete remission: application of sibling and matched unrelated donors  
J.J. Cornelissen 91

29 Nuevos agentes terapéuticos en la leucemia mieloide aguda  
J. Sierra, S. Brunet 94

#### Linfomas T cutáneos

Coordinadores: A. López Guillermo. Barcelona  
R.M.<sup>a</sup> Pujol. Barcelona

39 Características citogenéticas de los linfomas T cutáneos  
B. Espinet, R. Salgado 103

#### Anemia ferropénica

Coordinadores: A. Remacha. Toledo  
J.A. Muñoz. Cádiz

56 Anemia ferropénica en el paciente anticoagulado  
E. Martí Sáez 110

61 Hierro oral o endovenoso. Nuevos preparados  
J.A. Muñoz, R. Jiménez, C.E. Risueño, C. de Cos Höhr 112

*Helicobacter pylori* y anemia ferropénica  
C. Benavente, F.A. González 116

73 The molecular significance and functional relevance of matriptase-2 mutations in the development of iron-refractory iron deficiency anemia  
A.J. Ramsay, A. Remacha, V. Quesada, A. Kwarciak, C. López-Otín, G. Velasco 120

## Herramientas informáticas en el laboratorio de hematología

Coordinadores: J. de Blas. Sevilla  
J.L. Vives Corrons. Barcelona

Herramientas de ayuda a la validación de resultados en hematimetría  
J.R. Furundarena Salsamendi 128

Aplicaciones informáticas para la gestión documental de los sistemas de calidad en el laboratorio clínico  
J. Anguita, A. Pérez 138

Can automated blood film analysis replace the manual differential?  
C. Briggs, S.J. Machin 142

Aplicaciones informáticas para la descentralización del TAO  
M. Vinuesa Vilella 142

## Endotelio y plaquetas: de la biología al tratamiento

Coordinadores: P. García de Frutos. Barcelona  
J.A. Páramo. Pamplona

The evaluation of the endothelium: recent concepts  
A. Blann, S. Apostolakis, E. Shantsila, G.Y.H. Lip 149

Endothelial microparticles in thrombosis and thrombolysis: detection and clinical implications  
E. Anglés-Cano 155

Más allá de la hemostasia: papel de las plaquetas en procesos tromboinflamatorios  
M.T. Santos, J. Vallés, A. Moscardó 155

Indicaciones actuales para la terapéutica combinada antiagregante/anticoagulante  
M. Heras 161

## Nuevas tendencias diagnóstico-terapéuticas en hemofilia

Coordinadores: R. Pérez-Garrido. Sevilla  
J.F. Lucía. Zaragoza

Tratamiento del primer hemartros en el paciente hemofílico  
J.A. Aznar 169

Ecografía articular en hemofilia: ¿una práctica para hematólogos?  
F. Querol, F. Aparisi, J. Beltrán, C. Cifrián 175

El parto en niños con hemofilia: ¿tratar o no tratar?  
C. Altisent 181

Valoración crítica de los modelos de profilaxis primaria  
C. Sedano 185

## Síndrome mielodisplásico

Coordinadores: J. Bargay. Palma de Mallorca  
B. Nomdedéu. Barcelona

Diagnóstico citogenético de los síndromes mielodisplásicos  
F. Solé 192

Algoritmo diagnóstico y tratamiento de los SMD de bajo riesgo. Recomendaciones europeas  
G.F. Sanz 197

Trasplante con acondicionamiento convencional y de intensidad reducida en síndromes mielodisplásicos y leucemia aguda mieloblástica  
D. Valcárcel, R. Martino 207

## Linfoma folicular

Coordinadores: J. Gayoso. Madrid  
E. Conde. Santander

The role of the microenvironment in follicular lymphoma. Meeting of the Spanish Hematology Society, November 2009  
R.D. Gascoyne 215

Tratamiento de primera línea y mantenimiento en el linfoma folicular  
A. López-Guillermo, G. Gutiérrez-García 220

Tratamiento de rescate en el linfoma folicular  
M.ªJ. Terol Casterá, A.I. Teruel Casasús 223

Trasplante de progenitores hemopoyéticos en el linfoma folicular  
S. Montoto 227

## Progenitores hemopoyéticos

Coordinadores: A. Urbano Ispizua. Sevilla  
J. de la Rubia. Valencia

Trasplante alogénico: ¿médula ósea o sangre periférica?  
J. de la Rubia 233

Mesenchymal stem cell therapy, a new form of immune suppression  
W.E. Fibbe 238



## **Novedades en hemostasia e hipercoagulabilidad**

*Coordinadores: F. España. Valencia  
J. Corral. Murcia*

Risk factors for venous thrombosis: genes and lifestyle  
*F.R. Rosendaal* 242

Novedades en hemostasia e hipercoagulabilidad: ARN en hemostasia, biología vascular y cardiopatías  
*E. Zorio, L.A. Ramón, P. Medina, E. Fernández, Ó. Cano, J. Navarro, A. Salvador, F. España, A. Estellés, en representación de la Unidad de Valoración del Riesgo de Muerte Súbita Familiar de la Comunidad Valenciana* 244

Implicaciones de la hemorreología en la hemostasia y la trombosis: de la interacción celular a la repercusión molecular  
*G. Escolar, J. Bozzo* 252

Serpinas hemostáticas  
*I. Martínez-Martínez, A. Ordóñez, V. Vicente, J. Corral* 257

## **Trasplante de progenitores hemopoyéticos**

*Coordinadores: I. Espigado. Sevilla  
M. Jurado. Granada*

Impacto clínico de los polimorfismos genéticos en el trasplante alogénico  
*M. Granell* 266

Cytomegalovirus infection in haematopoietic stem cell transplantations  
*I. Gracia-Ahufinger, F. de la Cruz-Vicente, I. Espigado-Tocino, O.J. BenMarzouk-Hidalgo, J. Mier-Mota, J.M. Cisneros-Herreros, Á. Urbano-Ispizua, P. Pérez-Romero* 269

Células mesenquimales y trasplante hematopoyético  
*M.C. del Cañizo, S. Carrancio, F.M. Sánchez-Guijo, M. Díez Campelo, J.A. Pérez Simón* 275

## **Genética en hemopatías malignas**

*Coordinadores: F. Prósper. Pamplona  
J. Hernández-Rivas. Salamanca*

Papel de las alteraciones epigenéticas en la patogénesis y pronóstico de la leucemia linfoblástica aguda  
*J. Román-Gómez, X. Agirre, A. Jiménez-Velasco, V. Martín, V. Arqueros, A. Heiniger, F. Prósper, A. Torres* 280

MicroRNA y tumores hematológicos  
*A. Navarro, T. Díaz, M. Monzó* 288

New molecular aspects of malignant lymphomas  
*J.I. Martín-Subero* 294

Mecanismos de resistencia a los inhibidores de tirosina-cinasa en la leucemia mieloide crónica  
*A. Jiménez-Velasco, J. Román-Gómez, X. Agirre, M. Alcalá, F. Prósper, A. Torres, A.I. Heiniger* 297

## **El histiocito**

*Coordinadores: L. Florensa. Barcelona  
M. Barbón. León*

Del monoblasto al histiocito/macrófago  
*S. Woessner, L. Arenillas, A. Ferrer, E. Pérez-Vila, L. Florensa* 302

El histiocito: el macrófago de las enfermedades de depósito lisosomal  
*P. Giraldo, P. Irún* 309

Linfohistiocitosis hemofagocítica  
*I. Astigarraga Aguirre* 315

Estado actual en el diagnóstico y tratamiento de las histiocitosis de células de Langerhans  
*C. Rodríguez-Galindo* 319

## **Hemoterapia**

*Coordinadores: M. Corral. Salamanca  
J. Carmona. Sevilla*

Aféresis terapéuticas: nuevas evidencias para definir las indicaciones  
*C. Arbona* 323

Anemia hemolítica autoinmune: diagnóstico serológico y tratamiento transfusional  
*C. Zamora de Pedro* 325

Uso óptimo de la transfusión de plaquetas  
*M. Lozano Molero, J. Cid Vidal* 330

Trazabilidad y seguridad de la transfusión en el hospital  
*N. Carpio, F. Moscardó, F. Arriaga, M.A. Sanz* 332

## **Aplicaciones terapéuticas de los nuevos anticoagulantes orales**

*Coordinadores: R. Lecumberri. Pamplona  
J. Mateo. Barcelona*

Nuevos anticoagulantes orales  
*J. Fontcuberta* 338

Profilaxis del tromboembolismo venoso con inhibidores orales de la trombina y del factor Xa <i>M. Monreal</i>	345	<b>Gestión clínica en hematología</b> <i>Coordinadores: E. Feliu. Barcelona A. Heiniger. Málaga</i>	
Prevención de la embolia de origen cardiaco con los nuevos anticoagulantes orales <i>P. Domènech, E. Pina, J. Peris, E. Rosselló</i>	348	Satisfacción del paciente hematológico y sus familias <i>J. Trelis</i>	398
<b>Nuevos métodos de diagnóstico en hemostasia y trombosis</b> <i>Coordinadores: M.ªF. López Fernández. A Coruña P. Llamas. Madrid</i>		Gestión clínica y calidad en hematología y hemoterapia <i>M.Á. Cuesta Casas, A.I. Heiniger Mazo</i>	400
Utilidad de los test de generación de trombina en la hemofilia <i>V. Jiménez Yuste, I. Fernández, M.T. Álvarez, M. Martín-Salces, I. Rivas, N. Butta, A. Rodríguez de la Rúa</i>	354	Funcionamiento integrado de la clínica con el laboratorio <i>P. Sánchez Godoy</i>	403
Controversias en el diagnóstico del síndrome antifosfolípido <i>L.J. García Frade, J.M. Martín Antorán, E. Fernández Fontecha</i>	358	La motivación de los profesionales de la salud <i>V. Martínez Espinosa</i>	410
Métodos diagnósticos en la enfermedad de von Willebrand <i>J. Baille, A. Pérez-Rodríguez, E. Lourés Fraga, Á. Rodríguez Trillo, M.F. López-Fernández</i>	363	<b>Nuevos aspectos clínicos y biológicos de la fibrinólisis</b> <i>Coordinadores: P. Marco. Alicante J.C. Reverter. Barcelona</i>	
Día a día en el laboratorio de hemostasia: automatización y modelos de gestión informatizada <i>R. Mata Serna, P. Llamas Sillero</i>	373	Fibrinólisis y enfermedades endocrinas <i>A. Estellés, E. Zorio, J. Gilabert-Estellés, L.A. Ramón, A. Braza Boils, F. España</i>	412
<b>Síndromes mieloproliferativos crónicos</b> <i>Coordinadores: C. Besses. Barcelona L. Hernández-Nieto. Tenerife</i>		Trombólisis en el ictus isquémico <i>J. Álvarez Sabín</i>	418
Impacto de las mutaciones de JAK2 en el diagnóstico y clasificación de las neoplasias mieloproliferativas no leucémicas <i>J. Martínez-López, E. Albizua, I. Rapado, M. Gallardo, S. Barrios, R. Ayala</i>	380	Fibrinólisis y proteólisis: implicaciones e interpretación clínica de las pruebas de laboratorio <i>J. Orbe, J.A. Rodríguez, J.A. Páramo</i>	422
Síndromes mieloproliferativos crónicos: papel de los leucocitos y mecanismos de trombocitemia y policitemia <i>A. Álvarez Larrán, E. Arellano</i>	383	Importancia de la estructura de la fibrina en su lisabilidad: estudio en distintas situaciones patológicas <i>A.M. Lauricella, D.N. de Paris, A. Arín, G. Rosa</i>	428
Tratamiento adaptado a riesgo en policitemia vera y trombocitemia esencial <i>C. Burgaleta, A. de Ozalla, J.J. Gil-Fernández</i>	387	<b>Terapia celular: de la investigación básica a la transfusión sanguínea</b> <i>Coordinadores: L. Blanco. Valladolid P. Ortiz. Barcelona</i>	
Familial chronic myeloproliferative disorders –from a curiosity to a model for pathogenesis and disease evolution <i>H. Cario</i>	394	Mecanismos que regulan la generación de células madre hematopoyéticas en el embrión de ratón: ¿qué se necesita para producir células madre hematopoyéticas? <i>A. Bigas Salvans</i>	434
		Back and forth with the stem cell niche: How RHO GTPases control stem cell trafficking <i>J.A. Cancelas</i>	437
		¿Es posible producir componentes sanguíneos <i>in vitro</i> a partir de células madre? <i>A. Pla, J.J. Cairó, J. García</i>	446



## CASOS CLÍNICO-CITOLÓGICOS

Coordinadores: *E. Tuset. Girona*  
*M.ªJ. Muruzábal. Cantabria*

### Caso 1

Niño de 3 años con alteraciones en la pigmentación, pancitopenia y fiebre  
*F.J. Ortuño, J.L. Fuster, M.L. Lozano, M.M. Bermúdez, E. Llinares, A. Galera, S. Alfayate, A.I. Antón, J. Rivera, M.M. Osmá, A. Jerez, V. Vicente*

### Caso 2

Hipoplasia medular con pequeña clona HPN  
*M. Aymerich, M. Suárez-Lledo, A. Martínez-Trillos, J.L. Aguilar, M. Rozman, B. Nomdedéu, N. Villamor*

### Caso 3

Paciente con adenopatías, toxicodermia y leucemia aguda con diferenciación eosinofílica de carácter clonal  
*E. Luño, C. Sanzo, R. Llorente, E. Fuente, M. González, A. Fernández, F. Jonte, E. Fanjul, B. Ordóñez, A. Díaz*

### Caso 4

Presentación simultánea de linfoma linfocítico y leucemia mieloide aguda  
*V.L. Peri, J.M. Bosch Benítez, C. Camacho García, J.L. Alfonso Martín, R. Fernández Martín, M.M. Caballero Gómez, J.D. González San Miguel, J.M. Díaz Cremades* 463

### Caso 5

451 Fiebre, pancitopenia y hepatoesplenomegalia en varón de 37 años con infección por virus de la inmunodeficiencia humana  
*L. Morabito, T. Martín-Santos, J.M. Raya, I. Ceballos, H. Álvarez-Argüelles, L.M. González del Castillo, M.R. Alemán, M.L. Brito, L. Hernández-Nieto* 467

### Caso 6

458 Leucemia aguda linfoide T con marcadores mieloides  
*M. Camós, T. Toll, S. Rives, A. Català, M. Pérez-Iribarne, R. Berrueco, N. Conde, A. Quintero, E. Tuset, J. Estella* 470

# PROGRAMA EDUCACIONAL

**COORDINADORES:** J.M.<sup>a</sup> RIBERA. *Barcelona*  
D. TÀSSIES. *Barcelona*



## Programa educacional

COORDINADORES: J.M.<sup>a</sup> RIBERA. *Barcelona*  
D. TÀSSIES. *Barcelona*

### Resumen

El Programa Educacional de la LI Reunión Nacional de la AEHH y el 25 Congreso Nacional de la SETH que tenemos el placer de coordinar trata de abarcar en profundidad temas relevantes de la práctica hematológica habitual. En algunos casos porque se trata de situaciones frecuentes y, en otros, porque se analizan procesos en los que ha habido avances notables que han determinado modificaciones en el enfoque diagnóstico o terapéutico. Como es habitual, se ha buscado un equilibrio en la distribución de temas con el fin de abarcar las diversas áreas de nuestra especialidad, como son la clínica, el laboratorio, la trombosis y hemostasia y la hemoterapia/inmunoematología.

Una situación muy frecuente en pacientes ancianos tanto hospitalizados como ambulatorios es la anemia. Aunque con frecuencia es multifactorial, su estudio preciso puede poner de manifiesto alteraciones corregibles que redundarán en una notable mejoría en la calidad de vida de los pacientes. Otros aspectos de la fisiopatología de la anemia del anciano son todavía poco conocidos y el proceso diagnóstico está poco sistematizado. El doctor González (Hospital Clínico San Carlos de Madrid) revisa el tema en profundidad, con especial énfasis en la estrategia diagnóstica y las diversas posibilidades terapéuticas. Otra situación menos frecuente, pero a veces difícil de resolver, son las citopenias autoinmunes corticorresistentes. Una vez establecido el fracaso a una pauta de glucocorticoides bien administrada, se abre un abanico muy amplio de posibilidades terapéuticas, en muchos casos más basadas en el empirismo que en resultados de estudios clínicos reglados. Los avances en el conocimiento de la patogenia de estas citopenias han llevado a la inclusión de nuevos fármacos en el arsenal terapéutico, que están determinando variaciones en el algoritmo terapéutico de estas citopenias, especialmente de la púrpura trombocitopénica inmune. Todo ello lo desarrolla en profundidad el doctor Cabrera (Hospital Puerta de Hierro de Madrid).

Las hemopatías malignas ocupan una gran parte del quehacer de los hematólogos. Así, la clasificación de las leucemias agudas ha variado notablemente conforme nos hemos acercado al conocimiento de las lesiones genéticas y moleculares que subyacen en su patogenia. Fruto de ello ha sido el paso de una clasificación puramente morfológica a una morfológica, genética y molecular, la cual está además en constante evolución. La doctora Matutes (Royal Marsden Hospital de Londres) efectúa una revisión de la última clasificación (4ª Edición) de la OMS de las leucemias mieloides agudas, con especial énfasis en los nuevos aspectos incorporados a la clasificación anterior. La leucemia aguda linfoblástica (LAL) es poco frecuente en el adulto y los progresos en las últimas décadas han sido tan sólo moderados en este grupo de edad. Sin embargo, merced al mayor conocimiento de los diversos subgrupos de LAL, se ha podido pasar de un tratamiento basado exclusivamente en factores pronósticos a uno más individualizado en función del subtipo genético-molecular. Y ello está empezando a proporcionar resultados más prometedores. Todo esto lo analiza el doctor Ribera (Institut Català d'Oncologia-Hospital Germans Trias i Pujol de Badalona). Por su parte, el tratamiento del mieloma múltiple ha cambiado enormemente con el desarrollo clínico de varios fármacos, especialmente activos en diversas combinaciones. La cantidad de información clínica es tan grande que hace necesaria una interpretación cuidadosa para su aplicación con criterio a la práctica clínica habitual. Ello es especialmente válido en pacientes de edad avanzada, donde la propia edad y las comorbilidades obligan a tener un especial cuidado en el tratamiento con los nuevos fármacos. El doctor Bladé (Hospital Clínic de Barcelona), con amplia experiencia en el mieloma, hace una puesta al día de este tema relevante. A su vez, aunque poco frecuentes, los linfomas primarios del sistema nervioso central han cobrado relevancia clínica por su incidencia creciente y por la progresiva mejoría en los resultados del tratamiento. Ello obliga a efectuar un balance equilibrado entre la intensidad y la eficacia del tratamiento, en

un intento de aumentar todavía más la tasa de curaciones sin pagar por ello el peaje de una excesiva toxicidad. El doctor Graus (Hospital Clínic de Barcelona) ha liderado desde hace años protocolos multicéntricos de tratamiento de estos linfomas y sus aportaciones son por tanto del máximo interés.

El trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) constituye un área terapéutica en continua evolución en cuanto a sus indicaciones y modalidades. La enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) todavía constituye una de las complicaciones más frecuentes y potencialmente más graves del TPH. A pesar de los avances en el conocimiento de su fisiopatología y también en el tratamiento, todavía ocasiona una elevada mortalidad y morbilidad. Esto último es especialmente frecuente en la EICH crónica, donde con frecuencia los tratamientos la controlan en mayor o menor grado, pero pocas veces la erradican. Por ello es especialmente valiosa la aportación del doctor Pérez Simón (Hospital Clínico Universitario de Salamanca), que cuenta con experiencia clínica y biológica en la EICH y que efectúa una revisión sobre la reciente clasificación y el tratamiento de la EICH crónica.

La hemofilia adquirida es una diátesis hemorrágica poco frecuente, que se ocasiona por la aparición de autoanticuerpos dirigidos contra el factor VIII de la coagulación. Aunque su incidencia es baja, es una entidad grave que suele asociarse con una alta morbilidad y mortalidad. Por ello, una rápida sospecha clínica, la adecuada caracterización en el laboratorio del anticuerpo inhibidor y la conducta terapéutica oportuna son de capital importancia para la mejora de la supervivencia del paciente. Como sucede con otras enfermedades raras, la existencia de registros internacionales puede ser de gran ayuda para avanzar en el conocimiento y homogeneizar conductas terapéuticas. En su ponencia, el doctor Monteagudo (Hospital Clínic de Barcelona), con amplia experiencia clínica y de laboratorio en el tratamiento de pacientes con diátesis hemorrágica, revisa los aspectos epidemiológicos y clínicos de la hemofilia adquirida, los procedimientos de laboratorio encaminados a la identificación del inhibidor, así como las opciones terapéuticas disponibles en la actualidad, tanto para el tratamiento del episodio agudo hemorrágico como para la erradicación del anticuerpo inhibidor.

El tratamiento con fármacos antiagregantes plaquetarios constituye una herramienta esencial en el tratamiento y prevención de eventos trombóticos en los pacientes con patología vascular arterial. Aunque la eficacia de los antiagregantes está bien demostrada, algunos pacientes desarrollan nuevos eventos vasculares durante el tratamiento. Este fenómeno, descrito hace ya años para el tratamiento con ácido acetil salicílico, se ha denominado “resistencia” o, más recientemente, “respuesta clínica inadecuada” a los antiagregantes. La correcta identificación de estos pacientes es, por tanto, de gran relevancia clínica. Sin embargo, uno de los aspectos más debatidos es la capacidad de las pruebas de laboratorio, disponibles actualmente, para identificar a los pacientes con riesgo de presentar nuevas trombosis, así como la estandarización e idoneidad de las mismas. El doctor Vicente (Hospital Universitario Morales Meseguer-Centro Regional de Hemodonación de Murcia) analiza con detalle la conveniencia de la metodología de laboratorio disponible, su correlación con las manifestaciones clínicas y los diversos factores que pueden influir en la variabilidad interindividual y en la respuesta inadecuada a los antiagregantes plaquetarios.

Por último, es conocido que la gestación y el puerperio constituyen una causa adquirida de riesgo de trombosis. En las mujeres que además presentan otros factores de trombofilia, congénita o adquirida, este riesgo se ve incrementado, a la vez que también aumenta el riesgo de padecer otras complicaciones vasculares obstétricas, tales como la preeclampsia. Además, la demanda creciente de procedimientos de reproducción asistida añade complejidad al control de las pacientes con riesgo trombótico. Para el eficaz control de estas situaciones clínicas es necesario estratificar el riesgo que comportan, a la vez que establecer las pautas óptimas de profilaxis en cada caso. Una de las mayores dificultades para ello es que la mayoría de las recomendaciones actuales están basadas en extrapolaciones a partir de población no embarazada y en estudios observacionales. La doctora Santamaría (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona), experta en el tema, nos ofrece en su ponencia una perspectiva actualizada de la patología trombótica, tanto arterial como venosa, relacionada con la gestación.

Deseamos que el contenido del presente Programa Educativo responda a las expectativas de los médicos hematólogos y especialistas en formación y contribuya a actualizar nuestros conocimientos en una especialidad con un desarrollo tan rápido como es la Hematología-Hemoterapia.

# La anemia del anciano

F.A. GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, C. BENAVENTE CUESTA

Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Clínico San Carlos. Madrid

## Introducción

La anemia es una de las situaciones patológicas más común que nos podemos encontrar en la práctica clínica diaria, siendo especialmente frecuente en las personas de edad avanzada. Sin embargo, sólo en los últimos años, debido al envejecimiento de la población, se han realizado estudios para conocer su prevalencia real, así como sus posibles causas y las repercusiones sobre el estado de salud y la esperanza de vida en pacientes de edad avanzada.

En este sentido se estima que en el mundo hay cerca de 500 millones (7% de la población mundial) de adultos mayores de 65 años y que en el 2030 esta cifra se duplicará alcanzando el billón (12%). En los países desarrollados, la caída de la natalidad con la disminución de la mortalidad está acentuando este fenómeno de envejecimiento con un incremento sustancial de la población octogenaria que constituye el segmento de la población que más está creciendo. Así, por ejemplo, se estima que en EE UU en el 2050 se cuadruplicará este segmento de la población con 21 millones de personas<sup>1</sup>.

En España, en la actualidad el 16,6% de la población es mayor de 65 años y se calcula que este porcentaje aumentará hasta el 36% en el 2050 con un 7,2% mayor de 80 años<sup>2</sup>.

## Epidemiología

La estimación de la prevalencia de la anemia en el anciano varía dependiendo de los criterios utilizados en la definición de la anemia (puntos de corte de la hemoglobina) y de las características demográficas de la población sobre las que se halla realizado el estudio (rangos de edad, raza, hospitalización, etc.). De esta forma se han comunicado prevalencias que varían de un 2,9% a un 61% en varones y de un 3,3 a un 41% en las mujeres<sup>3,4</sup>.

En la mayoría de los estudios se utilizan como puntos de corte de la hemoglobina (Hb) para definir la anemia los establecidos por la OMS (120 g/L de Hb para las mujeres y en 130 g/L para los hombres)<sup>5</sup>. No obstante, la validez de estos criterios está en el momento actual sujeta a debate. En este sentido, en un estudio realizado por el instituto de salud y nutrición de EE UU (NHANES III) se observó una diferencia

significativa entre grupos raciales, presentando la población blanca no hispana una prevalencia significativamente menor que la población negra (9,0% versus 27,8%) (Figura 1), y parece que estas diferencias tienen una base biológica, de forma que la población negra presenta una Hb fisiológicamente más baja independientemente de las diferencias socioeconómicas<sup>6</sup>. En un estudio prospectivo en una cohorte de pacientes mayores de 65 años, el quintil más bajo de Hb (< 137 g/L en hombres y < 126 g/L en mujeres) presentó una mayor sensibilidad que los criterios de la OMS para la identificación de un incremento de la mortalidad<sup>7</sup>. Por otro lado, aunque hay una disminución de la hemoglobina (y hematocrito) con el envejecimiento en los hombres debido a la reducción de la producción de testosterona<sup>8</sup>, los estudios longitudinales no apoyan la afirmación de que esta disminución se traduce en anemia<sup>9</sup>. Por lo tanto, los niveles de Hb que definen la anemia deberían estar en relación con el mejor estado de salud posible según los rangos de edad, aunque esta aproximación incluiría un mayor número de personas con anemia. No obstante, serían necesarios más estudios con controles que contemplaran las posibles comorbilidades que interfirieran en esta valoración para que este enfoque se pueda utilizar en la práctica clínica diaria<sup>10</sup>.

En un metaanálisis reciente que engloba 34 estudios con más de 85.000 adultos mayores de 65 años, utilizando los criterios de la OMS, la prevalencia global de la anemia fue del 17%, de un 12% (3-50%) en ancianos de comunidades extrahospitalarias, de un 47% (31-50%) en los que recibían cuidados médicos

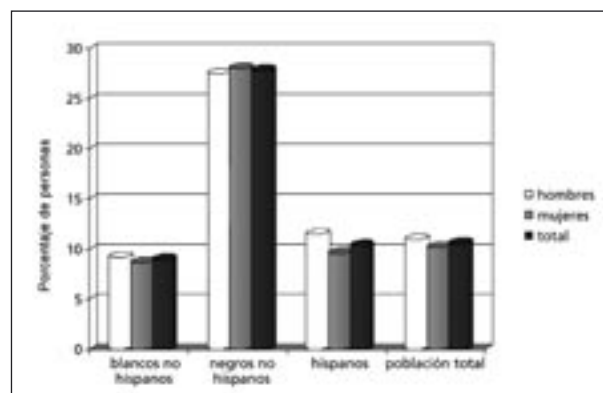


Figura 1. Porcentaje de personas mayores de 65 años de edad con anemia, según raza, etnia y sexo. NHANES III<sup>6</sup>.



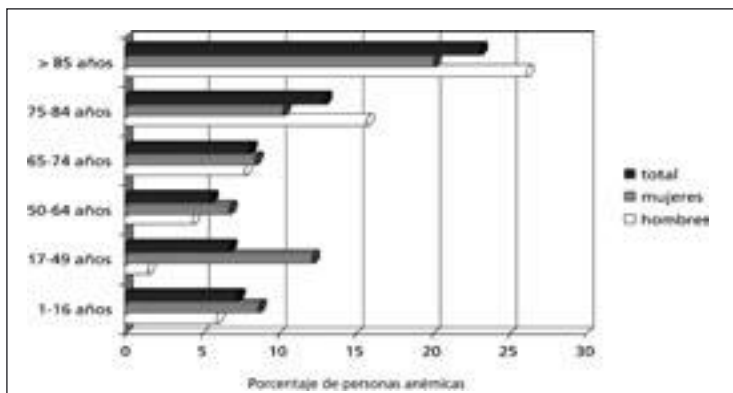


Figura 2. Porcentaje de personas con anemia en la población general según edad y sexo. NHANES III<sup>6</sup>.

a domicilio y de un 40% (40-72%) en los ingresados en un hospital<sup>11</sup>.

Otro dato interesante desde un punto de vista epidemiológico es que la prevalencia se incrementa según aumenta la edad y este incremento es mayor en los hombres que en las mujeres<sup>6</sup> (Figura 2). De esta forma, en los mayores de 85 años (grandes ancianos u *oldest-old*) la anemia está presente en el 29,6% y el 30,7% de los hombres y en el 16,5% y el 17,7% de las mujeres en dos estudios diferentes, respectivamente<sup>12,13</sup>.

En la mayoría de los casos el grado de anemia es leve, así en el estudio NHANES III que incluye adultos mayores de 65 años extrahospitalarios, menos del 1% presentaban una Hb < 100 g/L y menos de 3% una Hb < 110 g/L<sup>6</sup>.

### Consecuencias de la anemia

Un creciente número de estudios en la literatura médica apoya el argumento de que la anemia incluso leve o una Hb más baja de lo normal se asocia con una amplia morbilidad y una mayor mortalidad, que son particularmente marcadas en los más ancianos.

Entre estas asociaciones con morbilidades destacan:

- Mayor prevalencia del síndrome de fragilidad, constituyendo la anemia un factor de riesgo independiente en su desarrollo con un efecto multiplicativo junto a la patología cardiovascular<sup>14</sup>.
- Disminución en su rendimiento y capacidad física<sup>15</sup>.
- Deterioro cognitivo con mayor riesgo de desarrollar demencia<sup>16,17</sup>.
- Reducción de la movilidad con un mayor riesgo de caídas recurrentes y menor densidad de los huesos y del músculo esquelético<sup>18-21</sup>.
- Incremento en la prevalencia de depresión grave<sup>22</sup>.
- Mayor frecuencia y duración de hospitalización, así como un mayor riesgo de desarrollar delirium durante ésta<sup>23,24</sup>.

- Peor evolución en insuficiencia cardíaca congestiva<sup>25</sup>.
- Mayor frecuencia de complicaciones y peor recuperación postoperatoria tras cirugía<sup>26</sup>.

Respecto a la mortalidad, ésta se ha asociado significativamente con la anemia en adultos mayores de 65 años independientemente de la causa de la muerte, la existencia o no de comorbilidad y del rango de edad. Existe una relación proporcional directa entre el riesgo de muerte y el descenso de nivel de Hb con riesgos significativos, incluso con descensos leves de la Hb<sup>8,23</sup>.

Sin embargo, todavía queda por definir en qué grado interviene la anemia en esta asociación por sí sola, dado que en la mayoría de las ocasiones es un signo de una enfermedad subyacente, y puede ser que constituya un marcador de gravedad de esta enfermedad de base.

Estas diferencias en la morbilidad y mortalidad en relación con la anemia son más notables en la población blanca que en la negra, lo que podría reflejar, al igual que la diferencia en la prevalencia de la anemia, las diferencias fisiológicas en los niveles de Hb, de forma que la población negra presenta unos niveles normales Hb menores que la población blanca<sup>6</sup>.

### Etiología

La anemia no debe considerarse como una consecuencia inevitable del envejecimiento, de forma que en el 80% de los ancianos se identifica una causa subyacente. Sin embargo, por el alto grado de comorbilidad que existe es difícil determinar cuál es la causa final responsable de la anemia, de forma que aproximadamente en dos tercios de los pacientes la anemia es multifactorial, encontrándose dos o más patologías como posibles causas de anemia<sup>6</sup>.

La procedencia es un factor importante en la valoración de las posibles causas. Así, en los pacientes hospitalizados las anemias posthemorragias, bien por cirugía, traumatismo o por sangrado digestivo o genitourinario, son mucho más frecuentes que en los pacientes ambulatorios, y en estos últimos las más frecuentes son la anemia de tipo crónico o asociada a enfermedades inflamatorias, la anemia ferropénica y la anemia por insuficiencia renal<sup>11</sup>.

No obstante, en los estudios donde se valora la posible causa de la anemia, la estratificación va a depender de los parámetros valorados, que en la mayoría de las ocasiones son inadecuados o insuficientes, de forma que en muchos de ellos no se realizan pruebas de hemólisis, aspirado de médula ósea, determina-

Tabla 1. Distribución de los tipos de anemia en mayores de 65 años. NHANES III<sup>6</sup>

Anemia	N.º de pacientes	Tipo (%)	Todas anemias (%)
<b>Anemia nutricional / sangrado</b>			
Déficit de hierro	467.000	48,3	16,6
Déficit de ácido fólico	181.000	18,8	6,4
Déficit de vitamina B <sub>12</sub>	166.000	17,2	5,9
Déficit de ácido fólico y vitamina B <sub>12</sub>	56.000	5,8	2,0
Déficit de hierro y ácido fólico/vitamina B <sub>12</sub>	95.000	9,9	3,4
Total	965.000	100,0	34,3
<b>Anemias de enfermedad crónica</b>			
Insuficiencia renal (IRC)	230.000	25,4	8,2
Proceso inflamatorio (AI)	554.000	61,3	19,7
IRC y AI	120.000	13,3	4,3
Total	904.000	100,0	32,2
<b>Anemia inexplicada</b>			
Total	945.000	-	33,5
Total	2.814.000	-	100,0

ción de factores de maduración, niveles de eritropoyetina, etc. Esto ha determinado que prácticamente en la totalidad de los estudios exista un porcentaje que varía entre el 14 y el 50% de casos en los que no se encuentra una causa que justifique la anemia<sup>11</sup>. Dentro de estos casos persiste un porcentaje entorno al 20-30% que, pese a que se haga una exhaustiva búsqueda, realmente no se descubre un factor etiológico claro, por lo que recientemente ha surgido el concepto de anemia propia del anciano o anemia inexplicada del anciano<sup>27</sup>.

De esta forma, en el estudio NHANES III, utilizando pruebas de laboratorio como la capacidad total de fijación del hierro, sideremia, ferritina, vitamina B<sub>12</sub>, fólico sérico, protoporfirina eritrocitaria, proteína C reactiva, glucosa, creatinina y factor reumatoide, las anemias se estratificaron en anemia nutricional, anemia de enfermedad crónica y anemia inexplicada (Tabla 1)<sup>6,27</sup>.

Dentro del grupo de las anemias nutricionales se englobaría la anemia ferropénica, que en la mayoría de las ocasiones son debidas a pérdidas crónicas de sangre por tubo digestivo, en especial por lesiones tumorales, lo que obliga a realizar una exploración digestiva completa endoscópica. Además, hay que tener en cuenta que la celiaquía puede ser la causa de anemia ferropénica y debutar a partir de los 60 años, y estos pacientes responden a la dieta sin gluten de forma similar a los más jóvenes. La dieta puede ser un factor importante en algunos casos, al igual que la ingesta de antiinflamatorios, así como a la presencia de *Helicobacter pylori* a nivel gástrico<sup>5,6,27</sup>.

El segundo tipo en frecuencia en este grupo sería las anemias por déficit de vitamina B<sub>12</sub>. Aunque es frecuente encontrar niveles bajos de vitamina B<sub>12</sub> en

el anciano (10-15%), sólo un pequeño porcentaje (1-2%) presentan anemia por este déficit<sup>27</sup>. Sin embargo, cada vez hay más evidencia de la relación entre la disminución de los niveles de vitamina B<sub>12</sub> con la existencia de alteraciones neurológicas y disminución de la capacidad cognitiva, así como con la presencia de osteoporosis asociada a una mayor incidencia de fracturas de cadera<sup>28</sup>. Hay que tener en cuenta que es frecuente la asociación de anemia ferropénica y por déficit de vitamina B<sub>12</sub>, que en alguna serie llega hasta el 10% de las anemias<sup>6</sup>.

La anemia por déficit de ácido fólico es mucho menos frecuente debido a que muchas personas mayores usan suplementos vitamínicos que contienen ácido fólico y en algunos países se fortifica la dieta<sup>27</sup>. Sin embargo, esta sobrefortificación con ácido fólico, dada la alta prevalencia del déficit vitamina B<sub>12</sub> a estas edades, puede tener efectos perjudiciales. En este sentido, los pacientes con déficit de vitamina B<sub>12</sub> con niveles más altos de ácido fólico se asocian a mayores problemas cognitivos<sup>6</sup>. Cuando aparece el déficit de fólico se suele asociar al abuso del alcohol<sup>26</sup>.

La anemia de trastornos crónicos o asociada a la inflamación es el tipo de anemia más frecuente<sup>6,11</sup>; sin embargo, la falta de pruebas o test diagnósticos específicos y sensibles hace que en algunos estudios esté infravalorado y en otros, al contrario, sobrevalorado<sup>27</sup>. Aunque su mecanismo patogénico no es bien conocido, se ha relacionado con el efecto inhibitorio de las diferentes citoquinas inflamatorias sobre la eritropoyesis, así como con el aumento de síntesis de hepcidina que determinaría un atrapamiento del hierro por los macrófagos del sistema mononuclear fagocítico, que tiene como resultado una disminución en los niveles de hierro plasmático y, por tan-

to, una menor disponibilidad de éste para las síntesis de nueva hemoglobina<sup>29</sup>. Se ha relacionado con numerosos procesos neoplásicos, infecciosos o inflamatorios agudos y crónicos, y recientemente se ha visto la existencia de un aumento de citoquinas inflamatorias en patologías como la insuficiencia cardiaca, diabetes y aterosclerosis<sup>30,31</sup>.

En los ancianos se ha observado una respuesta inflamatoria aberrante, con una elevación prolongada de la interleuquina (IL-6) y el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), incluso después de haber desaparecido el estímulo inflamatorio, que se ha relacionado con la disminución de las hormonas sexuales que regularían negativamente la inflamación y la reducción de catabolismo de estas citoquinas inflamatorias<sup>32,33</sup>. Esta anormal regulación de la inflamación justificaría que la anemia asociada a ella sea especialmente frecuente en los pacientes de edad avanzada<sup>27,32,33</sup>.

La insuficiencia renal constituye otra de las causas frecuentes de anemia en el anciano, que representa en torno al 10% de los casos<sup>6</sup>. Incluso insuficiencias renales moderadas pueden cursar con anemia por una falta de producción de eritropoyetina. Dada la alta prevalencia de la insuficiencia renal en la población anciana, su asociación con otras posibles causas de anemia es frecuente y puede empeorar la situación clínica de estas otras patologías. Por tanto, su despistaje es importante, sobre todo porque el componente renal de la anemia puede responder a dosis bajas de agentes eritropoyéticos<sup>34</sup>.

Las síndromes mielodisplásicos son una causa frecuente de anemia del anciano. La edad media de su presentación se sitúa entono a los 70 años, el 80% de los casos se diagnostican en mayores de 60 años y un 26% de los pacientes superan los 80 años<sup>35</sup>. Se estima que su incidencia es de 8,1 por 100.000 habitantes y año en nuestro medio<sup>36</sup>. Sin embargo, dada la necesidad de realizar aspirados de médula ósea y estudios citogenéticos para su correcto diagnóstico, su prevalencia en la mayoría de los estudios sobre las causas de la anemia del anciano es infravalorada o no se contempla, incluyéndose en las anemias inexplicadas. No obstante, se estima que su prevalencia se sitúa entre el 5 y el 10% de las anemias del anciano<sup>6</sup>.

## Anemia inexplicable del anciano

Aproximadamente en un tercio de los pacientes ancianos con anemia no se encuentra una causa aparente, por lo que recientemente se ha acuñado el término de *anemia inexplicable* o *propia del anciano* para esta situación, que se caracteriza por una anemia leve, normocítica y normocrómica con niveles de eritropoyetina más bajos de los esperados para el nivel de

Hb<sup>37</sup>. Aunque estos niveles bajos de eritropoyetina sugieren que la anemia podría estar en relación con un proceso inflamatorio oculto, en un estudio donde se valoraron marcadores inflamatorios como la proteína C reactiva, la IL-6 y el TNF- $\alpha$ , éstos fueron bajos, descartando la inflamación, al menos como el factor más importante<sup>38</sup>.

Recientemente se está empezando a considerar a este tipo de anemia, más que como un hallazgo misterioso que se diagnostica por exclusión del resto de las causas, como un entidad compleja multifactorial, de forma que la contribución relativa de estos factores variará con la heterogeneidad clínica observada<sup>37</sup>.

Entre estos factores se han involucrado<sup>37</sup>:

- Disminución de la función endocrina renal según aumenta la edad asociada a la edad en la función renal, que determina una reducción en la respuesta de la eritropoyetina.
- Reducción de los niveles de andrógenos en hombres y mujeres con el envejecimiento que puede representar una disminución en el nivel de hemoglobina de hasta 10 g/L.
- Desregulación en la respuesta inflamatoria.
- Disminución en la capacidad proliferativa de la células pluripotenciales hematopoyéticas (disminución de la reserva medular), que se traduciría en una disminución de la eritropoyesis.
- Disminución de los requerimientos de oxigenación por la pérdida de masa muscular (sarcopenia).
- Signos precoces de mielodisplasia que afectarían a la eritropoyesis sin afectar a los leucocitos ni a las plaquetas.

Estos factores (con la excepción de la mielodisplasia) se podrían considerar como característicos del envejecimiento y no requieren ni implicarían la presencia de enfermedades concurrentes. Otros factores, como la malnutrición y el abuso de medicamentos y alcohol, que se presentan con mayor frecuencia en las personas mayores, también pueden tener un efecto negativo sobre eritropoyesis<sup>37</sup>.

Por lo tanto, la anemia inexplicable está directa e indirectamente relacionados con el envejecimiento y, como tal, es más común en los ancianos de edad más avanzada, y prácticamente no existe en las personas sanas menores de 50 años<sup>27</sup>.

## Evaluación clínica

En la evaluación clínica de los pacientes de edad avanzada con anemia es de particular importancia la identificación de las condiciones de comorbilidad y una historia detallada del tratamiento farmacológico, incluido el hábito tóxico del alcohol por su alta preva-

Tabla 2. Evaluación clínica de la anemia del anciano. Pruebas necesarias para la aproximación diagnóstica<sup>27</sup>

<i>Pruebas iniciales (siempre útiles)</i>
· Hemograma, reticulocitos, extensión de sangre periférica
· Estudio de hierro (ferritina, sideremia, capacidad total de fijación, IST, receptor soluble de la transferrina)
· Niveles séricos de vitamina B <sub>12</sub> , ácido metilmalónico y homocisteína
· Bioquímica básica, incluyendo creatinina
· Niveles séricos de eritropoyetina
<i>Pruebas secundarias (útiles ocasionalmente)</i>
· Hormonas tiroideas, testosterona
· Test de inflamación (VSG, proteína C reactiva)
· Aspirado y/o biopsia de médula ósea. Estudio citogenético
· Niveles séricos y eritrocitarios de ácido fólico
· Pruebas específicas de fisiología eritrocitaria (masa eritrocitaria, interleucina 6, estudios de membrana, estudios enzimáticos, estudio de hemoglobinas, etc.)

lencia y su asociación etiológica, sintomática y pronóstica con la anemia<sup>27</sup>.

En cuanto a los datos complementarios de laboratorio, los podemos agrupar en pruebas siempre útiles y, por tanto, imprescindibles en la evaluación inicial; y un segundo grupo de pruebas más específicas, que

se deben realizar en función de los resultados de las primeras<sup>27</sup> (Tabla 2).

Al igual que en los pacientes jóvenes un aproximación diagnóstica práctica sería estratificar las anemias según su volumen corpuscular medio (VCM)<sup>39</sup> (Figura 3), teniendo en cuenta que en los pacientes de edad

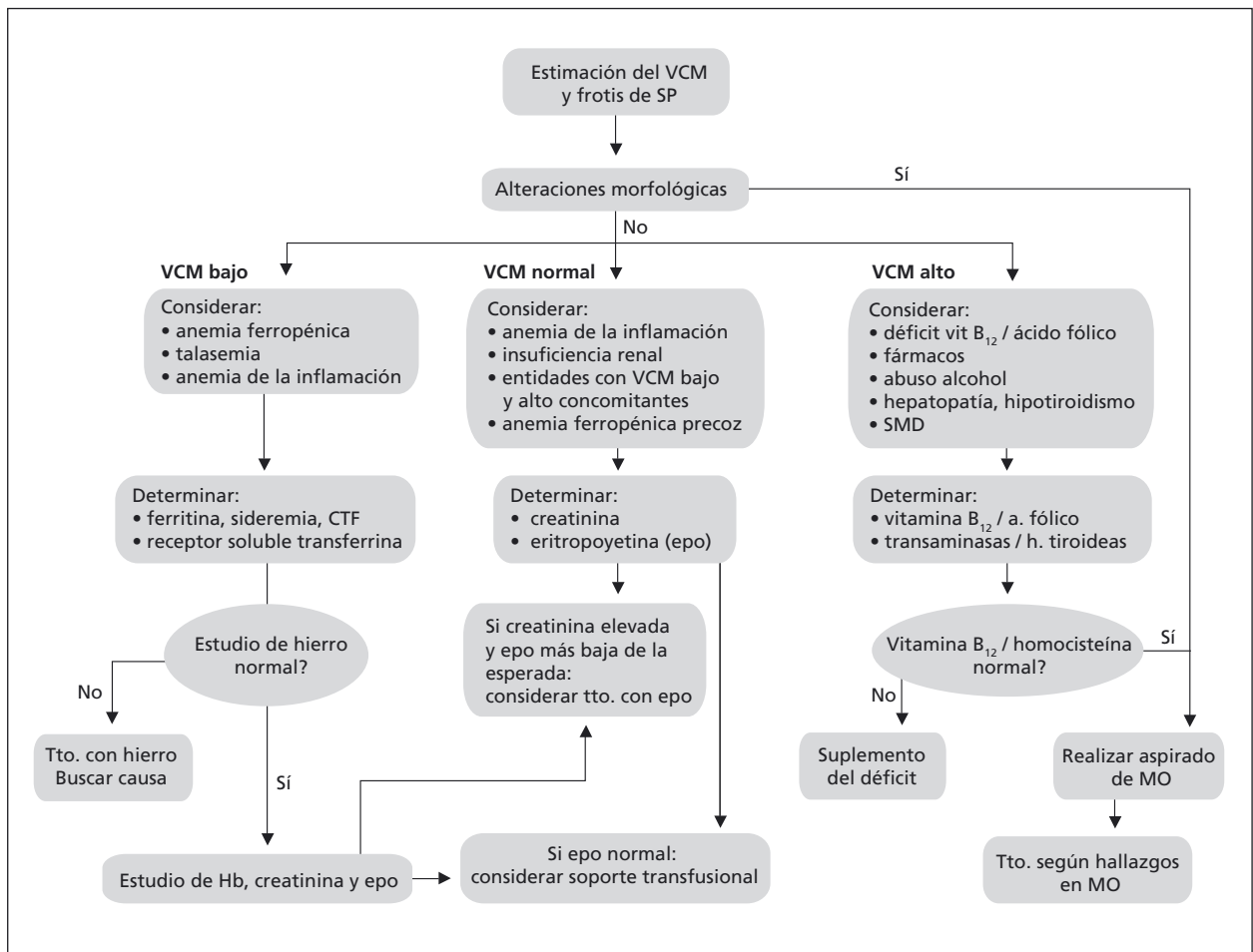


Figura 3. Algoritmo diagnóstico de la anemia en mayores de 65 años<sup>39</sup>.

avanzada la existencia de más de una patología con efectos opuestos sobre el VCM es frecuente.

## Tratamiento

Hasta el momento actual no hay guías clínicas que indiquen cuál es la mejor manera de manejar la anemia leve de los ancianos, o si esta anemia debe ser tratada aunque no se haya corregido la patología subyacente que la causa.

Los pacientes con déficit nutricionales (hierro, vitamina B<sub>12</sub>, ácido fólico) o anemia severa debido a la insuficiencia renal o inflamación, por supuesto, deben recibir la administración de suplementos de los nutrientes deficientes o el tratamiento con eritropoyetina recombinante (r-HuEpo), respectivamente. Sin embargo, el enfoque adecuado en los casos con anemia inexplicable es más difícil de establecer, especialmente si la anemia es relativamente leve y el paciente no está claramente sintomático<sup>39</sup>.

Pese a los claros beneficios de la transfusión de hemáties en cuanto a disminución de la morbilidad y mejoría de la calidad de vida, no está exenta de riesgos, como las reacciones transfusionales agudas, la transmisión de infecciones, la sobrecarga de volumen y la sobrecarga de hierro, por lo que no constituyen una buena alternativa en los pacientes con niveles de Hb > 100 g/L<sup>39</sup>.

Hasta la aparición de la r-HuEpo, los andrógenos han sido utilizados en diversos tipos de anemia incluyendo la anemia inexplicable de los ancianos. Sin embargo su efectividad es menor que la r-HuEpo y presentan una toxicidad no despreciable (hirsutismo, acné, atrofia testicular, peliosis del hígado, elevado riesgo de cáncer hepatocelular y de cáncer de próstata). Por lo tanto, los andrógenos son menos utilizados hoy en día, y su papel en la anemia inexplicable del anciano no está aclarado<sup>39</sup>.

Un pequeño ensayo clínico prospectivo controlado a doble ciego frente placebo demostró que la r-HuEpo aumentaba los niveles de hemoglobina y la calidad de vida en pacientes de edad avanzada con anemia (mediana de Hb 105 g/L antes de iniciar el tratamiento), incluyendo casos de anemia inexplicable<sup>40</sup>. Sin embargo, el uso generalizado de agentes eritropoyéticos en pacientes ancianos con anemia leve todavía no se puede recomendar sin más pruebas de futuros ensayos, tanto porque sería muy costoso como por las dudas que se han planteado acerca de su seguridad. Diversos estudios con pacientes oncológicos tratados o no con quimioterapia y radioterapia han sido detenidos precozmente por efectos adversos en la rama de tratamiento con agentes eritropoyéticos<sup>41,42</sup>. Por último, en un estudio aleatorizado con 1.432 pacientes con anemia debido a la insuficiencia renal, los tra-

tados con r-HuEpo para alcanzar una Hb de 135 g/L presentaron más eventos adversos y no mejoraron la función cardiaca en comparación con aquellos tratados con el objetivo de alcanzar una Hb de 113 g/L<sup>43</sup>. Desde marzo del 2007 la FDA recomienda que los pacientes no deben ser tratados para alcanzar un nivel de Hb superior a 120 g/L.

Por tanto, hasta que no se disponga de más datos, en la anemia de los ancianos sólo se debe intervenir terapéuticamente en las causas, y la anemia en sí no debe ser tratada con agentes eritropoyéticos a menos que el paciente esté gravemente sintomático o en riesgo vital, por lo que sea necesario un soporte transfusional (por ejemplo, Hb < 100 g/L).

## Conclusiones

La anemia es un problema común, no valorado suficientemente y que no se debe considerar como una consecuencia normal del envejecimiento. Su falta de evaluación en el anciano puede dar lugar a un retraso en el diagnóstico de causas potencialmente tratables. La falta de tratamiento se puede asociar con una mayor prevalencia de las diferentes comorbilidades, una disminución del estado funcional y de su calidad de vida y un aumento de la mortalidad. El envejecimiento de la población determina que en un futuro pueda constituir un importante problema de salud pública, por lo que es necesario un abordaje multidisciplinar que englobe aspectos científicos, epidemiológicos, clínicos y sociales que nos permita contestar algunas cuestiones todavía no bien definidas:

- ¿Cuál es la mejor definición de la anemia en las diferentes poblaciones de personas mayores?
- ¿Cuál es la magnitud de la morbilidad producida por la anemia personas mayores en nuestro medio, y cómo puede ser corregida mediante las terapias actuales?
- ¿Hay realmente una “anemia del envejecimiento o del anciano” específica? Si es así, ¿cómo pueden ser diagnosticados y tratados estos pacientes?
- ¿Las personas de edad avanzada deben ser estudiadas rutinariamente para descartar anemia o sólo en algunos casos seleccionados?
- ¿Qué especialidad es la que mejor puede abordar la problemática del diagnóstico y tratamiento de los pacientes ancianos con anemia y cuál debería ser el papel de la hematología?
- ¿Debe elaborarse una guía clínica del manejo de la anemia en ancianos?
- ¿Cuáles son las implicaciones económicas de nuestro sistema de salud de un enfoque más agresivo a la anemia en el anciano?
- ¿Cómo se debe coordinar la investigación en la búsqueda de las respuestas a estas cuestiones?



## Bibliografía

- Patel KV. Epidemiology of anemia in older adults. *Semin Hematol* 2008; 45 (4): 210-7.
- Instituto Nacional de Estadística. Proyecciones de población a corto plazo. 19-02-09.
- Carmel R. Anemia and aging: an overview of clinical, diagnostic and biological issues. *Blood Rev* 2001; 15: 9-18.
- Beghé C, Wilson A, Ershler W. Prevalence and outcomes of anemia in geriatrics: a systematic review of the literature. *Am J Med* 2004; 116 (7A): 3S-10S.
- Iron deficiency anaemia. Assessment, prevention and control. A guide for programme managers. WHO/HHD/01.3.
- Guralnik JM, Eisenstaedt RS, Ferrucci L, Klein HG, Woodman RC. Prevalence of anemia in persons 65 years and older in the United States: evidence for a high rate of unexplained anemia. *Blood* 2004; 104: 2263-8.
- Zakai NA, Katz R, Hirsch C, et al. A prospective study of anemia status, haemoglobin concentration, and mortality in an elderly cohort: the Cardiovascular Health Study. *Arch Intern Med* 2005; 165: 2214-20.
- Nilsson-Ehle H, Jagenburg R, Landahl S, Svanborg A. Blood haemoglobin declines in the elderly: implications for reference intervals from age 70 to 88. *Eur J Haematol* 2000; 65: 297-305.
- Zauber NP, Zauber AG. Hematologic data of healthy very old people. *JAMA* 1987; 257: 2181-4.
- Boehringer PA, Darden IL. The quest for the normal hemoglobin concentration [letter]. *Blood* 2006; 108: 777.
- Gaskell H, Derry S, Andrew Moore R, McQuay HJ. Prevalence of anaemia in older persons: systematic review. *BMC Geriatr* 2008; 14 (8): 1.
- Salive ME, Cornoni-Huntley J, Guralnik JM, Phillips CL, Wallace RB, Ostfeld AM, Cohen HJ. Anemia and hemoglobin levels in older persons: relationship with age, gender, and health status. *J Am Geriatr Soc* 1992; 40 (5): 489-96.
- Skjelbakken T, Langbakk B, Dahl IM, Løchen ML; Tromsø Study. Haemoglobin and anaemia in a gender perspective: the Tromsø Study. *Eur J Haematol* 2005; 74 (5): 381-8.
- Chaves PH, Semba RD, Leng SX, et al. Impact of anemia and cardiovascular disease on frailty status of community-dwelling older women: the Women's Health and Aging Studies I and II. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2005; 60: 729-35.
- Penninx BW, Guralnik JM, Onder G, Ferrucci L, Wallace RB, Pahor M. Anemia and decline in physical performance among older persons. *Am J Med* 2003; 115: 104-10.
- Chaves PH, Carlson MC, Ferrucci L, Guralnik JM, Semba R, Fried LP. Association between mild anemia and executive function impairment in community-dwelling older women: the Women's Health and Aging Study II. *J Am Geriatr Soc* 2006; 54: 1429-35.
- Atti AR, Palmer K, Volpato S, Zuliani G, Winblad B, Fratiglioni L. Anaemia increases the risk of dementia in cognitively intact elderly. *Neurobiol Aging* 2006; 27: 278-84.
- Chaves PH, Ashar B, Guralnik JM, Fried LP. Looking at the relationship between hemoglobin concentration and prevalent mobility difficulty in older women: should the criteria currently used to define anemia in older people be reevaluated? *J Am Geriatr Soc* 2002; 50: 1257-64.
- Penninx BW, Pluijm SM, Lips P, et al. Late-life anemia is associated with increased risk of recurrent falls. *J Am Geriatr Soc* 2005; 53: 2106-11.
- Cesari M, Pahor M, Lauretani F, et al. Bone density and hemoglobin levels in older persons: results from the InCHIANTI study. *Osteoporos Int* 2005; 16: 691-9. Epub 2004 Sep 28.
- Cesari M, Penninx BW, Lauretani F, et al. Hemoglobin levels and skeletal muscle: results from the InCHIANTI study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2004; 59: 249-54.
- Onder G, Penninx BW, Cesari M, et al. Anemia is associated with depression in older adults: results from the InCHIANTI study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2005; 60: 1168-72.
- Penninx BW, Pahor M, Woodman RC, Guralnik JM. Anemia in old age is associated with increased mortality and hospitalization. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2006; 61: 474-9.
- Joosten E, Lemiengre J, Nelis T, Verbeke G, Milisen K. Is anaemia a risk factor for delirium in an acute geriatric population? *Gerontology* 2006; 52: 382-5.
- Maraldi C, Volpato S, Cesari M, Onder G, Pedone C, Woodman RC, Fellin R, Pahor M, Investigators of the Gruppo Italiano di Farmacoepidemiologia nell'Anziano Study. Anemia, physical disability, and survival in older patients with heart failure. *J Card Fail* 2006; 12: 533-9.
- Vezeridis M, Khuri SF, Friedmann PD. Preoperative hematocrit levels and postoperative outcomes in older patients undergoing noncardiac surgery. *JAMA* 2007; 13 (297): 2481-8.
- Guralnik JM, Ershler WB, Schrier SL, Picozzi VJ. Anemia in the elderly: a public health crisis in hematology. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005: 528-32.
- Hin H, Clarke R, Sherliker P, Atoyebi W, Emmens K, Birks J, Schneede J, Ueland nPM, Nexo E, Scott J, Molloy A, Donaghy M, Frost C, Evans JG. Clinical relevance of low serum vitamin B<sub>12</sub> concentrations in older people: the Banbury B<sub>12</sub> study. *Age Ageing* 2006; 35: 416-22.
- Ershler WB. Biological interactions of aging and anemia: a focus on cytokines. *J Am Geriatr Soc* 2003; 51: S18-S21.
- Hak AE, Pols HA, Stehouwer CD, Meijer J, Kiliaan AJ, Hofman A, et al. Markers of inflammation and cellular adhesion molecules in relation to insulin resistance in nondiabetic elderly: the Rotterdam study. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4398-405.
- Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA* 1992; 282: 2131-5.
- Bruunsgaard H, Pedersen M, Pedersen B. Aging and proinflammatory cytokines. *Curr Opin Hematol* 2001; 8 (3): 131-6.
- Ershler WB, Keller ET. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases and frailty. *Annu Rev Med* 2000; 51: 245-70.
- Robinson B, Artz AS, Culleton B, Critchlow C, Sciarra A, Audhya P. Prevalence of anemia in the nursing home: contribution of chronic kidney disease. *J Am Geriatr Soc* 2007; 55: 1566-70.
- Germing U, Strupp C, Kundgen A, Bowen D, Aul C, Haas R, Gattermann N. No increase in age-specific incidence of myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2004; 89: 905-10.
- Giralt M, Franco-García E, Giraldo P, Gutiérrez M, Angos A, Perella M, et al. Incidence of MDS in a Northern-Spanish area. *Leuk Res* 1999; 23 (suppl 1): S158.
- Makipour S, Kanapuru B, Ershler WB. Unexplained Anemia in the Elderly. *Semin Hematol* 2008; 45 (4): 250-4.
- Ferrucci L, Guralnik JM, Bandinelli S, Semba RD, Lauretani F, Corsi A, Ruggiero C, Ershler WB, Longo DL. Unexplained anaemia in older persons is characterised by low erythropoietin and low levels of pro-inflammatory markers. *Br J Haematol* 2007; 136 (6): 849-55.
- Steensma DP, Tefferi A. Anemia in the elderly: how should we define it, when does it matter, and what can be done? *Mayo Clin Proc* 2007; 82 (8): 958-66.
- Agnihotri P, Ahuja M, Telfer MC, et al. Chronic anemia and fatigue in elderly patients: results of the first randomized double-blind placebo-controlled cross-over study with epoetin alfa [abstract]. *Blood* 2005; 106. Abstract 3553.
- Crawford J. Erythropoietin: high profile, high scrutiny [editorial]. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1021-3. Epub 2007 Feb 20.



42. Glaspy J, Smith R, Aapro M, et al. Results from a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled study of darbepoetin alfa (DA) for the treatment of anemia in patients not receiving chemotherapy or radiotherapy [abstract]. Presented at: American Association for Cancer Research Annual Meeting; Los Angeles, CA; April 17, 2007. Abstract LB-3.
43. Singh AK, Szczech L, Tang KL, et al.; CHOIR Investigators. Correction of anemia with epoetin alfa in chronic kidney disease. *N Engl J Med* 2006; 355: 2085-98.

# The WHO classification of acute myeloid leukaemias

E. MATUTES

*Reader and Consultant Haematologist. Haemato-Oncology Unit.*

*Institute of Cancer Research/ Royal Marsden Hospital. London (United Kingdom)*

---

## Introduction

The World Health Organization (WHO) classification of Tumours of the Haemopoietic and lymphoid tissues was published in 2001 and resulted from an extensive collaborative work of haematopathologists and molecular biologists recognized experts in the various fields with the advice of clinical haemato-oncologists<sup>1</sup>. Special attention was made that experts from different parts of the world were represented. The classification aimed at establishing: 1) uniform criteria for the definition of haemopoietic malignancies which could be useful for diagnosis and 2) a common nomenclature which could be adopted worldwide. Such “common language” and diagnostic guidelines have facilitated over the last years the communication among clinicians and scientists allowing them to perform comparative multicenter studies and develop therapeutic approaches with the ultimate benefit to the patients. The previous WHO classification (3<sup>rd</sup> edition) provided an excellent framework to be used in the current practice and, indeed this has been the case, for most pathologists, haematologists and clinicians devoted to classify, diagnose and treat patients with the various types of haemopoietic malignancies<sup>1</sup>. In 2006, the investigators met again as it was apparent that the classification needed to be updated in the light of the major advances in the field of molecular biology and availability of novel treatments. Again various committees integrating members from different disciplines were set up in order to incorporate in the classification the relevant new information available and an updated version of the WHO classification has been published in November 2008 (4<sup>th</sup> edition)<sup>2</sup>.

Because there is no gold standard to classify a haematopoietic tumour within a particular group, major emphasis were made on the following: 1) the characterization and definition of the various disease entities requires a multiparametric analysis which should include morphology, immunophenotype and genotype and recognises that the diagnostic weight of one or another investigation varies among the different diseases and, 2) the stratification or subdivision of the neoplasms should consider not only clinicopathological and genetic features but also prognostic features to ensure that provides relevant information to the clinician for the optimal management of

the patients. In a broad sense, the WHO classification recognises three main disease categories according to the cell origin of the neoplastic cell: 1) lymphoid neoplasms (precursor and mature); 2) myeloid disorders including chronic myeloproliferative disorders, acute myeloid leukaemias and myelodysplastic syndromes (MDS) and, 3) a miscellaneous that comprises, among others, histiocytic and dendritic cell derived diseases.

I shall briefly review the basis and principles of the WHO classification in its present status with a focus on the classification of acute myeloid leukaemia (AML), highlight the changes introduced in the revised WHO classification and briefly outline some distinct disease entities that are included in sections other than AML but that may present as AML or the lineage of the neoplastic cell involved is related to the myeloid line.

---

## WHO classification of AML. Diagnostic tools

Classification of the myeloid neoplasms relies on a combination of clinical and laboratory features the latter including morphology, bone marrow histology, immunophenotype and molecular genetics. Morphology allows estimation of the proportion of blasts and evaluation of the presence of dysplastic changes. Further, certain AML with recurrent chromosome abnormalities have a characteristic morphology that points towards the diagnosis of a particular AML subtype. Good examples are cases with hypergranular acute promyelocytic leukaemia (APL) and those with acute myelomonocytic leukaemia with immature eosinophils (AML-M4-Eo) which are associated respectively with the t(15;17) and inv(16) or t(16;16). The proportion of bone marrow infiltrating blasts, unlike in acute lymphoblastic leukaemia (ALL), is very relevant to the diagnosis of AML and to distinguish it from MDS. The blast count should be estimated in all cases by morphological examination of the blood and bone marrow smears and should not be derived from CD34 cell counts by flow cytometry. Megakaryoblasts should be considered in the blast differential but not erythroblasts unless we are dealing with a pure erythroid leukaemia in which there is a neoplastic proliferation of poorly differentiated blasts or proerythroblasts accounting for greater than

80% of the bone marrow cellularity with few, if any, myeloblasts. The bone marrow trephine biopsy is also contributive to this analysis and it is particularly useful in haemodilute specimens and fibrotic bone marrows from megakaryoblastic AML and acute panmyelosis with myelofibrosis; it also allows evaluation of the bone marrow stroma and the more accurate assessment of the cellularity. Problems may arise in distinguishing in the bone marrow smears monoblasts from promonocytes and the latter cells from atypical monocytes. The distinction between monoblasts and promonocytes is not critical for the diagnosis of AML as both are considered blasts; however, distinction between promonocytes and atypical/dysplastic monocytes is relevant to establish a diagnosis of AML and rule out that of chronic myelomonocytic leukaemia (CMML). Cytochemistry is nowadays rarely carried out on the routine practice as it has been largely substituted by immunophenotyping. Nevertheless, stains for myeloperoxidase (MPO) and non-specific esterases may add information to the immunophenotyping and contribute to diagnosis.

Immunophenotyping using a comprehensive panel of monoclonal antibodies that detect antigens in myeloid and lymphoid progenitor cells is a solid stone for the diagnosis of AML by determining the nature or lineage of the blasts. It is critical in distinguishing minimally differentiated AML (M0-AML) from ALL, in confirming or establishing the diagnosis of megakaryoblastic AML and in detecting mixed phenotype acute leukaemia (MPAL) and blastic plasmacytoid dendritic cell leukaemia. In addition, certain immunophenotypic patterns are associated with some recurrent chromosomal abnormalities such as it is the case of APL in which the blasts are often CD34 and HLA-Dr negative and have a strong MPO expression. The detection of phenotypes that raise suspicion of the presence of a cytogenetic abnormality may help on setting or planning specific genetic investigations in these cases. Furthermore, atypical or aberrant immunophenotypic profiles are found in greater than 60% of AML and these facilitate investigation and detection of minimal residual disease (MRD) at follow-up after chemotherapy.

Molecular genetic studies of the neoplastic cells should be performed in AML when ever possible. However it has to be acknowledged that this is not always feasible due to the lack of laboratory facilities and/or failure in the sample processing. The WHO classification considers a variety of distinct disease entities on the basis of chromosome translocations/inversions and/or gene mutations. These abnormalities can be detected by standard cytogenetics, fluorescence in situ hybridization (FISH) and/or reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). The use of one or another methodology will

depend on the abnormality that is being looked for. In addition, these genetic changes may have a major prognostic impact and might be of great help to the clinician to devise or establish optimal and tailored treatments. Microarray genome-wide expression profiling is still in its infancy in myeloid derived tumours and the information derived from this investigation has not been incorporated in the WHO classification. Although gene expression profiling is relevant for research and provides key information on the biology of the disease, it has not yet found its place on a diagnostic or clinical scenario<sup>3,4</sup>.

---

### Revised WHO classification of AML

AML is a disease that results from the clonal expansion and accumulation of an “aberrant” myeloid progenitor cell; it may involve more than one lineage (i.e. myeloid and megakaryocytic) and it is the most common form of leukaemia in adults. It affects predominantly adults without a particularly geographical distribution but exposure to certain agents (ie, benzene) predisposes to the disease.

As in the 3<sup>rd</sup> Edition of the WHO, in the revised version, the threshold of blasts to make the diagnosis of AML is >20%; however, this does not apply to patients presenting with: 1- isolated “myeloid sarcoma”, a tumour of myeloblasts occurring in other sites than bone marrow such as skin or lymph node and that responds well to AML directed therapy<sup>5</sup>, 2-patients in whom blasts harbour the following recurrent genetic abnormalities t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q22;q12), and inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1q22) and 3-some cases of erythroid leukaemia when erythroid precursors account for greater than 50% of the cellularity.

The five major subgroups of AML are shown in Table 1. As in the previous edition, the WHO has considered the following issues: 1) whether there is a background or a previous clinical history suggesting that the disease is “secondary” or related to chemo/radiotherapy; 2) whether it arises from a silent phase of MDS the latter designated AML with myelodysplasia-related changes and 3) whether the neoplastic cells have certain recurrent genetic abnormalities. Such stratification of AML not only has given insights on the putative origin of the clonogenic cell (i.e. myeloid committed or myeloid stem cell in cases with myelodysplasia-related changes) but also has provided relevant information on the prognosis and outcome of the patients<sup>6</sup>. Globally, the three subcategories of cases with recurrent genetic abnormalities already defined in the previous WHO edition but not the new three subcategories added in the updated version have a favorable prognosis whilst those

**Table 1. Acute myeloid leukaemias (AML). WHO classification**

1. AML with recurrent genetic abnormalities
AML with t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1
AML with inv(16)(p13.1;q22) or t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11
APL with t(15;17)(q22;q12); PML-RARA
AML with t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL
AML* with t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214
AML* with inv(3)(q21;q26) or t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1
AML* (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1
AML with gene mutations: Provisional entity: AML with mutated NPM1 Provisional entity: AML with mutated CEBPA
2. AML with myelodysplasia-related changes
3. Therapy - related myeloid neoplasms
4. AML, not otherwise specified (NOS)
AML with minimal differentiation (M0)
AML without maturation (M1)
AML with maturation (M2)
AML (myelomonocytic) (M4)
AML (monoblastic/ monocytic) (M5)
AML (erythroid): Pure erythroid
Erythroid/myeloid (M6)
AML (megakaryoblastic) (M7)
AML (basophilic)
Acute panmyelosis with myelofibrosis
5. Myeloid sarcoma
6. Myeloid proliferations related to Down syndrome:
Transient abnormal myelopoiesis
AML associated with Down syndrome
7. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms

\* New entities incorporated

with myelodysplasia-related changes and secondary to therapy fare worst. Although rearrangement of genes encoding for transcription factors such as the retinoic acid receptor alpha (*RARA*), *CBFB* or *RUNX1* are considered to be early events in leukaemogenesis by impairing cell differentiation, second hits in these cells are required to maintain and promote proliferation, survival and expansion of the neoplastic clone. These second hits may be multiple and comprise deregulation of a variety of genes such as mutations or internal tandem duplications of the *fms*-related tyrosine kinase 3 (*FLT-3*) gene, mutations of nucleophosmin (*NPM1*), *c-KIT*, *CEBPA* (CCAAT/enhancer binding protein alpha gene), Wilms' tumour 1 (*WT1*) and/or *N* and *K-RAS*. The two-hit model will explain the additional abnormalities such as *c-KIT* mutations seen in cases with t(8;21) or inv(16). Investigation of the presence of these secondary events is particularly

important in patients in whom a primary abnormality (normal cytogenetics) is not detected such it is the case of the category of AML Not Otherwise Specified (AML NOS) which represents a substantial proportion of cases, around 30%. The presence of these abnormalities may also help to stratify these patients in several prognostic groups as patients with *c-KIT* and *WT1* mutations and/or internal tandem duplication of *FLT-3* have an unfavorable outcome<sup>7-10</sup>. Incorporation of these genetic changes in the updated WHO classification has been a challenge as by themselves do not define a distinct "clinico-pathologic-genetic" entity since they are present in a range of AML subgroups with or without other abnormalities; in addition, they are not mutually exclusive. Despite of this, some of them have been considered and included in the classification as provisional entities (i.e. AML with mutated *NPM1* or with nucleophosmin cytoplasmic expression and cases with mutated *CEBPA*). Further studies are needed to establish whether these provisional groups constitute separate disease entities. Both these abnormalities of *NPM1* and *CEBPA* are relatively frequent in adult AML but *NPM1* mutations appear to be less common in children<sup>11</sup>. In cases with a normal karyotype and absence of *FLT-3* internal tandem duplications, appear to be associated with a favorable prognosis. Although internal tandem duplications of *FLT-3* have not been considered for disease stratification, its prognostic significance should not be disregarded particularly in cases of AML NOS. In summary, the current classification has incorporated some but not all new information concerning genetic abnormalities and, according to this, few changes have been introduced as outlined below.

### Modifications introduced in the new WHO classification

1. AML with recurrent genetic abnormalities includes now three new genetic defined entities (Table 1) and two provisional entities: cases with mutations of *NPM1* and cases with mutations of *CEBPA*. It is worth to note that whilst in the previous WHO classification, the prognosis was favorable in these patients, this is not the case in the updated version as the new three added definitive entities have an unfavorable prognosis. In addition, cases with acute promyelocytic leukaemia (APL) with variant translocations of *RARA* (17p12) involving partner chromosomes different than 15 such as 11q23, 11q13, 5q35 and 17q11.2, are considered separately. The rationale

behind this is that some of these variant cases do not have typical APL features and may be resistant to all-trans retinoic acid (ATRA). Therefore, these cases should be diagnosed as AML with a variant RARA translocation. AML with 11q23 (*MLL*) abnormalities has been more specifically renamed as AML with t(9;11) (p22;q23)/*MLLT3/MLL* and cases with other *MLL* abnormalities such as a tandem duplication of this gene are not included in this category.

**2.** AML with multilineage dysplasia is renamed AML with myelodysplasia-related changes and this group includes cases with: a) AML arising from a previous MDS or MDS/myeloproliferative disorder; b) AML with specific dysplasia related chromosome abnormalities namely unbalanced abnormalities of chromosomes 7 and 5 but also balanced translocations which are not included in the group of AML with recurrent genetic changes and c) AML with greater than 50% of cells from two myeloid lineages being dysplastic, designated AML with multilineage dysplasia. This category also includes some of the cases previously classified as AML NOS erythroid/myeloid leukaemia (see later). Validation of such criteria to classify these three diseases under the umbrella of AML with myelodysplasia-related changes has been recently documented in a series of a 100 consecutive AML patients<sup>12</sup>.

**3.** Therapy related myeloid neoplasms are not further subclassified in alkylating/radiation and type II topoisomerase related. This group of myeloid neoplasms includes both therapy related AML and therapy related MDS occurring after exposure to chemotherapy and/or radiotherapy. The two subcategories are regarded as a unique clinical disease independently of the proportion of blasts. The rationale for not subdividing into two subgroups according to the type of agent responsible for the development of AML or MDS is that in practice most patients receive combination chemotherapy that include both types of drugs. Still, it is worth to consider as to whether they are related to one or another type since these two subgroups have characteristic clinical, morphological and genetic features.

**4.** AML NOS. This group comprises cases that do not fulfill the criteria to be included in the previous three categories. Subclassification into the various AML NOS subgroups is based on the major lineage involved (i.e. megakaryoblastic or monocytic) and degree of differentiation of the blasts and this can be achieved by morphology, cytochemistry and immunophenotyping. Overall, these subgroups overlap with the previous French-American-British (FAB) classification of AML. Cases of M7-AML with t(1;22)(p13;q23) and AML with inv(3)(q21;q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2) are now considered in the group of AMLs with recurrent chromosome abnormalities and

some cases assigned before as AML NOS (erythroid/myeloid leukaemia) are reclassified in AML with myelodysplasia-related changes.

**5.** Myeloid proliferations related to Down syndrome include AML and transient abnormal myelopoiesis (TAM) or transient myeloproliferative disorder; in the latter patients, the disease evolves into AML in around 20-30% of cases. AML in infants and children with Down syndrome are often megakaryoblastic (50% of cases) and their frequency is similar to ALL; this incidence is sharply different than what is seen in the other children in whom ALL is significantly more frequent than AML (ALL/AML: 4/1). In both AML and TAM, in addition to trisomy 21, somatic mutations of the gene encoding the transcription factor *GATA* are frequently present and pathognomonic. The distinct clinical and laboratory features of these diseases in Down syndrome are the rationale to consider as a separate entity from other forms of AML in children.

**6.** Blastic plasmacytoid dendritic cell leukaemia was previously included in the WHO 3<sup>rd</sup> Edition under blastic natural killer cell lymphoma /leukaemia but in the revised version is considered as a separate AML category. This is an aggressive disease thought to derive from plasmacytoid dendritic cells and presents with a high frequency with extramedullary involvement, particularly of the skin. Some cases are associated or develop acute myeloid or monocytic leukaemia. The immunophenotype is characteristic with expression of CD4, CD56, CD123 and TCL-1; in around half of the cases the blasts are CD68<sup>+</sup><sup>13</sup>. Despite of these characteristic phenotypic features, some cases may be problematic and difficult to diagnose as not all the typical dendritic cell markers are expressed whilst cells may be positive for some B and T lymphoid not strictly specific lymphoid markers.

In addition to these AML groups there are cases that may present as AML or ALL and they have been included in other sections. This is the case of mixed phenotype acute leukaemia (MPAL) and that of cases with myeloid and lymphoid neoplasms associated to eosinophilia and harboring abnormalities of the platelet derived growth factor alpha and beta (*PDGFA/PDGFB*) or *FGFR1* mutations. The blasts in MPAL cases do not show a clear evidence of differentiation along a single cell lineage and most likely represent leukaemias of early haemopoietic stem-cells with myeloid and lymphoid features. Criteria for the definition of MPAL has been refined and, in particular, it has been considered as major diagnostic criteria: 1) the expression of highly specific markers for the myeloid (i.e., MPO) and lymphoid (i.e. CD3) lineages regardless of the expression of other less specific markers and 2) exclusion of AML cases with recurrent genetic abnormalities. Myeloid and lym-



phoid neoplasms with eosinophilia and abnormalities of *PDGFA/PDGFB* or *FGFR1* are thought to derive from a pluripotent lymphoid/myeloid progenitor cell and may present as T-lymphoblastic lymphoma, AML, including myeloid sarcoma in the cases with *FGFR1* mutations or the patients develop AML following a phase of chronic eosinophilic leukaemia<sup>14</sup>. Patients with AML will have infiltration by blasts co-existing with eosinophilia (often mature abnormal eosinophils).

## Conclusions

The WHO classification of AML in its updated version (4<sup>th</sup> edition) has provided a useful framework in a clinical and laboratory settings for haemato-pathologists and clinicians devoted to diagnose and treat patients with this haemopoietic tumour. As in the previous edition, major emphasis has been made on the value and need for a multiapproach and comprehensive analysis that includes a range of different investigations to diagnose and subclassify this leukaemia into distinct groups. However, it is also apparent that facilities and resources to carry out all the investigations are not available worldwide. The modifications introduced in this 4<sup>th</sup> edition largely derive from the new information available on gene deregulation. It is recognized that, some AML categories defined by genetic abnormalities and introduced in the updated WHO classification may not represent a “clinical-pathological-genetic” disease entity but have been considered as a provisional category because patients have a different prognosis and outcome.

What is the future of the WHO classification? To this end, it is essential to consider that a classification should not be static but dynamic and therefore subject to further changes and modifications. The incorporation of new findings may well help to define more precisely some disease entities which at present lack a genetic signature and refine the definition of the already well established conditions. In future, if data on gene profiling expression matures and its assessment becomes more simple and accessible, it is possible that a new updated classification may come into light.

## References

- Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (eds.). World Health Organization Classification of Tumours. Tumours of Haemopoietic and Lymphoid Tissues. IARCPress. 3<sup>rd</sup> edition. Lyon; 2001.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. World Health Organization Classification of Tumours. Tumours of Haemopoietic and Lymphoid Tissues. IARCPress. 4<sup>th</sup> edition. Lyon; 2008.
- Wouters BJ, Lowenberg B, Delwel R. A decade of genome-wide gene expression profiling in acute myeloid leukaemia: flashback and prospects. *Blood* 2009; 113: 291-8.
- Marcucci G, Radmacher MD, Maharry K, Mrozek K, Ruppert AS, Paschka P, et al. MicroRNA expression in cytogenetically normal acute myeloid leukaemia. *N Engl J Med* 2008; 358: 1919-28.
- Tsimberidou AM, Kantarjian HM, Wen S, Keating MJ, O'Brien S, Brandt M et al. Myeloid sarcoma is associated with superior event-free survival and overall survival compared with acute myeloid leukaemia. *Cancer* 2008; 113: 1370-8.
- Estey E, Dohner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet* 2006; 368: 1894-907.
- Mrozek 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.
- Schlenk RF, Dohner K, Krauter J, Frohling S, Corbacioglu A, Bullinger L, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukaemia. *N Engl J Med* 2008; 358: 1909-18.
- Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, Whitman SP, Mrozek K, Maharry K, et al. Wilms' tumor 1 gene mutations independently predict poor outcome in adults with cytogenetically normal acute myeloid leukaemia: a cancer and leukaemia group B study. *J Clin Oncol* 2008; 26: 4595-602.
- Falini B, Mecucci C, Saglio G, Lo Coco F, Diverio D, Brown P, et al. NPM1 mutations and cytoplasmic nucleophosmin are mutually exclusive of recurrent abnormalities: a comparative analysis of 2562 patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2008; 93: 439-42.
- Brown P, McIntyre E, Rau R, Meshinchi S, Lacayo N, Dahl G et al. The incidence and clinical significance of nucleophosmin mutations in childhood AML. *Blood* 2007; 110: 979-85.
- Weinberg OK, Seetharam M., Ren L, Seo K, Ma L, Merker JD et al. Clinical characterization of acute myeloid leukaemia with myelodysplasia-related changes as defined by the 2008 WHO classification system. *Blood* 2009; 113: 1906-8.
- Herling M, Jones D. CD4+ CD56+ hematodermic tumor: the features of an evolving entity and its relationship to dendritic cells. *Am J Clin Pathol* 2007; 127: 687-700.
- Metzgeroth G, Walz C, Score J, Siebert R, Schnittger S, Haferlach C et al. Recurrent finding of the FIP1L1-PDGFR4 fusion gene in eosinophilia-associated acute myeloid leukemia and T-cell lymphoma. *Leukemia* 2007; 21: 1183-8.



# Hemofilia adquirida

J. MONTEAGUDO TERRÉS

Servicio de Hemoterapia y Hemostasia. Hospital Clínic. Barcelona

---

## Epidemiología y diagnóstico

La hemofilia adquirida es una diátesis hemorrágica muy infrecuente, que consiste en la aparición de autoanticuerpos contra el factor VIII, y que presenta morbilidad y mortalidad altas. Aun cuando se considera que su incidencia puede estar infravalorada, la mayoría de autores estiman que se observa entre 1 y 4 pacientes/millón y año; la edad es asimismo un factor influyente, siendo mucho más infrecuente en la infancia (0,05 pacientes/millón y año) que en los casi 15 casos por millón y año descritos en ancianos<sup>1,2</sup>.

Esta entidad nosológica se basa en la aparición de autoanticuerpos policlonales de tipo IgG (subclases 1 y 4, en la mayoría de los casos) que inhiben la función coagulante del factor VIII, actuando sobre los dominios C2, A2 y A3 de la molécula, con lo que interfieren su interacción con el factor IXa, los fosfolípidos y el factor von Willebrand. En su mayoría, son tiempo- y temperatura-dependientes, como ocurre con los aloanticuerpos que se observan en pacientes con hemofilia A, y en buena parte de ellos su cinética de acción es compleja (tipo 2)<sup>3,4</sup>.

Aunque la eclosión de dichos anticuerpos procede de una alteración en los mecanismos de tolerancia inmune que regulan la respuesta al factor VIII, su mecanismo desencadenante no se halla elucidado en la actualidad. La hemofilia adquirida no se ha podido asociar a ninguna otra patología en aproximadamente la mitad de los casos; en los pacientes en los que se ha evidenciado una entidad predisponente, la mayor parte han sido relacionados con el puerperio, enfermedades autoinmunes y neoplásicas, así como con tratamientos farmacológicos<sup>5</sup>. En los últimos años, se está investigando adicionalmente una eventual predisposición genética a la aparición de anticuerpos anti-FVIII, todavía sin resultados concluyentes<sup>6</sup>.

Las manifestaciones clínicas son invariablemente hemorrágicas y, en gran parte, graves. Se han descrito multitud de localizaciones y de gravedad de las mismas, aunque su mayor frecuencia son las que afectan a los tejidos muscular y subcutáneo; mientras que topologías muy frecuentes en la hemofilia congénita, como es el caso de las hemartrosis, son aquí poco habituales. La preexistencia de un desencadenante (maniobra invasiva, rotura de fibras musculares) es habitual, aunque la magnitud de la hemorragia suele ser

desproporcionada, así como impredecible. Según diversos autores, la mortalidad observada abarca un rango de entre el 9 y el 22%<sup>5</sup>.

La coexistencia de dicha sintomatología con un alargamiento del tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA), así como la ausencia de antecedentes personales y familiares de diátesis hemorrágica, debe hacer sospechar poderosamente la aparición de un inhibidor contra algún o algunos de los factores relacionados con la antes llamada vía intrínseca de la hemostasia. En el despistaje subsiguiente de dicho inhibidor, debe asegurarse la inexistencia de otros artefactos. Los más habituales son atribuibles a la fase preanalítica (ausencia de fibrinógeno, presencia de heparina); una vez eliminados éstos, debe investigarse la presencia de un anticuerpo tipo lupus, aunque (salvo en algunas ocasiones en el síndrome antifosfolípido catastrófico) una clínica hemorrágica asociada suele descartar en la práctica la existencia de dicho anticuerpo.

Como se ha mencionado anteriormente, los inhibidores anti-FVIII suelen ser (todos los alo- y la mayoría de autoanticuerpos) tiempo- y temperatura-dependientes. En la práctica urgente de laboratorio, la simple mezcla del plasma del paciente con plasma normal arrojará un resultado erróneo de corrección del TTPA; cualquier incubación con plasma normal, desde la mencionada hasta la técnicamente más correcta (dosificación de la actividad, según las técnicas 'Bethesda' e incluso 'Nijmegen'), deben realizarse a 37 °C y con una duración de  $\geq 2$  horas. Es desde luego aconsejable, siempre que el laboratorio reúna las condiciones adecuadas, la dosificación, tanto del FVIII como del eventual inhibidor. En inhibidores de título elevado, el FVIII es indetectable. No obstante, la existencia de trazas de FVIII detectable residual en el plasma no descarta necesariamente presencia de actividad inhibitoria; existen inhibidores de bajo título (incluso de  $< 1$  unidad Bethesda) que condicionan clínica hemorrágica, incluso grave<sup>4,5</sup>.

---

## Tratamiento

### Tratamiento de la hemorragia

Una mayor o menor agresividad terapéutica va a depender, obviamente, de la gravedad de la hemorra-

gia, bien por criterio cuantitativo, bien por las características del tejido u órgano implicado. Los casos con hemorragias leves o moderadas pueden beneficiarse de una serie de medidas conservadoras, desde la fisioterapia hasta los antifibrinolíticos, los cuales, y a menos que coexista en algún momento contraindicación formal, suelen recomendarse, inclusive en paralelo a tratamientos con rFVIIa, habiéndole atribuido algunos autores un efecto de incremento de la hemostasia clínica<sup>7</sup> a las dosis habituales (p.ej., ácido tranexámico, 25 mg/kg cada 6-8 horas). La realización de cirugía u otras maniobras invasivas debe obedecer a indicaciones del todo imprescindibles. Algún autor ha utilizado la desmopresina en pacientes con bajo título y existencia de FVIIIc residual en la circulación.

En las situaciones en que no son aconsejables las medidas conservadoras, el tratamiento de la hemorragia en estos pacientes se basa en la administración por vía endovenosa de agentes capaces de producir generación de trombina, 'puenteando' el paso fisiológico que se halla inhibido por el anticuerpo. En la actualidad, existen dos concentrados con dicho efecto, el cual consiguen por mecanismos diferentes: los concentrados activados de complejo protrombínico (CAPP o FEIBA<sup>®</sup> -Factor Eight Inhibitor Bypassing Activity-) y el factor VII activado (rFVIIa). No parece existir una predilección consensuada por una de estas opciones; es más, se ha sugerido el cambio de un agente al otro en caso de ineficacia del primero<sup>1</sup>.

Los CAPP comenzaron a utilizarse a principios de la década de los setenta<sup>8</sup>, para el tratamiento de los episodios hemorrágicos en inhibidores anti-FVIIIc en la hemofilia A, sufriendo desde 1985 diversos procesos de inactivación viral. El FEIBA<sup>®</sup>, único de estos concentrados existente en el mercado en el momento actual, procede del fraccionamiento del plasma humano, y está compuesto fundamentalmente por varios factores de la coagulación: protrombina y factores II, IX y X, en su mayor parte en su forma inactiva o de zimógeno, y factor VII, éste sobre todo en su forma activa (FVIIa); contiene asimismo trazas de FVIIIc y quininas, pero no de heparina.

Hay que manifestar que hoy por hoy no existe un test específico que pueda traducir la acción de los CAPP (al igual que sucede con el rFVIIa) ni, por tanto, correlacionar unos eventuales niveles circulantes con un efecto clínico determinado y, en consecuencia, su monitorización en la práctica<sup>9</sup>. Mediante la evaluación, directa o indirecta, de la generación de trombina (sea cual fuere la metodología utilizada), se ha estimado la vida media de dicho efecto en 4-7 horas, con un pico máximo a los 15-30 minutos<sup>10</sup>. El incremento en la formación de trombina es resultado de la aceleración de la generación del complejo protrombinasa en la superficie plaquetaria promovida por los facto-

res activados del concentrado, fundamentalmente el Xa. Los niveles de trombina conseguidos a las dosis habitualmente utilizadas, no obstante, no alcanzan a mantener los fisiológicos<sup>11</sup>, con independencia de la consecución del efecto clínico deseado.

Los datos procedentes de los distintos estudios de eficacia, si bien existe una gran heterogeneidad (incluso en las pautas utilizadas de dosificación), varían desde un 64% a un 96%, referidos a la yugulación de un episodio hemorrágico en pacientes de hemofilia A con inhibidor<sup>12,13</sup>. Si no se sobrepasa la dosis de 200 U/kg/día y, aun cuando se evidencien niveles de dímero D por encima de la normalidad, ello no traduce necesariamente una coagulopatía de consumo; de hecho, la cifra de efectos adversos trombóticos en general se halla alrededor de 4 por cada 100.000 infusiones de concentrado<sup>14,15</sup>.

El factor VII activado es de origen recombinante (rFVIIa, NovoSeven<sup>®</sup>). Se halla disponible en el mercado desde hace más de una década, bajo las indicaciones aprobadas a día de hoy por las autoridades sanitarias: inhibidores anti-FVIII y anti-FIX, déficit congénito de factor VII y trombostenia de Glanzmann con anticuerpos anti-GPIIb/IIIa o anti-HLA resistentes a transfusión plaquetaria.

Por lo que respecta al mecanismo de acción del rFVIIa a las dosis establecidas en los inicios de su utilización (90-120 µg/kg o 1,8 µg/mL circulantes), éste forma un complejo con el factor tisular (TF), activando directamente al factor X en la superficie plaquetaria (con lo que "ignora" los pasos dependientes de los factores VIIIa y IXa) e incrementando la formación de trombina en los lugares de lesión vascular; esto es, allí donde ocurre exposición de TF a la circulación<sup>16,17</sup>.

No existe actualmente una dosis estándar ampliamente refrendada por los diversos expertos. A las dosificaciones iniciales antes descritas, se les han añadido otras pautas que se han basado en el hecho de que la generación de trombina no se normalizase por debajo de concentraciones de aproximadamente 180-200 µg/kg infundidas<sup>18</sup>, mientras que mejoraba considerablemente a dosis mayores. Este hecho llevaba a hipotetizar que en este caso el coágulo de fibrina sería más resistente a la degradación<sup>16,19</sup>. Adicionalmente, su corta vida media (2,3 horas) y su aclaramiento constituyen un factor más, en una buena parte de los pacientes tratados con dosis de 90 µg/kg, que determina, según algunos autores, que no se consiga la hemostasia clínica hasta la segunda o la tercera dosis.

Como ya ocurrió en el caso de las CAPP, los estudios sobre seguridad y eficacia se fundamentan en gran medida en los pacientes con hemofilias. Se han llevado a cabo estudios adicionales con dosificaciones de 270 µg/kg (unidosis) que han mostrado

también una excelente eficacia<sup>(20)</sup>, aunque los estudios comparativos con otras pautas no han resultado del todo concluyentes. Tampoco se han demostrado diferencias en cuanto a la seguridad de una u otra alternativa<sup>21</sup>. La EMEA aprobó en marzo de 2007 la utilización de la dosis mencionada, en régimen de monodosis, para el tratamiento de hemorragias leves y moderadas en pacientes hemofílicos con inhibidor.

Finalmente, se están llevando a cabo investigaciones tendientes a mejorar el rendimiento del rFVIIa, alargando su vida media en la circulación (formulación con liposomas pegilados)<sup>22</sup>, o de variantes moleculares como el rFVIIa-NN1731<sup>23</sup>, aún en fase de experimentación.

### Erradicación del inhibidor

Los corticosteroides e inmunosupresores (ciclofosfamida y azatioprina) han sido ampliamente utilizados para esta indicación en la mayoría de casos. Lamentablemente, no existe ninguna pauta establecida, ni en las dosis, ni en la eventual combinación de los fármacos. No obstante, en un metaanálisis realizado por el grupo del Hospital Universitario La Paz de Madrid, se sugiere una mayor eficacia de la ciclofosfamida sobre la prednisona en cuanto a la erradicación del inhibidor, aunque no mejora la supervivencia<sup>24</sup>. Los resultados de los tratamientos con inmunoglobulinas (IG) sólo han conseguido mostrar cierta eficacia en la erradicación de inhibidores de bajo título<sup>2</sup>. Existe un protocolo que ha utilizado una combinación con ciclofosfamida, prednisona, IG, inmunoadsorción e infusión de dosis elevadas de FVIII con buenos resultados, aunque difícilmente aplicable en un número considerable de centros<sup>25</sup>. Hay poca información sobre los resultados de la inmunoadsorción y plasmaféresis en estos pacientes.

En los últimos años se han reportado resultados esperanzadores con el rituximab, utilizado originariamente para el tratamiento de una parte de síndromes linfoproliferativos CD20+. Este anticuerpo monoclonal quimérico viene siendo utilizado en multitud de trastornos autoinmunes con resultados dispares, e incluso existen algunos casos que han conseguido erradicar temporalmente aloanticuerpos anti-FVIII en hemofilia congénita. Más recientemente, se han postulado terapias combinadas de rituximab e inmunosupresores según las titulaciones del anticuerpo<sup>5,26</sup>. Para avanzar en el conocimiento y tratar de homogeneizar las actitudes terapéuticas, hay depositadas muchas esperanzas en el registro europeo EACH2 (European Acquired Haemophilia Registry-2), en el cual, en el momento de la remisión de este manuscrito, existen ya 512 pacientes incluidos.

### Bibliografía

- Collins U, Budde J, Rand H, Federici AB, Kessler CM. Epidemiology and general guidelines of the management of acquired haemophilia and von Willebrand syndrome. *Haemophilia* 2008; 14 (Suppl 3): 49-55.
- Collins PW, Hirsch S, Baglin TP, et al. UK Haemophilia Centre Doctors' Organisation. Acquired hemophilia A in the United Kingdom: A 2-year national surveillance study by the United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation. *Blood* 2007; 109: 1870-7.
- Franchini M, Targher G, Manzato F, Lippi G. Acquired factor VIII inhibitors in oncohematology: A systematic review. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008; 66: 194-9.
- Franchini M, Targher G, Montagnana M, Lippi G. Laboratory, clinical and therapeutic aspects of acquired hemophilia A. *Clin Chim Acta* 2008; 395: 14-8.
- Franchini M, Lippi G. Acquired factor VIII inhibitors. *Blood* 2008; 112: 250-5.
- Pavlova A, Díaz-Lacava A, Zeitler H, Satoguina J, Niemann B, Krause M, et al. Increased frequency of the CTLA-4 49 A/G polymorphism in patients with acquired haemophilia A compared to healthy controls. *Haemophilia* 2008; 14: 355-60.
- Schulman S, d'Oiron R, Martinowitz U, et al. Experiences with continuous infusion of recombinant activated factor VII. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998; 9 (Suppl 1): 97-101.
- Kurczynski EM, Penner JA. Activated prothrombin concentrate for patients with factor VIII inhibitors. *N Engl J Med* 1974; 291: 164-7.
- Van Veen JJ, Gatt A, Makris M. Thrombin generation testing in routine clinical practice: are we there yet? *Brit J Haematol* 2008; 142: 889-903.
- Váradí K, Négrier C, Berntorp E, et al. Monitoring the bioavailability of FEIBA with a thrombin generation assay. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 2374-80.
- Négrier C, Dargaud Y, Bordet JC. Basic aspects of bypassing agents. *Haemophilia* 2006; 12 (Suppl 6): 48-53.
- Lusher JM, Shapiro SS, Palascak JE, Rao AV, Levine PH, Blatt PM. Efficacy of prothrombin-complex concentrates in hemophiliacs with antibodies to factor VIII: a multicenter therapeutic trial. *N Engl J Med* 1980; 21: 421-5.
- Sjamsodin LJ, Heijnen L, Mauser-Bunschoten EP, et al. The effect of activated prothrombin-complex concentrate (FEIBA) on joint and muscle bleeding in patients with hemophilia A and antibodies to factor VIII. A double-blind clinical trial. *N Engl J Med* 1981; 305: 717-21.
- Gomperts ED. FEIBA safety and tolerability profile. *Haemophilia* 2006; 12 (Suppl 5): 14-9.
- Ehrlich HJ, Henzl MJ, Gomperts ED. Safety of factor VIII bypass activity (FEIBA): 10-year compilation of thrombotic adverse events. *Haemophilia* 2002; 8: 83-90.
- Hedner U. Mechanism of action, development and clinical experience of recombinant FVIIa. *J Biotechnol* 2006; 124: 747-57.
- Butenas S, Brummel KE, Branda RF, Paradis SG, Mann KG. Mechanism of factor VIIa-dependent coagulation in hemophilia blood. *Blood* 2002; 99: 923-30.
- Abshire TC. Dose optimisation of recombinant activated factor VII for control of mild to moderate bleeds in inhibitor patients: improved efficacy with higher dosing. *Semin Hematol* 2004; 41: 3-7.
- Wolberg AS, Allen GA, Monroe DM, Hedner U, Roberts HR, Hoffman M. High dose factor VIIa improves clot structure and stability in a model of haemophilia B. *Brit J Haematol* 2005; 131: 645-55.
- Santagostino E, Mancuso ME, Rocino A, Mancuso G, Scaraggi F, Mannucci PM. A prospective randomized trial of high and standard dosages of recombinant factor VIIa for treat-

- ment of hemarthroses in hemophiliacs with inhibitors. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 367-71.
21. Sumner MJ, Geldziler BD, Pedersen M, Seremetis S. Treatment of acquired haemophilia with recombinant activated FVII: a critical appraisal. *Haemophilia* 2007; 13: 451-61.
  22. Yatuv R, Dayan I, Carmel-Goren L, Robinson M, Aviv I, Goldenbergfurmanov M, et al. Enhancement of factor VIIa haemostatic efficacy by formulation with PEGylated liposomes. *Haemophilia* 2008; 14: 476-83.
  23. Brophy DF, Martin EJ, Nolte ME, Kuhn JG, Carr ME Jr. Effect of recombinant factor VIIa variant (NN1731) on platelet function, clot structure and force onset time in whole blood from healthy volunteers and haemophilia patients. *Haemophilia* 2007; 13: 533-41.
  24. Delgado J, Jiménez-Yuste V, Hernández-Navarro F, Villar A. Acquired haemophilia: review and metaanalysis focused on therapy and prognostic factors. *Brit J Haematol* 2003; 121: 21-35.
  25. Zeitler H, Ulrich-Merzenich G, Hess L, Konsek E, Unkrig C, Walger P, et al. Treatment of acquired hemophilia by the Bonn-Malmö Protocol: documentation of an in vivo immunomodulating concept. *Blood* 2005; 105: 2287-93.
  26. Stasi R, Brunetti M, Stipa E, Amadori S. Selective B-cell depletion with rituximab for the treatment of patients with acquired hemophilia. *Blood* 2004; 103: 4424-8.

# Resistencia y variabilidad en la respuesta a antiagregantes plaquetarios: diagnóstico, relevancia clínica y opciones terapéuticas

V. VICENTE, M.L. LOZANO, V. ROLDÁN, J. RIVERA

Servicio de Hematología y Oncología Médica. Hospital Universitario Morales Meseguer.

Centro Regional de Hemodonación. Murcia.

Desde hace años se ha involucrado a las plaquetas como parte activa e importante en la génesis de la patología vascular arterial. Es por ello que la terapia antiagregante plaquetaria constituye una herramienta principal en la prevención de nuevos eventos vasculares en los pacientes que sufren esta patología, siendo el ácido acetilsalicílico –aspirina– y las tienopiridinas –en la actualidad el clopidogrel– los dos fármacos más utilizados<sup>1,2</sup>. Aunque en términos generales la eficacia de la terapia con aspirina y clopidogrel está bien demostrada, también es conocido desde hace años que un número importante de pacientes desarrollan nuevos eventos oclusivos vasculares durante el tratamiento farmacológico. Éste fenómeno fue observado en pacientes tratados con aspirina hace ya casi 20 años<sup>1</sup> y se definió como “resistencia” a la aspirina. Más recientemente se ha observado también en los pacientes tratados con clopidogrel, siendo definido como “resistencia” a clopidogrel<sup>3</sup>.

La hipótesis de una posible “resistencia” a los antiagregantes plaquetarios generó una gran presión a los laboratorios de hemostasia, e instó a la búsqueda de pruebas *in vitro* que identificaran precozmente a los pacientes “resistentes”; asimismo, se vio la necesidad de establecer indicadores que asegurasen la eficacia de la terapia antitrombótica. A diferencia de la terapia anticoagulante oral, que requiere un control periódico para que sea segura y eficaz, este control no se ha contemplado para los antiagregantes plaquetarios. Como veremos, el fundamento del control rutinario de la terapia antiagregante con la metodología disponible en los laboratorios hospitalarios es muy discutible, sobre todo considerando que el término *resistencia* engloba aspectos diversos como la variabilidad interindividual en el cumplimiento de los tratamientos, en la biodisponibilidad y farmacodinámica, así como la escasa estandarización y la variabilidad inherente a los diferentes métodos de laboratorio actualmente en uso<sup>4,5</sup>. Esos hechos, junto a los que mencionamos a continuación, deberían ser elementos básicos para poder plantear decisiones terapéuticas adecuadas para la prevención de nuevos episodios vasculares en los pacientes antiagregados.

La considerable desorientación alcanzada en este campo durante la última década se va regulando con la experiencia clínica y de laboratorio adquirida en los

últimos años, y el concepto de “resistencia” a la aspirina y a clopidogrel está siendo redefinido como “respuesta clínica inadecuada” al tratamiento con cada tipo de antiagregante<sup>1,6,7</sup>. Hay que tener presente que para utilizar correctamente el término *resistencia* a un fármaco debe cumplirse alguno de los siguientes requisitos: a) incapacidad del fármaco para alcanzar su diana farmacológica (como consecuencia de una biodisponibilidad subóptima, inactivación *in vivo* o interacción con otras sustancias que impiden su función); b) modificación de la diana farmacológica que se hace insensible al fármaco.

Dado que los mecanismos de acción antiagregante de la aspirina y del clopidogrel son muy distintos, el concepto de “respuesta inadecuada” a cada uno de ellos debe ser tratado de forma diferente, si bien haremos algunas consideraciones que son comunes a los dos fármacos.

---

## Consideraciones comunes y generales del concepto “resistencia” a los antiagregantes plaquetarios, aspirina o clopidogrel

Como ya hemos comentado, actualmente está sobradamente demostrado el beneficio clínico de los antiagregantes plaquetarios en la prevención secundaria de trombosis arterial<sup>1,2</sup>. Sin embargo, la aparición de oclusiones vasculares en pacientes en tratamiento, con aspirina aislada en un principio y más tarde también con clopidogrel, propició que se planteara la hipótesis de que en el desarrollo de estos nuevos eventos vasculares jugaba un papel relevante el fallo de la terapia antiagregante plaquetaria, y se estableció el término *resistencia al antiagregante*<sup>1,3,8</sup>. Esta idea es desde hace unos años objeto de crítica y revisión sobre la base de nuestro mejor conocimiento de la fisiología plaquetaria y la constatación de la existencia de numerosas vías de activación parcialmente redundantes, por lo que no es de extrañar que la modulación de sólo una de ellas sea insuficiente para asegurar un efecto antiagregante completamente eficaz. Asimismo, también conocemos mejor el complejo y multifactorial proceso de generación de la aterogénesis, paso previo y fundamental en el desarrollo de los episodios oclusivos vasculares.



### Control biológico de la antiagregación plaquetaria

La evaluación de la función plaquetaria en los pacientes en terapia antiagregante que desarrollaron un nuevo evento arterial, y el hallazgo de resultados no coincidentes con los esperados, sustentó la hipótesis de “resistencia” al fármaco antiagregante. La observación llevó a extender el estudio de la función plaquetaria a pacientes en tratamiento antiagregante, aun sin sufrir episodios oclusivos, encontrándose en algunos de ellos un resultado “inadecuado”, que generó intranquilidad acerca de si estos pacientes estaban o no correctamente antiagregados. La forma de intentar aclarar esta situación fue realizar estudios de función plaquetaria en pacientes ya tratados con antiagregantes, y ver si los resultados ayudaban a establecer criterios de riesgo de aparición de las oclusiones vasculares<sup>9,10</sup>.

La estrategia, que podía ser adecuada en un planteamiento inicial, presenta la limitación crítica de que la metodología aplicada es débil, inconsistente, con escasa especificidad y sensibilidad, y cuyos resultados pueden estar influenciados de forma determinante por mecanismos biológicos no relacionados. En nuestra opinión, durante los últimos años se han estado aplicando aproximaciones metodológicas dispares para definir la “resistencia” biológica a los antiagregantes plaquetarios, empleando técnicas en absoluto equivalentes<sup>11</sup>, como el tiempo de hemorragia, la agregación plaquetaria en plasma rico en plaquetas (PRP) con diferentes agonistas, la agregación plaquetaria en sangre total por método de impedancia, la medida de niveles séricos o en orina de productos de la vía metabólica del ácido araquidónico, métodos de citometría de flujo para la valoración del estatus de activación plaquetaria y diferentes tipos de equipos semiautomáticos de hemostasia primaria/función plaquetaria, como el PFA-100, VerifyNow®, o los nuevos tromboelastógrafos<sup>1,6,7</sup>.

Buena parte de esta metodología presenta cierta complejidad técnica y falta de estandarización, y sobre todo no tiene una definición específica y consensuada de la “ventana de respuesta terapéutica adecuada” a alcanzar en cada técnica para los antiagregantes utilizados<sup>11</sup>. Así, la calificación de “resistencia” se ha establecido generalmente de forma arbitraria ante resultados de laboratorio, que se consideraban inesperados según la experiencia particular del grupo investigador, lo cual ha contribuido a generar una importante confusión en este campo<sup>11-15</sup>.

### Estudios clínicos

En los últimos cinco años numerosos estudios clínicos han evaluado el valor predictor de cada método

utilizado para evaluar la “resistencia” o “respuesta inadecuada” al agente antiagregante<sup>1,3,6,8,9</sup>. En general, los estudios son retrospectivos, han incluido un número reducido de pacientes e interpretan un único valor de laboratorio como la expresión de un “fenotipo estable”, sin tener en cuenta otros factores relevantes para la correcta valoración de los resultados, como son los que mencionamos más adelante. De todas formas, un buen número de los estudios, pese a aplicar metodología muy diferente, ha revelado que los pacientes calificados como “resistentes” presentan un mayor riesgo de nuevos eventos oclusivos vasculares<sup>3,9</sup>. Si esto es una consecuencia de una verdadera resistencia al fármaco antiagregante, o tan sólo el reflejo de un estado basal de hiperreactividad plaquetaria, es una cuestión de controversia<sup>1,16-18</sup>.

### Causas de resistencia

Tanto en el caso de la aspirina como del clopidogrel, las causas de “resistencia” o “respuesta inadecuada” pueden ser diversas y de efecto no generalizable. Una de ellas, posiblemente mucho más habitual de lo generalmente considerado, es una mala o irregular adherencia al tratamiento<sup>19</sup>. Otra es la ingesta con otros fármacos, como antiinflamatorios no esteroideos, analgésicos, inhibidores de la bomba de protones, o el uso de preparaciones “entéricas”, que podrían interferir en la farmacodinámica de los antiagregantes y modificar el resultado de las pruebas de función plaquetaria utilizadas para la definición de “resistencia” biológica a los antiagregantes plaquetarios<sup>1,6,8,19-21</sup>. Adicionalmente, cada vez es más evidente que comorbilidades como la diabetes, obesidad, ser fumador, etc., también puede incidir de forma relevante en la interpretación de los resultados<sup>1,7,26</sup>. Finalmente, en los últimos años hemos conocido que la respuesta biológica de los pacientes a la aspirina y al clopidogrel puede estar influenciada de forma significativa por determinantes genéticos de los receptores plaquetarios y/o de las enzimas implicadas en el metabolismo de los antiagregantes<sup>22-25,27,28</sup>.

### Aspirina

#### Mecanismo de acción

El ácido acetilsalicílico ejerce su acción antiagregante acetilando irreversiblemente el residuo serina en posición 529 de la enzima ciclooxigenasa (COX)-1, lo que impide su acción enzimática sobre el ácido araquidónico (AA) conducente a la síntesis de tromboxano A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>). Este prostanoides es un agonista plaquetario que actúa, junto con el ADP, potenciando considera-

blemente la activación y agregación plaquetaria inducida por otros agonistas. La inhibición de la generación de  $\text{TxA}_2$  es la consecuencia farmacológica de la aspirina y la base de su efecto antitrombótico<sup>1</sup>.

### **Métodos de control biológico de la acción antiagregante de la aspirina**

Para evaluar el efecto antiplaquetario de la aspirina se están empleando diferentes métodos, que podemos clasificar en directos e indirectos:

#### *Métodos directos*

Una forma utilizada clásicamente para observar el efecto de la aspirina es la cuantificación de la inhibición de la agregación plaquetaria en respuesta a AA, pero posiblemente la forma más adecuada y directa de medir su efecto farmacológico sea la cuantificación de la generación de  $\text{TxA}_2$ . Por métodos de ELISA o radioinmunoensayo se miden, respectivamente, los niveles en orina de 11-dehidro- $\text{TxB}_2$ , y los niveles de  $\text{TxB}_2$  en suero o en el sobrenadante de plaquetas activadas con AA. Estas pruebas, en particular la medición de  $\text{TxB}_2$  en suero, es considerada el estándar de oro para evaluar el efecto farmacológico de la aspirina, y generalmente son las pruebas que identifican un porcentaje más bajo de pacientes con “resistencia” o “respuesta inadecuada” a la aspirina<sup>1,11,15</sup>.

#### *Métodos indirectos*

Junto a los métodos biológicos mencionados, que como hemos indicado están más relacionados con el efecto biológico directo de la aspirina sobre el funcionamiento plaquetario, se han venido utilizando otros que pretenden medir de forma indirecta el potencial residual agregante de las plaquetas de pacientes que toman aspirina. Por una parte, se han utilizado diferentes agentes inductores de la agregación plaquetaria, como el ADP, epinefrina o colágeno, menos específicos y sensibles que el ácido araquidónico para cuantificar la administración de acetilsalicílico. Alternativamente, la agregabilidad residual se puede valorar en sangre total por métodos clásicos de impedancia eléctrica, o con equipos automáticos como VerifyNow<sup>®</sup> Aspirin que evalúa agregación sobre microesferas recubiertas de fibrinógeno. Otros sistemas semiautomáticos empleados para valorar indirectamente el efecto antiagregante de la aspirina son el PFA-100, que mide tiempo de oclusión del flujo a través de un poro en una membrana recubierta de colágeno y ADP o epinefrina, o los modernos tromboelastógrafos<sup>1,4,6,9-11,13,15,19</sup>.

Genéricamente se suponía que todos estos métodos proporcionarían un patrón de respuesta equivalente o similar en los pacientes tratados con acetilsalicílico. Sin embargo, se ha demostrado que esto no es así, y los distintos estudios comparativos han mostrado resultados muy discordantes, incluso en sujetos sanos que se prestaron voluntariamente para investigar la variabilidad del efecto de la aspirina<sup>13,15</sup>. Las discrepancias entre los resultados no debe llamar mucho la atención, pues en general sabemos que muchas de las pruebas clásicamente aplicadas, como la agregación plaquetaria, adolecen de falta de estandarización, tienen una amplia variabilidad y su resultado puede variar con el tiempo, incluso en el mismo paciente<sup>13,15</sup>.

### **Interpretación de las pruebas de función plaquetaria y de la “respuesta inadecuada” a la aspirina**

La gran heterogeneidad en la interpretación de los estudios de monitorización de la acción de la aspirina ha llevado a una gran confusión en este campo. En gran medida ello se debe a la ausencia de una definición clara del concepto de “respuesta biológica adecuada a la aspirina” para cada una de las técnicas aplicadas. Hay indefinición en el punto de corte universal para medir la respuesta de agregación o los niveles séricos o en orina de  $\text{TxA}_2$  ( $\text{TxB}_2$  u 11-d $\text{TxB}_2$ ), e igualmente falta de consenso de los agonistas y concentraciones válidas a utilizar en los estudios de agregación plaquetaria<sup>1,8,9</sup>, lo que ha aumentado la dispersión de los resultados y ha servido para añadir más sombras que luces en este asunto<sup>1,10</sup>.

El efecto antitrombótico global de la aspirina es dependiente de un amplio abanico de factores, biológicos o no. El recambio plaquetario acelerado puede contribuir a la heterogeneidad en los niveles de  $\text{TxA}_2$  detectados en los individuos con los test “directos”<sup>15</sup>, ya que estas plaquetas jóvenes no han estado expuestas a la acción farmacológica de la aspirina sobre COX-1, y además se sabe que tienen un mayor contenido de COX-2, que tiene una distinta sensibilidad al acetilsalicílico<sup>15</sup>. Por otra parte, los monocitos y células endoteliales también pueden generar  $\text{TxA}_2$ , lo que puede contribuir a la variabilidad interindividual en los niveles del prostanoide.

La heterogeneidad en los resultados de los métodos directos e indirectos se hace patente incluso en estudios controlados en sujetos sanos. Es fácil de imaginar que la variabilidad puede ser mucho mayor cuando se estudian pacientes con comorbilidades y terapias concomitantes. Así, se ha demostrado que la respuesta en pacientes diabéticos es especialmente heterogénea, probablemente como consecuencia de una hiperreactividad plaquetaria sistémica variable.



Este fenómeno puede ser extensivo a pacientes obesos, hipercolesterolémicos o fumadores<sup>6,11,14,16,18,19</sup>.

Un factor muy importante en la interpretación crítica de los estudios de monitorización del efecto de la aspirina es la desigual adherencia al tratamiento. Trabajos recientes nos indican que hasta el 25% de los pacientes en profilaxis secundaria con antiagregantes plaquetarios no cumplen con rigor el tratamiento prescrito, con lo cual la supuesta “resistencia” a la aspirina no es más que un inadecuado cumplimiento de tratamiento<sup>1,6,8,19</sup>. Para complicar un poco más la situación, existe un amplio rango de dosis utilizadas en los diferentes estudios clínicos, que oscilan entre 75 y 500 mg de acetilsalicílico. Asimismo, el grado de absorción intestinal de la aspirina puede depender de la presentación del fármaco, especialmente cuando se trata de modalidades “entéricas recubiertas”, cuya absorción puede ser menor. Además, muchos de los estudios realizados no han tenido en cuenta la toma de fármacos que interactúan o bloquean la acción antiagregante del acetilsalicílico, como pueden ser los antiinflamatorios no esteroideos, analgésicos, etc.<sup>1,6</sup>.

Los estudios farmacogenéticos realizados hasta la fecha, buscando polimorfismos que justifiquen diferencias interindividuales en el comportamiento frente a la aspirina, no han sido fructíferos. Solamente hay indicios que sugieren una asociación genética entre el polimorfismo HPA-1 (PIA1/PIA2) y la respuesta de agregación plaquetaria en sujetos sanos que han tomado aspirina. Curiosamente, la respuesta es menor en pacientes con enfermedad cardiovascular<sup>27</sup>.

Finalmente, hay que indicar que la gran mayoría de los estudios realizados están basados en los resultados obtenidos en una única determinación biológica, cuando hay datos que nos muestran falta de consistencia de un mismo parámetro en el mismo individuo.

### **Consideraciones finales relacionadas con la respuesta biológica a la aspirina**

Lo que venimos comentando cuestiona el uso del término *resistencia a la aspirina*, siendo probablemente más adecuado usar el de *respuesta inadecuada a la aspirina*. Dependiendo de la técnica biológica utilizada, podemos encontrar entre el 0,4 y el 83,3% de los enfermos con esta “respuesta inadecuada”<sup>1,6,8</sup>. Esos datos justifican a su vez la enorme precaución en el uso y extrapolación de los resultados biológicos para definir el riesgo de padecer nuevos episodios oclusivos vasculares en pacientes que toman aspirina<sup>(29)</sup>.

La falta de estandarización de buena parte de las técnicas biológicas utilizadas, la ausencia de defini-

ción de criterios de respuesta, el estudio de muestras heterogéneas de pacientes con diferentes comorbilidades, la utilización de dosis diferentes de aspirina, la toma de acetilsalicílico con presentación diferente –formas entéricas recubiertas–, la existencia de medicación concomitante analgésica o antiinflamatoria, datos insuficientes de adherencia al tratamiento, y la no consideración de reactividad plaquetaria “basal”, etc., justifican que tanto la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia como la Sociedad Europea de Cardiología<sup>29</sup> hayan establecido una serie de recomendaciones, que podemos resumir en los siguientes puntos:

a) No se recomienda la evaluación biológica rutinaria de la función plaquetaria en pacientes en tratamiento con aspirina.

b) Algunas pruebas de laboratorio nos pueden indicar el estado actual de reactividad plaquetaria pero no son capaces de mostrarnos qué inhibición hemos podido alcanzar con la aspirina.

c) Las pruebas “directas” que miden inhibición de generación de tromboxano deberían ser preferibles a métodos indirectos de funcionalidad plaquetaria.

d) Actualmente seguimos sin tener evidencia científica que justifique el cambio de aspirina o la adición de otro antiagregante ante datos biológicos de “respuesta inadecuada a la aspirina”. El juicio clínico debe prevalecer en la conducta terapéutica a seguir.

---

## **Clopidogrel**

### **Mecanismo de acción**

El ADP liberado de los gránulos densos es un mediador soluble fundamental en la activación de las plaquetas, interactuando con dos receptores purinérgicos de membrana específicos denominados P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>12</sub>. Diferentes estudios *in vitro* y con modelos animales, y también algunos con pacientes, han identificado a P2Y<sub>12</sub> como el receptor principal en la amplificación y mantenimiento de la activación de las plaquetas por ADP, si bien P2Y<sub>1</sub> también participa en la iniciación de la respuesta. Ello justifica que la inhibición de P2Y<sub>12</sub> con tienopiridinas sea una estrategia ampliamente usada y de probada eficacia en la prevención de las complicaciones trombóticas arteriales, en particular en pacientes sometidos a implantación de *stents*<sup>3,7</sup>.

El clopidogrel pertenece a la familia de las tienopiridinas. A diferencia de lo que ocurre con la aspirina, el clopidogrel bisulfato, que es el fármaco de uso clínico, es una prodroga inerte que requiere ser absorbida en el intestino y biotransformada en el hígado a su metabolito activo, por acción de isoenzimas citocromo P-450 (CYP)<sup>7</sup>. Se estima que la tasa

de biotransformación no supera el 15% del fármaco ingerido, siendo el resto hidrolizado a una forma no activa por esterasas. En términos generales, con un tratamiento estándar de 75 mg/día la tasa de biotransformación de clopidogrel bisulfato es suficiente para procurar un estado irreversible de antiagregación significativa frente al ADP durante 7-10 días, aunque con una considerable variación interpersonal.

### **Métodos de control biológico de la acción antiagregante del clopidogrel**

Al igual que para la aspirina, en la valoración del efecto antiplaquetario del clopidogrel también se han utilizado diferentes procedimientos, que podemos clasificar en directos e indirectos.

#### *Métodos directos*

El estudio de agregación plaquetaria utilizando como agonista el ADP es el método de cuantificación directa más empleado, ya que la agregación plaquetaria debería reflejar los receptores no ocupados por la tienopiridina. Sin duda, ha sido la técnica más utilizada con el propósito de evaluar la respuesta terapéutica al clopidogrel, y muchos consideran que es la herramienta fundamental para explorar el efecto de la tienopiridina<sup>7,30</sup>. El problema surge al considerar que el ADP también puede activar las plaquetas a través de otro receptor no bloqueable por el clopidogrel, como es el P2Y<sub>1</sub>. La existencia de dos receptores de ADP supone una dificultad importante a la hora de valorar directamente el efecto de drogas que antagonizan la acción activadora de este agonista. Además, hay otras limitaciones genéricas de esta técnica, que surgen durante la extracción y procesamiento de las muestras de sangre.

Recientemente se ha desarrollado un método de citometría de flujo para la evaluación directa del bloqueo de P2Y<sub>12</sub> por clopidogrel, y está basado en la medida de la inhibición por ADP, vía P2Y<sub>12</sub>, de la fosforilación de la proteína del citoesqueleto VASP (*vasodilator-stimulated phosphoprotein*)<sup>7</sup>. Este método directo, que está ya comercializado, ha mostrado en diferentes estudios una asociación significativa con la presencia de episodios trombóticos en pacientes sometidos a angioplastia y colocación de *stents*, y está cada vez más introducido en laboratorios interesados en el campo de la resistencia al fármaco. Sin embargo, se trata de una prueba de relativa complejidad, no fácilmente estandarizable, y requiere tiempo, personal y equipos especializados, por lo que no es sencilla su implantación como prueba de rutina en laboratorios de hematología.

#### *Métodos indirectos*

Al igual que ha sucedido con la aspirina, aunque en menor grado, se han aplicado otros métodos para el estudio del funcionalismo plaquetario residual en pacientes en tratamiento con clopidogrel. Se ha estudiado la agregación plaquetaria en PRP con diferentes agentes inductores distintos al ADP, especialmente el colágeno, y con metodología ya comentada en el apartado dedicado a métodos indirectos aplicados para evaluar la acción antiagregante de la aspirina.

Al igual que se comprobó con la aspirina, no existe un comportamiento similar o concordante entre las pruebas, de ahí que también surgiera el término *resistencia* al clopidogrel utilizando metodología no comparable, lo que también facilitó la confusión<sup>3,7,12</sup>.

### **Interpretación de las pruebas de función plaquetaria y de la "respuesta inadecuada" a clopidogrel**

En analogía con la resistencia a aspirina, en los últimos años hemos asistido a un auténtico crecimiento exponencial en los estudios de valoración de "eficacia" o "resistencia" a clopidogrel, sobre todo en pacientes sometidos a colocación de *stent(s)*. También en similitud con la resistencia a aspirina, la arbitrariedad en el uso de los métodos de evaluación de la respuesta a clopidogrel, la ausencia de consenso en los criterios de definición de respuestas normales o anormales al ADP para cada uno de estos métodos y, muchas veces, la falta de concordancia entre los resultados obtenidos por las distintas técnicas son factores que han exacerbado la confusión respecto al concepto de "resistencia" al clopidogrel. Esta "confusión" se refleja bien en el hecho de que el porcentaje de paciente definidos como resistentes o malos respondedores a clopidogrel varía enormemente<sup>7</sup>.

Las causas de la variabilidad en la respuesta al clopidogrel son, genéricamente, similares a las comentadas para la resistencia a la aspirina, e incluyen falta de adherencia al tratamiento, disparidad en la dosis administrada del fármaco, acelerado *turn-over* plaquetario o la existencia de una hiperreactividad plaquetaria basal, exacerbada en ocasiones por escenarios clínicos asociados, como obesidad o diabetes<sup>3,7,12</sup>.

Además, en este caso, al tratarse de una prodroga que requiere activación, uno de los factores que más podrían influir en la respuesta individual al clopidogrel es la actividad de las enzimas implicadas en su absorción y biotransformación. Los genes que codifican estas enzimas son polimórficos, y se ha mostrado que determinadas variantes genéticas influyen en la bioactividad del clopidogrel. Así, se ha observado que el polimorfismo C3435T del gen ABCB1 que codifica el transportador intestinal P-glicoproteína dis-

minuye significativamente la absorción intestinal de clopidogrel<sup>7</sup>, y se asocia a una tasa más elevada de eventos cardiovasculares durante el primer año después de padecer un infarto de miocardio y comenzar el tratamiento con la tienopiridina<sup>22</sup>. Igualmente, estudios recientes han encontrado que determinados alelos de isoenzimas CYP, como CYP 2C19\*2 que confieren una menor actividad enzimática, se asocian a un riesgo significativamente mayor de sufrir nuevos eventos<sup>22-25</sup>.

Los niveles circulantes del metabolito activo de clopidogrel y su efecto antiagregante final también pueden estar influenciados por fármacos administrados concomitantemente. En concreto, se ha mostrado que ciertos inhibidores de la bomba de protones, como omeprazol, disminuyen significativamente la potencia antiagregante de clopidogrel<sup>21</sup>.

Hay otros fármacos que también pueden modificar la respuesta a los inductores de agregación plaquetaria en presencia de clopidogrel, como es la rifampicina, eritromicina o ketonazol<sup>7</sup>, las estatinas lipofílicas –artovastatina, simvastatina y lovastatina–<sup>21</sup> o los bloqueantes de los canales del calcio, como las dihidropiridinas<sup>7</sup>.

Aunque con aparente menor peso que los factores genéticos y ambientales que afectan al metabolismo del clopidogrel, en algunos estudios se ha mostrado que las variantes genéticas de los receptores plaquetarios de ADP, fibrinógeno o epinefrina también pueden tener algún peso en la variabilidad de la respuesta al clopidogrel<sup>27</sup>.

A pesar de estas limitaciones añadidas, los datos sobre la relevancia clínica de una “resistencia” o “respuesta inadecuada” al clopidogrel son más amplios y consistentes que para el caso de la resistencia a la aspirina. Un campo de investigación emergente es el análisis del valor de los métodos biológicos aplicados a la evaluación de las respuestas de los pacientes a la nueva generación de tienopiridinas, como prasugrel, con menor dependencia metabólica de CYP450, o los nuevos antagonistas directos de P2Y<sub>12</sub>, como cangrelor<sup>31</sup>.

### **Consideraciones finales relacionadas con la respuesta biológica a clopidogrel**

Al igual que sucede con la aspirina, hay numerosos datos que muestran una importante variabilidad individual de las pruebas funcionales plaquetarias en los pacientes que toman clopidogrel. De forma similar, también se han involucrado desde problemas de la estandarización y definición clara de los criterios de respuesta con las diferentes técnicas empleadas a situaciones de una mala adherencia al tratamiento, comorbilidades existentes o la toma concomitante de fármacos, como inhibidores de la bomba

de protones, estatinas y antimicrobianos, fármacos que en muchas ocasiones son habituales en estos pacientes.

De todas las técnicas funcionales utilizadas, el estudio de la agregación plaquetaria en PRP inducida por ADP y la prueba del VASP parecen ser las más adecuadas para realizar un aproximación funcional plaquetaria.

Los estudios moleculares publicados recientemente de las formas polimórficas del citocromo 450 y de la glicoproteína P intestinal están aportando luz acerca de los posibles mecanismos que explican la variabilidad individual observada en sujetos sanos y en pacientes que toman clopidogrel. Aunque una posibilidad es que la tipificación de los polimorfismos puedan desplazar o complementar a las pruebas funcionales –especialmente al VASP–, son necesarios estudios adicionales que confirmen los datos recientemente conseguidos y ayuden a aclarar si la relación genotipo-fenotipo observada se reproduce en pacientes de edades y etnias diferentes. Aunque se ha avanzado más en el entendimiento de los posibles mecanismos responsables de una “respuesta inadecuada” al clopidogrel que a la aspirina, los datos existentes todavía son insuficientes para dar una recomendación clara de conducta clínica a seguir ante una de estas situaciones. La aparición de nuevos agentes antitrombóticos seguros y eficaces –incluidas las tienopiridinas de tercera generación, cuya absorción intestinal y metabolismo no están sometidos a una regulación genética, como el clopidogrel– podría facilitar la resolución de este problema<sup>31,32</sup>.

### **Bibliografía**

1. Patrono C, Rocca B. Aspirin, 110 years later. *J Thromb Haemost* 2009; 7 (Suppl 1): 258-61.
2. Yusuf S, Zhao F, Mehta SR et al. Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent Recurrent Events Trial Investigators. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med* 2001; 345: 494-502.
3. De Miguel A, Ibáñez B, Badimón JJ. Clinical implications of clopidogrel resistance. *Thromb Haemost* 2008; 100: 196-203.
4. Rivera J, Navarro-Núñez L, Lozano ML, et al. Valor diagnóstico de las pruebas de función plaquetaria. *Haematologica* 2008; 92 (Suppl. 1): 48-62.
5. Hayward CPM, Pai M, Liu KA, et al. Diagnostic utility of light transmission platelet aggregometry: results from a prospective study of individuals referred for bleeding disorder assessments. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 676-84.
6. Lev EI. Aspirin resistance. Transient laboratory finding or important clinical entity. *JACC* 2009; 53: 678-80.
7. Ferreira JL, Angiolillo D. Clopidogrel response variability: current status and future directions. *Thromb Haemost* 2009; 102: 7-14.
8. Zimmermann N, Hohfeld T. Clinical implications of aspirin resistance. *Thromb Haemost* 2008; 100: 379-90.

9. Krasopoulos G, Brister SJ, Beattie WS, Buchanan MR. Aspirin "resistance" and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2009; 336: 195-8.
10. Crescente M, Di Castelnuovo A, Iacovello L, et al. PFA-100 closure time to predict cardiovascular events in aspirin-treated cardiovascular patients: a meta-analysis of 19 studies comprising 3,303 patients. *Thromb Haemost* 2008; 99: 1129-31.
11. Lordkipanidzé M, Pharand Ch, Schampaert E, et al. A comparison of six major platelet function test to determine the prevalence of aspirin resistance in patients with stable coronary artery disease. *Eur Heart J* 2007; 28: 1702-9.
12. Horowitz JD, Chirlov YY. Identifying clopidogrel resistance during chronic therapy: the case for a biochemical approach. *Thromb Haemost* 2008; 100: 519-20.
13. González-Conejero R, Rivera J, Corral J, et al. Biological assessment of aspirin efficacy on healthy individuals. Heterogeneous response or aspirin failure? *Stroke* 2005; 36: 276-80.
14. Frelinger AL, Li Y, Linden MD, et al. Aspirin "resistance": role of preexistent platelet reactivity and correlation between test. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 2035-44.
15. Santilli F, Rocca B, De Cristofaro R, et al. Platelet cyclooxygenase inhibition by low-dose aspirin is not reflected consistently by platelet function assays. *JACC* 2009; 53: 667-77.
16. Guthikonda S, Mangalpally K, Vaduganathan M, et al. Increased platelet sensitivity among individuals with aspirin resistance-platelet aggregation to submaximal concentration of arachidonic acid predicts response to antiplatelet therapy. *Thromb Haemost* 2008; 100: 83-9.
17. Serebruany VS, Pokov I, Kuliczowski W, et al. Baseline platelet activity and response after clopidogrel in 257 diabetics among 822 patients with coronary artery disease. *Thromb Haemost* 2008; 100: 76-82.
18. Biondi-Zoccai G, Lotrione M. Aspirin resistance in cardiovascular disease. Carries a worse prognosis, but may indicate pre-existing higher risk. *BMJ* 2008; 336: 166-7.
19. Pignatelli P, Di Santo S, Barillá F, et al. Multiple anti-atherosclerotic treatments impair aspirin compliance: effects on aspirin resistance. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 1832-4.
20. Sibbing D, Morarth T, Stegherr J, et al. Impact of proton pump inhibitors on the antiplatelet effects of clopidogrel. *Thromb Haemost* 2009; 101: 714-9.
21. Serebruany V, Goto S. Clopidogrel and proton pump inhibitors: gastric protection at expenses of vascular benefit? *Thromb Haemost* 2009; 101: 607-9.
22. Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, et al. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *N Engl J Med* 2009; 360: 363-75.
23. Collet JP, Hulot JS, Pena A, et al. Cytochrome P450 2C19 polymorphism in young patients treated with clopidogrel after myocardial infarction: a cohort study. *Lancet* 2009; 373: 309-17.
24. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, et al. Cytochrome P-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *N Engl J Med* 2009; 360: 354-62.
25. Sibbing D, Stegherr J, Latz W, et al. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism and stent thrombosis following percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J* 2009; 20: 916-22.
26. Shantsila E, Lip GYH. Beyond glucose levels in diabetic patients with coronary artery disease: platelet activity and non-responsiveness to antiplatelet therapy. *Thromb Haemost* 2008; 100: 7-8.
27. Marín F, González-Conejero R, Capranzano P, et al. Pharmacogenetics in cardiovascular antithrombotic therapy. *JACC* (en prensa).
28. Goodman T, Ferro A, Sharma P. Pharmacogenetics of aspirin resistance: a comprehensive systematic review. *Br J Clin Pharmacol* 2008; 66: 222-32.
29. Kuliczowski W, Witkowski A, Polonski L, et al. Interindividual variability in the response to oral antiplatelet drugs: a position paper of the Working Group on antiplatelet drugs resistance appointed by the section of cardiovascular interventions of the Polish Cardiac Society, endorsed by the Working Group on thrombosis of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2009; 30: 426-35.
30. Sollier CB, Berge N, Boval B, et al. Functional variability of platelet response to clopidogrel correlates with P2Y<sub>12</sub> receptor occupancy. *Thromb Haemost* 2009; 101: 116-22.
31. Cattaneo M. New P2Y<sub>12</sub> blockers. *J Thromb Haemost* 2009; 7 (Suppl 1): 262-5.
32. Becker RC, Smyth S. The evolution of platelet-directed pharmacotherapy. *J Thromb Haemost* 2009; 7 (Suppl 1): 266-71.

# Patología trombótica relacionada con la gestación: profilaxis y tratamiento

A. SANTAMARÍA ORTIZ

Unidad de Hemostasia y Trombosis. Servicio de Hematología. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona

## Introducción

La gestación es un “estado adquirido” de riesgo de trombosis<sup>1-6</sup>. El riesgo de trombosis es hasta cinco o seis veces superior si se asocia a trombofilia<sup>3</sup>. Teniendo en cuenta, que en el Reino Unido y EE UU se dan unos 50 casos al día, podemos asegurar que estamos ante un problema serio<sup>4</sup>. Por ello, se ha avanzado en el conocimiento de la incidencia, fisiopatología, prevención y tratamiento de la enfermedad tromboembólica venosa y arterial. La mayoría de las recomendaciones se basan en guías clínicas que revisan todos los estudios realizados, y establecen las mejores opciones terapéuticas<sup>6</sup>. Dadas las características del embarazo y, en general, por problemas éticos, estas recomendaciones se basan en extrapolaciones de población no embarazada, estudios observacionales y opiniones de expertos<sup>1-9</sup>.

Uno de los grandes avances en la medicina obstétrica, y que ha irrumpido en el mundo de la hematología, es la posible implicación de la trombofilia en el desarrollo de las complicaciones vasculares gestacionales<sup>7,8-14</sup>. Estas complicaciones incluyen la preeclampsia/eclampsia, retraso de crecimiento intraútero, *abruptio placentae* y pérdidas fetales. Las complicaciones vasculares gestacionales (o complicaciones obstétricas asociadas a trombosis) se podrían considerar como parte de la patología trombótica del embarazo. Si la presencia de trombofilia se asocia a estas complicaciones o es la causa de ellas, es motivo de controversia<sup>10</sup>. Y, sin duda, una de las preguntas que deberemos responder en el futuro es si las complicaciones vasculares gestacionales son otra de las caras de la enfermedad cardiovascular.

## Enfermedad tromboembólica venosa y gestación

La incidencia de enfermedad tromboembólica en la gestación se estima entre 0,76 y 1,72 por 1.000 embarazos, que es aproximadamente cuatro veces superior a la población no gestante. Un metaanálisis ha demostrado que dos tercios de los casos se producen durante el periodo anteparto, y el riesgo se distribuye por igual durante los tres trimestres. Sin embargo, en el periodo posparto se presentan la mayoría de los episodios de tromboembolismo pulmonar<sup>4</sup>.

La embolia pulmonar es la primera causa de mortalidad materna en el mundo desarrollado. La incidencia es de 1,1-1,5 muertes por cada 100.000 partos en Estados Unidos y Europa. En la mayoría de los casos, estas muertes podrían estar relacionadas con el retraso en el diagnóstico, tardío o inadecuado tratamiento o trombopprofilaxis<sup>4</sup>.

## Factores de riesgo de tromboembolismo venoso durante la gestación

### Variaciones fisiológicas durante la gestación

Durante el embarazo se produce un estado de hipercoagulabilidad. Se produce un aumento de generación de fibrina y una disminución de la actividad fibrinolítica. Los factores de la coagulación, como los factores II, VII, VIII y X aumentan, mientras que la proteína S libre disminuye, y también aumenta la resistencia a la proteína C activada, el TAFI y el PAI-1, entre otros (Tabla 1). Se produce una activación de la hemostasia con un aumento de los marcadores de la activación de la coagulación, como el fragmento de la protrombina F1+2 y el dímero D<sup>15</sup>.

Otra situación mecánica que aumenta el riesgo de trombosis es la reducción hasta en un 50% del flujo sanguíneo en las piernas alrededor de la semana 25-29, y que dura hasta 6 semanas posparto.

### Otros factores de riesgo adicionales

Entre ellos se encuentran la diabetes, el lupus eritematoso sistémico, los embarazos múltiples, edad superior a 35 años, la obesidad, enfermedades cardíacas, la raza negra y las cesáreas (sobre todo las no electivas)<sup>4,15</sup>.

Tabla 1. Riesgo de CVG asociado a la presencia de trombofilia según registro TREATS (x)

Complicaciones vasculares gestacionales	OR (IC 95%)
<i>Abruptio placentae</i>	3,26 (2,10-5,06)
Preeclampsia	1,91 (1,60-2,28)
Pérdida fetal antes de la semana gestacional 24	2,22 (1,70-2,91)
Pérdida fetal tras la semana gestacional 24	2,31 (1,66-3,21)
Retraso de crecimiento intraútero	2 (1,49-3,40)



Tabla 2. Prevalencia de trombofilia y riesgo asociado de trombosis en población europea

Trombofilia	Prevalencia (%)	OR
<b>Factor V Leiden</b>		
Heterocigosis	2,0-7,0	9
Homocigosis	0,2-0,5	34
<b>Mutación de la PT20210A</b>		
Heterocigosis	2,0	7
Homocigosis	Baja	26
<b>Déficit de antitrombina</b>		
Déficit de proteína C	< 0,1-0,6	5
Déficit de proteína S	0,2-0,3	5
Déficit de proteína S	< 0,1-0,2	3

Es muy importante conocer si existen antecedentes personales de tromboembolismo venoso relacionados o no con gestaciones previas, si existen antecedentes familiares de tromboembolismo y, por tanto, si se conoce la existencia de trombofilia conocida.

### Trombofilia y gestación

Existen diferentes estudios que establecen el riesgo y prevalencia de la presencia de factores trombofílicos y trombosis durante la gestación<sup>1-8</sup>. En la Tabla 1 se puede observar el riesgo asociado a trombosis, según un estudio TREATS<sup>3</sup>. En la Tabla 2 se establece la prevalencia estimada de trombofilia y el riesgo de tromboembolismo asociado durante el embarazo en la población europea<sup>4</sup>.

Los datos sugieren que hasta el 50% de las mujeres embarazadas con tromboembolismo venoso están asociadas a algún tipo de trombofilia, tanto adquirida como hereditaria<sup>3,4,13</sup>.

Sin embargo, sólo el 0,1% de los embarazos presentan tromboembolismo venoso; por ello, el cribaje de trombofilia en todas las embarazadas no sería rentable<sup>3,4</sup>. Asumiendo que la razón de tromboembolismo venoso durante el embarazo es aproximadamente de 1:1.000, el riesgo absoluto de ETEV es modesto para la mayoría de casos de trombofilia, excepto para la deficiencia de antitrombina, homocigotos para factor V Leiden y déficit combinados<sup>3-5</sup>.

Los datos relativos a la homocigosidad para la MTHFR C677T y el riesgo de ETEV durante el embarazo sugieren que esta anomalía probablemente no incrementa el riesgo de ETEV durante el embarazo<sup>4</sup>.

Otro factor genético de riesgo sería la homocigosidad para el alelo T del polimorfismo 46 C/T del factor XII. Se sabe que aumenta hasta cinco veces el riesgo de trombosis venosa, aunque no existen estudios sobre el riesgo asociado a embarazo<sup>17</sup>.

### ¿Cuándo realizar el estudio de trombofilia?

Sólo se recomienda realizar este estudio al final del embarazo si la mujer ha presentado un episodio de tromboembolismo venoso. Se debe realizar al menos 4 semanas después de haber parado el tratamiento anticoagulante oral y, en el caso de las heparinas de bajo peso molecular, que hayan pasado al menos 24 horas de la última dosis; y en todos los casos realizarlo a los 3 meses del parto.

### ¿Qué incluir en el estudio de trombofilia?

En general, existe lo que se llama el estudio de trombofilia “básico”, que incluye :

- **El estudio plasmático:** la antitrombina funcional, la proteína C, la proteína S libre, funcional y antigénica, el anticoagulante lúpico, los antifosfolípidos como los anticuerpos anticardiolipinas IgG e IgM y el fibrinógeno funcional.
- **El estudio genético:** la mutación factor V Leiden y la mutación de la protrombina PT20210A.

Otros factores que se pueden estudiar pero cuya implicación como factores de riesgo de trombosis presentan cierta controversia, o simplemente requieren laboratorios especializados para su realización, son: el polimorfismo 46 C/T del F12, el factor VIIIc elevado, la mutación antitrombina Cambridge, el TAFI tanto antigénico como funcional, la proteína Z y la mutación en homocigosis de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR).

### Profilaxis y tratamiento de la enfermedad tromboembólica venosa en la gestación

Los fármacos disponibles para la prevención y tratamiento de la ETEV y el tromboembolismo arterial incluyen la heparina y compuestos afines (heparina no fraccionada –HNF–, heparinas de bajo peso molecular –HBPM– y heparinoides), derivados de la cumarina y aspirina<sup>3,4</sup>.

### Tratamiento de la ETEV durante la gestación

La heparina y compuestos afines (HNF y HBPM) son los anticoagulantes de elección durante el embarazo, tanto en la fase aguda como en la profilaxis o tratamientos a medio-largo plazo, ya que no atraviesan la barrera placentaria y son seguros para el feto.

Existen diferentes recomendaciones en función de la ACCP<sup>6,8</sup> (American College of Chest Physicians), el BCSH (British Committee for Standards in Haematology), la RCOG (Royal College of Obstetricians and Gynaecologist) y la SIGN (Scottish Intercolle-

giate Guidelines Network), que utilizan diferentes niveles de evidencia en función del tipo de estudios realizados, pero en general parece que existe cierto consenso en las pautas<sup>8</sup>.

En concreto, se recomienda iniciar con HBPM a dosis terapéuticas, bien a dosis diarias o cada 12 horas en función del tipo de heparina y, si es posible, efectuar niveles de anti-factor Xa a las 4-6 horas de haberse inyectado la dosis de HBPM y ajustar la dosis de HBPM para alcanzar unos niveles de anti-factor Xa de 0,4-1 UI/mL (en función del laboratorio). En cuanto a la duración, debe ser al menos de 6 meses en total, y siempre realizar tratamiento a dosis terapéuticas hasta al menos 6-12 semanas posparto.

El manejo del parto es otro de los puntos importantes de controversia y de dificultad asistencial en estos casos. Por ello, en dicho manejo, hay que tener en cuenta la semivida de las HBPM y establecer protocolos de actuación, con el objeto de disminuir el efecto anticoagulante durante el parto. En especial, el caso de la anestesia espinal, se sugiere suprimir la dosis de heparina 24 horas antes de la inducción electiva del parto o intervención por cesárea. En el posparto se recomienda reiniciar la HBPM a dosis profilácticas a las 6-12 horas de la intervención. Se mantendrá hasta 24-48 horas sin sangrado, y se iniciarán entonces dosis terapéuticas o paso a anticoagulantes orales, o continuar con profilaxis según indicación. La anticoagulación en el posparto debe administrarse como mínimo durante 3 meses, y un mínimo de 6 meses de tratamiento total del episodio agudo.

### Prevención de ETEV durante la gestación

Existen diferentes situaciones en el caso de la prevención de trombosis en las que no hay consenso, y cuyas recomendaciones varían según las guías clínicas. En la última, de la ACCP, y en la de la RCOG, parece que las recomendaciones son más profarmacológicas frente a la observación<sup>8</sup>.

### Recomendaciones según diferentes situaciones clínicas (basadas en las guías u opiniones de expertos)

1. Gestación en pacientes con antecedentes de trombosis venosa, sin trombofilia.
  - a) ETEV espontánea no relacionada con gestaciones previas.
 

Se recomienda observación o HBPM en el anteparto y durante el puerperio, además de medidas físicas, como medias de compresión.
  - b) ETEV relacionada con gestaciones previas.
2. Gestación en pacientes con antecedentes de trombofilia hereditaria o adquirida.

En estos casos, debe distinguirse entre los diferentes tipos de déficit y la historia personal de la gestante:

#### a) No antecedentes de ETEV

Las recomendaciones más consensuadas son la observación en anteparto y HBPM en el posparto, excepto en las mujeres con déficit de antitrombina. Aunque en la práctica asistencial generalmente se aconsejan medidas farmacológicas profilácticas en función de la trombofilia.

i) **Heterocigotas para el factor V Leiden o mutación de la protrombina PT20210 A, homocigotas T/T del FXII:** se recomienda anticoagulación profiláctica con HBPM en anteparto, y en el puerperio con HBPM.

ii) **Déficit congénito de proteína C y proteína S, homocigosis para la mutación factor V Leiden y PT20210A, dobles heterocigotas o déficits combinados:** profilaxis durante todo el embarazo con HBPM a dosis intermedias o profilácticas de alto riesgo y en el puerperio.

iii) **Déficits congénitos de proteína S funcional o presencia de títulos bajos de anticuerpos antifosfolípido:** profilaxis durante el último trimestre y el puerperio, con HBPM profiláctica a dosis de alto riesgo.

#### b) Antecedentes de ETEV

i) **Déficits congénitos de proteína S, proteína C, mutación factor V Leiden y de la protrombina PT20210A o síndrome antifosfolípido, dobles heterocigotas, homocigotas T/T (46 C/T) del FXII:** anticoagulación a niveles terapéuticos durante todo el embarazo y puerperio con HBPM.

ii) **Síndrome antifosfolípido con antecedentes de pérdidas fetales:** anticoagulación a dosis terapéuticas de HBPM y AAS 100 mg durante el embarazo y 3 meses tras puerperio.

iii) **Déficit de antitrombina independientemente de antecedentes de ETEV:** anticoagulación durante todo el embarazo. Con la precaución de estudiar inicialmente una resistencia a la heparina, y durante el parto y el posparto administrar concentrados de antitrombina.

### Complicaciones vasculares gestacionales relacionadas con trombofilia

Las complicaciones vasculares gestacionales (CVG) relacionadas con trombofilia incluyen: pérdidas fetales, retraso de crecimiento fetal, preeclampsia, *abruptio* y muerte intrauterina. Hasta un 25% de los embarazos acaban en pérdidas fetales. Un 5% de las mujeres presentan dos o más abortos, y entre un 1

y un 2% llegan a presentar tres o más pérdidas fetales. La preeclampsia se presenta hasta en un 5-7% de los embarazos, siendo una de las mayores causas de mortalidad y morbilidad del embarazo, con hasta 50.000-75.000 muertes en todo el mundo. Y en el 0,5% de los embarazos se desarrolla *abruptio placentae*. Estos datos nos dan una idea de la gravedad de esta patología durante la gestación<sup>11-15</sup>.

En los años noventa comenzaron a publicarse los primeros estudios sobre la posible asociación de la trombofilia con las CVG<sup>9</sup>. Aunque no queda claro si la trombofilia en esta patología es asociativa o causal, lo que sí se ha demostrado es el aumento de riesgo de presentar CVG en mujeres con diferentes trombofilias<sup>3</sup>. La placenta es un órgano con circulación de la madre y del hijo. El embarazo depende de una invasión adecuada de los trofoblastos en la vasculatura uterina y del mantenimiento de la circulación uteroplacentaria. Un estado de hipercoagulabilidad, materno o fetal, como la trombofilia materna parece que magnifica la respuesta inflamatoria materna y una activación del factor tisular, las micropartículas y otros factores, que conlleva una insuficiencia maternoplacentaria o una disfunción de los trofoblastos u otras alteraciones que suponen el desarrollo de las GVP<sup>11,12,16</sup>.

En la Tabla 2 se resumen los datos obtenidos en el TREATS study<sup>(3)</sup>. No existen datos en la actualidad sobre el papel del polimorfismo 46 C/T del factor XII.

Se recomienda, por ello, en las mujeres con abortos de repetición, pérdidas fetales en el segundo trimestre, muertes intrauterinas y preeclampsia grave o recurrente, descartar trombofilia.

En base a estos datos, y teniendo en cuenta la fisiopatología placentaria con la aparición de insuficiencia placentaria y depósitos de fibrina, se iniciaron estudios que hacían uso de tratamiento antitrombótico profiláctico con heparina<sup>3,13,14</sup>. Estudios como el LIVENOX<sup>13</sup> han demostrado que las HBPM son efectivas en los abortos de repetición. Otro estudio publicado recientemente con dalteparina<sup>14</sup>, utilizada en las otras CVG, también corrobora los buenos resultados con las HBPM. Sin embargo, no existe consenso en su utilización en la práctica clínica<sup>3</sup>.

En este tipo de pacientes con complicaciones durante el embarazo se recomienda realizar tratamiento, aunque no hay protocolos de actuación basados en la evidencia, por lo que hay varias tendencias, aunque en general se recomienda una actitud activa terapéutica, ya sea tratamiento con aspirina a dosis bajas (100-125 mg/d) y/o con HBPM a dosis profilácticas o terapéuticas. No obstante, faltan estudios bien aleatorizados para confirmar la eficacia de estas medidas terapéuticas en este tipo de complicaciones del embarazo<sup>3,11,14,15</sup>.

## El síndrome antifosfolípido y la gestación

La mujer embarazada con anticuerpos antifosfolípidos (AAF) es una paciente de alto riesgo para presentar este tipo de complicaciones, y la paciente con abortos de repetición debe ser sometida a un estudio para descartar la presencia de AAF antes del embarazo o en las primeras semanas del mismo.

El seguimiento de la paciente embarazada con AAF es problemático, porque hay pocos ensayos clínicos que evalúen diferentes pautas terapéuticas. Con los datos actuales, el tratamiento de elección de mujeres embarazadas con AAF y pérdidas fetales consiste en dosis bajas de aspirina (100-125 mg/d) más heparina, tanto HNF como HBPM. Una mujer embarazada con AAF sin antecedentes de pérdidas fetales, pero con antecedentes de trombosis venosa o arterial, debe ser candidata a tratamiento con HBPM a dosis terapéuticas, especialmente si estaba recibiendo tratamiento anticoagulante a largo plazo. La mujer con AAF sin antecedentes personales de trombosis ni pérdidas fetales probablemente tiene un alto riesgo de ETEV, y debe ser seguida con cuidadosa vigilancia clínica con controles de AAF y/o profilaxis con HNF o HBPM y aspirina, según protocolo<sup>3,11</sup>.

En resumen, en el caso de trombofilia y complicaciones vasculares gestacionales asociadas a trombosis, se recomienda:

1. Mujeres con trombofilia conocida, incluyendo AAF positivos y antecedentes de pérdidas fetales recurrentes. Profilaxis con HBPM a dosis profilácticas de alto riesgo y AAS 100 mg/día durante la gestación y puerperio.
2. Mujeres con trombofilia conocida y antecedentes de retardo de crecimiento intrauterino, preeclampsia grave o recurrente o *abruptio*. Prevención con HBPM a dosis profilácticas de alto riesgo durante la gestación y el puerperio.
3. Mujeres sin trombofilia conocida y antecedentes de complicaciones obstétricas. Valorar la profilaxis con HBPM a dosis de alto riesgo; y en caso de pérdidas fetales, valorar añadir AAS durante la gestación.

## Gestación y enfermedad tromboembólica arterial (accidente cerebrovascular isquémico)

En un estudio en el que se incluyeron 1.408.015 partos, se observó que el riesgo de presentar accidente cerebrovascular isquémico (ACV)/100.000 partos era de 13,1 (IC 95%: 11,2-15,0), y existe un alto riesgo de recidiva. La asociación a trombofilia también aumenta el riesgo de tromboembolismo arterial. En caso de ACV relacionado con embarazos previos con o sin trombofilia conocida, en principio se recomienda profilaxis con AAS, y valorar, según casos y gra-

vedad y/o recurrencias de ETE arterial, la posibilidad de trombofilaxia con HBPM. En mujeres con ACV no relacionados con gestación sin trombofilia conocida, valorar AAS; y si factores de riesgo cardiovascular, como historia familiar o HTA, etc., valorar HBPM a dosis profilácticas de alto riesgo<sup>17</sup>.

## Bibliografía

- Helt J, Kobbervig CE, James AH, Petterson TM, Bailey KR, Melton LJ. Trends in the incidence of venous thromboembolism during pregnancy or postpartum: A 30-year population-based study. *Ann Intern Med* 2005; 143: 697-706.
- Blanco-Molina A, Trujillo-Santos J, Criado J, López L, Lecumberri R, Gutiérrez R, Monreal M, for the RIETE Investigators. Venous thromboembolism during pregnancy or postpartum: findings from the RIETE Registry. *Thromb Haemost* 2007; 97: 186-90.
- Wu O, Robertson L, Twaddle S, Lowe GDO, Clark P, Greaves M, Walker ID, Langhorne P, Brenkel I, Regan L, Greer IA. Screening for thrombophilia in high-risk situations: systematic review and cost-effectiveness analysis. The thrombosis: risk and economic assessment of thrombophilia screening (TREATS study). *Health Technol Assess* 2006; 10 (11): 1-100.
- Marik PE, Plante LA. Venous thromboembolic disease and pregnancy. *N Engl J Med* 2008; 359: 2025-33.
- Chunila SD, Bates SM. Venous thromboembolism in pregnancy: diagnosis, management and prevention. *Thromb Haemost* 2009; 101: 428-38.
- Bates SM, Greer IA, Pabinger I, Sofaer S, Hirsh J; American College of Chest Physicians. Venous thromboembolism, thrombophilia, antithrombotic therapy, and pregnancy: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (8<sup>th</sup> edition). *Chest* 2008; 133 (6 Suppl): 844S-886S.
- Gerhardt A, Scharf RE, Beckman MW, et al. Prothrombin and factor V mutations in women with thrombosis during pregnancy and the puerperium. *N Engl J Med* 2000; 342: 374-80.
- Clark P, Bates SM. North American and British guidelines for antithrombotic therapy: are we reaching consensus? *Thrombosis Research* 2009; 123 (Suppl 2): S111-S123.
- Kupfermanc MJ, Eldor A, Steinman N, Many A, Bar-Am A, Jaffa A, Fait G, Lessing JB. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med* 1999; 340: 9-13.
- Middeldorp S. Thrombophilia and pregnancy complications: cause or association? *J Thromb Haemost* 2007; 5: 276-82.
- Rodger MA. Thrombophilia and placenta-mediated pregnancy complications: from the bench to bedside to policy. *Thrombosis Research* 2009; 123 (Suppl 2): S100-S104.
- Aharon A, Brenner B. Microparticles and placental hemostasis. *Thrombosis Research* 2009; 123 (Suppl 2): S88-S92.
- Brenner B, Hoffman R, Blumenfeld Z, Weiner Z, Younis JS. Gestational outcome in thrombophilic women with recurrent pregnancy loss treated with enoxaparin. *Thromb Haemost* 2000; 83: 693-7.
- Rey E, Garneau P, David M, Gauthier R, Leduc L, Michon N, Morin F, Demers C, Kahn R, Magee LA, Rodger M. Dalteparin for the prevention of recurrence of placental-mediated complications of pregnancy in women without thrombophilia: a pilot randomized controlled trial. *J Thromb Haemost* 2008; 7: 58-64.
- Franchini M. Haemostasis and pregnancy. *Thromb Haemost* 2006; 95: 401-13.
- Roberts DJ. Placental pathology, a survival guide. *Arch Pathol Lab Med* 2008; 132: 641-51.
- Tirado I, Soria JM, Mateo J, Oliver A, Souto JC, Santamaria A, Felices R, Borrell M, Fontcuberta J. Association after linkage analysis indicates that homozygosity for the 46C>T polymorphism in the F12 gene is a genetic risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost* 2004; 91 (5): 899-904.
- Feske SK. Stroke in pregnancy. *Semin Neurol* 2007; 27 (5): 442-52.



# Citopenias autoinmunes corticorresistentes

J.R. CABRERA MARÍN

Servicio de Hematología. Hospital Universitario Puerta de Hierro. Majadahonda (Madrid)

## Púrpura trombocitopénica autoinmune

Se trata de un trastorno autoinmune adquirido, caracterizado por trombopenia aislada.

Es relativamente frecuente. En los niños, la prevalencia es de 5,8/100.000, siendo más frecuente entre los 2 y los 4 años. En los adultos, la incidencia anual es de 1,6-3,2/100.000. No se conoce con claridad el evento iniciador que precipita la trombopenia, pero podría ser de naturaleza infecciosa. Se han detectado anticuerpos (Ac) dirigidos contra glicoproteínas plaquetarias en el 50-70% de los casos. Las plaquetas son opsonizadas por los Ac y aclaradas por las células del SMF (principalmente del bazo), que tienen receptores Fc. La ausencia de auto-Ac en el 30-40% de los casos sugiere la existencia de un mecanismo adicional. La citotoxicidad directa contra las plaquetas y megacariocitos, mediada por las células T, puede ser el mecanismo primario de la trombopenia en una proporción de pacientes.

Además, existe evidencia de que en la púrpura trombocitopénica idiopática (PTI) la producción plaquetaria está disminuida por el daño a los megacariocitos mediado por la citotoxicidad de los anticuerpos o por citoquinas, que producirían un trastorno en su maduración y en la trombopoyesis. Los niveles de trombopoyetina (TPO) no están elevados como cabría esperar, en contraste a lo que ocurre en la aplasia medular, por ejemplo, en donde los niveles de TPO están claramente elevados. Hay, por tanto, destrucción plaquetaria aumentada y producción disminuida.

### Tratamiento inicial en los niños

Como en los niños es esperable una recuperación espontánea, algunos consideran suficiente el tratamiento de soporte, más que tratamiento farmacológico específico. Otros, sin embargo, consideran que el tratamiento inicial debe hacerse con **glucocorticoides, inmunoglobulina i.v. o inmunoglobulina anti-D** (ésta última en niños Rh positivos). Estos tratamientos aceleran la recuperación del conteo plaquetario, pero pueden causar efectos secundarios. La recuperación de la cifra de plaquetas suele ocurrir en unas semanas en el 80% de los casos. Las hemorragias graves son poco frecuentes. La **esplenectomía** es una opción de tratamiento eficaz en

niños con trombopenia grave sintomática (respuesta en dos tercios de los casos). El riesgo de sepsis tras la esplenectomía es mayor en los niños pequeños, por lo que ésta debe retrasarse, si es posible, hasta la edad de 5 años. Vacunar antes frente a *Streptococcus pneumoniae*, meningococo y *Haemophilus influenzae*. Además, administrar penicilina profiláctica hasta la edad adulta.

### Tratamiento inicial en los adultos

Los **corticoides** son el tratamiento estándar en los adultos con PTI de nuevo diagnóstico. Los pacientes asintomáticos con trombopenia moderada no requieren tratamiento. Por lo tanto, la primera decisión importante es saber qué pacientes deben tratarse y cuáles observarse. Con  $> 30 \times 10^9/L$  plaquetas no es necesario tratar, excepto si van a ser sometidos a un procedimiento invasivo. Debe iniciarse tratamiento con prednisona (o Ig i.v. o Ig anti-D) si plaquetas  $< 20 \times 10^9/L$  con sangrado mucoso o si plaquetas  $< 10 \times 10^9/L$  sin sangrado mucoso.

El tratamiento aumenta la cifra de plaquetas en la mayoría de los pacientes, pero ésta desciende nuevamente cuando se baja la dosis de prednisona o se suspende. No hay una opinión unánime del tiempo que debe continuarse con prednisona antes de considerar tratamiento de segunda línea. La trombopenia persistente o recurrente, grave y sintomática de 4-6 semanas de duración es indicación de tratamiento de segunda línea (esplenectomía, etc.).

### Fármacos empleados en primera línea

- **Corticoides.** *Prednisona* es el tratamiento estándar inicial, en dosis de 1-2 mg/kg de 2 a 4 semanas, con disminución de la dosis si hay respuesta. Con este tratamiento se obtiene respuesta en 60-70% de los adultos, de los que sólo un 10-20% la mantienen. En los niños hay un 80% de respuestas mantenidas a largo plazo. **Dexametasona** en dosis de 40 mg/d  $\times$  4 días cada 15 días (4 ciclos) produce respuesta en el 85% y respuesta mantenida en el 74%, y con buena tolerancia. Este tratamiento parece más efectivo que la prednisona (Mazzucconi, 2007), sin bien no hay estudios comparativos.



- **Inmunoglobulina intravenosa:** el fragmento Fc de la Ig se une al receptor FcγR de los macrófagos, impidiendo la destrucción plaquetaria. Se utiliza en dosis total de 1-2 g administrada en 1-5 días. En los niños, la Ig i.v. produce un aumento más rápido de la cifra de plaquetas que los corticoides. Tres cuartas partes de los pacientes responden. Funciona mejor en pacientes no esplenectomizados. Alternativamente puede emplearse **Ig anti-D** i.v. en dosis de 50-75 μL/kg. Sólo es útil en pacientes Rh positivos; reduce la hemoglobina (hemólisis) de 0,5-2 g/dL.

### Tratamiento de segunda línea

La **esplenectomía** produce remisión mantenida en dos terceras partes de los pacientes. Las recomendaciones de vacunación son las mismas que en los niños, pero no es necesario administrar penicilina profiláctica. El bazo juega un papel importante en la eliminación de las plaquetas y, hasta la fecha, la esplenectomía es considerada todavía el “estándar de oro” en pacientes con PTI crónica refractaria, con plaquetas  $< 30 \times 10^9/L$ , especialmente si hay complicaciones hemorrágicas (Guidelines ITP, 2003).

En los pacientes refractarios a la esplenectomía o que recaen tras la misma hay que descartar la existencia de un bazo accesorio. Últimamente se está cuestionando si la esplenectomía debe seguir siendo el tratamiento de segunda línea porque, aunque produce mayor número de respuestas a corto plazo, el riesgo de recaídas tardías no está bien establecido (Schwartz, 2003), hay complicaciones derivadas de la cirugía (Rodeghiero, 2008) y existe riesgo a largo plazo de sepsis no predecible. Por estas razones, un tratamiento alternativo a la esplenectomía eficaz y seguro, que induzca una remisión a largo plazo, sería bienvenido.

### Tratamiento con inmunosupresores

Forman parte del tratamiento clásico de la PTI refractaria grave y sintomática. Los agentes más empleados son: ciclofosfamida, azatioprina, vincristina, mico-fenolato mofetilo y ciclosporina, que pueden usarse como agentes únicos o en combinación. Los efectos secundarios incluyen nefrotoxicidad, infección y tumores secundarios, lo que limita su uso por periodos de tiempo prolongados. Sólo una minoría de pacientes responden a ellos.

En los pacientes con **PTI refractaria**, el consejo más acertado es intentar mantener la cifra de plaquetas en un nivel de seguridad de  $10-20 \times 10^9/L$  con el menor tratamiento posible. Es muy importante que la morbilidad del tratamiento no exceda a la morbi-

lidad del riesgo de sangrado. Muchos pacientes tienen una vida activa con contajes plaquetarios de  $< 20 \times 10^9/L$ .

### Otros tratamientos en fase de estudio

El tratamiento tradicional de la PTI se ha centrado en la inhibición de la destrucción plaquetaria por el sistema mononuclear fagocítico. El mayor conocimiento de la patogenia de la enfermedad ha permitido iniciar el desarrollo de nuevos tratamientos (Andemariam, 2007; Psaila, 2007), como son: **anti-CD20**, un Ac monoclonal humanizado que depleciona de células B y, por lo tanto, impide la producción de Ac antiplaquetarios. **Agentes trombopoyéticos** como AMG531, eltrombopag y AKR501, que aumentan la producción plaquetaria promoviendo la trombopoyesis. **Inhibidores más específicos de la destrucción plaquetaria** con diana en los receptores FcγRs, como los Ac monoclonales anti-FcγR (GMA 161) y las moléculas que impiden la señal mediada por dichos receptores como el R788, inhibidor de la Syk quinasa.

### Anti-CD20 en la PTI refractaria

Anticuerpo monoclonal, quimérico, humanizado, dirigido contra los determinantes CD20 de las células B, por lo que causa una depleción transitoria de éstas, interfiriendo con la producción de auto-Ac. Bien tolerado, no causa complicaciones infecciosas a pesar de la linfopenia que provoca. Su mecanismo de acción en la PTI no está bien definido. Los pacientes que responden, en general, lo empiezan a hacer rápidamente (incluso después de la primera o segunda dosis). Las células B CD20+ opsonizadas por el anti-CD20 saturan el receptor Fc de los macrófagos del SMF, actuando de manera similar a como lo hace la Ig i.v. La eliminación de las células B autorreactivas puede ser responsable de la remisión mantenida.

Arnold (2007), en su revisión de 313 pacientes, encontró una respuesta global del 62% y una tasa de recaída del 10% (mediana de seguimiento de 10,5 meses [2-48]). Otros estudios recientes han reportado respuestas mantenidas en 35-67% con medianas de seguimiento de 9-54 meses (Peñalver, 2006).

- **Estudio retrospectivo multicéntrico** (Peñalver, 2006). Datos obtenidos mediante un cuestionario en 43 centros españoles a 89 pacientes con PTI crónica, grave y refractaria a más de 2 líneas de tratamiento. Los pacientes habían recibido numerosos tratamientos previos (5 [2-13]), incluyendo corticoides en un 98% y esplenectomía en un 53%. Se obtuvo respuesta global (RG) al anti-CD-20 en el

55%, con respuesta completa (RC) en el 46%. La mayoría de los pacientes (40%) respondieron en la primera semana de tratamiento con anti-CD20, y el 87% de los que respondieron lo hicieron en las 5 primeras semanas. Las plaquetas aumentaron rápidamente tras la administración del anti-CD20, de una cifra media de  $10-86 \times 10^9/L$  en la respuesta inicial y en la máxima respuesta a  $177 \times 10^9/L$ . Como ya se ha dicho, un 55% de los pacientes respondieron y 63% de ellos la mantuvieron durante el seguimiento del estudio (mediana 9 meses [2-42]). Es decir, un 35% del total de los pacientes mantuvieron la respuesta. Los pacientes no esplenectomizados tuvieron mejor porcentaje de respuestas iniciales ( $p = 0,029$ ), pero no hubo diferencias en las respuestas mantenidas en los 2 grupos ( $p = 0,815$ ).

### Anti-CD20 en la PTI refractaria: otras cuestiones

En el estudio multicéntrico español (Peñalver, 2006), el único factor predictor de respuesta fue alcanzar respuesta completa. Se ha sugerido que los pacientes jóvenes y las mujeres responden mejor (Arnold, 2006). Se consigue mejor respuesta con la administración precoz de anti-CD20, es decir, antes de que se hayan administrado muchos tratamientos (Zaja, 2006). Una respuesta plaquetaria rápida se ha relacionado con mejor resultado a largo plazo (Godeau, 2008). En general, la administración de anti-CD20 es segura (Peñalver, 2006) y las infecciones son raras si los pacientes no han recibido muchos tratamientos anteriormente (Godeau, 2008). Si, por el contrario, se trata de pacientes gravemente inmunocomprometidos, pueden surgir graves infecciones (Calabrese, 2007).

Hay varias preguntas respecto al anti CD-20 que se plantean a continuación: ¿cuál es la dosis adecuada?; ¿puede sustituir a la esplenectomía?; ¿puede predecirse la respuesta?

### ¿Cuál es la dosis adecuada en la PTI?

No establecida; se ha copiado la dosis utilizada en los linfomas. En el estudio multicéntrico español (Peñalver, 2006), 12 pacientes recibieron entre 1 y 6 dosis sin que hubiera diferencia aparente en las respuestas. El 40% de los que respondieron lo hicieron con la primera dosis. En un estudio pediátrico multicéntrico alemán (Taube, 2005), en los niños con PTI crónica tratados con una sola dosis se obtuvo igual porcentaje de respuestas y de respuestas mantenidas que con 4 dosis en otras publicaciones en adultos y niños. En esta serie ninguno de los pacientes esplenectomizados (3/22) respondió con una dosis. En la publicación de Provan (2007) se utilizan dosis de 100 mg/

semana  $\times$  4 semanas: respuestas completas mantenidas en 4/7 casos (57%), igual porcentaje de respuestas que con dosis de 375 mg/m<sup>2</sup>/semana  $\times$  4; teóricamente 100 mg causan menos efectos secundarios y menor coste. Resumen: ¿una dosis es tan eficaz como cuatro? ¿100 mg son tan eficaces como 375 mg/m<sup>2</sup>? Son pocos casos para sacar conclusiones.

### Esplenectomía y anti-CD20: pros y contras

- **Esplenectomía.** Normaliza las plaquetas en dos tercios de los pacientes. *Inconvenientes:* no hay métodos fidedignos que predigan la respuesta; elimina un órgano sano; complicaciones quirúrgicas. En un estudio que analiza 4.955 pacientes esplenectomizados (Kojouri 2004): la mortalidad por laparotomía fue del 1% y por laparoscopia del 0,2% (por sangrado, infección, tromboembolismo); la morbilidad por laparotomía fue del 12,9% y por laparoscopia del 9,6% (hospitalización prolongada, reintegro, reintervención, etc.). Mayor riesgo en ancianos, obesos y con presencia de comorbilidades.
- **Anti-CD20.** Normaliza las plaquetas en un tercio de los pacientes de manera mantenida. *Inconvenientes:* no sabemos cuánto dura la respuesta. *Efectos adversos:* bien tolerado en general, pero los efectos secundarios a largo plazo no son bien conocidos. Graves complicaciones infecciosas poco frecuentes en pacientes muy tratados anteriormente (seroconversión inversa de hepatitis B y casos aislados de leucoencefalopatía multifocal progresiva con resultado de muerte en colagenopatías) (Calabrese, 2007).
- **Entonces, ¿anti-CD20 o esplenectomía?** Se ha publicado recientemente un estudio prospectivo, multicéntrico, de un solo brazo (Godeau, 2008), para valorar la seguridad y la eficacia del anti-CD20 en adultos con PTI crónica de más de 6 meses de evolución, candidatos a esplenectomía, a los 1 y 2 años de su administración. Sesenta pacientes con  $< 30 \times 10^9/L$  plaquetas recibieron 4 dosis, suspendiendo todos los demás tratamientos para la PTI. Al año del tratamiento había buena respuesta en el 40%, y a los 2 años en el 33%. Además, un 7% mantuvieron las plaquetas  $> 30 \times 10^9/L$  sin tratamiento. Es decir, un 40% no necesitaban tratamiento a los 2 años. Treinta y seis no respondieron, de los que fueron esplenectomizados 25. Sólo hubo efectos secundarios de poca importancia. Basados en estos resultados, los autores consideran que el tratamiento es aparentemente seguro y eficaz, y constituye una opción para evitar la esplenectomía en algunos adultos con PTI crónica. Otros autores (Cooper, 2007) consideran que sólo debe usarse antes de la esplenectomía en aquellos casos

en los que el paciente rechace la cirugía o haya riesgo quirúrgico.

- **¿Se puede predecir la respuesta?** El anti-CD20 (IgG1) produce lisis de las células B por citotoxicidad mediada por Ac, cosa que requiere que su Fc se una al receptor FcγR de las células citotóxicas (células NK y macrófagos), desencadenándose la activación celular. El gen FCGR3A codifica al receptor FcγRIIIa (CD16) y tiene 2 alotipos respecto a su posición 158: valina o fenilalanina. El gen FCGR2A codifica al receptor FcγRIIa y tiene 2 alotipos respecto a su posición 133: histidina (H) o arginina (R). Hemos relacionado el polimorfismo del gen FCGR3A 158 V/F y el del gen FCGR2A 131 H/R con la respuesta al tratamiento con anti-CD20 en 45 pacientes con PTI crónica, concluyendo que no hay influencia de los polimorfismos del gen FCGR3A 158 V/F en la respuesta. La ausencia del alotipo 131 H en el gen FCGR2A se asocia a peor pronóstico (Peñalver, 2007). Este estudio tendría un valor teórico para indicar la esplenectomía antes de tratamiento con anti-CD20 o para considerar mayores dosis de las habituales de anti-CD20.
- **Inhibidores específicos de la destrucción por fagocitosis** (Martin, 2008). La trombopenia en la PTI se produce, al menos en parte, por la interacción entre la superficie plaquetaria con el anticuerpo y el receptor FcγRIII de los macrófagos. Anticuerpos monoclonales específicos anti-FcγRIII se han considerado como tratamiento potencial para evitar la destrucción plaquetaria. El Ac humanizado GMA-161 se ha desarrollado y empleado en dosis bajas en 4 adultos con PTI crónica. En estos estudios iniciales la respuesta fue bastante corta. También se encuentran en ensayos iniciales los inhibidores de la Syk quinasa (R788), que bloquearían la señal mediada por los receptores FcγR; presentan unos primeros resultados prometedores. Además de lo anterior, se están desarrollando Ac anti-CD20 modificados (GA101) que presentan mayor afinidad y mayor potencia de citotoxicidad medida por anticuerpos.

### **Anemias hemolíticas autoinmunes por anticuerpos calientes y fríos**

La **anemia hemolítica autoinmune por anticuerpos calientes** (AHAI-AC) representa el 50-70% de todas las AHAI. Está mediada por anticuerpos de clase IgG cuya unión óptima a los hematíes ocurre a 37 °C. Los hematíes recubiertos de IgG son reconocidos por los macrófagos del bazo, produciendo pérdida de su membrana, siendo así atrapados por los sinusoides esplénicos y eliminados de la circulación.

La primera línea de tratamiento de la AHAI-AC consiste en la administración de prednisona en dosis de 1-1,5 mg/kg/día durante 1-3 semanas, hasta conseguir la remisión de la anemia; luego deberá continuarse con esta dosis durante 1-2 semanas adicionales antes de iniciar su descenso, que se hará a razón de 10 mg/semana hasta alcanzar la dosis de 20 mg/día. La reducción siguiente deberá hacerse más despacio con un régimen a días alternos.

Aproximadamente dos terceras partes de los pacientes adultos responden al tratamiento esteroideo, aunque sólo con un 20% de respuestas completas mantenidas. La mayoría de los pacientes necesitan tratamiento de mantenimiento.

Los pulsos de altas dosis de esteroides son efectivos en algunos pacientes en los que falla el tratamiento a dosis estándar.

Para aquellos pacientes con respuesta inadecuada a los esteroides, se puede plantear la esplenectomía, que produce una tasa de respuestas aproximada de un 50%. La esplenectomía debe considerarse si tras 2-3 semanas de prednisona continúa una hemólisis grave, si la remisión no se puede alcanzar con dosis bajas de esteroides o si el paciente tiene efectos adversos importantes a ellos.

Aquellos pacientes que recaen tras tratamiento esteroideo o tras esplenectomía pueden ser tratados con inmunosupresores (ciclofosfamida, azatioprina, etc.). El danazol y la inmunoglobulina i.v. inespecífica son menos eficaces que en la PTI. La ciclosporina A puede ser también eficaz en algunos casos refractarios.

La ciclofosfamida, azatioprina o ciclosporina A producen un 40% de respuestas, pero son de tener en cuenta los efectos secundarios de estos fármacos. La plasmaféresis puede ser útil en casos puntuales.

La **anemia hemolítica autoinmune por anticuerpos fríos** (AHAI-AF) representa el 16-32% de todas las AHAI. Aproximadamente el 90% de ellas están mediadas por anticuerpos de clase IgM que reaccionan mejor a temperaturas inferiores a 37 °C, uniéndose a los hematíes y fijando complemento en su superficie. Estos hematíes son eliminados de la sangre, principalmente por los macrófagos del hígado o por lisis intravascular mediada por complemento.

La enfermedad de las aglutininas frías generalmente no responde a los esteroides, mientras que la ciclofosfamida y el clorambucil son útiles, especialmente cuando la anemia está asociada a enfermedad linfoproliferativa. La esplenectomía tampoco es útil, ya que los hematíes son eliminados principalmente en el hígado. La plasmaféresis puede ser transitoriamente eficaz en situaciones agudas, pero su realización puede plantear dificultades por problemas técnicos derivados de la amplitud térmica del anticuerpo, y además no tiene efecto en la enfermedad subyacente.

Estudios que incluyen series de 5 o más pacientes adultos con AHAI-AC refractaria tratados con anti-CD20 (Garvey, 2008) revelan un porcentaje de respuestas globales (RG) del 60-100% y de respuestas completas (RC) del 40%. Además, muchas de estas respuestas son duraderas. En la AHAI-AF, produce RG del 60% con RC del 10%, que también son duraderas. En la serie de Arriaga F *et al.* (Arriaga, 2006) se comunicaron unos resultados excelentes utilizando anti-CD20 en monoterapia (RG 62%, RC 56%, con una duración media de la respuesta de 24 meses).

La combinación anti-CD20, ciclofosfamida y dexametasona resultó muy eficaz en el tratamiento de las AHAI asociadas a LLC y SLP de bajo grado (muy tratadas) con tasas de RC del 100%.

Se realizó un estudio retrospectivo multicéntrico con datos obtenidos mediante cuestionario en 36 casos de 21 centros españoles (Peñalver, pendiente de publicación), con pacientes de edades de entre 20 y 86 años, diagnosticados de AHAI refractaria a varias líneas de tratamiento (mediana 4). El 75% eran AHAI-AC y el 25% AHAI-AF. De ellos, un 42% tenían AHAI idiopática, 44% asociada a SLPC y 6% asociada a trastornos autoinmunes. Fueron tratados con anti-CD20 a dosis habituales y se valoró la respuesta. Se definió como RC una Hb > 12 g/dL o el aumento estable de la Hb > 2 g/dL; y como RP una Hb > 10 g/dL o aumento estable de Hb 1,5-2 g/dL. Alcanzaron RC el 75% y RP el 2,8%. La mayoría de los pacientes respondieron en las 3 primeras semanas. La cifra de Hb ascendió desde una media de 7,1 g/dL a 12,3 g/dL en la máxima respuesta. El 64% del total de pacientes mantuvieron la respuesta. En análisis de Kaplan-Meier, la respuesta mantenida (RM) estimada fue de 58,3 meses.

No hubo diferencia en el porcentaje de respuestas, RM ni duración de la respuesta entre AHAI-AC y AHAI-AF. Los únicos factores que se relacionaron con obtener RM fueron alcanzar RC y negatividad de la prueba de Coombs. En los pacientes esplenectomizados (AHAI-AC), la RC fue del 100%. Los pacientes muy tratados (>4 líneas) no presentaron diferencias significativas en el porcentaje de respuestas con relación a los que habían recibido menos líneas de tratamiento.

Se observó una excelente respuesta a la combinación anti-CD20, ciclofosfamida y dexametasona.

El tratamiento fue generalmente bien tolerado. No se comunicaron complicaciones infecciosas.

Tanto la esplenectomía como el tratamiento con anti-CD20 tienen aspectos negativos y positivos que deben ser valorados en cada caso antes de su indicación. La esplenectomía produce un 66% de respuestas duraderas en AHAI-AC, pero con ella se elimina

un órgano sano, no hay posibilidad de retratamiento y hay complicaciones quirúrgicas que ya han sido referidas más arriba (Kojouri, 2004). El anti-CD20 produce un 65% de RM, con una mediana de seguimiento de 18 meses (1-86) (estudio multicéntrico español), pero no está determinada con exactitud la duración de la respuesta; además, hay efectos secundarios, que están descritos más arriba.

En resumen podemos concluir: 1) El tratamiento inicial de la AHAI-AC debe hacerse con corticoides, con lo que se obtendrá un 20% de respuestas completas mantenidas. 2) En los casos de respuesta inadecuada se planteará como segunda línea de tratamiento anti-CD20, que produce respuestas mantenidas prolongadas hasta en el 65% de pacientes refractarios (incluyendo pacientes multitratados). 3) En las AHAI-AF, el anti-CD20 produce respuestas no logradas hasta ahora con otros tratamientos, tanto en pacientes no tratados como en refractarios. 4) La combinación anti-CD20/ciclofosfamida/dexametasona es el tratamiento de elección de la AHAI asociada a SLP. 5) El anti-CD20 es útil en retratamiento. 6) El anti-CD20, en general, ha sido bien tolerado.

## Bibliografía

- Andemariam B, et al. *Ann Intern Med* 2007; 427: 431-14.  
 Arnold DM, et al. *Ann Intern Med* 2007; 146: 25-33.  
 Arriaga F, et al. *Blood* 2006; 108: abstract 965.  
*Brit J Haematol* 2003; 574: 596-120.  
 Bussel JB, et al. *N Engl J Med* 2006; 355: 1672-81.  
 Calabrese LH, et al. *Arthritis & Rheumatism* 2007; 2116: 218-7.  
 Cines DB, et al. *Medical Progress* 2002: 346-13.  
 Cooper N, et al. *Current Opinion in Hematology* 2007; 642: 646-14.  
 Dunleavy K, et al. *Blood* 2005; 106: 795-802.  
 Garvey B. *Br J Haematol* 2008; 141: 149-69.  
 Godeau B, et al. *Blood* 2008; 112: 999-1004.  
 Kojouri K, et al. *Blood* 2004; 104: 2623-34.  
 Kuter D. *Blood* 2007; 109: 4607-17.  
 Martin P, et al. *Sem Hematol* 2008; 45: 126-32.  
 Mazzucconi MG, et al. *Blood* 2007; 109: 1401-7.  
 Niscola P, et al. *Leukemia* 2005; 19: 1840-418.  
 Peñalver FJ, et al. Pendiente de publicación.  
 Peñalver FJ, et al. *Ann Hematol* 2006; 85: 400-6.  
 Peñalver FJ, et al. *Blood (ASH Annual Meeting Abstract)* 2007; 110: abstract 2097.  
 Provan D, et al. *Haematologica* 2007; 92: 1695-8.  
 Peñalver FJ, et al.; on behalf of the multi-institucional retrospective study on the use of rituximab in refractory AIHA. Pendiente de publicación.  
 Psaila B, et al. *Hematol Oncol Clin N* 2007; 21: 743-59.  
 Hariris HE. *Rheumatology* 2008; 47 (2): 224-5.  
 Rodeghiero F, et al. *Am J Hematology* 2008; 83: 91.  
 Schwartz J, et al. *Am J Hematol* 2003; 72: 94-8.  
 Stasi R, et al. *Thromb Haemost* 2008; 4: 13-99.  
 Taube T, et al. *Haematologica* 2005; 281: 283-90.  
 Zaja F. *Experimental Hematology* 2006; 34: 571-2.



# Tratamiento de la leucemia aguda linfoblástica del adulto

J.M. RIBERA, A. ORIOL, J.M. SANCHO, M. MORGANES, O. GARCÍA, C. FERRÀ, B. XICOY, M. BATLLE, A. FLORES, S. VIVES, M.J. JIMÉNEZ, J. JUNCÀ, I. GRANADA, L. ZAMORA, F. MILLÀ, E. FELIU  
*Servicio de Hematología Clínica. Institut Català d'Oncologia. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Badalona. Universidad Autónoma de Barcelona.*

## Introducción

La leucemia aguda linfoblástica (LAL) es la hemopatía maligna más prevalente en la infancia, donde se diagnostican el 60-70% de casos<sup>1,2</sup>. La incidencia de LAL aumenta rápidamente después de los 2 años de edad y alcanza su máximo entre los 4 y 5 años. Durante la adolescencia y edad adulta la tasa disminuye, hasta los 40 años, momento en el cual se observa un ligero y gradual aumento en su incidencia. La LAL representa el 15-20% de las leucemias agudas de los adultos<sup>3</sup>. Los resultados del tratamiento en niños con LAL han mejorado en las últimas décadas, con tasas de curación del 80% en la actualidad<sup>4</sup>. Por el contrario, la tasa de curación en adultos es de sólo un 35-40%<sup>5</sup>, y ha mejorado muy ligeramente en los últimos 20 años<sup>6</sup>.

## Clasificación de la leucemia aguda linfoblástica

El estudio de la LAL debe comenzar con el examen morfológico, si bien la clasificación FAB ha caído en desuso. El estudio inmunofenotípico es esencial para diagnosticar la LAL y adscribirla a una línea determinada. La mayoría de los casos de LAL son de precursores B, mientras que aproximadamente el 20-25% son de origen T<sup>8</sup>. Entre las LAL-B, el fenotipo más frecuente es el común y la mitad de estos pacientes expresan el antígeno CD20. Además de la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT), las LAL-T expresan los marcadores CD2, CD3, CD5, CD7 y CD8, de los que el más importante es el CD3, que se expresa inicialmente en el citoplasma, y más tarde en la membrana. El CD34 se expresa normalmente en las formas menos maduras de LAL. Los marcadores mieloides, CD13 y CD33 sobre todo, pueden expresarse de forma aberrante en el 20-30% de los adultos con LAL. En cambio, son muy infrecuentes las leucemias auténticamente bifenotípicas<sup>8</sup>.

## Factores pronósticos en la leucemia aguda linfoblástica del adulto

El pronóstico de los adultos con LAL empeora con la edad y la cifra de leucocitos en el momento del

diagnóstico. Los pacientes adultos con un mejor pronóstico son los menores de 30-35 años de edad con leucocitos  $< 30 \times 10^9/L$  en las LAL de precursores B o  $< 100 \times 10^9/L$  para las LAL-T. Las anomalías cromosómicas son uno de los factores más importantes para determinar el pronóstico en los adultos con LAL. Los reordenamientos asociados a buen pronóstico en las LAL (t[12;21] TEL/AML1, hiperdiploidía  $> 46$  cromosomas) son infrecuentes en el adulto<sup>11</sup>. Por el contrario, la aberración citogenética más común en adultos con LAL es la t(9;22) (33%), asociada típicamente a LAL común o pre-B temprana<sup>9</sup>. Su pronóstico era muy desfavorable hasta la introducción de los inhibidores de la tirosinasa de ABL, como el mesilato de imatinib en combinación con quimioterapia, con los que ha logrado una mejoría en el pronóstico en comparación con controles históricos (ver más adelante). Igualmente, los pacientes con t(8;14), t(8;22) o t(2;8)<sup>10</sup>, características de LAL de fenotipo B maduro y reordenamientos de C-MYC, han dejado de considerarse como LAL de mal pronóstico con la aplicación de inmunoterapia específica (ver más adelante). Otra anomalía cromosómica asociada con mal pronóstico es la t(4;11), que produce el reordenamiento MLL-AF4 y se encuentra en aproximadamente el 6% de adultos con LAL<sup>11</sup>. Estos pacientes suelen presentar hiperleucocitosis y fenotipo pro-B, con frecuente expresión de marcadores mieloides. Los pacientes con un cariotipo complejo tienen peor pronóstico en algunos estudios<sup>12</sup>. El significado pronóstico desfavorable de la t(1;19) está cuestionado. Por el contrario, la del(9p) está asociada a buen pronóstico.

Otro factor pronóstico adicional de primer orden es la rapidez de la respuesta al tratamiento de inducción. Ésta se define de alguna de las siguientes formas: existencia de menos de  $1 \times 10^9$  blastos/L en sangre periférica tras una semana de tratamiento con glucocorticoides, desaparición de blastos en sangre periférica el día 8 del tratamiento de inducción, menos de un 5% de blastos en médula ósea el día 14, evidencia de remisión completa (RC) a las 4-5 semanas del tratamiento y, por último, la presencia de enfermedad residual (ER) al final de la inducción y al final de la consolidación (ver más adelante), que motivarán que algunos pacientes considerados inicialmente como de riesgo estándar (RE) pasen a considerarse como de alto riesgo (AR).



Por último, algunos estudios han señalado un peor pronóstico para las LAL pro-B, para las LAL pro-T y T maduras<sup>13</sup>, y también para las LAL-T que presentan el reordenamiento HOX11L2 (TLX3)<sup>13</sup>. Por el contrario, las LAL-T con sobreexpresión de HOX11 (TLX1)<sup>14</sup>, y las que presentan la mutación NOTCH1/FBXW7 presentan un pronóstico más favorable<sup>15</sup>.

### Enfermedad residual en la LAL

Existen tres técnicas para la detección de la ER en la LAL. La primera es la reacción en cadena de polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real, aplicable únicamente a pacientes con reordenamientos específicos. La segunda es la citometría de flujo multiparamétrica, que con la tecnología actual es aplicable a la práctica totalidad de casos de LAL y su nivel de sensibilidad es de 10<sup>-4</sup> o 10<sup>-5</sup>. La tercera es la detección de reordenamientos del gen de las Ig o del receptor T, que proporciona niveles de sensibilidad de 10<sup>-5</sup> o 10<sup>-6</sup> y también es ampliamente aplicable.

La detección de ER al final de la inducción y en diferentes momentos a lo largo del tratamiento post-remisión es muy útil para determinar el pronóstico en la LAL infantil. Los datos en LAL del adulto son más limitados. En un estudio del grupo GMALL se evaluó el significado clínico de la cuantificación de la ERM en adultos con LAL de riesgo estándar (definida por criterios convencionales)<sup>16</sup>. La frecuencia de positividad de ER fue del 88% durante la inducción y del 13% en la semana 52. El 10% de los pacientes logró una rápida disminución de ER (inferior a 10<sup>-4</sup>) entre los días 11 y 24, y ello comportó un pronóstico excelente. Por el contrario, la persistencia de ER detectable (superior a 10<sup>-4</sup>) al final de la consolidación comporta un mal pronóstico<sup>17</sup>. Por otra parte, se ha constado que la cantidad de ER antes del alo-TPH tiene un valor pronóstico en la LAL del adulto. En pacientes con LAL Ph+ la detección de niveles elevados de reordenamiento *BCR-ABL* antes del TPH se asocia a mal pronóstico<sup>18</sup>, y también es probable que la intensidad de reducción del número de transcritos *BCR-ABL* al final de la inducción tenga valor pronóstico favorable<sup>19</sup>.

Por todo ello, parece claro que la ER también constituye un factor pronóstico de primer orden en los pacientes adultos con LAL, aunque el nivel de corte y los momentos óptimos de su detección están menos sistematizados que en la LAL infantil.

La detección de ER en pacientes en RC comporta invariablemente una recidiva en un plazo variable, en general entre 1 y 5 meses, lo que ofrece una oportunidad para administrar tratamiento antes de que se detecte una recaída a nivel clínico<sup>20</sup>. Con todo, la frecuencia de monitorización de la ER no está estableci-

da en la LAL del adulto y es probable que deba adecuarse a cada subtipo clinicobiológico.

### Plan general del tratamiento

El tratamiento de LAL es un proceso complejo que comprende diversas partes, en las que se emplean múltiples fármacos en combinaciones ampliamente variables entre los diversos protocolos. Hasta la fecha, no existe ningún régimen estándar y, a pesar de la heterogeneidad de LAL en los adultos, la mayoría de los pacientes son tratados de manera similar, en el seno de protocolos multicéntricos cuya comparación es difícil (Tablas 1 y 2). Además, hay muy pocos ensayos aleatorizados que comparen diferentes fármacos o regímenes de tratamiento (Tabla 3). Sin embargo, conforme se ha progresado en el conocimiento de la LAL, se va tendiendo a individualizar el tratamiento en determinados subtipos. Tal es el caso de los pacientes con LAL B madura y con LAL Ph-positiva, como se verá más adelante.

Los protocolos de tratamiento en LAL de adultos han derivado en la mayoría de los casos de los protocolos pediátricos. Así, al igual que los regímenes pediátricos, el tratamiento en adultos consta de 3 fases diferentes: 1) terapia de inducción para lograr la RC; 2) terapia de consolidación, que en general es intensiva; y 3) tratamiento de mantenimiento. A lo largo del tratamiento se efectúa la profilaxis de la leucemia en el sistema nervioso central (SNC). El trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) se considera una estrategia de tratamiento de intensificación.

Tabla 1. Principales resultados del tratamiento de inducción en la leucemia aguda linfoblástica del adulto

Estudio	Año	n	Edad	Fármacos	RC
GMALL 02/84	1993	562	28	V,P,A,D,C,AC,M,MP	75%
FGTALL	1993	572	n.r.	V,P,D/R,C, [AM,AC]	76%
MRC XA	1997	618	> 15	V,P,A,D	82%
PETHEMA-89	1998	108	20	V,P,D,A,C	86%
CALGB	1998	198	35	V,P,D,A,C	85%
MDACC	2000	204	39	V,DX,A,D,C	91%
GMALL 05/93	2001	1163	35	V,P,D,A,C,AC,MP	83%
Lombardia	2001	121	35	V,P,A [C]	84%
Sweden	2002	153	42	V,BX,HDAC,C,D,AM	86%
GIMEMA	2002	794	28	V,P,A,D,C [HDAC,Mi]	82%
PETHEMA-93	2005	222	27	V,P,D,A,C	82%
MRC/ECOG	2005	1.521	< 35	V,P,A,D,C,AC,MP	91%
<b>TOTAL</b>		<b>6.236</b>			<b>84%</b>

A: asparaginas; AC: citarabina; AM: adriamicina; C: ciclofosfamida; D: daunorubicina; DX: dexametasona; HDAC: altas dosis de citarabina; M: metotrexato; Mi: mitoxantrona; MP: mercaptopurina; P: prednisona; R: rubidazona; RC: remisión completa, V: vincristina

**Tabla 2. Principales resultados del tratamiento de consolidación en la leucemia aguda linfoblástica del adulto**

Grupo	Año	n	Consolidación	SLE
GMALL 02/84	1993	562	V,DX,AD,AC,C,TG,VM	39% (7a)
FGTALL	1993	572	AD,AC,A	32% (4a)
MRC XA	1997	618	[AC,VP,D,TG]	29% (5a)
PETHEMA	1998	108	HDM,V,D,P,A,C,VM,AC	41% (4a)
CALGB	1998	198	C,MP,AC,V,A,M,AD,DX,TG,P	40% (3a)
MRC/ECOG	1999	920	HDM,A [AC,VP,V,DX,D, C,TG]±TPH	
MDACC	2000	204	HDM,HDAC,C,P	38% (5a)
GMALL 05/93	2001	1163	V,DX,AD,AC,C,TG,VM,AC, HDM,A,C [HDAC,Mi]	
Lombardia	2001	121	I,V,C,VM,HDAC,HDM, DX±TPH	49% (3a)
Sweden	2002	153	AD,HDAC,V,BX,C,D,VP±TPH	30% (5a)
GIMEMA	2002	794	V,HDM,HDAC,DX,VM	29% (9a)
PETHEMA	2005	222	V,DX,AD,HDM,HDAC±TPH	34% (7a)
<b>TOTAL</b>		<b>5.635</b>		<b>34%</b>

A: asparaginasa; AC: citarabina; AD: adriamicina; C: ciclofosfamida; D: daunorubicina; DX: dexametasona; HDAC: altas dosis de citarabina; HDM: altas dosis de metotrexato; I: idarubicina; M: metotrexato; Mi: mitoxantrona; MP: mercaptopurina; P: prednisona; SLE: supervivencia libre de enfermedad; TG: tioguanina; TPH: trasplante de progenitores hematopoyéticos; V: vincristina; VM: tenipósido; VP: etopósido

### Inducción a la remisión

En un sentido general, cabe considerar dos grandes aproximaciones. La primera, más puramente pediátrica y empleada por la mayoría de grupos, deriva de los protocolos del grupo Berlín-Frankfurt-Münster (BFM) e incluye una **prefase** de 5-7 días de duración con un glucocorticoide, seguida de la primera fase del tratamiento de inducción (o **inducción I**), que incluye la combinación de prednisona (dexametasona en algunos estudios), vincristina, daunorubicina (u otra antraciclina) y asparaginasa. La daunorubicina se suele dar en los primeros 3 días de la terapia de inducción, mientras que la vincristina se administra una vez por semana (4 dosis). Los glucocorticoides se suelen administrar durante un mes. En varios protocolos existe una segunda fase de la terapia de inducción (o **inducción II**), que consiste en ciclofosfamida, citarabina y 6-mercaptopurina, que se da después de 4 semanas. La administración de dosis altas de citarabina, antraciclinas o ciclofosfamida en el tratamiento de inducción no produce ningún beneficio clínico y aumenta la toxicidad relacionada con el tratamiento.

La segunda aproximación se ha desarrollado en el MD Anderson Cancer Center en Houston, Texas, y consiste en el protocolo HiperCVAD. Consta de una primera fase con ciclofosfamida hiperfraccionada, doxorubicina continua, además de vincristina y dexa-

metasona (parte A), que se sigue, después de la recuperación hemoperiférica, de altas dosis de metotrexato y citarabina (parte B). En contraste con otros regímenes, este protocolo no incluye asparaginasa. La tasa de RC se sitúa en el 85-90%, al igual que los protocolos de base pediátrica.

### Consolidación

Suele incluir un tratamiento intensivo con rotación de fármacos activos frente a la LAL, en forma de múltiples ciclos de quimioterapia. Las pautas y su duración son bastante diferentes según los protocolos. Algunos grupos incluyen al final un ciclo de reinducción, que consiste en una repetición del tratamiento de inducción, basándose en el hecho de que este tratamiento ha proporcionado un beneficio clínico a los niños con LAL de alto riesgo de enfermedad. En el régimen HyperCVAD, la consolidación consiste en repetición de las partes A y B, hasta completar un total de 4 ciclos (cada ciclo comprende 2 partes).

### Mantenimiento

Consiste en la administración prolongada y continua de 6-mercaptopurina diaria y metotrexato semanal, por lo general junto con pulsos mensuales de vincristina y prednisona. La omisión de esta fase se traduce en una mayor tasa de recaída. La duración de la terapia de mantenimiento oscila entre los 2 y 3 años. No es necesario el tratamiento de mantenimiento en la LAL de células B maduras<sup>21</sup>. La absorción y el metabolismo de la 6-mercaptopurina y el metotrexato pueden variar entre los pacientes, en función de los polimorfismos de las enzimas que participan en su metabolización, y dado que no se miden los valores séricos de estos fármacos, desde un punto de vista práctico, las dosis deben ajustarse para mantener un recuento de leucocitos alrededor de  $3 \times 10^9/L$ . Con la 6-mercaptopurina y el metotrexato se producen con frecuencia alteraciones de las pruebas de función hepática. Sin embargo, en ausencia de toxicidad hepática grave, las dosis de estos medicamentos no deben reducirse.

### Profilaxis de la leucemia en el SNC

Sin profilaxis, aproximadamente un tercio de los pacientes con LAL experimentan recaída en el SNC<sup>22</sup>, casi siempre en forma de meningitis leucémica. Este riesgo es mayor en pacientes con LAL de células B maduras, en pacientes con LAL-T y en los pacientes con hiperleucocitosis. No existen estudios aleatorizados sobre cuál es la mejor pauta de profilaxis del

SNC, aunque el fármaco esencial para la prevención de la recaída en el SNC en adultos es el metotrexato intratecal, administrado de forma repetida a dosis de 12 mg, bien aislado o en combinación con citarabina y dexametasona o hidrocortisona (triple terapia intratecal). La irradiación holocraneal se ha empleado tradicionalmente, pero tiende a omitirse en los protocolos recientes por su toxicidad cerebral tardía, manifestada sobre todo en forma de déficit cognitivos, leucoencefalopatía, así como, al menos en niños, una mayor incidencia de endocrinopatías y de segundas neoplasias<sup>23</sup>. Un segundo motivo de omisión de la radioterapia es el empleo durante la consolidación de dosis altas de fármacos que atraviesan la barrera hematoencefálica, como el metotrexato y la citarabina. El número óptimo de administraciones y la duración del tratamiento intratecal no están determinados, pero en general se sitúa entre 12 y 16 en los diferentes protocolos<sup>24</sup>. En la actualidad se hallan en curso ensayos clínicos que evalúan la utilidad de la citarabina liposómica depot como profilaxis del SNC en la LAL del adulto, ya que en estudios no controlados este fármaco ha demostrado eficacia en el tratamiento de las recaídas neuromeningeas en la LAL<sup>25</sup>.

### L-asparaginasa en la LAL de adulto

A pesar de utilizarse en todos los protocolos pediátricos y en muchos de los de adultos, los médicos que tratan a adultos son más reacios que los pediatras a utilizar asparaginasa, y con frecuencia disminuyen su dosis por problemas de toxicidad. Por otra parte, no hay ensayos aleatorizados con asparaginasa en adultos, por lo que su beneficio no se ha documentado<sup>26</sup>. Sin embargo, se ha demostrado que existe una relación entre la intensidad y duración de la depleción sérica de asparagina o la mayor actividad enzimática con mejores resultados globales del tratamiento<sup>27</sup>.

Existen 3 formas de asparaginasa. La más empleada es la nativa (es decir, sin modificar) derivada de *Escherichia coli*, que tiene una vida media de aproximadamente 1,3 días<sup>28</sup>. Por lo tanto, son necesarias múltiples dosis de asparaginasa para lograr una depleción sostenida de asparagina. La asparaginasa derivada de la bacteria *Erwinia* tiene una vida media corta (0,65 días) y normalmente se emplea (en dosis más altas que la nativa) cuando hay hipersensibilidad a la asparaginasa de *E. coli*. La tercera forma es la asparaginasa de *E. coli* conjugada con polietilenglicol (peg-asparaginasa)<sup>29</sup>, cuya indicación está aprobada por la FDA, aunque por desgracia no está disponible en España. Esta formulación produce un menor número de reacciones de hipersensibilidad y tiene una vida media más larga (5,73 días), por lo que una única inyección puede sustituir múltiples dosis de la forma nativa. La

producción de una depleción prolongada y sostenida de asparagina podría asociarse a beneficios clínicos en la LAL del adulto<sup>29</sup>.

### Trasplante de progenitores hematopoyéticos en la LAL del adulto

Constituye una estrategia ampliamente empleada para mejorar los resultados del tratamiento de la LAL en los adultos. El tipo de TPH más utilizado en la actualidad es el alogénico, sobre todo en pacientes de edad inferior a 55-60 años, con características de alto riesgo y que disponen de un hermano HLA-idéntico. Recientemente se van comunicando resultados cada vez más similares a los del TPH a partir de hermano histocompatible con el empleo de donantes no emparentados (DNE) o de progenitores hematopoyéticos de sangre de cordón umbilical (SCU), por lo que la mayoría de grupos utilizan estas fuentes de progenitores hematopoyéticos en ausencia de familiar histocompatible.

Si bien el papel de TPH en LAL sigue siendo objeto de evaluación, el Center for International Bone Marrow Transplant Research (CIBMTR) recomienda no efectuar alo-TPH en adultos con LAL de riesgo estándar en primera RC, por obtenerse resultados similares con quimioterapia<sup>30</sup>. Para los pacientes con LAL de alto riesgo la tasa de recaídas es menor con el alo-TPH, y ello se traslada en algunos estudios en una prolongación significativa de la supervivencia<sup>31</sup>, aunque no en otros<sup>32</sup> (Tabla 3). El TPH autogénico no se recomienda en general, ya que no ofrece ventaja sobre la quimioterapia<sup>33</sup>.

Los resultados finales del estudio MRC UKLALXII/ECOG E2993, que constituye el estudio comparativo de alo-TPH frente a quimioterapia o auto-TPH más

Tabla 3. Principales estudios aleatorizados entre quimioterapia y trasplante de progenitores hematopoyéticos en la leucemia aguda linfoblástica del adulto

Estudio	n	Población	SLE	SG
LALA-87	116 vs. 141	LAL adulto	45 vs. 31%	48 vs. 35%
		Alto riesgo	39 vs. 14%	44 vs. 11%
JALSG-93	34 vs. 108	LAL adulto	NR	46 vs. 40%
LALA-94	100 vs. 159	Alto riesgo	45 vs. 23%	51 vs. 33%
GOELAL02	41 vs. 106	Alto riesgo	75 vs. 40%	75 vs. 33%
EORTC	68 vs. 116	LAL adulto	38 vs. 36%	41 vs. 39%
PETHEMA	84 vs. 98	Alto riesgo	40 vs. 49%	37 vs. 46%
MRC/ECOG	443 vs. 558	LAL adulto	50 vs. 41%	53 vs. 45%
		Alto riesgo	38 vs. 32%	41 vs. 35%

Se indican en cursiva los estudios con diferencia estadísticamente significativa a favor del trasplante de progenitores hematopoyéticos

NR: no referido; SG: supervivencia global; SLE: supervivencia libre de enfermedad

amplio efectuado hasta la actualidad (1.913 pacientes)<sup>33</sup>, demostró que los pacientes con donante tuvieron una probabilidad de supervivencia a los 5 años significativamente mayor que la registrada en los pacientes sin donante (53% frente a 45%,  $p = 0,01$ ). Sin embargo, cuando se evaluaron los resultados en función del grupo de riesgo, el mayor beneficio (y, de hecho, el único que fue estadísticamente significativo) del alo-TPH se observó en los enfermos de riesgo estándar (edad inferior a 35 años, leucocitos  $< 30 \times 10^9/L$  en LAL de precursores B y  $< 100 \times 10^9/L$  en las LAL-T) (Tabla 3). Para los pacientes con LAL de alto riesgo, el TPH alogénico tuvo un efecto antileucémico mayor, pero la mortalidad inherente al mismo impidió que ello se trasladara en una prolongación significativa de la supervivencia. Este estudio también demostró que el auto-TPH no fue superior a la quimioterapia en ningún grupo o subgrupo de pacientes adultos con LAL, y por ello confirmó su papel limitado en el tratamiento de la LAL del adulto. Un metaanálisis de los estudios aleatorizados divulgados con anterioridad a la publicación de los resultados del ensayo del MRC/ECOG demostró que el alo-TPH proporcionaba una supervivencia significativamente superior a la quimioterapia, en especial en la LAL de alto riesgo<sup>34</sup>. En la actualidad se está llevando a cabo un metaanálisis más amplio, que incluye todos los protocolos que comparan de forma aleatorizada el TPH en cualquiera de sus variedades con la quimioterapia. Es de esperar que su elevada potencia estadística permita disponer de resultados

que puedan clarificar mejor el papel del TPH en el tratamiento de la LAL del adulto.

### Tratamiento de la LAL del adulto con protocolos de base pediátrica

Diversos estudios retrospectivos han demostrado que los pacientes adolescentes y adultos jóvenes (hasta 21 años) tratados con protocolos pediátricos tenían mejor pronóstico que los que recibían protocolos desarrollados por grupos que tratan LAL del adulto, a pesar de que sus características clinicobiológicas eran similares<sup>35,39</sup> (Tabla 4). Ello se ha atribuido, entre otras razones, a una mayor intensidad de dosis de fármacos esenciales en el tratamiento de la LAL, como vincristina, glucocorticoides y L-asparaginasa, en los protocolos pediátricos, así como a una adherencia más estricta al calendario de las distintas fases del tratamiento en los protocolos pediátricos<sup>40</sup>. En países como EE UU, las diferencias socioeconómicas entre los pacientes tratados en instituciones pediátricas (más dependientes de los padres) o en protocolos de adultos (mayor frecuencia de emancipación y seguros de enfermedad menos completos) también pueden influir en los resultados.

Ello ha llevado a investigar de forma prospectiva la aplicación de protocolos pediátricos a adultos jóvenes. Diversos estudios prospectivos (Tabla 5) han demostrado su aplicabilidad hasta edades de 30 años<sup>41</sup> o incluso hasta 45-50 años<sup>42</sup>, con resultados prometedores. Mención especial debe hacerse a la inclusión de la asparaginasa (que clásicamente tendía a reducirse o a eliminarse en los protocolos de LAL del adulto), sobre todo en su forma pegilada, que ha demostrado una buena tolerabilidad. En un estudio del grupo alemán GMALL en 959 pacientes, se demostró que los adultos que recibieron un mayor dosis de PEG-asparaginasa (2.000 frente a 1.000 U/m<sup>2</sup>) tuvieron menos enfermedad residual y, aunque con un seguimiento corto, se observó una tendencia hacia una mayor supervivencia libre de enfermedad (SLE), sin más toxicidad<sup>43</sup>. Otros protocolos que incluyen asparaginasa en dosis densas (hasta 30 dosis)<sup>44</sup> han proporcionado resultados muy alentadores, con probabilidad de SLE y de SG a los 2 años del 72 y 73%, respectivamente, sin que se registrara mayor toxicidad que en otros protocolos de adultos. Por su parte, los resultados preliminares de la aplicación del protocolo pediátrico BFM con inclusión de PEG-asparaginasa (2.000 U/m<sup>2</sup>) en adultos con LAL45 han demostrado una tasa de RC del 95% y una probabilidad de SLE a 1,5 años del 74%, aunque se observó toxicidad significativa pero reversible de la asparaginasa.

Los grupos americanos CALGB, SWOG y ECOG están desarrollando un ensayo clínico en fase II

Tabla 4. Principales estudios comparativos retrospectivos en adolescentes y adultos jóvenes tratados con protocolos pediátricos (P) frente a protocolos de adultos (A)

País	Protocolo	Edad	n	RC (%)	SLE (%)
EE UU	CCG(P)	16-20	197	90	63
	CALGB(A)		124	90	34
Francia	FRALLE93(P)	15-20	77	94	67
	LALA94 (A)		100	83	41
Holanda	DCOG (P)	15-18	47	98	69
	HOVON (A)		44	91	34
Italia	AIEOP (P)	14-18	150	94	80
	GIMEMA (A)		95	89	71
Suecia	NOPHO-92(P)	10-40	144	99	65
	Adult (A)		99	90	48
Reino Unido	ALL97 (P)	15-17	61	98	65
	UKALLXII(A)		67	94	49
México	LALIN (P)	15-25	20	90	70
	LALA (A)		20	80	40
Finlandia	NOPHO (P)	10-25	128	96	67
	ALL (A)		97	97	60

n: número de pacientes; RC: remisión completa; SLE: supervivencia libre de enfermedad



**Tabla 5. Estudios prospectivos en adolescentes y adultos jóvenes tratados con protocolos de base pediátrica**

País	Protocolo	Edad	n	RC (%)	SLE (%)
EE UU	DFCI 91-01, 95-01	15-18*	51*	94	78
España	PETHEMA ALL-96	15-18	35	94	60
		19-30	46	100	63
Alemania	GMALL 6/99, 7/03	15-25	417	90	67**
Francia	GRAALL-2003	15-45	172	95	58
EE UU	DFCI	18-50	74	82	72,5***
Canadá	DFCI modificado	17-71	68	85	65****

n: número de pacientes; RC: remisión completa; SLE: supervivencia libre de enfermedad

\*Resultados restringidos a adolescentes; \*\*Duración de la RC;

\*\*\*Estimada a 2 años; \*\*\*\*Supervivencia global.

(C10403), en el que se evaluarán los resultados del régimen pediátrico BFM en adolescentes y adultos jóvenes (está previsto incluir 300 pacientes de entre 15 y 30 años)<sup>46</sup>. El objetivo del estudio es doble: evaluar, por un lado, su tolerabilidad y eficacia y, por otro, comparar los resultados con los de un estudio muy similar del Children’s Oncology Group (ALAL0232), en el que se tratan pacientes de 1 a 30 años de edad con LAL de precursores B47. El estudio examinará si los resultados en adolescentes y adultos jóvenes son similares cuando se tratan por hematólogos pediatras o de adultos. Otras cuestiones que se abordarán en este estudio incluyen el perfil de toxicidad de un régimen terapéutico pediátrico cuando se aplica a los adultos jóvenes (hasta 30 años de edad) y el grado de adherencia al mismo de los pacientes y sus cuidadores.

En definitiva, es posible que con el empleo de protocolos de base o de inspiración pediátrica exista un margen de mejora en los resultados de la quimioterapia en adultos jóvenes (hasta 30 o incluso 50 años) con LAL del adulto. De ser así, ello volverá a cuestionar el papel del alo-TPH en los pacientes de este subgrupo de edad.

### Tratamiento de los adultos con LAL B madura

La LAL B madura se clasifica morfológicamente como LAL3 según los criterios del grupo FAB, y se conoce también como LAL tipo Burkitt, por ser la contrapartida leucémica del linfoma de Burkitt. Se caracteriza por la expresión de inmunoglobulinas de superficie y por el reordenamiento del oncogén *C-MYC* como consecuencia de las translocaciones t(8;14), t(2;8), o t(8;22)<sup>10</sup>. Las células leucémicas expresan intensamente el antígeno CD20 y tienen un elevadísimo índice proliferativo, responsable del síndrome de lisis tumoral, espontáneo o inducido por el tratamiento, que debe prevenirse o, en su caso, tratarse pronta y

enérgicamente con hidratación y rasburicasa. La estrategia de tratamiento es distinta a la empleada en los demás subtipos de LAL. Los protocolos típicos incluyen regímenes de quimioterapia cortos e intensos que incorporan ciclofosfamida y altas dosis de metotrexato. Es obligatoria la profilaxis intensiva del SNC. No es necesaria la terapia de mantenimiento. La introducción de estos protocolos de tratamiento ha mejorado los resultados en los últimos años, con tasas de curación de aproximadamente el 60%<sup>48-51</sup>. La recaída después de 6 meses es poco frecuente en estos pacientes. Recientemente, estos resultados están mejorando con la adición de rituximab a los protocolos de quimioterapia, con SLE del 70-80%<sup>52-55</sup>.

### Tratamiento de los pacientes con LAL con cromosoma Filadelfia

Tradicionalmente, el TPH alogénico ha venido siendo el único tratamiento potencialmente curativo para las LAL Ph+, ya que ha proporcionado supervivencias superiores a la quimioterapia en estudios controlados<sup>56</sup>, aunque la tasa de curación (aproximadamente del 20%) era inferior a la registrada en otros subtipos de LAL. La combinación de mesilato de imatinib con quimioterapia ha mejorado la tasa de RC, la accesibilidad al TPH alogénico y, globalmente, la probabilidad de SLE prolongada (30-50%) ha sido superior a la observada en controles históricos<sup>57-62</sup>. La administración concomitante de imatinib con quimioterapia tiene un mayor efecto antileucémico que la alternativa<sup>60</sup>. El TPH alogénico continúa estando recomendado tras la quimioterapia e imatinib, aunque una proporción no despreciable de pacientes a los que no se ha podido efectuar un TPH presentan remisiones prolongadas con imatinib y quimioterapia de mantenimiento<sup>57</sup>. Es probable que después del TPH alogénico deba efectuarse algún tratamiento de mantenimiento, al menos tan pronto como se detecte recidiva molecular. En esta situación, los inhibidores de tirosincinasas (imatinib, dasatinib, nilotinib y otros en el futuro), solos o en combinación con otros agentes, pueden constituir el tratamiento de elección.

La mitad de los pacientes de edad avanzada con LAL presentan el cromosoma Filadelfia, y generalmente no son candidatos a TPH alogénico. En ellos, la combinación de imatinib y glucocorticoides consigue altas tasas de RC, pero se siguen generalmente de recaída durante el tratamiento de consolidación o de mantenimiento<sup>63-65</sup>. Se está explorando el papel de dasatinib, solo o combinado con otros agentes, en el tratamiento inicial de la LAL en pacientes de edad avanzada<sup>66,67</sup>. El alo-TPH con acondicionamiento de intensidad reducida podría ser una opción a considerar en estos casos.



En casos de resistencia o intolerancia al imatinib, los inhibidores de tirosinasa de segunda generación (dasatinib y nilotinib) han demostrado eficacia<sup>68-70</sup>, y de hecho el dasatinib está indicado en esta situación. Los datos de otros inhibidores, como el bosutinib, son escasos hasta ahora en la LAL Ph+.

Las mutaciones en el dominio de tirosinasa de ABL son frecuentes en el momento del diagnóstico de la LAL Ph+ (20% en pacientes jóvenes y 40% en adultos de más de 55 años). Esta frecuencia es mucho mayor en el momento de la recaída, donde se seleccionan, además, mutaciones que comportan resistencia a imatinib, nilotinib y dasatinib, como la T315I. Se está investigando activamente la tolerabilidad y eficacia de los inhibidores de aurora cinasa y otros inhibidores multicinasas en los pacientes con la mutación T315I.

### Tratamiento de la LAL en adultos de edad avanzada

Aproximadamente el 20% de los adultos con LAL tienen 60 o más años de edad, y en ellos los resultados del tratamiento son peores que en los adultos más jóvenes. Ello se debe a una menor tasa de RC (50-60%) y mayor frecuencia de recaídas conforme se incrementa la edad<sup>71</sup>.

Estas diferencias se atribuyen tanto a factores relacionados con la propia LAL en este grupo de edad como con el propio paciente. Así, los adultos mayores tienen la tasa más alta de LAL Ph+ y la menor de LAL con reordenamientos *TEL-AML1* o con hiperdiploidía. Asimismo, los adultos mayores también pueden tener más enfermedades asociadas. Por regla general, son más susceptibles a los efectos adversos de los citostáticos incluidos en los regímenes utilizados para el tratamiento de la LAL. Así, tienen mayor riesgo de neurotoxicidad por vincristina, son más susceptibles a las infecciones y a la hiperglucemia secundaria a glucocorticoides, presentan con más frecuencia toxicidad grave por asparaginasa, y en ellos la duración e intensidad de la pancitopenia secundaria al tratamiento son mayores que en los adultos jóvenes. Por ello, a menudo reciben dosis atenuadas de la quimioterapia, y no suelen incluirse en ensayos clínicos. Con todo, se están desarrollando protocolos cooperativos para el tratamiento de estos pacientes, que consisten en una quimioterapia de inducción atenuada que no incluya fármacos genotóxicos, seguida de una consolidación y mantenimiento, que incluyen quimioterapia estándar junto a nuevos agentes con actividad específica para cada subtipo de LAL<sup>72</sup> (ver más adelante). Asimismo, el alo-TPH con acondicionamiento de intensidad reducida puede ser una opción a evaluar en fases iniciales de la enfermedad (pacientes en RC o en primera recaída)<sup>73-75</sup>.

### Tratamiento de la enfermedad resistente o en recidiva

La recurrencia de una LAL es siempre un suceso grave, especialmente si es temprana (durante la fase de quimioterapia o en los 6 meses siguientes a la supresión del tratamiento) y si se trata de una recidiva en medula ósea. Con tratamientos similares al de inducción, el 40-60% de los adultos consiguen una segunda RC. En los casos de recidiva temprana aislada en el SNC, es preciso reforzar el tratamiento anterior con administraciones repetidas de citostáticos (metotrexato, ARA-C e hidrocortisona) por vía intratecal. Dado que en general la duración de la segunda RC es corta (mediana de 2-8 meses), una vez obtenida la RC el mejor tratamiento es el TPH alogénico, al que sin embargo pueden acceder una proporción reducida de pacientes<sup>76,76a</sup>. En la experiencia de los autores, el único subgrupo de enfermos en los que se logra una proporción valorable (25-35%) de segundas RC mantenidas es el de los adultos jóvenes (edad inferior a 30 años), con duración de la primera RC superior a un año<sup>77</sup>. Los pacientes que no pueden acceder a un TPH deberían incluirse en ensayos clínicos con nuevos agentes, que se comentan en el siguiente apartado.

### Nuevos tratamientos en la leucemia aguda linfoblástica

Después de varias décadas sin inclusión de nuevos fármacos en el arsenal terapéutico de la LAL (y en las que los leves avances únicamente se debían a mejoría en las combinaciones de fármacos clásicos y en mejores tratamientos de soporte), en el momento actual se está asistiendo a una explosión de nuevos agentes con actividad antileucémica demostrada en ensayos clínicos y que se van incorporando a las pautas actuales de tratamiento de la LAL<sup>78</sup>.

#### Agentes citostáticos

En este grupo cabe considerar las modificaciones de citostáticos conocidos tendentes a mejorar su tolerabilidad y eficacia, los nuevos antimetabolitos y los nuevos análogos de nucleósidos. En el primer grupo cabe destacar la PEG-asparaginasa (cuya vida media es más larga, es menos inmunogénica y posiblemente más eficaz)<sup>26,27,79</sup>, la vincristina liposómica (que asegura una mayor concentración tisular y exposición más prolongada)<sup>80</sup>, las antraciclinas liposómicas (con menor cardiotoxicidad, pero, por ahora, menor eficacia)<sup>81</sup> y la citarabina liposómica depot (con mayor vida media en el LCR y eficacia demostrada en las recaídas meníngeas de la LAL)<sup>25</sup>. Entre los nuevos an-

timetabolitos cabe citar los antifolatos, como tralotrexin y pemetrexed, que se hallan en fases iniciales de ensayos clínicos.

Entre los análogos de nucleósidos cabe citar la nelarabina, la clofarabina y la forodesina. La nelarabina es un análogo de nucleósidos que ha demostrado actividad en LAL-T<sup>82</sup> y está aprobada por la FDA y la EMEA para el tratamiento de adultos y niños con LAL-T o linfoma linfoblástico T que no han respondido o han recaído tras recibir por lo menos 2 líneas de quimioterapia. La dosis recomendada para adultos es de 1.500 mg/m<sup>2</sup> en infusión de 2 horas los días 1, 3 y 5 de cada ciclo de 21 días de tratamiento. La neurotoxicidad es poco frecuente, y el principal efecto adverso es la mielodepresión. La clofarabina también está aprobada por la FDA para pacientes pediátricos de edades 1-21 años, en recaída o refractarios después de recibir al menos 2 regímenes de tratamiento. La dosis recomendada en niños es de 52 mg/m<sup>2</sup> durante 5 días, y para los adultos de 40 mg/m<sup>2</sup> durante 5 días<sup>83</sup>. En la actualidad se está investigando en asociación con otros fármacos como ciclofosfamida, etopósido y citarabina. La forodesina inhibe la purina nucleósido fosforilasa, tiene buena biodisponibilidad oral y escasos efectos secundarios. Se está investigando en ensayos clínicos, tanto en LAL-T como de precursores B.

### Tratamientos dirigidos a dianas (targeted therapy)

El mejor ejemplo lo constituyen el imatinib y los inhibidores de tirosincinasas de segunda generación. Además de la LAL Ph+, los inhibidores de la tirosincinasa de ABL pueden ser útiles en un pequeño subgrupo de LAL-T (6%) que tienen el reordenamiento episómico *NUP214-ABL1*<sup>84</sup>. También cabe citar los inhibidores de aurora cinasa, que bloquean el alineamiento y separación de los cromosomas durante la mitosis. Inhiben múltiples cinasas, incluida la tirosincinasa de ABL con la mutación T315I y se hallan en ensayos en fase I y II.

Los inhibidores de gamma-secretasa bloquean la actividad de la proteína mutada NOTCH1, que se observa en más del 70% de pacientes con LAL-T. Si bien su actividad es prometedora, en los ensayos clínicos se ha observado una elevada toxicidad digestiva, lo que limita su aplicabilidad. En la actualidad se investiga su combinación con glucocorticoides, que al parecer comporta una clara disminución de su toxicidad digestiva y posiblemente un aumento de su eficacia, al revertir la resistencia de los linfoblastos T a los glucocorticoides<sup>85</sup>. Otro grupo de agentes en investigación son los inhibidores de la tirosincinasa FLT3, que está sobreexpresada en las LAL con reordenamiento MLL<sup>86</sup>.

### Anticuerpos monoclonales

El antígeno CD20 se expresa intensamente en más del 85% de las LAL B maduras y en el 40-50% de LAL de precursores B<sup>87</sup>. El rituximab combinado con quimioterapia específica ha mostrado tener gran actividad en las LAL B maduras, con supervivencias del 70% en series recientes<sup>54,55</sup>. En las LAL de precursores B parece ser eficaz en pacientes jóvenes tanto con LAL de riesgo estándar como de alto riesgo, donde parece mejorar la duración de la RC, sin añadir toxicidad<sup>88</sup>. En los pacientes de edad avanzada no ha demostrado impacto en la respuesta al tratamiento y en la supervivencia.

El antígeno CD19 se expresa en más del 90% de LAL de línea B. Una estrategia inmunoterápica atractiva es la administración de blinatumomab (anti-CD19 bite), que se fija al antígeno CD19 de las células leucémicas y al CD3 de los linfocitos T citotóxicos, de modo que éstos atacarían a las células leucémicas mediante citotoxicidad directa. Sus resultados son prometedores en situación de enfermedad residual alta, donde se ha comenzado a investigar su utilidad clínica<sup>89</sup>. El CD22 también se expresa en el 90% de las LAL de precursores B. Existen ensayos en marcha con anti-CD22 (epratuzumab) conjugado con toxinas en LAL infantil y del adulto<sup>90</sup>. El CD52 se expresa en el 60-80% de LAL tanto de línea T como B. El anti-CD52 tiene actividad prometedora como tratamiento de consolidación en LAL-T y también en LAL de precursores B<sup>91</sup>. En cambio, el anti-CD33 no parece tener actividad en la LAL, a diferencia de la LAM.

### Otros agentes

Entre ellos cabe citar los inhibidores de la farnesiltransferasa, agentes desmetilantes, inhibidores de histona desacetilasa e inhibidores de m-TOR, entre otros, todos en fases preliminares de estudios clínicos.

### Conclusiones

Tomando como base la amplia experiencia de los grupos pediátricos en el tratamiento de la LAL, es altamente recomendable incluir a los adultos con LAL en protocolos terapéuticos y en ensayos clínicos desarrollados en centros con experiencia (habida cuenta de su escasa frecuencia), y asegurarse de que haya una elevada adherencia a los mismos. Asimismo, los avances en el conocimiento de las bases biológicas de la LAL y de las características genéticas de los pacientes que la sufren está llamada a revolucionar el tratamiento, haciéndolo cada vez más individualizado. En definitiva, la selección del trata-

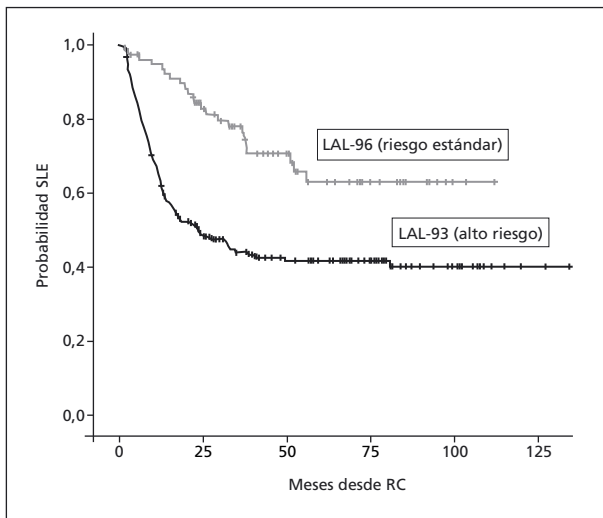


Figura 1. Resultados del grupo PETHEMA en el tratamiento adaptado al riesgo en la leucemia aguda linfoblástica (LAL) del adulto.

miento basada en características específicas, tanto de la propia LAL como del paciente, constituye la base del éxito del tratamiento actual de los niños con LAL, y la aplicación de estos principios al tratamiento de la LAL en pacientes adultos está empezando a tener un impacto favorable.

### Agradecimientos

A todos los hematólogos que participan en los protocolos del Grupo PETHEMA por su continuada dedicación y por la participación activa en los estudios.

### Bibliografía

- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics 2008. *CA Cancer J Clin* 2008; 58: 71-96.
- Surveillance, Epidemiology, and End Results program (SEER) stat fact sheets: acute lymphocytic leukemia. <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/aly1.html>. Visitado en abril de 2009.
- Surveillance, Epidemiology, and End Results program (SEER) data, 1975-2004. Available at: [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2004/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2004/). Visitado en marzo de 2009.
- Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2006; 354: 166-78.
- Rowe JM, Goldstone AH. How I treat acute lymphocytic leukemia in adults. *Blood* 2007; 110: 2268-75.
- Surveillance, Epidemiology, and End Results program (SEER) fast stats results. Available at: <http://seer.cancer.gov/faststats>. Visitada en abril de 2009.
- Pulte D, Gondos A, Brenner H. Improvement in survival in younger patients with acute lymphoblastic leukemia from the 1980s to the early 21<sup>st</sup> century. *Blood* 2009; 113: 1408-11.
- Hoelzer D, Thiel E, Löffler H, Büchner T, Ganser A, Heil G, et al. Prognostic factors in a multicenter study for treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. *Blood* 1988; 71: 123-31.

- Armstrong SA, Look AT. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2005; 23: 6306-15.
- Dave SS, Fu K, Wright GW, Lam LT, Kluin P, Boerma EJ, et al. Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma. *N Engl J Med* 2006; 354: 2431-42.
- Vey N, Thomas X, Picard C, Kovascovicz T, Charin C, Cayuela JM, et al. Allogeneic stem cell transplantation improves the outcome of adults with t(1;19)/E2APBX1 and t(4;11)/MLL-AF4 positive B-cell acute lymphoblastic leukemia: results of the prospective multicenter LALA-94 study. *Leukemia* 2006; 20: 2155-61.
- Moorman AV, Harrison CJ, Buck GA, Richards SM, Secker-Walker LM, Martineau M, et al. Karyotype is an independent prognostic factor in adult acute lymphoblastic leukemia (LAL): analysis of cytogenetic data from patients treated on the Medical Research Council (MRC) UKLALXII/Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 2993 trial. *Blood* 2007; 109: 3189-97.
- Baak U, Gökbuğet N, Orawa H, Schwartz S, Hoelzer D, Thiel E, et al. Thymic adult T-cell acute lymphoblastic leukemia stratified in standard- and high-risk group by aberrant HOX11L2 expression: experience of the German multicenter ALL study group. *Leukemia* 2008; 22: 1154-60.
- Bergeron J, Clappier E, Radford I, Buzyn A, Millien C, Soler G, et al. Prognostic and oncogenic relevance of TLX1/HOX11 expression level in T-ALLs. *Blood* 2007; 110: 2324-30.
- Asnafi V, Buzyn A, Le Noir S, Baleyrier F, Simon A, Beldjord K, et al. NOTCH1/FBXW7 mutation identifies a large subgroup with favorable outcome in adult T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL): a Group for Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (GRAALL) study. *Blood* 2009; 113: 3918-24.
- Brüggemann M, Raff T, Flohr T, Gökbuğet N, Nakao M, Drosese J, et al. Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2006; 107: 1116-23.
- Bassan R, Spinelli O, Oldani E, Intermesoli T, Tosi M, Peruta B, et al. Improved risk classification for risk-specific therapy based on the molecular study of minimal residual disease (MRD) in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood* 2009; 113: 4153-62.
- Wassmann B, Pfeifer H, Stadler M, Bornhäuser M, Bug G, Scheuring UJ, et al. Early molecular response to posttransplantation imatinib determines outcome in MRD+ Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ ALL). *Blood* 2005; 106: 458-63.
- Lee S, Kim YJ, Chung NG, Lim J, Lee DG, Kim HJ, et al. The extent of minimal residual disease reduction after the first 4-week imatinib therapy determines outcome of allogeneic stem cell transplantation in adults with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 2009; 115: 561-70.
- Raff T, Gökbuğet N, Lüschen S, Reutzel R, Ritgen M, Imer S, et al. Molecular relapse in adult standard-risk ALL patients detected by prospective MRD monitoring during and after maintenance treatment: data from the GMALL 06/99 and 07/03 trials. *Blood* 2007; 109: 910-5.
- Blum KA, Lozanski G, Byrd JC. Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood* 2004; 104: 3009-20.
- Cortes J. Central nervous system involvement in adult acute lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2001; 15: 145-62.
- Pui CH, Cheng C, Leung W, Rai SN, Rivera GK, Sandlund JT, et al. Extended follow-up of long-term survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2003; 349: 640-9.
- Sancho JM, Ribera JM, Oriol A, Hernandez-Rivas JM, Rivas C, Bethencourt C, et al. Central nervous system recur-

- rence in adult patients with acute lymphoblastic leukemia: frequency and prognosis in 467 patients without cranial irradiation for prophylaxis. *Cancer* 2006; 106: 2540-6.
25. 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 leukemia: report of 6 cases. *Haematologica* 2006; 91 (3): ECR02.
  26. Douer D. Is asparaginase a critical component in the treatment of acute lymphoblastic leukemia? *Best Practice Res Clin Haematol* 2008; 21: 647-58.
  27. 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;109:4164-4167.
  28. Asselin BL, Whitin JC, Coppola DJ, et al. Comparative pharmacokinetic studies of three asparaginase preparations. *J Clin Oncol* 1993; 11: 1780-6.
  29. Douer D, Yampolsky H, Cohen LJ, Watkins K, Levine AM, Periclou AP, et al. Pharmacodynamics and safety of intravenous pegaspargase during remission induction in adults 55 years old or younger with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2007; 109: 2744-50.
  30. Hahn T, Wall D, Camitta B, Davies S, Dillon H, Gaynon P, et al. The role of cytotoxic therapy with hematopoietic stem cell transplantation in the therapy of acute lymphoblastic leukemia in adults: an evidence-based review. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12: 1-30.
  31. Hunault M, Harousseau JL, Delain M, Truchan-Graczyk M, Cahn JY, Witz F, et al. Better outcome of adult acute lymphoblastic leukemia after early genotypical allogeneic bone marrow transplantation (BMT) than after late high-dose therapy and autologous BMT: a GOELAMS trial. *Blood* 2004; 104: 3028-37.
  32. Ribera JM, Oriol A, Bethencourt C, Parody R, Hernández-Rivas JM, Moreno MJ, et al. Comparison of intensive chemotherapy, allogeneic or autologous stem cell transplantation as post-remission treatment for adult patients with high-risk acute lymphoblastic leukemia. Results of the PETHEMA ALL-93 trial. *Haematologica* 2005; 90: 1346-56.
  33. 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 LAL patients: final results of the International LAL Trial (MRC UKLAL XII/ECOG E2993). *Blood* 2008; 111: 1827-33.
  34. Yanada M, Matsuo K, Suzuki T, Naoe T. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation as part of postremission therapy improves survival for adult patients with high-risk acute lymphoblastic leukemia: a metaanalysis. *Cancer* 2006; 106: 2657-63.
  35. Stock W, La M, Sanford B, Bloomfield CD, Vardiman JW, Gaynon P, et al. What determines the outcomes for adolescents and young adults with acute lymphoblastic leukemia treated on cooperative group protocols? A comparison of Children's Cancer Group and Cancer and Leukemia Group B studies. *Blood* 2008; 112: 1646-54.
  36. Boissel N, Auclerc MF, Lheritier V, Perel Y, Thomas X, Leblanc T, et al. Should adolescents with acute lymphoblastic leukemia be treated as old children or young adults? Comparison of the French FRLALE-93 and LALA-94 trials. *J Clin Oncol* 2003; 21: 774-80.
  37. De Bont JM, Holt B, Dekker AW, Van der Does-van den Berg A, Sonneveld P, Pieters R, et al. Significant difference in outcome for adolescents with acute lymphoblastic leukemia treated on pediatric vs adult protocols in the Netherlands. *Leukemia* 2004; 18: 2032-5.
  38. Hallbook H, Gustafsson G, Smedmyr B, SoderhLAL S, Heyman M. Treatment outcome in young adults and children >10 years of age with acute lymphoblastic leukemia in Sweden: a comparison between a pediatric protocol and an adult protocol. *Cancer* 2006; 107: 1551-61.
  39. Ramanujachar R, Richards S, Hann I, Goldstone A, Mitchell C, Vora A, et al. Adolescents with acute lymphoblastic leukaemia: outcome on UK national paediatric (LAL97) and adult (UK-LALXII/E2993) trials. *Pediatr Blood Cancer* 2007; 48: 254-61.
  40. Schiffer CA. Differences in outcome in adolescents with acute lymphoblastic leukemia: a consequence of better regimens? Better doctors? Both? *J Clin Oncol* 2003; 21: 760-1.
  41. Ribera JM, Oriol A, Sanz MA, Tormo M, Fernández-Abellán P, Del Potro E, et al. Comparison of the results of the treatment of adolescents and young adults with standard-risk acute lymphoblastic leukemia with the Programa Español de Tratamiento en Hematología pediatric-based protocol ALL-96. *J Clin Oncol* 2008; 26: 1843-9.
  42. Hugué F, Leguay T, Raffoux E, Thomas X, Beldjord K, Delabesse E, et al. Pediatric-inspired therapy in adults with Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia: the GRAALL-2003 study. *J Clin Oncol* 2009; 27: 911-8. Erratum in: *J Clin Oncol* 2009; 27: 2574.
  43. Goekbuget N, Baumann A, Beck J, et al. PEG-asparaginase in adult acute lymphoblastic leukemia (LAL): efficacy and feasibility analysis with increasing dose levels. Program and abstracts of the 50<sup>th</sup> American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition; December 6-9, 2008; San Francisco, California. Abstract 302.
  44. DeAngelo DJ, Dahlberg S, Silverman LB, et al. A multicenter phase II study using a dose intensified pediatric regimen in adults with untreated acute lymphoblastic leukemia. Program and abstracts of the 49<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Hematology; December 8-11, 2007; Atlanta, Georgia. Abstract 587.
  45. Douer D, Watkins K, Mark L, et al. Sustained and prolonged asparagine depletion by multiple doses of intravenous pegylated asparaginase in the treatment of adults with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. Program and abstracts of the 50<sup>th</sup> American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition; December 6-9, 2008; San Francisco, California. Abstract 1928.
  46. ClinicalTrials.gov. An intergroup phase II clinical trial for adolescents and young adults with untreated acute lymphoblastic leukemia (LAL). <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00558519>. Consultado en marzo de 2009.
  47. ClinicalTrials.gov. Dexamethasone compared with prednisone during induction therapy and methotrexate with or without leucovorin during maintenance therapy in treating patients with newly diagnosed high-risk adult lymphoblastic leukemia. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00075725>. Consultado en marzo de 2009.
  48. Hoelzer D, Ludwig WD, Thiel E, Gassmann W, Löffler H, Fonatsch C, et al. Improved outcome in adult B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1996; 87: 495-508.
  49. Magrath I, Adde M, Shad A, Venzon D, Seibel N, Gootenberg J, et al. Adults and children with small non-cleaved-cell lymphoma have a similar excellent outcome when treated with the same chemotherapy regimen. *J Clin Oncol* 1996; 14: 925-34.
  50. Mead GM, Sydes MR, Walewski J, Grigg A, Hatton CS, Pescosta N, et al. An international evaluation of CODOX-M and CODOX-M alternating with IVAC in adult Burkitt's lymphoma: results of United Kingdom Lymphoma Group LY06 study. *Ann Oncol* 2002; 13: 1264-74.
  51. Soussain C, Patte C, Ostronoff M, Delmer A, Rigal-Hugué F, Cambier N, et al. Small noncleaved cell lymphoma and leu-



- kemia in adults. A retrospective study of 65 adults treated with the LMB pediatric protocols. *Blood* 1995; 85: 664-74.
52. Oriol A, Ribera JM, Esteve J, Sanz MA, Brunet S, Garcia-Boyer 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.
  53. Thomas DA, Faderl S, O'Brien S, Bueso-Ramos C, Cortes J, Garcia-Manero G, et al. Chemoimmunotherapy with hyper-CVAD plus rituximab for the treatment of adult Burkitt and Burkitt-type lymphoma or acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 2006; 106: 1569-80.
  54. Oriol A, Ribera JM, Bergua J, Giménez Mesa E, Grande C, Esteve J, et al. High-dose chemotherapy and immunotherapy in adult Burkitt lymphoma: comparison of results in human immunodeficiency virus-infected and noninfected patients. *Cancer* 2008; 113: 117-25.
  55. Hoelzer D, Hiddemann W, Baumann A, et al. High survival rate in adults Burkitt's lymphoma/leukemia and diffuse large B-cell lymphoma with mediastinal involvement. *Blood* 2007; 110: 159a.
  56. Fielding AK, Rowe JM, Richards SM, Buck G, Moorman AV, Durrant IJ, et al. Prospective outcome data on 267 unselected adult patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia confirms superiority of allogeneic transplantation over chemotherapy in the pre-imatinib era: results from the International ALL Trial MRC UKALLXII/ECOG2993. *Blood* 2009; 113: 4489-96.
  57. 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.
  58. 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.
  59. Lee S, Kim YJ, Min CK, Kim HJ, Eom KS, Kim DW, et al. The effect of first-line imatinib interim therapy on the outcome of LALogeneic stem cell transplantation in adults with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2005; 105: 3449-57.
  60. Wassmann B, Pfeifer H, Goekbuget N, Beelen DW, Beck J, Stelljes M, et al. Alternating versus concurrent schedules of imatinib and chemotherapy as front-line therapy for Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+LAL). *Blood* 2006; 108: 1469-77.
  61. De Labarthe A, Rousselot P, Hugué-Rigal F, Delabesse E, Witz F, Maury S, et al. Imatinib combined with induction or consolidation chemotherapy in patients with de novo Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: results of the GRAAPH-2003 study. *Blood* 2007; 109: 1408-13.
  62. 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: 11: 303b.
  63. Ottmann OG, Wassmann B, Pfeifer H, Giagounidis A, Stelljes M, Dührsen U, et al. Imatinib compared with chemotherapy as front-line treatment of elderly patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+LAL). *Cancer* 2007; 109: 2068-76.
  64. 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 patients with acute lymphoblastic leukemia without additional chemotherapy: results of the Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto (GIMEMA) LAL0201-B protocol. *Blood* 2007; 109: 3676-8.
  65. Delannoy A, Delabesse E, Lhéritier 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.
  66. Foa R, Vitale A, Guarini A, et al. Dasatinib monotherapy effective and feasible as first-line treatment of adult Philadelphia-chromosome positive acute lymphoblastic leukemia: Final results of the GIMEMA LAL1205 study. Program and abstracts of the 50th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition; December 6-9, 2008; San Francisco, California. Abstract 305.
  67. Rousselot P, Cayuela JM, Hayette S, Recher C, Leguay T, Salanoubat C, et al. Dasatinib and chemotherapy for first-line therapy in elderly patients with de novo Philadelphia-positive ALL (EWALL-Ph-01: analysis of response and resistance. *Haematologica* 2009; 94 (s2): 195-6.
  68. Kantarjian H, Giles F, Wunderle L, Bhalla K, O'Brien S, Wassmann B, et al. Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive LAL. *N Engl J Med* 2006; 354: 2542-51.
  69. 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.
  70. Larson R, Ottmann O, Shah N, Lilly M, Reiffers J, Charbonnier A, et al. Dasatinib 140 Mg Once Daily (QD) Has Equivalent Efficacy and Improved Safety Compared with 70 Mg Twice Daily (BID) in Patients with Imatinib-Resistant or -Intolerant Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia (Ph+ ALL): 2-Year Data from CA180-035. *Blood* 2008; 112: Abstract 2926.
  71. 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.
  72. Goekbuget N, Leguay T, Hunault, Al-Nawakil C, Chevallerier P, Dombret H, et al. First European Chemotherapy Schedule for Elderly Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia: promising remission rate and feasible moderate dose intensity consolidation. *Blood* 2008; 112: 304.
  73. Martino R, Giral 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.
  74. Hamaki T, Kami M, Kanda Y, Yuji 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.
  75. Mohty M, Labopin M, Tabrizzi 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.
  76. Fielding AK, Richards SM, Chopra R, Lazarus HM, Litzow MR, Buck G, et al. Outcome of 609 adults after relapse of acute lymphoblastic leukemia (ALL); an MRC UKALL12/ECOG 2993 study. *Blood* 2007; 109: 944-50.
  - 76a. Tavernier E, Boiron JM, Hugué F, Bradstock K, Vey N, Kovacovics T, et al. Outcome of treatment after first relapse in adults with acute lymphoblastic leukemia initially treated by the LALA-94 trial. *Leukemia* 2007; 21: 1907-14.



77. Vives S, Oriol A, Tormo M, Brunet S, Del Potro E, Bueno J, et al. Outcome of 198 adults after relapsed of acute lymphoblastic leukemia (ALL) included in four consecutive first-line PETHEMA trials. *Haematologica* 2008; 93 (s1): 5.
78. Ribera JM, Feliu E. Nuevos fármacos en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda. *Med Clín (Barc)* 2007 (extraordinario 1): 68-74.
79. Dinndorf PA, Gootenberg J, Cohen MH, Keegan P, Pazdur R. FDA drug approval summary: pegaspargase (oncaspar) for the first-line treatment of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Oncologist* 2007; 12: 991-8.
80. Thomas DA, Sarris AH, Cortes J, Faderl S, O'Brien S, Giles FJ, et al. Phase II study of sphingosine in patients with recurrent or refractory adult acute lymphocytic leukemia. *Cancer* 2006; 106: 120-7.
81. Hunault-Berger M, Leguay T, Thomas X, Legrand O, Huguot F, Witz F, et al. A Randomised Phase II Study of Pegylated Liposomal Doxorubicin in Elderly Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL): The GRAALL-SA1 Study. *Blood*; 112: 918 (abstract).
82. 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.
83. 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: 1917-32.
84. Quintás-Cardama A, Tong W, Manshouri T, Vega F, Lennon PA, Cools J, et al. Activity of tyrosine kinase inhibitors against human NUP214-ABL1-positive T cell malignancies. *Leukemia* 2008; 22: 1117-24.
85. Real PJ, Tosello V, Palomero T, Castillo M, Hernando E, De Stanchina E, et al. Gamma-secretase inhibitors reverse glucocorticoid resistance in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* 2009; 15: 50-8.
86. Brown P, Levis M, Shurtleff S, Campana D, Downing J, Small D. FLT3 inhibition selectively kills childhood acute lymphoblastic leukemia cells with high levels of FLT3 expression. *Blood* 2005; 105: 812-20.
87. Paietta E, Li X, Richards S, Racevskis S, Dewald GW, Rowe JM, et al. Implications for the Use of Monoclonal Antibodies in Future Adult ALL Trials: Analysis of Antigen Expression in 505 B-Lineage (B-Lin) ALL Patients (pts) on the MRC UKALLXII/ECOG2993 Intergroup Trial. *Blood* 2008; 112: 1907 (abstract).
88. Thomas DA, O'Brien S, Jorgensen JL, Cortes J, Garcia-Manero G, et al. Prognostic significance of CD20 expression in adults with de novo precursor B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2008; doi:10.1182/blood-2008-04-151860.
89. Topp MS, Goekbuget N, Kufer P, Zugmaier G, Klinger M, Degenhard E, et al. Blinatumomab (anti CD19 bite) for targeted therapy of minimal residual disease (MRD) in patients with B precursor acute lymphoblastic leukemia (ALL): update of an ongoing Phase II study. *Haematologica* 2009; 94 (s2): 195 (abstract)
90. Raetz EA, Cairo MS, Borowitz MJ, Blaney SM, Krailo MD, Leil TA, et al. Chemoimmunotherapy reinduction with epratuzumab in children with acute lymphoblastic leukemia in marrow relapse: a Children's Oncology Group Pilot Study. *J Clin Oncol* 2008; 26: 3756-62.
91. Stock W, Yu D, Sanford B, et al. Incorporation of alemtuzumab into front-line therapy of adult acute lymphoblastic leukemia (LAL) is feasible: a phase I/II study from the Cancer and Leukemia Group B (CALGB 10102). Program and abstracts of the 47<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Hematology; December 10-13, 2005; Atlanta, Georgia. Abstract 145.

# Linfomas cerebrales primarios

F. GRAUS

*Jefe del Servicio de Neurología. Hospital Clínic. Barcelona*

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

La mayoría de los LCP tienen unas características anatomopatológicas homogéneas compatibles con los linfomas difusos de células grandes. Raramente la anatomía patológica demuestra otros patrones compatibles con linfomas de bajo grado y de comportamiento previsiblemente menos agresivo<sup>3</sup>. El 95% de los LCP son de tipo B con un inmunofenotipo que los clasificaría dentro del grupo de célula B activada de la clasificación de los linfomas difusos de células grandes<sup>4</sup>. Esto sugiere que los LCP se desarrollan a partir de una célula B que ha sido expuesta a la influencia de un centro germinal fuera del sistema nervioso. La adaptación y proliferación en el sistema nervioso probablemente se deba a la expresión diferencial de genes aún no bien conocidos. En un estudio en el que se compararon LCP con linfomas difusos de células grandes no cerebrales, se observó que los LCP expresaban un conjunto de genes diferentes relacionados con tropismo hacia el sistema nervioso<sup>5</sup>. Los linfomas T representan un 5% de los LCP y su presentación clínica y evolución no difiere de los de fenotipo B<sup>6</sup>. Se ha relacionado la presencia del LCP con la infección por el virus de Epstein-Barr (VEB). Mientras que la frecuencia de expresión de RNA de VEB es prácticamente del 100% en LCP de pacientes con SIDA, la frecuencia es prácticamente nula en LCP de pacientes no inmunodeprimidos. Estos resultados sugieren que la patogénesis de los LCP en pacientes con SIDA podría ser diferente del LCP de pacientes sin inmunodepresión.

---

## Clínica

El cuadro clínico de los pacientes con LCP dependerá de la localización, que suele afectar a la sustancia blanca de los hemisferios cerebrales y las áreas peri-

ventriculares. Los LCP se presentan como masas intraparenquimatosas en el 80-90% de los casos. Las lesiones son casi siempre supratentoriales, pero también afectan el tronco cerebral. El paciente puede presentar diversos síndromes neurológicos, que aparecen de manera aislada o simultáneamente, como hipertensión intracraneal, déficit focales, trastornos mentales y crisis convulsivas. Cerca del 10% de los LCP infiltran de manera difusa la región subependimaria de los ventrículos laterales. Esta localización es muy sugestiva de LCP. El cuadro clínico se manifiesta como un déficit cognitivo, trastornos de la marcha, déficits focales neurológicos y, mas raramente, hipertensión intracraneal<sup>1</sup>.

La presentación del LCP como linfomatosis meníngea es excepcional y representa menos del 5% de todos los LCP. La leptomeningitis linfomatosa es casi siempre secundaria a un LNH sistémico o a la diseminación de un LCP inicialmente intraparenquimatoso o periventricular. Por este motivo, el diagnóstico de linfoma meníngeo primario sólo puede aceptarse después de confirmar por neuroimagen la ausencia de lesiones linfomatosas y de realizar un exhaustivo estudio de extensión en el que no se detecte LNH sistémico y éste no aparezca durante el seguimiento del enfermo. La clínica de los LNH meníngeos primarios es indistinguible de la que se registra en la infiltración meníngea por un LNH sistémico. Suele haber afección de los nervios craneales, hipertensión intracraneal o alteraciones cognitivas, confusión o trastornos psiquiátricos. La extensión espinal puede ocasionar un síndrome de la cola de caballo, que a veces es la única manifestación clínica del linfoma<sup>7</sup>. De forma excepcional, el LCP puede presentarse como un tumor muy infiltrante sin formar masa. Los pacientes con esta variedad de LCP, denominada linfomatosis cerebral, suelen presentarse con cuadro de deterioro cognitivo<sup>8</sup>.

---

## Diagnóstico y estudio de extensión

El estudio neurorradiológico no aporta imágenes diagnósticas de LCP, pero algunas son muy sugestivas. En la TC o RM sin contraste el LCP se presenta como una (70% de casos) o varias lesiones circunscritas, de densidad homogénea, con poco efecto de masa en relación con el volumen del tumor, y rodeadas de poco edema. Tras la administración de contraste el tumor capta de manera intensa y uniforme,

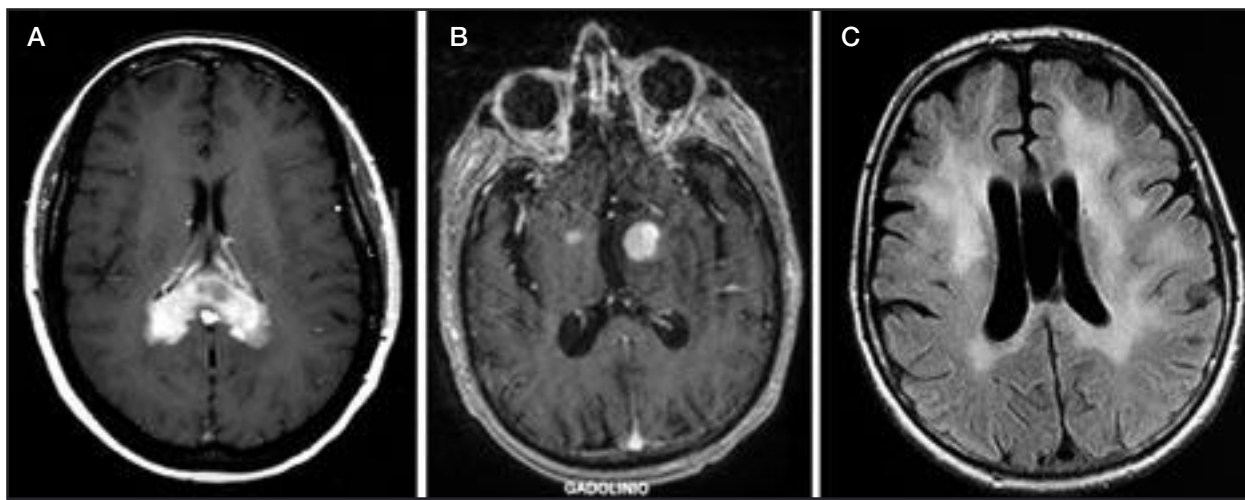


Figura 1. Imágenes de RM cerebral de pacientes con distintas formas de presentación de LCP. En secuencias potenciadas en T1 el LCP se presenta como masas que captan gadolinio de forma intensa de predominio periventricular (a) o revelando mas de una lesión (b). Raramente el LCP se presenta como una lesión difusa infiltrativa que no produce efecto de masa mostrándose como una afectación inespecífica de la sustancia blanca en secuencias potenciadas en T2 (c).

con bordes bien definidos, de modo similar a lo que ocurre en las metástasis. Esta apariencia radiológica descrita en los LCP no es constante, y en pacientes con SIDA el patrón es más variable: con mayor frecuencia de masas necróticas. En la forma de presentación periventricular se observan en la RM lesiones difusas hipodensas que infiltran de forma irregular las estructuras periventriculares, sobre todo de las astas frontales, de manera bilateral y simétrica. La lesión ocasiona un edema mínimo y se hace más manifiesta después de la administración de contraste (Figura 1).

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

Una vez confirmado el diagnóstico de LCP, debe realizarse un estudio de extensión, tanto para conocer la extensión local del LCP como para excluir la existencia de un linfoma sistémico. Así, procede efectuar un examen del LCR, siempre que no existan contraindicaciones, y si las hay, debe analizarse con detalle la RM con gadolinio para detectar captación en las meninges. Las exploraciones obligadas en el estudio de extensión del LCP son el estudio oftalmológico con lámpara de hendidura, la TC torácica y abdominal y la biopsia de médula ósea<sup>9</sup>. Recientemente, se ha sugerido que el rastreo con tomografía por emisión de positrones podría suplantar a la práctica de la TC torácica y abdominal y la biopsia de médula ósea

al demostrarse más sensible para detectar pequeños focos de linfoma sistémico<sup>10</sup>.

### Factores pronóstico

La baja incidencia del LCP ha limitado la publicación de series amplias donde se puedan analizar la presencia de factores pronóstico. En un estudio retrospectivo de 378 pacientes con LCP tratados en 23 centros diferentes se identificó como predictores de mortalidad la edad superior a 60 años, un estado funcional superior a 1 de la escala de la ECOG, niveles altos de LDH sérica o de proteínas en el LCR, y afectación de estructuras profundas del cerebro. Con estas variables se diseñó una escala en la que el valor 0 significaba el no tener ningún predictor favorable de mortalidad y el valor 5 el tenerlos todos. Al aplicar el modelo al subgrupo de 105 pacientes que recibieron quimioterapia basada en dosis altas de metotrexato se vio que los pacientes con valores pronósticos de 0-1 tenían una supervivencia media actuarial a los dos años del 80%, aquellos con valores de 2-3 del 48% y los de peor pronóstico (valores de 4-5) del 15%<sup>11</sup>.

Las limitaciones de esta escala pronóstica es la inclusión de valores de LCR que pueden faltar en pacientes en los que la punción lumbar esta contraindicada. En otro estudio de 77 pacientes tratados con el mismo protocolo se identificó como predictores de mortalidad la edad superior a 60 años, un estadio funcional superior a 1 de la escala de ECOG y la presencia de linfoma multifocal o con diseminación meníngea. La combinación de estas 3 variables permitió elaborar una escala de 0 (ningun predictor desfavorable) a 3 (todos los predictores desfavorables) con

predicciones de supervivencia similares a los del estudio previo<sup>12</sup>. Finalmente, se ha publicado una tercera escala que agrupa los pacientes en tres categorías pronósticas. Clase 1, pacientes de menos de 50 años; clase 2, pacientes de edad  $\geq 50$  años y índice de Karnofsky  $\geq 70$ ; y clase 3, pacientes de edad  $\geq 50$  años y índice de Karnofsky  $< 70$ <sup>13</sup>.

Recientemente, se ha descrito en una serie de 75 pacientes con LCP que la delección 6q22, que contiene el oncogen supresor PTPRK, presente en el 45% de los LCP y la translocación de BCL6, presente en 17%, son predictores de un cuadro clínico más agresivo y una menor supervivencia<sup>14</sup>. Si estos hallazgos son validados en otras series, se podrían incluir en modelos de estratificación de riesgo junto con las variables clínicas.

---

## Tratamiento

El LCP es un tumor maligno que sin tratamiento produce la muerte del paciente en pocas semanas. Los corticoides son citolíticos para el LCP y pueden causar una respuesta parcial o total hasta en el 40% de los pacientes no inmunodeprimidos. La respuesta, sin embargo, es de poca duración y no tiene efecto curativo ni predice una mejor evolución. La radioterapia holocraneal era hasta la última década el tratamiento estándar de los LCP. La sobrevida mediana de los pacientes no inmunodeprimidos tratados con radioterapia es de unos 11 meses con una tasa de sobrevida a los 2 años del 35%<sup>15</sup>.

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

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

2. Los fármacos más activos para el tratamiento del LCP en pacientes no inmunodeprimidos son el metotrexato a dosis mínimas de 1 g/m<sup>2</sup> y la citarabina a dosis de 3 g/m<sup>2</sup>. Los regímenes que incluyen estos fármacos junto con radioterapia consiguen una tasa de respuestas cercana al 80% y una sobrevida media de 3 años<sup>16</sup>. La dosis de metotrexato ideal sigue siendo un tema de debate. Es importante que la dosis

consiga unos niveles suficientes de fármaco en el parénquima cerebral y LCR durante un tiempo suficiente. Para ello es importante administrar la dosis en un periodo no inferior a 4 horas. Aunque la dosis aconsejable para alcanzar unos niveles de seguridad es de 3 g/m<sup>2</sup>, esquemas con dosis inferiores, pero siempre superiores a 1 g/m<sup>2</sup>, han demostrado tasas de respuesta similares. Este dato es importante al considerar que más del 50% de los pacientes con LCP tienen una edad superior a 60 años y su filtrado glomerular puede estar alterado con el consiguiente aumento de toxicidad al usar dosis muy altas de metotrexato.

Otro aspecto no resuelto es demostrar si el tratamiento aislado con metotrexato produce unos resultados similares a regímenes de poliquimioterapia. La tendencia es usar el metotrexato en combinación con otros fármacos liposolubles como nitrosureas o tio-tepa o fármacos en altas dosis para pasar la barrera hematoencefálica como la citarabina siguiendo el razonamiento que el tratamiento con monoterapia es poco probable que cure el LCP. En la actualidad no hay ningún esquema de poliquimioterapia que se haya demostrado superior.

3. La adición de quimioterapia intratecal no parece mejorar la tasa de respuestas completas ni la sobrevida. Aunque no hay estudios comparativos, el análisis retrospectivo de las series que han complementado el tratamiento sistémico con metotrexato intratecal no demuestra una superioridad clara frente a estudios que no usaron esta modalidad terapéutica<sup>17</sup>. El tratamiento intratecal se ha dado a través de un reservorio de Omayo. El tratamiento con reservorio es más práctico para el paciente y asegura una mejor distribución del fármaco en el LCR; sin embargo, la colocación del reservorio puede ser difícil en pacientes con ventrículos pequeños y no está exento de complicaciones, sobre todo, en centros con poca experiencia en la colocación de este reservorio.

---

## Neurotoxicidad

Un problema importante del tratamiento combinado de quimio y radioterapia propuesto para el LCP es su neurotoxicidad. Los pacientes afectados desarrollan un cuadro progresivo de trastorno de la marcha, incontinencia de esfínteres y deterioro cognitivo en los primeros años después de recibir el tratamiento. La RM demuestra una afectación difusa de la sustancia blanca y atrofia cerebral. También pueden aparecer lesiones captantes de gadolinio, generalmente periventriculares, que desaparecen de forma espontánea y pueden confundirse con recidiva del LCP. En pacientes mayores de 60 años, el riesgo de neurotoxicidad es muy alto, prácticamente del 100%, y se desaconseja el hacer radioterapia si el LCP está en remisión



al acabar la quimioterapia. Sin embargo, esta actitud disminuye de forma clara el periodo libre de recaída de la enfermedad. En pacientes más jóvenes, el tratamiento con radioterapia probablemente es importante para asegurar la curación del LCP. En un estudio retrospectivo, los pacientes de menos de 60 años que recibieron tras la quimioterapia una dosis de RT de 36 Gy tuvieron una tasa de recaídas significativamente superior a los que recibieron 54 Gy<sup>18</sup>.

Una alternativa a considerar para mejorar los resultados y disminuir la toxicidad es sustituir la radioterapia por dosis más altas de quimioterapia seguidas de un autotrasplante de progenitores hematopoyéticos. Los pocos estudios realizados hasta el momento no nos permiten sacar conclusiones firmes. Sin embargo, el tratamiento estándar de condicionamiento en el autotrasplante de linfomas sistémicos, el protocolo BEAM, no ha dado los resultados esperados, probablemente porque los fármacos no son los más apropiados para tratar una enfermedad protegida por la barrera hematoencefálica. Los tratamientos basados en tiotepa ofrecen unos resultados discretamente mejores con una supervivencia a los 5 años del 87%, mientras que con el régimen BEAM la supervivencia publicada oscila entre el 60-67,5% a los 4 años<sup>19</sup>. Con la información actual, no se sabe si el autotrasplante puede ser una alternativa al tratamiento con RT holocraneal, pero los estudios han demostrado un buen perfil de toxicidad incluso en paciente mayores de 60 años.

### Tratamiento de la recaída

Los tratamientos actuales del LCP basados en protocolos que incluyen dosis altas de metrotexato y radioterapia holocraneal sólo consiguen que un 40-50% de los pacientes menores de 60 años estén libres de enfermedad y este porcentaje baja a menos del 20% en pacientes de edad > 60 años. Por tanto, el LCP recaerá en un número importante de pacientes generalmente dentro de los tres primeros años después del tratamiento inicial. En la actualidad no hay una estrategia única y el tratamiento ha de recomendarse en base a la edad del paciente, estado funcional y tratamientos previos recibidos. En pacientes menores de 70 años con buen estado general, se puede valorar la posibilidad de hacer un tratamiento de rescate que incluya un autotrasplante. En un estudio reciente, 43 pacientes con LCP recurrente o refractario se trataron con dos ciclos de dosis altas de citarabina y etopósido seguido de un autotrasplante (condicionamiento con tiotepa, busulfan y ciclofosfamida). Al final del estudio, la supervivencia actuarial a los dos años fue del 69% (76% para los que se trasplantaron en remisión completa)<sup>20</sup>. Aquellos pacientes que no pueden

entrar en un protocolo de autotrasplante, una alternativa con un perfil relativamente bajo de toxicidad es el tratamiento con temozolomida sola o asociada con rituximab. En estos esquemas, el porcentaje de supervivencia al año es del 31-58%<sup>21</sup>. Finalmente, se puede considerar el rescate con radioterapia holocraneal en pacientes de edad inferior a 60 años y que no hayan recibido radioterapia como parte del esquema de tratamiento inicial.

### Conclusiones

El LCP es un tumor cerebral poco frecuente pero su diagnóstico correcto y rápido es importante, ya que con los tratamientos actuales se puede garantizar la curación en casi la mitad de los pacientes menores de 60 años. Todo y los avances en su tratamiento, aun quedan preguntas importantes por responder específicamente si esquemas de tratamiento más intensivos con autotrasplante de progenitores hematopoyéticos podrían sustituir el tratamiento con radioterapia holocraneal y encontrar nuevas estrategias de tratamiento de rescate para los pacientes que recidivan.

### Bibliografía

1. Batchelor T, Loeffler JY. Primary CNS lymphoma. *J Clin Oncol* 2006; 24: 1281-8.
2. Bessell EM, Hoang-Xuan K, Ferreri AJM, Reni M. Primary central nervous system lymphoma. Biological aspects and controversies in management. *Eur J Cancer* 2007; 43: 1141-52.
3. Jahnke K, Korfel A, O'Neill BP, et al. International study on low-grade primary central nervous system lymphoma. *Ann Neurol* 2006; 59: 755-62.
4. Camilleri-Broet S, Criniere E, Broet P et al. A uniform activated B-cell-like immunophenotype might explain the poor prognosis of primary central nervous system lymphomas: analysis of 83 cases. *Blood* 2006; 107: 190-6.
5. Tun HW, Personett D, Baskerville KA, et al. Pathway analysis of primary central nervous system lymphoma. *Blood* 2008; 111: 3200-10.
6. Shenkier TN, Blay JY, O'Neill BP, et al. Primary CNS lymphoma of T-cell origin: A descriptive analysis from the international primary CNS lymphoma collaborative group. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2233-9.
7. Lachance DH, O'Neill BP, MacDonald DR, et al. Primary leptomeningeal lymphoma: report of 9 cases, diagnosis with immunocytochemical analysis, and review of the literature. *Neurology* 1991; 41: 95-100.
8. Kanai R, Shibuya M, Hata T, et al. A case of "lymphomatosis cerebri" diagnosed in an early phase and treated by whole brain radiation: case report and literature review. *J Neurooncol* 2008; 86: 83-8.
9. Abrey L, Batchelor TT, Ferreri AJM, et al. Report of an international workshop to standardize baseline evaluation and response criteria for primary CNS lymphoma. *J Clin Oncol* 2005; 23: 5034-43.
10. Mohile NA, DeAngelis LM, Abrey LE. The utility of body FDG PET in staging primary central nervous system lymphoma. *Neuro-Oncology* 2008; 10: 223-8.



11. Ferreri AJM, Blay JY, Reni M, et al. Prognostic scoring system for primary CNS lymphomas: The international extranodal lymphoma study group experience. *J Clin Oncol* 2003; 21: 266-72.
12. Bessell EM, Graus F, López-Guillermo A, et al. Primary non-Hodgkin lymphoma of the CNS treated with CHOD/BVAM or BVAM chemotherapy before radiotherapy: long-term survival and prognostic factors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 59: 501-8.
13. Abrey LE, Ben-Porat L, Panaceas KS et al. Primary central nervous system lymphoma: The Memorial Sloan-Kettering Cancer Center prognostic model. *J Clin Oncol* 2006; 24: 5711-5.
14. Cady FM, Law ME, Gianni C, et al. del (6)(q22) and BCL6 rearrangements in primary central nervous system lymphoma (PCNSL) are indicators of an aggressive clinical course. *J Clin Oncol* 2008; 26: 4814-9.
15. Nelson FD, Martz KL, Bonner H, et al. Non-Hodgkin's lymphoma of the brain: can high dose, large volume radiation therapy improve survival? Report of a prospective trial by the Radium Therapy Oncology Group. *Int J Radiol Biol Phys* 1992; 23: 9-17.
16. DeAngelis LM, Seiferheld W, Schold C, et al. Combination chemotherapy and radiotherapy for primary central nervous system lymphoma: Radiation therapy oncology group study 93-10. *J Clin Oncol* 2002; 20: 4643-8.
17. Khan RB, Shi W, Thaler HT, et al. Is intrathecal methotrexate necessary in the treatment of primary CNS lymphoma? *J Neurooncol* 2002; 58: 175-8.
18. Bessell EM, Lopez-Guillermo A, Villa S, et al. Importance of radiotherapy in the outcome of patients with primary CNS lymphoma : An analysis of the CHOD/BVAM regimen followed by two different radiotherapy treatments. *J Clin Oncol* 2002; 20: 231-6.
19. Ferreri AJM, Crocchiolo R, Assanelli, et al. High-dose chemotherapy supported by autologous stem cell transplantation in patients with primary central nervous system lymphoma: facts and opinions. *Leukemia lymphoma* 2008; 49: 2042-7.
20. Soussain C, Hoang-Xuan K, Taillandier L, et al. Intensive chemotherapy followed by hematopoietic stem-cell rescue for refractory and recurrent primary CNS and intraocular lymphoma: Societe française de greffe de moëlle osseuse-thérapie cellulaire. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2512-8.
21. Reni M, Mazza E, Foppoli M, Ferreri AJM. Primary central nervous system lymphomas: salvage treatment after failure to high-dose methotrexate. *Cancer letters* 2007; 258: 165-70.

# Mieloma múltiple en pacientes de edad avanzada

J. BLADÉ, L. ROSIÑOL, M<sup>a</sup> T. CIBEIRA, C. FERNÁNDEZ DE LARREA

Instituto de Hematología y Oncología. Servicio de Hematología. IDIBAPS. Hospital Clínic. Barcelona

---

## Introducción

El mieloma múltiple (MM) se caracteriza por una proliferación de células plasmáticas de carácter neoplásico que producen una proteína monoclonal que se puede encontrar en suero y/u orina. Representa el 1% de todas las neoplasias y alrededor del 15% de las hemopatías malignas. La edad mediana de los pacientes con MM es de 65-70 años. Las principales manifestaciones clínicas son el dolor óseo, anemia, hipercalcemia, insuficiencia renal, infecciones bacterianas de repetición y/o plasmocitomas extramedulares. A pesar de la introducción de los agentes alquilantes, de los glucocorticoides y del trasplante de progenitores hematopoyéticos, la supervivencia de los pacientes con MM es insatisfactoria, con medianas de alrededor de 3 años para los pacientes mayores de 65 años y de 5-6 años para los enfermos más jóvenes. El empleo de los llamados “nuevos fármacos” está mejorando los resultados en términos de tasa de respuestas y de supervivencia<sup>1</sup>.

---

## La edad como factor pronóstico

La edad constituye un factor pronóstico *per se*, independientemente de que pueda condicionar un tipo de tratamiento u otro. Así, en un estudio del grupo PETHEMA, la mediana de supervivencia para los pacientes mayores y menores de 70 años fue de 23 y 33 meses, respectivamente<sup>2</sup>. En esta serie, las características en el momento de diagnóstico y la respuesta al tratamiento fueron similares en ambos grupos de edad. De otro lado, en la experiencia de la Clínica Mayo, la mediana de supervivencia en pacientes menores de 40 y 30 años fue 54 y 87 meses, respectivamente<sup>3</sup>. Por último, en un análisis reciente del International Myeloma Working Group, la supervivencia de los pacientes menores de 50 años fue claramente superior a la de los mayores de 50 años (mediana, 5,2 vs. 3,7 años)<sup>4</sup>. Un análisis multivariante mostró que la edad era un factor pronóstico independiente en los pacientes tratados con quimioterapia convencional. En este estudio, los pacientes menores de 50 años presentaron factores pronósticos más favorables que los pacientes de edad más avanzada, incluyendo un índice pronóstico internacional más bajo<sup>4</sup>.

---

## Tratamiento inicial

Los pacientes mayores de 65 años y los que siendo más jóvenes tienen enfermedades asociadas, como trastornos cardiopulmonares, insuficiencia renal no reversible entre otras, no son candidatos a tratamiento de intensificación con autotrasplante. En estos enfermos, el tratamiento ha consistido en agente alquilantes, básicamente melfalán y prednisona o bien en regímenes basados en dexametasona. Con estos tratamientos la tasa de respuestas se sitúa alrededor del 50% con menos del 5% de remisiones completas (RC) y con medianas de supervivencia que no superan los 3 años. La asociación de los llamados nuevos fármacos con mecanismo de acción distinto al de la quimioterapia convencional (talidomida, bortezomib y lenalidomida), bien a agentes alquilantes o a dexametasona está dando lugar a un incremento significativo de la tasa de respuestas y de la supervivencia libre de progresión (SLP) en prácticamente todos los estudios y a una prolongación significativa de la supervivencia global (SG) en varios de ellos.

El grupo Francés IFM comparó el tratamiento con MP frente a dos ciclos de quimioterapia con VAD seguido de dos ciclos de intensificación (autotrasplante) con melfalán-100 y con MP-talidomida. (MPT) en pacientes con edad comprendida entre 65 y 75 años<sup>5</sup>. La asociación de MPT dio lugar a una mayor tasa de respuesta global y RC, así como a una prolongación significativa tanto de la SLP como de la SG. El mismo grupo comparó MP frente a MPT (con dosis de talidomida de 100 mg/día) en pacientes mayores de 75 años. La tasa de respuestas fue superior con MPT, pero lo más importante es que en esta población de edad tan avanzada, la SLP y la SG fueron significativamente más prolongadas con MPT que con MP (24,1 vs. 19 y 45,3 vs. 27,7 meses, respectivamente<sup>6</sup>). El grupo Italiano también ha referido un aumento significativo en la tasa de respuestas y de RC así como una mayor SLP con MPT frente a MP<sup>7</sup>. Sin embargo, la supervivencia global fue similar. El grupo Nórdico y el grupo Holandés HOVON refirieron una prolongación significativa de la SLP en favor de la combinación MPT, sin que ello se tradujera en una prolongación de la supervivencia global<sup>9,10</sup>. La neuropatía periférica es la principal complicación del tratamiento con regímenes que incluyan talidomida. De otro lado, el riesgo de trombosis venosa profunda obliga

a efectuar profilaxis antitrombótica cuando la talidomida se asocia a agentes citostáticos como melfalán o adriamicina o a dosis elevadas de glucocorticoides, hecho que obliga a una anticoagulación profiláctica<sup>8</sup>.

En un estudio fase I/II del grupo cooperativo PETHEMA, la asociación de MP con boertezomib (MPV) mostró resultados muy prometedores con una tasa de RC del 32%<sup>11</sup>. En un amplio estudio posterior fase III, la asociación MPV se comparó con MP (ensayo clínico VISTA). La tasa global de respuestas (71 vs. 36%), de RC (30 vs. 4%), la SLP (mediana, 24 vs. 16,6 meses) y la supervivencia global (82,6 vs. 69,5% a los dos años de seguimiento) fueron superiores con MPV<sup>12</sup>. Otro hecho interesante es que el régimen MPV fue superior a MP en todos los subgrupos pronósticos incluyendo los pacientes con citogenética de mal pronóstico (t(4;14), t(14;16) y delección de 17p. La principal toxicidad de MPV es la neuropatía periférica/dolor neuropático debida al bortezomib<sup>12</sup>.

En un estudio fase II, la asociación de MP con lenalidomida (MPR) dió lugar a una tasa de respuestas del 81%, incluyendo un 24% de RC. La SLP y la SG al año de seguimiento fueron del 92% y 100%, respectivamente<sup>13</sup>. Se ha llevado a cabo un amplio estudio internacional en el que se compara la combinación MPV frente a MP, de cuyos resultados se podrá disponer en breve.

Por lo que concierne a la asociación de nuevos fármacos con dexametasona, las principales combinaciones en pacientes de edad avanzada son talidomida/dexametasona (TD) y lenalidomida/dexametasona (Len/Dex). Ludwig *et al.*<sup>14</sup> compararon la eficacia de TD vs. MP. Si bien la tasa de respuestas con TD fue superior (68 vs. 51%), la SG fue significativamente más prolongada con MP (mediana, 49,4 vs. 41,5 meses) debido a la mayor toxicidad de TD, en particular en los pacientes de edad más avanzada<sup>(14)</sup>. En un amplio estudio internacional fase III, la asociación TD fue superior a dexametasona sola en términos de respuesta (63 vs. 46%) y tiempo hasta progresión (22,6 vs. 8,5 meses)<sup>15</sup>. Sin embargo, la tasa de RC con TD fue de tan solo el 7,7% y, además, es posible que este régimen no sea óptimo para pacientes con plasmocitomas extramedulares<sup>16</sup>. Los resultados preliminares del grupo Inglés MRC muestran resultados muy prometedores, incluyendo una tasa de RC del 22%, con la asociación de ciclofosfamida a TD (CTD)<sup>1</sup>.

En un estudio fase II, la asociación Len/Dex dió lugar a una tasa de respuestas del 91% con una supervivencia a los tres años de 88%<sup>17</sup>. Por otra parte, en un amplio estudio fase III del Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) se comparó la asociación de Len/Dex con dosis plenas de dexametasona frente a Len/Dex con dosis bajas de dexametasona (40 mg/

semanal). La tasa de respuestas fue inferior utilizando dosis bajas de dexametasona; sin embargo, la supervivencia global a uno y a dos años de seguimiento fue superior en la rama de dosis bajas de dexametasona debido a la menor toxicidad de este régimen<sup>18</sup>. La diferencia fue más acusada en los pacientes mayores de 65 años. Obviamente, este estudio requiere un mayor seguimiento.

Actualmente se están llevando a cabo numerosos ensayos clínicos en fase III en los que se investiga la toxicidad y eficacia de asociaciones que contienen dos de los nuevos fármacos (MPT-bortezomib, TD-bortezomib o talidomida-bortezomib-prednisona), así como nuevos esquemas o formas de administración del bortezomib (semanal, subcutáneo), cuyos resultados se están empezando a referir de forma preliminar.

De todo lo anterior se desprende que la asociación de un régimen "clásico", como MP o dexametasona, con uno de los nuevos agentes (talidomida, bortezomib o lenalidomida) se están convirtiendo en el tratamiento de elección en los pacientes con MM de edad avanzada. También parece que la asociación con MP da lugar a una mayor tasa de respuestas que la asociación de un nuevo fármaco con dexametasona.

Por lo que se refiere a las asociaciones MPT y MPV, los resultados en términos de respuesta y supervivencia son similares (Tabla 1). Una vez aprobados para su uso en primera línea, la elección del tratamiento dependerá de la edad, forma de presentación de la enfermedad, resultados del estudio citogenético y preferencia del paciente (Tabla 2). Así, para los pacientes con enfermedad con datos de mal pronóstico (afección extramedular con gran afección esquelética o plasmocitomas extraóseos, o bien, con citogenética de mal pronóstico) el tratamiento de elección sería MPV. En caso de enfermedad más "acumulativa" que "proliferativa" (gran componente M con anemia, infecciones de repetición sin gran destrucción esquelética), el tratamiento inicial de elección sería MPT (con dosis de talidomida de 100 mg para los mayores de 75 años o pacientes con gran comorbilidad).

Si el paciente tiene neuropatía periférica, el tratamiento de elección consiste en una combinación que incluya lenalidomida (Len/Dex o MPR). En pacientes con insuficiencia renal significativa (creatinina sérica superior a 2 mg/dL) se debe evitar la administración de melfalán y en esta situación la asociación de bortezomib/dexametasona podría ser el mejor tratamiento. Si por razones logísticas, el paciente no puede acudir con la frecuencia necesaria al hospital para que se le administre el bortezomib, se le debe ofrecer un tratamiento oral que incluya talidomida o lenalidomida<sup>19</sup>.

**Tabla 1. Tratamiento inicial para pacientes con mieloma no elegibles para trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos.**

Autor	Año	Esquema	RG (%)	RC (%)	SLP	SG
Facon <i>et al.</i> <sup>5</sup>	2007	MPT / MP	76/35	13/2	RR 0,5 (a favor de MPT)	51,6/33,2 meses
Hulin <i>et al.</i> <sup>6</sup>	2007	MPT / MP	62/31	7/1	24,1/19 meses	45,3/27,7 meses
Palumbo <i>et al.</i> <sup>7</sup>	2008	MPT / MP	76/47	15,5/2,4	54/27% a 2 años	80/64% a 3 años
Wijermans <i>et al.</i> <sup>10</sup>	2008	MPT/ MP	66/47	2/2	13/9 meses	37/30 meses
San Miguel <i>et al.</i> <sup>12</sup>	2008	MPV / MP	71/36	30/4	24/16,6 meses	82,6/69,5% a 2 años
Palumbo <i>et al.</i> <sup>13</sup>	2007	MPR	81	24	92% a 1 año	100% a 1 año
Ludwig <i>et al.</i> <sup>14</sup>	2008	TD / MP	68/51	14/7	43/25 meses	58/45 meses
Rajkumar <i>et al.</i> <sup>18</sup>	2008	Len/Dex / Len/dex	82/70	-	87/75% a 2 años	-

RG: respuesta global; RC: respuesta completa; SLP: supervivencia libre de progresión; SG: supervivencia global; MPT: melfalán, prednisona y talidomida; MP: melfalán y prednisona; MPV: melfalán, prednisona y bortezomib; MPR: melfalán, prednisona y lenalidomida; TD: talidomida y dexametasona; Len: lenalidomida; Dex: dexametasona (altas dosis); dex: dexametasona (bajas dosis); RR: riesgo relativo.

### Tratamiento de pacientes con mieloma resistente o en recaída

El tratamiento de los pacientes con MM resistente o en recaída es complejo y se deben tener en cuenta las siguientes consideraciones: 1) el tipo de tratamiento inicial; 2) el grado y la duración de la respuesta inicial (si la respuesta ha durado más de 2 años, la mejor actitud puede consistir en repetir la opción inicial); 3) estado general y edad en el momento de la recaída (en pacientes con mal estado general y/o edad muy avanzada se deben considerar aproximaciones más conservadoras); 4) tipo de recaída (en recaídas agresivas considerar combinaciones con bortezomib, mientras que recídas menos “agresivas” se pueden tratar inicialmente con regímenes que contengan talidomida o lenalidomida, reservando el bortezomib para ulteriores fases de la enfermedad; y 5) toxicidad previa (en pacientes con neuropatía periférica se deben evitar la talidomida y el bortezomib).

En una revisión reciente sobre el tratamiento del MM con talidomida se hace énfasis en que la tasa de respuestas a la talidomida cuando se adminis-

tra como agente único se sitúa entre el 30 y el 40%, mientras que cuando se combina con dexametasona con o sin agentes citostáticos, la tasa de repuesta puede alcanzar el 70%. De otro lado, se destaca que los plasmocitomas extramedulares raramente responden al tratamiento con talidomida

El bortezomib administrado en monoterapia produce una tasa de respuestas del 35% en pacientes con enfermedad avanzada y resistente al tratamiento<sup>20</sup>. Un estudio fase III mostró que el bortezomib es superior a dexametasona en términos de tasa de respuestas, SLP y SG<sup>21</sup>. De otro lado, un análisis de este mismo ensayo clínico con mayor seguimiento mostró una tasa de respuesta global y de RC del 43% y 9%, respectivamente, así como una asociación significativa entre la calidad de la respuesta y la duración de la misma<sup>22</sup>. Por último, un amplio estudio fase III mostró que la asociación de bortezomib y doxorubicina liposómica pegilada era superior a la administración de bortezomib en monoterapia en términos de RC, SLP y SG<sup>23</sup>.

La combinación de lenalidomida/dexametasona da lugar a una tasa de respuesta global del 60% incluyendo un 15% de RC frente a un 20-24% con 1-4% de RC con dexametasona sola<sup>24,25</sup>. Comparado con dexametasona en monoterapia, la asociación de Len/Dex fue superior no sólo en tasa de respuestas sino también en SLP y SG<sup>24,25</sup>. En la Tabla 3 se resumen los principales ensayos clínicos llevados a cabo en pacientes con MM resistente o en recaída.

Cabe destacar que se están llevando a cabo muchos ensayos clínicos que incluyen 3 o 4 fármacos combinando agentes “clásicos” y “nuevos” en los que se refiere una elevada tasa de respuestas. Sin embargo, a nuestro juicio, estos estudios tienen una serie de inconvenientes como son escaso número de pacientes, un posible sesgo en la selección de pacientes con pronóstico más favorable, seguimiento corto, toxicidad no despreciable y limitación de opciones de rescate

**Tabla 2. Tratamiento ajustado para pacientes de edad avanzada con mieloma múltiple**

	Esquema de tratamiento
Enfermedad “agresiva”	MPV
Enfermedad “no agresiva”	MPT
Citogenética de mal pronóstico	MPV
Insuficiencia renal	Bortezomib/Dexametasona
Historia de neuropatía periférica	Esquemas basados en lenalidomida
Muy ancianos	MPT (con talidomida 100 mg/día)
Logística	MPT/Esquemas basados en lenalidomida

MPV: melfalán, prednisona y bortezomib; MPT: melfalán, prednisona y talidomida.

Tabla 3. Ensayos clínicos aleatorizados en mieloma múltiple refractario o en recaída

Autor	Año	Esquema	RG (%)	RC (%)	SLP	SG
Richardson <i>et al.</i> <sup>22</sup>	2005	Bort / Dex	38/18	6/1	6,2/3,5	80/60% a 1 año
Orlowski <i>et al.</i> <sup>23</sup>	2007	Bort + Dox / Bort	44/41	4/2	9,3/6,5	76/65% a 15 meses
Weber <i>et al.</i> <sup>24</sup>	2007	Len/Dex / Dex	61/19,9	14,1/0,6	11,1/4,7	29,6/20,2 meses
Dimopoulos <i>et al.</i> <sup>25</sup>	2007	Len/Dex / Dex	60,2/24	15,9/3,4	11,3/4,7	NA/20,6 meses

RG: respuesta global; RC: respuesta completa; SLE: supervivencia libre de progresión; SG: supervivencia global; Bort: bortezomib; Dox: doxil; Len: lenalidomida; Dex: dexametasona; NA: no alcanzada.

para recaídas ulteriores. Los autores de esta revisión son partidarios de una aproximación terapéutica secuencial a lo largo de las subsiguientes recaídas que un paciente pueda presentar. La selección del tratamiento dependerá de la exposición y respuesta previas, de la toxicidad, de la edad y estado general del paciente y del tipo de recaída (“agresiva” vs. “indolente”).

### Consideraciones finales

De todo lo anterior resulta evidente que en la última década hemos asistido a avances terapéuticos en los pacientes con MM. De hecho, tres estudios han mostrado un incremento significativo en la supervivencia de los pacientes con esta enfermedad en los últimos años<sup>26-28</sup>. El Grupo de la Clínica Mayo ha observado una prolongación significativa de la supervivencia, tanto para los pacientes de nuevo diagnóstico como tras la recaída<sup>27</sup>. De hecho, en su serie de 2.981 pacientes de nuevo diagnóstico la supervivencia de los pacientes diagnosticados en la última década fue superior a los diagnosticados en un periodo anterior (mediana, 45 vs. 30 meses)<sup>27</sup>. Un estudio del grupo Nórdico<sup>26</sup> y otro del grupo de Brenner<sup>28</sup> también muestran un incremento significativo de la supervivencia en los pacientes diagnosticados en los últimos años. Sin embargo, en ambos estudios la prolongación de la supervivencia se limita a los pacientes menores de 60 años y se atribuye, al menos en parte, al impacto de la intensificación con autotrasplante<sup>26,28</sup>. A mayor abundamiento, una publicación reciente de Brenner *et al.*<sup>29</sup> donde se analiza la supervivencia relativa proyectada para los pacientes con MM diagnosticados entre 2006 y 2010 y, tras un análisis estadístico complejo, encuentran que se espera un incremento significativo de la supervivencia en los pacientes menores de 45 años y concluyen que el prolongar de forma significativa la supervivencia en la población de edad avanzada continúa siendo un desafío. Aun estando plenamente de acuerdo en esta afirmación, los autores de la presente revisión están convencidos de que la mejoría se va a producir. La base de nuestro convencimiento radica tanto en los resultados tan esperanzadores de los ensayos clínicos, tanto en primera línea como en recaída, como en

la prolongación de la supervivencia referida en los pacientes diagnosticados en la última década en instituciones altamente especializadas en el tratamiento de esta enfermedad. Los pilares en que descansa la obtención de una mejoría significativa de la supervivencia y calidad de vida de los pacientes con mieloma de edad avanzada son los siguientes: 1) disponibilidad de fármacos y combinaciones más efectivos; 2) el empleo de un tratamiento inicial individualizado optimizando el uso de MPT, MPV y Len/Dex de acuerdo con la edad, estado general, forma de presentación de la enfermedad y comorbilidad; 3) selección del mejor tratamiento de rescate tras la recaída empleando los fármacos disponibles de forma secuencial tomando en consideración el tratamiento previo, el grado y la duración de la respuesta y la toxicidad; 4) una cuidadosa evaluación de la respuesta, de la recaída serológica y de la recaída clínica al objeto de evitar tanto tratamiento innecesario como el diferir el tratamiento cuando está indicado; 5) prevención y tratamiento adecuado de la neuropatía y de los fenómenos tromboembólicos; y 6) tratamiento de soporte adecuado de las principales complicaciones, tratando de optimizar el uso de la eritropoyetina, y bisfosfonatos, profilaxis y tratamiento de las complicaciones infecciosas, así como una aproximación adecuada en los pacientes con insuficiencia renal<sup>30</sup>.

### Bibliografía

- Blade J, Rosiñol L. Advances in therapy of multiple myeloma. *Curr Opin Oncol* 2008; 20: 697-704.
- Bladé J, Muñoz M, Fontanillas M, et al. Treatment of multiple myeloma in elderly people: long-term results in 178 patients. *Age & Ageing* 1996; 25: 357-61.
- Bladé J, Kyle RA, Greipp PR. Presenting features and prognosis in 72 patients with multiple myeloma who were younger than 40 years. *Br J Haematol* 1996; 95: 345-51.
- Ludwig H, Durie BGM, Bolejack V, et al. Myeloma in patients younger than age 50 years presents with more favorable features and shows better survival: an analysis of 10,549 patients from the International Myeloma Working Group. *Blood* 2008; 111: 4039-47.
- Facon T, Mary JY, Hulin C, et al. Melphalan and prednisone plus thalidomide versus melphalan and prednisone or reduced-intensity autologous stem cell transplantation in elderly patients with multiple myeloma. *Lancet* 2007; 370: 1209-18.



6. Hulin C, Facon T, Rodon P, et al. Comparison of melphalan-prednisone thalidomide (MPT) demonstrates a significant survival advantage in elderly patients > 75 years with multiple myeloma compared with melphalan-prednisone (MP) in a randomized double-blind, placebo controlled trial. *J Clin Oncol* 2009 (in press).
7. Palumbo A, Bringhen S, Liberati AM, et al. Oral melphalan, prednisone and thalidomide in elderly patients with multiple myeloma: updated results from a randomized controlled trial. *Blood* 2008; 112: 3107-14.
8. Palumbo A, Rajkumar SV, Dimopoulos MA, et al. Prevention of thalidomide and lenalidomide-associated thrombosis in myeloma. *Leukemia* 2008; 111: 2521-6.
9. Waage A, Gimsing P, Juliusson G, et al. Melphalan-prednisone-thalidomide to newly diagnosed patients with multiple myeloma: a placebo-controlled phase III trial. *Blood* 2007; 110: 32a.
10. Wiejermans P, Schaafsme M, van Norden , et al. Melphalan+prednisone-thalidomide in induction therapy for multiple myeloma in elderly patients : final analysis of the Dutch Cooperative HOVON 49 study. *Blood* 2008; 112:241 (Abstract).
11. Mateos MV, Hernández JM, Hernández MT, et al. Bortezomib plus melphalan and prednisone in elderly untreated patients with multiple myeloma: up-dated time-to-event results and prognostic factors for time to progression, *Haematologica* 2008; 93: 560-5.
12. San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK, et al. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med* 2008; 359: 906-17.
13. Palumbo A, Falco P, Corradini P, et al. Melphalan, prednisone and lenalidomide treatment for newly diagnosed myeloma: a report from GIMEMA – Italian Multiple Myeloma Network. *J Clin Oncol* 2007; 25: 4459-65.
14. Ludwig H, Tothova E, Hajek R, et al. Thalidomide-dexamethasone compared to melphalan.prednisolone in elderly patients with multiple myeloma. *Blood* 2009; 113: 3435-42.
15. Rajkumar SV, Rosiñol L, Hussein M, et al. A multicentric, randomised, doubleblind, placebo-controlled study of thalidomide plus dexamethasone versus dexamethasone as initial therapy for newly diagnosed multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2171-7.
16. Rosiñol L, Cibeira MT, Bladé J, et al. Escape of extramedullary disease to the thalidomide effect in multiple myeloma. *Haematologica* 2004; 89: 832-6.
17. Lacy MQ, Gertz MA, Dispenzieri A, et al. Long-term results of response to therapy, time to progression, and survival with lenalidomide plus dexamethasone in newly diagnosed myeloma. *Mayo Clin Proc* 2007; 82: 1179-84.
18. Rajkumar SV, Jacobus S, Callender N, et al, A randomized trial of lenalidomide plus high-dose dexamethasone versus lenalidomide plus low-dose dexamethasone in newly diagnosed multiple myeloma (E4A03): a trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol* 2008; 26 (Abstract 8504).
19. Palumbo A, Facon T, Sonneveld P, et al. Thalidomide for treatment of multiple myeloma: 10 years later. *Blood* 2008; 111: 3968-77.
20. Richardson P, Barlogie B, Berenson J, et al. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N Engl J Med* 2003; 348: 2609-17.
21. Richardson P, Sonneveld P, Schuster MW, et al. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med* 2005; 352: 2487-98.
22. Richardson P, Sonneveld P, Schuster MW, et al. Extended follow-up of a phase III trial in relapsed multiple myeloma: final time-to-event results of the APEX trial. *Blood* 2007; 110: 3557-70.
23. Orłowski RZ, Nagler A, Sonneveld P, et al. Randomized phase III study of pegylated liposomal doxorubicin plus bortezomib compared to bortezomib alone in relapsed or refractory multiple myeloma: combination therapy improves time to progression. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3892-01.
24. Weber D, Chen C, Niesvizki R, et al. Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed multiple myeloma in North America. *N Engl J Med* 2007; 357: 2133-42.
25. Dimopoulos MA, Spencer A, Attal M, et al. Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 2007; 357: 2123-32.
26. Kristinsson SY, Landgren O, Dickman PW, et al. Patterns of survival in multiple myeloma: a population-based study of patients diagnosed in Sweden from 1973 to 2003. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1993-9.
27. Brenner H, Gonds A, Pulte D. Recent major improvement in long-term survival of younger patients with multiple myeloma. *Blood* 2008; 111: 2521-6.
28. Kumar SK, Rajkumar SV, Dispenzieri A, et al. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood* 2008; 111: 2516-20.
29. Brenner H, Gonds A, Pulte D. Expected long-term survival of patients diagnosed with multiple myeloma in 2006-2010. *Haematologica* 2009; 94: 270-5.
30. Bladé J, Rosiñol L. Changing paradigms in the treatment of multiple myeloma. *Haematologica* 2009; 94: 163-6.

# Enfermedad injerto contra huésped crónica: fisiopatología, clasificación y tratamiento

J.A. PÉREZ-SIMÓN

Servicio de Hematología. Hospital Clínico Universitario de Salamanca

## Introducción

El número de trasplantes alogénicos realizados a nivel mundial se incrementa año tras año. En la actualidad se realizan más de 20.000 trasplantes anuales. Si bien los resultados han mejorado significativamente en los últimos años, la enfermedad injerto contra huésped (EICH) continúa representando un grave problema que afecta tanto la supervivencia como la calidad de vida de los pacientes. Clásicamente, la EICH se ha dividido en aguda o crónica en función de que su aparición se produjera antes o después del día +100 postrasplante. Sin embargo, las manifestaciones clínicas más que el momento de aparición deben establecer el diagnóstico, tal y como se recoge en la Tabla 1 propuesta por Filipovich y cols.<sup>1</sup>.

La EICH crónica típicamente se presenta a partir del día +100 postrasplante y puede aparecer como evolución de una EICH aguda (forma progresiva), tras un intervalo libre de enfermedad (quiescente) o sin EICH aguda previa (*de novo*). Curiosamente, algunas estrategias que han provocado un incremento en la incidencia de EICH crónica, como el uso de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica<sup>2</sup>, no han incrementado de manera significativa el riesgo de EICH agudo lo que, unido al diferente momento de aparición y las diferentes manifestaciones clínicas e histológicas<sup>3</sup> ponen en evidencia que la EICH crónica no es simplemente una prolongación de la EICH aguda sino que los mecanismos fisiopatológicos en uno y otro caso son diferentes.

Revisaremos a continuación la fisiopatología y factores de riesgo para desarrollar EICH crónica, la clínica y clasificación y el tratamiento de la misma.

## Patogénesis y factores de riesgo:

Contrariamente a lo que sucede con la EICH aguda, para la que se ha desarrollado un modelo fisiopatológico

dividido en 3 fases (daño tisular y liberación de citocinas, activación linfocitaria y fase celular efectora) ampliamente aceptado<sup>4,5</sup>, en la EICH crónica no disponemos de modelos experimentales adecuados.

La enfermedad injerto contra huésped crónica (EICHc) se inicia con la expansión de linfocitos T del donante en respuesta a alo o auto-antígenos, que escapan a los mecanismos de delección a nivel tímico o en sangre periférica<sup>6</sup>. El papel de la auto o alo-reactividad en el contexto de la EICHc constituye un área de debate que permanece sin clarificar. En este sentido, la alo-reactividad frente a antígenos menores de histocompatibilidad explica la EICHc como una manifestación o fase tardía de EICHa. Sin embargo, las manifestaciones clínicas de la EICHc frecuentemente se asemejan a las descritas en el contexto de enfermedades autoinmunes y algunos estudios han identificado linfocitos T reactivos frente a antígenos no polimórficos comunes (compartidos por donante y receptor) que aparecerían en el contexto de un daño a nivel tímico y ausencia de selección negativa<sup>7</sup>. Por tanto, la EICHc depende de la persistencia de linfocitos T que no desarrollan una respuesta inmuno-tolerante frente a antígenos del receptor. Por otra parte, se detectan anticuerpos antinucleares, antiDNA o antimúsculo liso en el 11 al 62% de los casos. Además, se ha encontrado una clara relación entre la generación de anticuerpos anti-Y<sup>8</sup> o la expresión del marcador de activación BAFF (B-cell activating factor)<sup>9</sup>, que promueve la supervivencia y diferenciación de los linfocitos B, y el desarrollo de EICH crónica, lo que pone de relieve la importancia de la respuesta inmune humoral en su aparición.

El patrón de citocinas es también diferente en el contexto de la EICH aguda o crónica. Mientras que las citocinas predominantes en la EICHa son del tipo Th1, en la EICHc predominan las Th2. Sin embargo, las diferencias en el patrón de citocinas no son tan evidentes dado que la IL-13, y más recientemente la IL-5, ambas citocinas de clase Th2, también se han

Tabla 1. Clasificación de la EICH en aguda o crónica

Categoría	Momento de aparición	Síntomas característicos de EICHa	Síntomas característicos de EICHc
<b>EICHa</b>			
Clásica	< 100 días postrasplante	Sí	No
Persistente, recurrente o tardía	> 100 días postrasplante	Sí	No
<b>EICHc</b>			
Clásica	Sin límite temporal	No	Sí
Mixto o compuesto	Sin límite temporal	Sí	Sí

relacionado con el desarrollo de EICH agudo. Más aún, en modelo murino se pudo demostrar que en las fases iniciales, tanto de EICH aguda como crónica, se aprecia un incremento de citocinas Th2 como IL-4 e IL-10<sup>10</sup>.

Además de la alteración en la función tímica, también se aprecian alteraciones funcionales a nivel periférico que pueden contribuir al desarrollo de la EICHc. En este sentido, tanto las células dendríticas (CDs) del donante como las del receptor pueden contribuir al desarrollo de la EICHc mediada por linfocitos CD4 en la piel (fundamentalmente las CDs del receptor) o en el tubo digestivo (las del donante). Otros mecanismos implicados en la regulación y homeostasis del sistema inmune a nivel periférico, como los linfocitos T reguladores, se encuentran disminuidos en el contexto de la EICHc<sup>11</sup>.

En cuanto a los factores de riesgo para el desarrollo de EICHc, el más importante es el antecedente de EICH agudo, de manera que el 20% de los pacientes sin EICHa desarrollan EICHc (*de novo*) frente al 60% de incidencia entre los pacientes con antecedente de EICHa grado I y el 80% entre los pacientes con EICHa grados 2-4. La disparidad HLA entre donante y receptor es también uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de EICHc, que se produce en aproximadamente 40% de los pacientes sometidos a trasplante de donante emparentado HLA idéntico, el 50% de los que reciben un trasplante de un donante emparentado con disparidad HLA y hasta 70% entre los que reciben un trasplante de un donante no emparentado. Debe indicarse, no obstante, que la mayoría de estudios han evidenciado una clara relación entre disparidad HLA y EICH tanto agudo como crónico, pero no se conoce en la actualidad qué disparidades incrementan en mayor grado uno u otro, especialmente si tenemos en cuenta que el desarrollo de EICH agudo incrementa notablemente el riesgo de EICH crónico, lo que dificulta la identificación de disparidades con efecto específico sobre el primero o el segundo. En caso de identidad HLA, la disparidad de antígenos menores de histocompatibilidad y su distribución en los diferentes órganos puede además determinar las manifestaciones clínicas de la EICH<sup>12</sup>.

La edad del paciente también influye en el riesgo de EICH. Así, la incidencia de EICHc se incrementa del 13% entre pacientes entre 10 y 20 años al 40% en pacientes con más de 20 años. También la edad del donante influye en el riesgo de EICHc y debe tenerse en cuenta a la hora de seleccionar el mejor donante, así como el sexo, ya que en pacientes varones, la incompatibilidad de sexo incrementa el riesgo de EICHc e incluso se ha relacionado con la aparición de bronquiolititis obliterante, lo que se ha atribuido a la presencia de anticuerpos frente a antígenos menores codificados en el cromosoma Y<sup>8</sup>.

La fuente de progenitores hematopoyéticos es también una variable a considerar. Diversos estudios, incluyendo un metaanálisis, han descrito una mayor incidencia de EICHc extenso en pacientes que reciben progenitores hematopoyéticos procedentes de sangre periférica<sup>3</sup>. Además, la EICHc puede ser más resistente al tratamiento en comparación con el trasplante de progenitores hematopoyéticos de médula ósea.

En cuanto a la composición del inóculo, la depleción T es un método eficaz para disminuir el riesgo de EICHa y, siendo ésta el principal factor de riesgo para su desarrollo, también se ha mostrado eficaz en cuanto a la reducción del riesgo de EICHc. Así, el uso de globulina antitimocítica disminuye el riesgo de EICHc del 62 al 39%. La depleción T empleando alemtuzumab (CAMPATH-1H) también ha mostrado su eficacia. En un estudio comparativo retrospectivo entre pacientes que recibieron un acondicionamiento de intensidad reducida, los pacientes que recibieron alemtuzumab presentaron una incidencia de EICHc del 5% frente al 66% entre los pacientes que recibieron metotrexate ( $p < 0,001$ )<sup>13</sup>. Además de los linfocitos T, la cantidad de progenitores CD34+ también influye en el riesgo de EICHc. En este sentido, la infusión de un número elevado de células CD34+ (habitualmente  $> 8 \times 10^6/\text{kg}$ ) incrementa el riesgo de EICHc extenso en aquellos pacientes que reciben sangre periférica como fuente de progenitores. Por el contrario, la dosis de CD34+ no influye en el riesgo de desarrollar EICHc en el trasplante de médula ósea<sup>14</sup>.

## Clasificación y manifestaciones clínicas

La mediana de aparición de la EICHc es de 201 días tras el trasplante en caso de donante emparentado HLA idéntico, 159 días tras trasplante de donante no emparentado y de 133 días tras trasplante de donante no emparentado con alguna disparidad HLA.

Clásicamente la EICHc se ha dividido en limitada (estos pacientes no requerirían tratamiento sistémico) o extensa (sí requieren tratamiento inmunosupresor) (Tabla 2)<sup>1</sup>. Aunque es fácilmente reproducible, esta clasificación tiene un escaso valor pronóstico y, además, la mayoría de pacientes quedan catalogados dentro del grupo de EICHc extensa. En un intento por establecer una clasificación pronóstica, Akpek y cols.<sup>15</sup> analizaron 151 pacientes que desarrollaron EICHc tras trasplante de médula ósea. Se identificaron 3 variables que permitían predecir el pronóstico de los pacientes: afectación extensa de la piel, trombocitopenia y EICHc progresivo. En el momento del fracaso al tratamiento de primera línea, además de los anteriores, también el estado del paciente, catalogado como Karnovski  $< 50\%$ , permitía distinguir

Tabla 2. Clasificación de la EICHc en limitada o extensa:

<p><b>a) EICH crónica limitada: (1 y/o 2)</b>  Afectación cutánea localizada (&lt; 50% de la superficie corporal) y/o Afectación hepática limitada (alteración de tests de función hepática con bilirrubina total &lt; 3 mg/dl)</p>
<p><b>b) Se considera EICHc extensa:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>· Afectación cutánea extensa (≥ 50% de la superficie corporal), o</li> <li>· Afectación cutánea y/o hepática limitada asociado a la presencia de ≥ 1 de los siguientes criterios: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Biopsia hepática con histología compatible con EICHc (hepatitis crónica agresiva, puentes de necrosis, cirrosis hepática) con bilirrubina ≥ 3 mg/dL</li> <li>- Test de Schirmer positivo (&lt; 5 mm )</li> <li>- Biopsia de mucosa oral o glándula salivar con histología diagnóstica de EICHc</li> <li>- Alteración pulmonar compatible con bronquiolitis obliterante sin evidencia de causa viral en el estudio histológico</li> <li>- Afectación intestinal: malaabsorción y/o pérdida de peso &gt; 15% debido a anorexia sin causa evidente excepto la presencia de EICHc</li> </ul> </li> </ul>

a los pacientes con un peor pronóstico. La probabilidad de supervivencia a 3 años para los pacientes de bajo riesgo fue del 92%, para pacientes con riesgo intermedio del 71% y para los pacientes de alto riesgo del 9%.

El International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) establece una clasificación pronóstica en función del estado general del paciente (Karnofsky), la presencia de diarrea crónica, de pérdida de peso y el grado de afectación cutánea.

Como se ha mencionado anteriormente, el uso de sangre periférica como fuente de progenitores hematopoyéticos modifica tanto la incidencia como las características de la EICHc, de manera que las variables que condicionan una mayor morbimortalidad también pueden ser diferentes. En una serie de pacientes que recibieron progenitores hematopoyéticos de sangre periférica la cifra de plaquetas < 100 x 10<sup>9</sup>/L y el antecedente de EICHa hepático fueron identificados como factores pronósticos adversos tras el diagnóstico de EICHc<sup>(16)</sup>.

La clasificación propuesta en el National Institute of Health Consensus Development Project pretende definir criterios mínimos para el diagnóstico de EICHc y establecer grupos pronósticos que permitan perfilar el tratamiento en función del riesgo del paciente. Así, distingue entre *criterios "diagnósticos"*, definidos como aquellos signos o síntomas que permiten establecer el diagnóstico de EICHc sin más estudios adicionales, *criterios "distintivos" o "característicos"*, entendidos como manifestaciones típicas de EICHc que normalmente no aparecen en el contexto de la EICH aguda pero que no permiten establecer un diagnóstico definitivo sin pruebas adicionales, *"otros" criterios*, que incluyen manifestaciones raras, controvertidas o inespecíficas que no pueden utilizarse para establecer el diagnóstico de EICHc y, finalmente, *criterios "comunes"* que aparecen indistintamente en EICH agudo o crónico<sup>1</sup>.

Si bien se recomienda tener una confirmación histológica para establecer el diagnóstico, ésta no es obligatoria si el paciente presenta al menos un *crite-*

*rio "diagnóstico"* (Tabla 3). A cada órgano se le asigna una puntuación de 0 a 3 según el grado de severidad de la afectación por EICHc (Tabla 4), de manera que la EICHc se divide en: (1) leve: afectación de uno o dos órganos (excepto el pulmón) con una puntuación máxima de 1; (2) moderada: 3 o más órganos afectados con una puntuación máxima de 1 o siempre que un órgano tenga una puntuación de 2 (salvo el pulmón en el que es suficiente una puntuación de 1); (3) grave: cuando al menos 1 órgano alcanza una puntuación de 3 (o bien el pulmón alcanza una puntuación de 2). Mientras que los tipos moderado y grave requieren tratamiento inmunosupresor sistémico, el leve puede manejarse con tratamiento tópico<sup>1</sup>.

Como se aprecia en la Tabla 3, la piel, las mucosas y los pulmones son los órganos diana donde se manifiestan los *criterios diagnósticos*. Por este motivo y dada la accesibilidad a la exploración física de los dos primeros, describimos a continuación de manera resumida los signos y síntomas de EICHc en piel y mucosas<sup>17,18</sup>.

Inicialmente las lesiones cutáneas suelen aparecer de manera insidiosa, con marcada sequedad (xerosis), ictiosis, prominencias foliculares, lesiones papulo-escamosas o pitiriasiformes (placas anulares), eccematosas o psoriasiformes. Posteriormente se desarrollan lesiones que ya se catalogan como *criterios "diagnósticos"* y que incluyen cambios liquenoides (afectación de dermis superficial) o escleróticos/esclerodermoides. En este último caso, de menor a mayor profundidad, se incluye el liquen escleroso (afectación de dermis profunda), la morfea (que alcanza hipodermis) y la fastitis eosinofílica (que afecta la fascia muscular). Clínicamente, la EICHc liquenoide (≈ liquen plano) se caracteriza por la aparición de pápulas poligonales violáceas, que se resuelven con hiperpigmentación. Dado que "liquenoide" es un concepto anatomo-patológico más que clínico, se recomienda la denominación global de "rash eritematoso" que incluye diversas variantes clínicas, entre ellas las lesiones tipo liquen plano, la poiquilodermia (combinación de patrón reticulado, atrofia, eritema y alteraciones

Tabla 3. Criterios diagnósticos de EICHc

Criterios:	Diagnóstico	Característico	Otros	Común con EICHa
Piel	Poiquidermia, liquen plano Cambios escleróticos Morfea, liquen escleroso	Despigmentación	Alt sudación Ictiosis Queratosis pilaris Hipo/hiperpigmentación	Eritema Rash maculopapular Prurito
Uñas		Distrofia Estrías longitudinales Uñas quebradizas Onicosis Pterigium ungueal Pérdida ungueal		
Cuero cabelludo		Alopecia cicatricial, lesiones descamativas, lesiones papulo-escomasas	Fragilidad capilar, Encanecimiento prematuro	
Boca	Lesiones liquenoides Placas hiperqueratósicas (leucoplaquia) Esclerosis	Xerostomía, mucocele, atrofia mucosa Pseudomembranas, úlceras		Gingivitis Mucositis Eritema Dolor
Ojos		Sequedad, dolor, conjuntivitis cicatricial, queratoconjuntivitis seca (requiere Schirmer)	Fotofobia, hiperpigmentación periorbital, blefaritis	
Genitales	Liquen plano, cicatrices o estenosis vaginal	Erosión, fisuras, úlceras		
Digestivo	Membrana esofágica Estenosis hasta 1/3 medio (documentados por endoscopia o contraste)		Insuficiencia pancreática exocrina	Anorexia, náuseas, vómitos, diarrea, pérdida de peso, retraso crecimiento (niños)
Hígado				Bilirrubina total, fosfatasa > 2 veces el límite superior de la normalidad (N) AST ó ALT > 2 x N
Pulmonar	Bronquiolitis obliterante (BO) diagnosticada por biopsia	BO diagnosticada por espirometría y radiología		Bronquiolitis obliterante con neumonía organizada
Muscular, fascia	Fascitis, rigidez o contracturas articulares secundarias a esclerosis	Miositis o polimiositis (requiere biopsia)	Edema, calambres, artralgia, artritis	
Hematológico e inmunológico			Trombocitopenia, eosinofilia, linfopenia, hipo/hipergammaglobulinemia, autoanticuerpos	
Otros			Ascitis, derrame pleural o pericárdico, neuropatía, síndrome nefrótico, miastenia gravis, alt. conducción a nivel cardiaco, miocardiopatía	

de pigmentación) o la keratosis pilaris like, caracteriza por papulas perifoliculares eritematosas con lesión queratósica. En mucosa bucal, las manifestaciones incluyen las lesiones liquenoides (placas blanquecinas de aspecto reticulado), leucoplaquia (placas hiperqueratósicas, forma evolucionada de lesiones liquenoides) y mucoceles (rotura de glándulas salivares).

En cuanto a las lesiones de espectro esclerodermiforme, se describen formas superficiales como el li-

quen esclero-atrófico (placas hipopigmentadas de superficie brillante con esclerosis leve y no muy induradas), morfea (más palpable que visible, de superficie brillante, indurada pero desplazable) y formas profundas como la paniculitis y la fascitis (no desplazables, pétéo, de aspecto abollonado y adherido a planos profundos/hidebound).

El tiempo medio dedicado a la exploración del paciente para llevar a cabo una evaluación completa se-



Tabla 4. Puntuación asignada a cada órgano para evaluar la severidad de la EICHc

	Puntuación: 1	Puntuación: 2	Puntuación: 3	Puntuación: 4
Estado general	Asintomático ECOG 0 Karnofsky 0	Sintomático; paciente ambulatorio, limitado únicamente con actividad intensa ECOG 1 Karnofsky 1	Sintomático, paciente ambulatorio, capaz de llevar a cabo medidas elementales de higiene personal ECOG 2 Karnofsky 2	Sintomático, capacidad limitada para llevar a cabo medidas de higiene personal ECOG 3 Karnofsky 3
Piel Rash maculopapuloso Similares a liquen plano, Ictiosis o lesiones papuloescamosas Hiperpigmentación Hipopigmentación Queratosis pilaris Eritema, Eritrodermia Poiquidermia Cambios escleróticos Prurito Afectación capilar Afectación ungueal % SCA	Asintomático Sin hallazgos a la exploración	< 18% SCA pero sin signos de esclerosis	19-50% SCA o lesiones superficiales escleróticas (la rigidez permite "pellizcar" la piel)	> 50% SCA o cambios escleróticos profundos (no se puede "pellizcar" la piel) o alteración de la movilidad ulceraciones o prurito severo
Boca	Asintomático	Sintomatología leve con signos de enfermedad en mucosa, pero que no limita la ingesta	Sintomatología moderada con signos de enfermedad en mucosa y limitación parcial de la ingesta oral	Sintomatología severa con signos de enfermedad que limitan la ingesta
Ojos Schirmer > 10 mm 6-10 mm < 5 mm	Asintomático	Síntomas leves de ojo seco que no afectan la AC (requiere gotas oculares ≤ 3 / día) o asintomático con signos de QS	Síntomas moderados que afectan parcialmente la AC (gotas > 3 / día) sin afectación de agudeza visual	Síntomas severos que afectan la AC o incapacidad para trabajar debido a la sintomatología ocular o pérdida de visión causada por QS
Tubo digestivo	Asintomático	Disfagia, anorexia, náuseas, vómitos, dolor abdominal o diarrea sin pérdida significativa de peso (< 5%)	Síntomas asociados a pérdida moderada de peso (5-15%)	Síntomas asociados a pérdida de peso > 15%, requiere aporte nutricional o dilatación esofágica
Hígado	PFH normales	Alteración PFH < 2 x LSN	Bilirrubina > 3 mg/dL o enzimas hepáticas 2-5 x LSN	PFH > 5 x LSN
Pulmones FEV1 DLCO	Asintomático  FEV1 > 80% ó PFP	Síntomas leves (disnea tras subir un piso de escaleras) FEV1 60-79% ó PFP 3-5	Síntomas moderados (disnea tras caminar en llano) FEV1 40-59% ó PFP 6-9	Síntomas graves (disnea de reposo)  FEV1 < 39% ó PFP 10-12
Articulaciones y músculos	Asintomático	Tirantez en brazos o piernas, movilidad articular normal o levemente disminuida que no afectan la AC	Tirantez en brazos o piernas o contracturas articulares, eritema debido a fascitis, movilidad articular afectada moderadamente que limita la AC de manera leve o moderada	Contracturas con afectación severa de la movilidad articular que afecta severamente la AC (incapaz de atarse los zapatos, vestirse, etc.)
Tracto genitourinario	Asintomático	Sintomático con signos de afectación leve que no afectan el coito; mínimas molestias a la exploración ginecológica	Sintomático con signos moderados de afectación a la exploración con dispareunia leve o molestias a la exploración	Sintomático con signos severos de afectación (estenosis, ulceración) con dispareunia severa o imposibilidad de introducir un espéculo ginecológico

SCA: superficie corporal afectada; AC: actividades cotidianas; PFH: pruebas de función hepática (bilirrubina, fosfatasa alcalina, transaminasas); QS: queratoconjuntivitis seca; LSN: límite superior de la normalidad; PFP: pruebas de función pulmonar (al FEV1 y DLCO se les asigna un valor de acuerdo al siguiente criterio: > 80% = 1; 70-79% = 2; 60-69% = 3; 50-59% = 4; 40-49% = 5; < 40% = 6)

**Tabla 4. Puntuación asignada a cada órgano para evaluar la severidad de la EICHc**

<i>Otros indicadores, manifestaciones clínicas o complicaciones relacionadas con EICHc (indicar puntuación 0 a 3 según que el grado de afectación sea leve, moderado o severo)</i>		
Membrana esofágica	Derrame pericárdico	Derrame pleural
Ascitis	Síndrome nefrótico	Neuropatía periférica
Miastenia gravis	Miocardopatía	Eosinofilia > 0,5 x 10 <sup>9</sup> /L
Polimiositis	Alteraciones en la conducción	Afectación arteria coronaria
Plaquetas < 100 x 10 <sup>9</sup> /L	Comienzo progresivo	
Otros		

SCA: superficie corporal afectada; AC: actividades cotidianas; PFH: pruebas de función hepática (bilirrubina, fosfatasa alcalina, transaminasas); QS: queratoconjuntivitis seca; LSN: límite superior de la normalidad; PFP: pruebas de función pulmonar (al FEV1 y DLCO se les asigna un valor de acuerdo al siguiente criterio: > 80% = 1; 70-79% = 2; 60-69% = 3; 50-59% = 4; 40-49% = 5; < 40% = 6)

ría de 36 minutos con 14 minutos adicionales dedicados a completar los auto-cuestionarios de valoración de síntomas por parte del paciente<sup>19</sup>. La evaluación de la respuesta al tratamiento de debe llevar a cabo cada 3 meses o bien siempre que se requiera algún cambio importante en el tratamiento. El NIH propone formularios de evaluación disponibles en [www.asbmt.org/GvHDForms](http://www.asbmt.org/GvHDForms) (apéndices A a D). Para cada órgano se

propone una medición objetiva que permita cuantificar el grado de respuesta (Tabla 5). Para cada órgano remisión completa indica la resolución de todas las manifestaciones reversibles, respuesta parcial la mejoría > 50%, progresión el empeoramiento > 25% (en [www.asbmt.org/GvHDForms](http://www.asbmt.org/GvHDForms) formulario C). Es importante tener en cuenta que algunas lesiones pueden no ser reversibles y, por tanto, no deben considerarse

**Tabla 5. Propuesta del NIH de evaluación de la EICHc**

Componente	Manifestación o parámetro analizado	Medición	Evaluador
Piel	Rash eritematoso	% superficie corporal afectada 0-100% para cada una	Médico (M)
	Esclerosis desplazable	Regla de los 9	M
	Esclerosis fija o fascitis	Medición de la de mayor tamaño	M
	Úlceras	Escala de 0 a 10	M
	Picor		Paciente (P)
Ojos	Test de Schirmer	Medición en mm	M
	Síntomas en el momento de la visita	Escala de 0 a 10	P
Boca (escala Schubert)	Eritema (1)	Escala de 0 a 15	M
	Lesiones liquenoides/hiperqueratosis (2)		M
	Úlceras (3)		M
	Mucoceles (4)		M
	Síntomas de dolor, sequedad o hipersensibilidad	Escala de 0 a 10	P
Datos hematimétricos	Recuento plaquetario	Número/microL	M
	Eosinófilos	%	M
Tubo digestivo	Síntomas de afectación alta <sup>Ω</sup>	Escala de 0 a 3	M
	Síntomas por afectación esofágica <sup>Σ</sup>	Escala de 0 a 3	M
	Diarrea	Escala de 0 a 3	M
Hígado	Bilirrubina total	Mg/dL	M
	ALT, fosfatasa alcalina	U/L	M
Pulmones	Bronquiolitis obliterante	FEV1, DLCO	M
Escala de síntomas de EICHc	30 parámetros, 7 subgrupos	0-100	P
Escala de actividad global de EICH	Severidad de los síntomas de EICHc	0-10	M/P
	Percepción de cambio	-3 a +3	M/P
	Severidad global	Leve-moderado-severo	M/P

En [www.asbmt.org/GvHDForms](http://www.asbmt.org/GvHDForms) formularios A y B

(Ω): se valoran: anorexia, náuseas, vómitos e ingesta calórica; (Σ): se valoran disfagia y odinofagia

a la hora de evaluar la respuesta, como la afectación ocular por síndrome seco, la bronquiolitis obliterante o las lesiones escleróticas cutáneas avanzadas. Por otra parte, debe tenerse en cuenta también la evolución previa de las lesiones, de manera que una estabilización de la enfermedad debe considerarse respuesta en caso de que la trayectoria previa fuese la progresión<sup>19</sup>. Finalmente, si bien la biopsia puede ser de gran valor en el diagnóstico, el papel de la realización de biopsias de reevaluación no ha sido establecido.

Algunos estudios retrospectivos han evaluado el valor pronóstico de la nueva clasificación del NIH. En nuestra experiencia<sup>20</sup>, la incidencia acumulada de EICHc leve, moderado o severo es del 29%, 42% y 28%, respectivamente, en pacientes sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica de donante emparentado. Globalmente, 68% de los pacientes no recibe tratamiento inmunosupresor a los 5 años del trasplante. La ausencia de EICHa previo (HR = 2; p = 0,004) y el EICHc leve (HR = 4,2; p = 0,007) permiten identificar a los pacientes en los que, con mayor probabilidad, se podrá suspender el tratamiento inmunosupresor. Por otra parte, el diagnóstico de EICHc severo tiene un efecto desfavorable en la supervivencia global (HR = 13,27; p = 0,001) mientras que, al contrario, el tipo de comienzo *de novo* (HR = 0,094; p = 0,003) tiene un valor pronóstico favorable. La combinación de

ambas variables (grado de severidad según el NIH y el tipo de comienzo) permite identificar 4 grupos de pacientes con supervivencia global del 82, 70, 50 y 25%, respectivamente (Figura 1).

## Tratamiento

Si bien la EICHc incrementa el riesgo de mortalidad relacionada con el trasplante a largo plazo y afecta la calidad de vida de los pacientes, también se asocia con un efecto injerto contra leucemia, de manera que numerosos estudios han descrito un efecto favorable de la EICHc en la supervivencia en pacientes con LMA, MM o LLC, entre otros<sup>21,22</sup>. Por tanto, a la hora de iniciar el tratamiento inmunosupresor debe tenerse en cuenta el grado de afectación (leve, moderado o severo), así como el riesgo de recaída del paciente.

## Profilaxis y tratamiento de primera línea

De manera muy resumida, en lo que se refiere a la profilaxis, exceptuando el impacto favorable de algunos tipos de depleción T que se han mencionado anteriormente, ningún procedimiento se ha mostrado eficaz como profilaxis de EICHc, incluyendo dos estudios randomizados que han planteado retrasar la retirada de Ciclosporina o administrar talidomida desde el día +80 postrasplante<sup>23,24</sup>.

En cuanto al tratamiento, el más comúnmente utilizado ha sido la prednisona. La supervivencia a 3 años en pacientes de alto riesgo (identificados como aquellos con EICHc extenso y trombocitopenia) fue del 26% cuando se empleó prednisona como agente único. En ese subgrupo de pacientes, la combinación con ciclosporina incrementa la supervivencia al 52%, mientras que en pacientes con EICHc de riesgo estandar la adición de ciclosporina no aportó una mejoría en la supervivencia de los pacientes. El grupo de Seattle describió el empleo de prednisona a 1 mg/kg/día y ciclosporina. Tras dos semanas, una vez confirmada la ausencia de progresión de la enfermedad, se inicia un descenso de la prednisona hasta administrar 1 mg/kg a días alternos. La respuesta al tratamiento se evalúa a las 8, 20 y 40 semanas. En caso de respuesta a la semana 20 se continúa el descenso de prednisona hasta alcanzar 0,5 mg/kg a días alternos seguido de un descenso de la dosis de ciclosporina. Tras 40 semanas de tratamiento se realiza un descenso paulatino hasta suspender ambos fármacos<sup>25</sup>.

La adición de mofetil micofenolato al tratamiento inmunosupresor como primera línea de tratamiento no se ha mostrado eficaz en un estudio randomizado<sup>26</sup>.

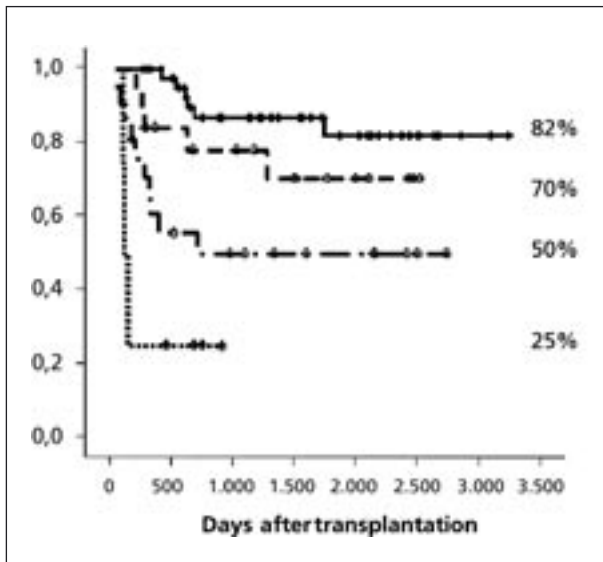


Figura 1. Supervivencia global en pacientes con EICHc en función de la clasificación del NIH y el tipo de comienzo: 82% en pacientes con EICHc leve independientemente del tipo de comienzo o EICHc moderado y comienzo *de novo*; 70% en pacientes con EICHc moderado y comienzo quiescente o progresivo; 50% en pacientes con EICHc severo y comienzo *de novo* y 25% en pacientes con EICHc severo y comienzo quiescente o progresivo.

En resumen, la prednisona en combinación con un inhibidor de la calcineurina en pacientes de alto riesgo puede considerarse el tratamiento estándar para la EICHc. Desafortunadamente, los resultados de esta estrategia son aún peores en pacientes que reciben progenitores hematopoyéticos de sangre periférica que los descritos en pacientes sometidos a trasplante de médula ósea. En este sentido, en un estudio comparativo, 25 de 39 pacientes que recibieron sangre periférica como fuente de progenitores requirieron más de dos líneas de tratamiento en comparación con 14 de 32 pacientes que recibieron progenitores de médula ósea. En nuestra experiencia, en pacientes sometidos a trasplante de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica, únicamente el 41% de los pacientes que desarrolló EICHc alcanzó remisión completa con la primera línea de tratamiento y el 58% de éstos recayó posteriormente<sup>20</sup>.

### Tratamiento de rescate

En la actualidad no existe ninguna estrategia que pueda considerarse como estándar en esta situación. Los pacientes deben incluirse dentro de ensayos clínicos controlados. A continuación se mencionan alguna de las estrategias terapéuticas descritas para estos pacientes:

a) *Mofetil micofenolato (MMF)*: es un antimetabolito que actúa como inhibidor de la inosina monofosfato deshidrogenasa, lo que produce una inhibición de la síntesis de purinas y, en consecuencia, de la proliferación linfocitaria. En el tratamiento de la EICHc refractaria, 35% de los pacientes alcanzaron remisión completa y 44% respuesta parcial en una serie de 34 pacientes. Otros autores han descrito un porcentaje de respuestas del 67%<sup>27</sup>.

b) *Sirolimus*: es un macrólido con capacidad inmunosupresora que actúa uniéndose a la proteína de unión de FK, inhibiendo de este modo la ruta de activación linfocitaria de mTOR (mamalian target of rapamycin). Se ha utilizado como tratamiento de rescate en una serie de 35 pacientes con EICHc resistente a una dosis de carga de 6 mg vía oral seguido de 2 mg al día posteriormente. Se obtuvo respuesta en el 63% de los pacientes, incluyendo 6 remisiones completas y 16 respuestas parciales. En otra serie de 19 pacientes, 15 de 16 evaluables alcanzaron algún tipo de respuesta. No obstante, los efectos adversos son relativamente frecuentes e incluyen alteración en la función renal, citopenias, síndrome hemolítico urémico e hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia. En la serie más amplia publicada, Jurado et al describen un 81% de respuestas (completas en 18 y parciales en 20 pacientes) en una serie de 47 pacientes con EICHc refractario<sup>28</sup>.

c) *Rituximab*: Aunque la mayoría de opciones de tratamiento en la EICHc tienen como diana terapéutica los linfocitos T, existe una evidencia creciente acerca de la importancia de los linfocitos B en su desarrollo. Estos hallazgos han llevado a evaluar el papel del Rituximab en el tratamiento de la EICHc. En las dos series más extensas publicadas, Cutler y cols., en una serie de 21 pacientes, describen un 70% de respuestas que se aprecian fundamentalmente a nivel cutáneo y músculo-esquelético. El Grupo Italiano de Trasplante, en una serie de 38 pacientes con EICHc refractario, describe un 65% de respuestas globales (63% en piel, 48% en boca, 43% en ojos, 25% en hígado)<sup>29</sup>.

d) *Otros fármacos*: La pentostatina es un análogo de nucleósidos que inhibe la adenosina deaminasa; de esta manera bloquea el metabolismo de la 2'-deoxiadenosina. Diversos estudios han demostrado su eficacia en el manejo de la EICHa. En el contexto de la EICHc la experiencia es más limitada. En una serie de 58 pacientes con EICHc refractario tratados con pentostatina a 4 mg/m<sup>2</sup>/día cada 2 semanas hasta completar  $\geq 12$  dosis se alcanzó un 55% de respuestas objetivas con una supervivencia del 70% a dos años<sup>30</sup>.

Las células presentadoras de antígenos y los linfocitos T activados son susceptibles a la acción de la radiación UVB o Uva en presencia de 8-metoxipso-lareno (8-MOP). En la fotoaféresis extracorpórea el concentrado leucocitario se incubaba con 8-MOP, se irradia y posteriormente se reinfunde al paciente, comenzando habitualmente por 2 a 3 fotoaféresis semanales y después manteniendo el tratamiento unas 12 semanas según respuesta. Algunos estudios han descrito respuestas de hasta el 80% en piel, 70% en hígado o 54% en pulmones aunque raramente se obtienen remisiones completas. En un estudio randomizado, tras 12 semanas de tratamiento se constató una mejoría de la afectación cutánea del -14,5% en pacientes que recibieron fotoaféresis versus -8,5% en los controles (datos similares) mientras que en un 25% de pacientes que recibieron fotoaféresis versus 12,8% de los controles se consiguió reducir los esteroides un 50% o más ( $p = 0,13$ ). Los autores describen mejores resultados en el grupo de fotoaféresis cuando juntan ambos criterios (mejoría del store cutáneo más descenso de esteroides)<sup>31</sup>.

El tratamiento en pacientes con formas avanzadas de EICH crónico con manifestaciones escleróticas es complejo y, frecuentemente, insatisfactorio. El Imatinib es capaz de inhibir la señalización intracelular tanto del TGF $\beta$  como del PDGF, factores involucrados en los cambios fibróticos/escleróticos de estos pacientes. En una serie de 19 pacientes se ha descrito un 79% de respuestas con 7 remisiones completas y 8 respuestas parciales, e incluyen-

do entre las respuestas pacientes con afectación pulmonar severa<sup>32</sup>.

e) *Otras estrategias y tratamiento de soporte*: Es importante destacar que, siempre que sea posible, es útil el uso de tratamiento tópico. En este sentido, puede resultar útil la beclometasona, que administrada por vía oral, ejercería su efecto antiinflamatorio a nivel local sobre la mucosa intestinal. En el contexto de la EICHc, en nuestra experiencia > 80% de pacientes obtienen algún tipo de respuestas aunque finalmente muchos de ellos recaen, lo que probablemente esté en relación con el periodo de tratamiento<sup>33</sup>. Otras formulaciones basadas en el uso tópico de corticoides, como el clobetasol, betametasona, dipropionato o hidrocortisona están disponibles y pueden ser de utilidad en el manejo de la EICHc a nivel cutáneo, mucoso o vaginal. Finalmente, es importante mencionar el papel del tratamiento de soporte y recomendaciones higiénico-dietéticas propuestas por el NIH Consensus Development Project<sup>34</sup> y que incluirían la protección solar, el uso de inhibidores de calcineurina tópicos, medidas físicas en caso de afectación muscular o de fascia, o el uso de lágrimas artificiales, entre la amplia gama de medidas complementarias.

## Bibliografía

- Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11: 945-55.
- Allogeneic Peripheral Blood Stem-Cell Compared With Bone Marrow Transplantation in the Management of Hematologic Malignancies: An Individual Patient Data Meta-Analysis of Nine Randomized Trials. *Stem Cell Translators' Collaborative Group. J Clin Oncol* 2005; 23: 5074-87.
- Shulman H, Kleiner D, Lee S, Morton T, Pavletic S, Farmer E. Histopathologic Diagnosis of Chronic Graft-versus-Host Disease: National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: II. Pathology Working Group Report *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2006; 12: 31-47.
- Ferrara JLM, Antin J. The pathophysiology of graft-vs.-host disease. En *Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation*. 3rd ed. Blume KG, Forman SJ, Appelbaum FR editores. Blackwell Publishing, USA, pp 353, 2004.
- Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002; 296: 301.
- Toubai T, Sun Y, Reddy P. GVHD pathophysiology: is acute different from chronic? *Best Pract Clin Hematol* 2008; 21: 101-17.
- Hess A, Thoburn C, Bright E et al. Specificity of effector mechanisms in syngeneic GVHD: recognition of the MHC class II invariant chain peptide. *Transplant Proceedings* 1997; 29: 725-7.
- Miklos DB, Kim HT, Guo L, et al. Antibody responses to H-Y minor histocompatibility antigens correlate with chronic graft-versus-host disease and disease remission. *Blood* 2005; 105 (7): 2973-8.
- Sarantopoulos S, Stevenson KE, Kim HT et al. High levels of B-cell activating factor in patients with active cGVHD. *Clin Cancer Research* 2007; 13: 6107-14.
- De Wit D, van Mechelen M, Zanin C et al. Preferential activation of Th2 cells in chronic graft versus host reaction. *J Immunol* 1993; 150: 361-6.
- Shlomchik WC, Couzens MS, Tang CB, et al. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen presenting cells. *Science* 1999; 285: 412-5.
- Kaplan DH, Anderson BE, McNiff JM et al. Target antigens determine graft-versus-host disease phenotype. *J Immunol* 2004; 173: 5467-75.
- Pérez-Simón JA, Kottaridis P, Martino R, et al. Non-myeloablative transplants with or without CAMPATH-1H: comparison between two prospective studies in patients with lymphoproliferative disorders. *Blood* 2002; 100 (9): 3121-7.
- Pérez-Simón J, Díez-Campelo M, Martino R, et al. Impact of CD34+ cell dose on the outcome of patients undergoing reduced intensity conditioning allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 2003; 102 (3): 1108-13
- Akpek G, Zahurak M, Piantadosi S, et al. Development of a prognostic model for grading chronic graft versus host disease. *Blood* 2001; 97: 1219-26.
- Pavletic S, Smith L, Bishop M, et al. Prognostic factors of chronic graft versus host disease after allogeneic blood stem cell transplantation. *Am J Hematol* 2005; 78: 265-74.
- Hymes S, Turner M, Champlin R, Couriel D. Cutaneous manifestations of cGVHD. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12: 1101-13.
- Häusermann P, Walter R, Halter J, Biedermann B et al. Cutaneous GVHD: a guide for the dermatologist. *Dermatology* 2008; 216: 287-304.
- Pavletic S, Martin P, Lee S, Mitchell S, Jacobsohn D, Cowen E et al. Measuring therapeutic response in chronic graft-versus-host disease: National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: IV. Response criteria working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12: 252-266.
- Pérez-Simón JA, Encinas C, Silva F, Arcos MJ, Díez-Campelo M, Sánchez-Guijo F, et al. Prognostic factors of chronic graft-versus-host disease following allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: the national institutes health scale plus the type of onset can predict survival rates and the duration of immunosuppressive therapy. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; 14(10): 1163-71.
- Valcárcel D, Martino R, Caballero D, Martin J, Ferra C, Nieto JB, et al. Sustained Remissions of High-Risk Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome After Reduced-Intensity Conditioning Allogeneic Hematopoietic Transplantation: Chronic Graft-Versus-Host Disease Is the Strongest Factor Improving Survival. *J Clin Oncol* 2008; 26(4): 577-84.
- Pérez-Simón J, Sureda A, Fernández-Avilés F, Sampol A, Cabrera J, Caballero D, et al. Reduced intensity conditioning allogeneic transplantation is associated with a high incidence of extramedullary relapses in multiple myeloma patients. *Leukemia* 2006; 20: 542-5.
- Chao NJ, Parker PM, Niland JC et al. Paradoxical effect of thalidomide prophylaxis on cGVHD. *Biol Blood Marrow Transplant* 1996; 2: 86-92.
- Kansu E, Gooley T, Flowers M et al. Administration of cyclosporine for 24 months compared with 6 months for prevention of GVHD: a prospective randomized trial. *Blood* 2001; 98: 3868-70.
- Koc S, Leisenring W, Flowers M, et al. Therapy for chronic graft versus host disease: a randomised trial comparing cyclosporine and prednisone versus prednisone alone. *Blood* 2002; 100: 48-51.
- Paul J, Martin Barry E, Storer, Scott D, Rowley, Mary E.D. Flowers. Evaluation of mycophenolate mofetil for initial treatment of chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2009, republished.



27. López F, Parker P, Nademanee A, et al. Efficacy of mycophenolate mofetil in the treatment of chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005; 11: 307-13.
28. Jurado M, Vallejo C, Pérez-Simón JA, Brunet S, et al. Sirolimus as part of immunosuppressive therapy for refractory chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007; 13 (6): 701-6.
29. Zaja F, Bacigalupo A, Patriarca F, Stanzani M, et al. Treatment of refractory chronic GVHD with rituximab: a GITMO study. *Bone Marrow Transplant*. 2007; 40 (3): 273-7.
30. Jacobsohn DA, Chen AR, Zahurak M, Piantadosi S, et al. Phase II study of pentostatin in patients with corticosteroid-refractory chronic graft-versus-host disease. *J Clin Oncol*. 2007; 25 (27): 4255-61.
31. Flowers M, Apperley J, Besien K, Elmaagacli A et al. A multicenter prospective phase 2 randomized study of extracorporeal photopheresis for treatment of chronic graft-versus-host disease *Blood* 2008; 112: 2667-74.
32. Olivieri A, Locatelli F, Zecca M, Sanna A, Cimminiello M, Raimondi R et al. Imatinib for refractory chronic graft-versus-host disease with fibrotic features. *Blood* 2009 (prepublished).
33. Villanueva NE, Pérez-Simón JA, Silva F, Caballero-Velazquez T, Sánchez-Guijo F, Cañizo C, Vazquez L, Caballero D, San Miguel JF. Oral beclomethasone dipropionate for the treatment of gastrointestinal chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009 (prepublished)
34. Couriel D, Carpenter P, Cutler C, Bolaños-Meade J, Treister N, Gea-Banacloche J et al. Ancillary therapy and supportive care of chronic graft-versus-host disease: national institute of health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: V. Ancillary therapy and supportive case working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12: 375-396.

# **XXII LECCIÓN**

# **CONMEMORATIVA**

# **ANTONIO RAICHS**

**COORDINADORES:** E. FELIU. *Barcelona*  
A. URBANO ISPIZUA. *Sevilla*



# Síndromes mieloproliferativos crónicos

F. CERVANTES

Servicio de Hematología, Hospital Clínic. IDIBAPS. Universidad de Barcelona

## Introducción

El término “síndromes mieloproliferativos”, acuñado por Dameshek en 1951, incluye un grupo de hemopatías de curso crónico que comparten características hematológicas, clínicas y evolutivas, tales como la proliferación excesiva de las tres series hemopoéticas, la propensión de los pacientes a la hemorragia y la trombosis, la frecuente presencia de esplenomegalia y fibrosis de la médula ósea y la tendencia a la evolución a leucemia aguda<sup>1</sup>. El descubrimiento en 1960 del cromosoma Filadelfia (Ph) en la leucemia mieloide crónica (LMC)<sup>2</sup> confirió a esta enfermedad una personalidad especial, denominándose a partir de entonces síndromes mieloproliferativos crónicos (SMPC) Filadelfia negativos (Ph-negativos) al resto de entidades: la policitemia vera (PV), la trombocitemia esencial (TE) y la mielofibrosis primaria (MFP). Tuvieron que pasar más de 50 años para que el descubrimiento de la mutación del gen *JAK2* en la mayoría de los pacientes con SMPC Ph-negativos<sup>3</sup> proporcionara un fundamento biológico a la agrupación meramente intuitiva de estas entidades.

En la presente ponencia se hace, en primer lugar, un breve repaso cronológico de los avances fundamentales en la LMC en los últimos 50 años. A continuación, se revisan de forma somera los progresos recientes en los SMPC Ph-negativos y el estado actual del conocimiento sobre la MFP.

## Leucemia mieloide crónica

La introducción del busulfán en la década de los cincuenta supuso un importante avance en la LMC. Mayor trascendencia tuvo el descubrimiento por Nowell y Hungerford en 1960 del cromosoma Ph<sup>2</sup>. En la década de los sesenta se introdujo la hidroxiurea como alternativa al busulfán, y Fialkow demostró el origen clonal de la LMC mediante sus estudios con las isoenzimas de la glucosa 6-PD en pacientes heterocigotas para dicha enzima. En 1973 Janet Rowley puso de manifiesto la translocación 9;22<sup>4</sup>. En esa década tuvieron lugar las primeras experiencias con el trasplante alogénico de progenitores hemopoyéticos (alo-TPH), único tratamiento, aún hoy en día, con capacidad curativa demostrada de la LMC. La década de los ochenta fue particularmente rica en avances, como la clasificación pronóstica de Sokal y el empleo

del interferón alfa como terapéutica con capacidad de conseguir respuestas citogenéticas. Sin embargo, sería un nuevo avance biológico, el descubrimiento del oncogén *BCR/ABL* (equivalente molecular de la translocación 9;22)<sup>5</sup> y la demostración en modelos animales de su papel en la patogenia de la LMC, el hecho trascendental para el conocimiento de la patogenia de la enfermedad y el desarrollo posterior de un tratamiento diana, imatinib. Este fármaco inhibidor de la proteína tirosinocinasa *bcr/abl* fue administrado por primera vez a un paciente con LMC en 1998<sup>6</sup>. Tan sólo 5 años más tarde, la publicación de los resultados del estudio *IRIS*, que demostraron su superioridad frente a la combinación de interferón y arabinósido de citosina en pacientes con LMC de nuevo diagnóstico, estableció a imatinib como tratamiento de elección de la LMC. Finalmente, en 2006, se demostró la eficacia de dasatinib y nilotinib, dos inhibidores de tirosinocinasa de segunda generación, en una proporción apreciable de pacientes resistentes a imatinib.

## Síndromes mieloproliferativos cromosoma Filadelfia-negativos

En 2005 cuatro grupos de Europa y Estados Unidos demostraron de manera simultánea la presencia, en la mayoría de los pacientes con PV y en la mitad de aquéllos con TE y MFP, de una mutación puntual, la V617F, en el gen de la cinasa *JAK2*, localizado en el brazo corto del cromosoma 9<sup>3</sup>. Dicha mutación se produce en el dominio pseudocinasa del gen y da como resultado la activación constitutiva de la proteína *JAK2* en ausencia del ligando al receptor hemopoyético correspondiente (Figura 1). La citada mutación provoca, pues, una ganancia de función, esto es, una activación permanente de diferentes vías de transducción de señales implicadas en la señalización de citocinas de tipo I (eritropoyetina, G-CSF y c-MPL). En el caso de la PV, la consecuencia de la mutación de *JAK2* es que el receptor de la eritropoyetina no requiere para activarse de su unión a esta citocina.

Con ser importante en la patogenia de los SMPC, la mutación de *JAK2* no parece constituir el evento inicial<sup>7</sup>. Estudios de clonalidad en mujeres, utilizando los patrones de inactivación del cromosoma X, han puesto de manifiesto discrepancias entre la hemopoyesis clonal analizada por ese método y la propor-

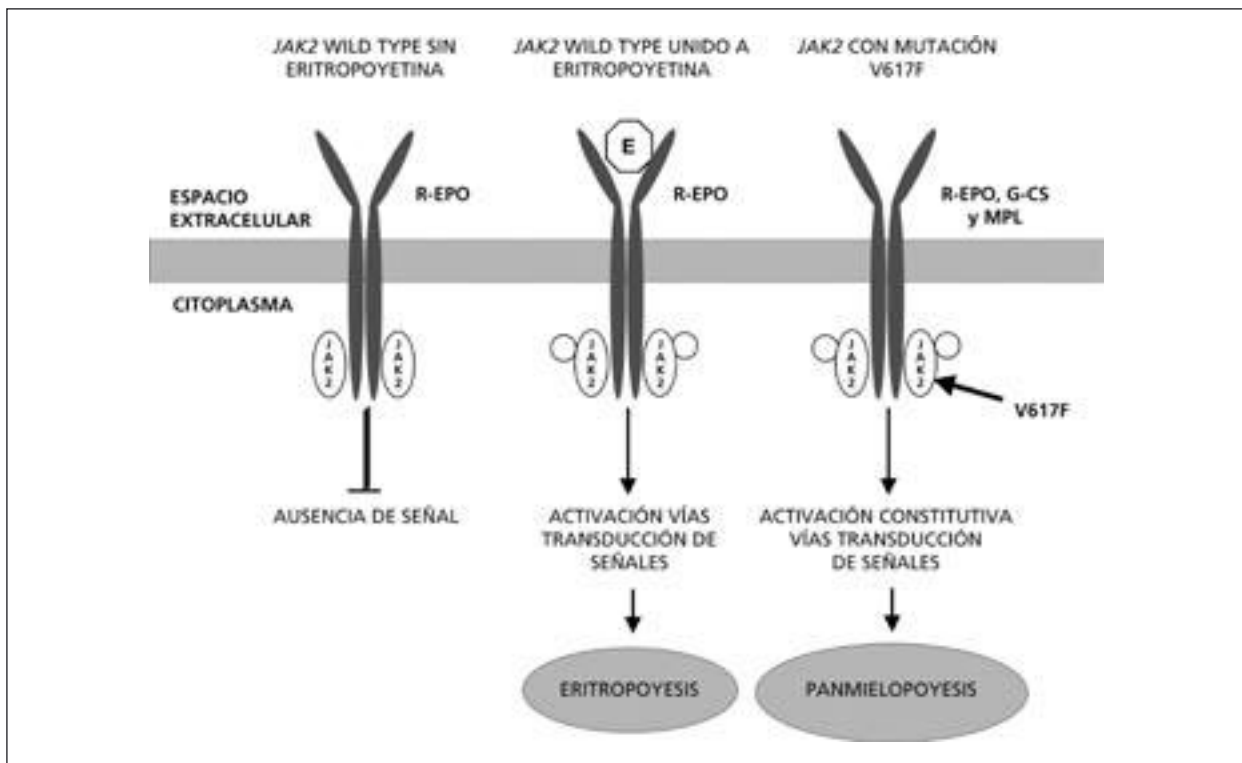


Figura 1. Mutación V617F del gen JAK2.

ción de granulocitos mutados, lo que indicaría que la proliferación clonal precedería a la adquisición de la mutación. Por otra parte, se ha descrito algún paciente con PV y la alteración cromosómica 20q- en el que la proporción de metafases con la anomalía citogenética era superior a la de granulocitos con la mutación. También se ha observado que en los cultivos de precursores eritroides de pacientes con PV *JAK2*-positiva algunas colonias que tienen el patrón de crecimiento endógeno característico de la enfermedad no presentan la mutación. Además, en una proporción apreciable de las leucemias agudas post-PV *JAK2*-positiva, las células leucémicas son *JAK2*-negativas, lo que sería compatible con un origen de la leucemia en una clona previa a la mutación de *JAK2*. Finalmente, en casos de síndromes mieloproliferativos familiares, se ha visto que dentro de una misma familia algunos pacientes presentan la mutación y otros no, y se ha podido demostrar que la mutación es adquirida, lo que indicaría que la predisposición heredada a desarrollar el SMPC sería independiente de la mutación de *JAK2*.

Otro de los aspectos objeto de debate es por qué una misma mutación da lugar a tres enfermedades diferentes, existiendo varias teorías al respecto. Según una de ellas, el fenotipo del SMPC vendría determinado por la célula en la que se produce la mutación, lo cual vendría apoyado por el hecho de que en la MFP habría una afectación preferencial de una

determinada subpoblación de células madres hemopoéticas. Mayor crédito merece la teoría de la dosis (*gene-dosage hypothesis*), según la cual el fenotipo del SMPC dependería de la carga de alelos mutados, apareciendo una PV o una MFP si la carga es elevada, y una TE en caso contrario. Esta teoría vendría apoyada por la diferente carga alélica encontrada en estas tres enfermedades y por los experimentos en animales de experimentación. Así, en ratones irradiados a dosis letales a los que se les realiza posteriormente un trasplante de sus progenitores sometidos a transfección de *JAK2*, cuando la dosis de *JAK2* mutado es alta, aparece una enfermedad con fenotipo similar al de la PV que acaba evolucionando a mielofibrosis, mientras que si la dosis de *JAK2* es baja la enfermedad resultante es parecida a la TE<sup>9</sup>. Una tercera teoría postula que el fenotipo del SMPC dependería del evento previo a la mutación de *JAK2*. Asimismo, se considera que factores genéticos, como ciertos polimorfismos, podrían contribuir al fenotipo del SMPC. Finalmente, no se descarta la contribución de factores epigenéticos y modificadores del huésped, como el sexo y la disponibilidad de hierro. Todas estas teorías no son mutuamente excluyentes. Es probable que eventos o factores previos o posteriores a la mutación contribuyan a determinar el fenotipo de los SMPC.

Nuevos descubrimientos moleculares en este terreno han sido la demostración de una mutación en el



exón 12 del gen *JAK2* en algunos pacientes con PV sin mutación V617F, así como la mutación del gen *c-MPL*<sup>9</sup>, que regula el receptor de la trombopoyetina, en el 5-10% de los pacientes con MFP o TE, la mayoría de los cuales no presentan la mutación de *JAK2*.

Además de contribuir a un mejor conocimiento de la patogénesis de los SMPC, el descubrimiento de la mutación de *JAK2* ha tenido importantes repercusiones prácticas. Entre ellas, la simplificación de los criterios diagnósticos de los SMPC, ya que la positividad del citado marcador molecular en presencia del fenotipo característico (aumento de la masa eritrocitaria en el caso de la PV, trombocitosis en la TE, fibrosis medular, esplenomegalia y síndrome leucoeritroblástico en la MFP) permite establecer fácilmente el diagnóstico de la enfermedad. Además, el escrutinio de la mutación de *JAK2* en los pacientes con síndrome de Budd-Chiari o trombosis del eje esplenoportal no sólo simplifica el diagnóstico de un posible SMPC subyacente (lo que la convierte en la primera prueba diagnóstica a realizar en tales casos), sino que aumenta en alrededor de un 10% la frecuencia diagnóstica de estas hemopatías en dichos enfermos. Por otra parte, el estudio de la mutación de *JAK2* se ha incorporado a los criterios de respuesta a terapéuticas potencialmente erradicativas de los SMPC, como el trasplante alogénico de progenitores hemopoyéticos en la mielofibrosis. Finalmente, se ha comprobado que el tratamiento con interferón es capaz de reducir e incluso negativizar los alelos mutados en los pacientes con PV.

Otro de los aspectos de desarrollo reciente es el estudio de los mecanismos de trombosis en los SMPC, en especial la importancia creciente que se concede al papel de los leucocitos en la génesis de esta complicación. En este sentido, varios estudios han puesto de manifiesto la influencia en la aparición de trombosis de cifras de leucocitos elevadas o en el cuartil superior de la normalidad, tanto en la PV como en la TE. Dicha influencia sería también cualitativa, pues se ha demostrado que estos pacientes presentan signos de activación leucocitaria, tales como un número incrementado de complejos granulocito-plaquetas, un aumento en la expresión del antígeno CD11b y un incremento del factor tisular monocitario, considerado actualmente como un importante iniciador de la cascada de la coagulación<sup>10</sup>. Además, en estudios recientes se ha observado una correlación entre los niveles de factor tisular y la mutación de *JAK2*.

Desde el punto de vista terapéutico, también se han producido avances en los SMPC. Entre ellos, la demostración de la superioridad de la hidroxiurea sobre la anagrelida en la disminución de la frecuencia de trombosis en la TE, lo que apoyaría el papel de los leucocitos en la trombosis de los SMPC<sup>11</sup>. Asimismo,

la importancia de la adición de ácido acetilsalicílico a dosis bajas al tratamiento de base de la PV para disminuir el riesgo de trombosis<sup>12</sup>. Finalmente, la mutación de *JAK2* ha abierto el camino al ensayo de fármacos inhibidores de *JAK2*.

---

## Mielofibrosis primaria

En su forma bien establecida, la MFP se caracteriza por fibrosis de la médula ósea, hemopoyesis extramedular con esplenomegalia, anemia con dacriocitosis y síndrome leucoeritroblástico. La MFP es una proliferación clonal de una célula madre pluripotencial de la hemopoyesis, en la que la fibrosis y la reacción del estroma constituyen fenómenos reactivos a la liberación de citocinas, fundamentalmente por los megacariocitos, los monocitos y las células endoteliales<sup>13</sup>. En los últimos años se han producido importantes avances en el conocimiento de la patogenia de la enfermedad, en especial el ya mencionado descubrimiento de la mutación V617F del gen *JAK2* en la mitad de los pacientes y de la mutación del gen *c-MPL* en un 5-10% de ellos<sup>9</sup>, lo que ha simplificado el diagnóstico de la enfermedad en una proporción apreciable de los casos.

La MFP afecta fundamentalmente a personas de edad avanzada, si bien también hay pacientes jóvenes. En series recientes, la supervivencia mediana se sitúa alrededor de los 5 años, pero existe una gran variabilidad. Los principales factores pronósticos iniciales son la edad superior a 65 años, la sintomatología constitucional, la Hb inferior a 10 g/dL, la leucocitosis superior a  $25 \times 10^9/L$  y la presencia de blastos en sangre periférica<sup>14</sup>. Dichos factores han permitido identificar cuatro grupos pronósticos (de bajo, intermedio-1, intermedio-2 y alto riesgo), con una supervivencia mediana de 11, 8, 4 y 2 años, respectivamente (Figura 2)<sup>14</sup>. Por otra parte, la MFP es heterogénea en su presentación y evolución, oscilando su espectro clínico desde pacientes asintomáticos al diagnóstico y que pueden no requerir tratamiento durante años hasta otros con sintomatología constitucional o síntomas derivados de la esplenomegalia y la anemia. Todo ello hace necesario adaptar el tratamiento a las características de la enfermedad en cada individuo. Excepto en la minoría de pacientes que pueden beneficiarse de un alo-TPH, la MFP es una enfermedad incurable, siendo su tratamiento fundamentalmente paliativo, lo que ha estimulado la búsqueda de nuevos tratamientos<sup>15</sup>.

Puesto que la mayoría de las terapéuticas actuales no alargan la supervivencia de los pacientes con MFP, se acepta que si éstos están asintomáticos la abstención terapéutica es una opción razonable, aplazándose el tratamiento hasta que los cambios en la situación

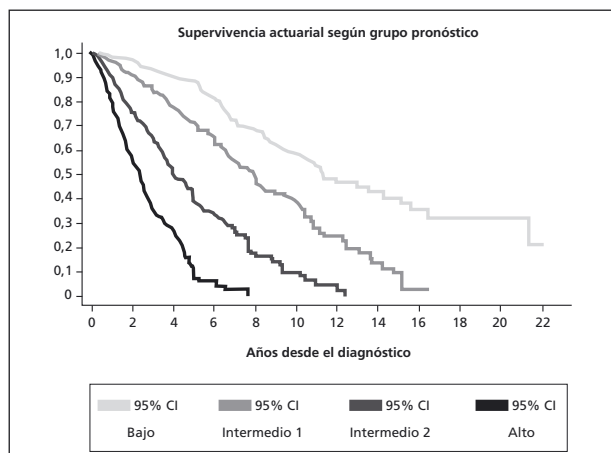


Figura 2. Mielofibrosis primaria: supervivencia de los cuatro grupos de riesgo según la clasificación pronóstica del International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment.

del paciente así lo aconsejen. Con toda seguridad, este enfoque conservador cambiará cuando se disponga de terapéuticas más eficaces para la enfermedad.

En los sujetos con formas hiperproliferativas de la MFP (con esplenomegalia sintomática, sintomatología constitucional, dolores óseos y leucocitosis o trombocitosis intensas) la terapéutica de elección es el tratamiento citolítico, fundamentalmente la hidroxiurea. En cuanto a la anemia, principal problema clínico en la MFP, pueden administrarse anabolizantes como la oxitosisona o el danazol, o bien eritropoyetina recombinante humana (rHuEPO) o darbepoyetina- $\alpha$  si los niveles de eritropoyetina son inadecuados al grado de anemia.

La terapéutica convencional de la MFP incluye asimismo la esplenectomía, que puede considerarse en pacientes con esplenomegalia dolorosa o anemia resistente al tratamiento médico, si bien deben sopesarse los riesgos que conlleva (hemorragia, infección, trombosis o hepatomegalia masiva compensatoria y posible insuficiencia hepática). Otra posibilidad paliativa para la esplenomegalia sintomática y resistente al tratamiento es la radioterapia esplénica, en enfermos que no son candidatos a la esplenectomía. Por su parte, la radioterapia a dosis bajas es el tratamiento de elección para los focos de hemopoyesis extramedular.

El alo-TPH es la única terapéutica con capacidad curativa de la MFP. En su modalidad convencional la mortalidad asociada al procedimiento es de alrededor del 35%, y la supervivencia a los 5 años, del 40% al 50%. Los resultados dependen en gran medida de la edad del paciente. Así, en un estudio amplio, sólo un 14% de los pacientes mayores de 45 años sobrevivían a los 5 años del trasplante, frente al 62% de los enfermos trasplantados por debajo de esa edad.

En los individuos jóvenes con MFP debe sopesarse la mortalidad y morbilidad relacionadas con el alo-TPH convencional frente a la supervivencia esperada sin el trasplante, que en esta subpoblación es notablemente más prolongada. Así, dependiendo de la presencia o no de tres factores de mal pronóstico (Hb < 10 g/dL, sintomatología constitucional y blastos en sangre periférica  $\geq$  1%), pueden identificarse dos subgrupos pronósticos: de bajo (con ninguno o sólo 1 factor desfavorable) y alto riesgo (con 2 o los 3 factores desfavorables). El primer grupo tiene una supervivencia mediana cercana a los 15 años, frente a la de 33 meses para los pacientes de alto riesgo. Por ello, la recomendación actual sería trasplantar de entrada a los pacientes jóvenes con MFP de alto riesgo, mientras que en los de bajo riesgo es razonable adoptar una conducta expectante o emplear antes tratamiento convencional, reservando el trasplante para cuando el tratamiento fracase o aparezcan signos de mal pronóstico.

Dada la edad de la mayoría de los pacientes con MFP, el alo-TPH con régimen de acondicionamiento de intensidad reducida (RIC) se está empleando de manera creciente en esta enfermedad<sup>16</sup>. Si bien la mortalidad relacionada con esta modalidad de trasplante es algo inferior (alrededor del 25%), las complicaciones derivadas de la enfermedad del injerto contra el huésped no difieren de las del trasplante con régimen de acondicionamiento estándar. Por dicho motivo, por ahora sólo se recomienda el empleo de entrada del alo-TPH con RIC en enfermos de 45 a 65-70 años con MFP de alto riesgo o en pacientes seleccionados con MFP de riesgo intermedio-2.

Los fármacos inmunomoduladores y antiangiogénicos, como la talidomida y la lenalidomida, son eficaces para la anemia en el 20-25% de los pacientes con MFP. Sin embargo, su uso se ve limitado por su frecuente toxicidad, fundamentalmente neurológica en el caso de la talidomida, y hematológica en el de la lenalidomida.

Por su parte, inhibidores de la tirosinocinasa como imatinib o tipifarnib han mostrado una actividad terapéutica mínima en la MFP, lo que también ha ocurrido con el inhibidor de proteosomas bortezomib.

En la actualidad se están ensayando en la MFP nuevos fármacos inmunomoduladores, como la pomalidomida, agentes desmetilantes como la azacitidina o la decitabina, fármacos neutralizantes del factor de crecimiento vascular-endotelial y, sobre todo, los inhibidores de *JAK2*<sup>17</sup>. Por el momento, los resultados de los ensayos llevados a cabo con estos últimos fármacos muestran su eficacia sobre las manifestaciones proliferativas de la enfermedad (sintomatología constitucional, esplenomegalia, leucocitosis) y su escaso efecto en la anemia, la fibrosis medular y la reducción de los alelos de *JAK2* mutados.

## Consideraciones finales

Los importantes avances conseguidos en el conocimiento de la biología molecular de la LMC se tradujeron en el diseño de un tratamiento altamente eficaz para esta enfermedad, lo que hace que en la actualidad la mayoría de los pacientes alcancen una situación de enfermedad mínima residual, equivalente en la práctica a una curación funcional. En este terreno, la nueva frontera será la curación auténtica de la enfermedad, bien a través del empleo de fármacos eficaces frente a las células madres quiescentes, que no eliminan los inhibidores de tirosinocinasa actuales, o mediante la inducción de una respuesta inmune que elimine dicho santuario leucémico. En cuanto a los SMPC Ph-negativos, el camino por recorrer es aún bastante más largo. Con toda seguridad, el logro de terapéuticas auténticamente efectivas para estas enfermedades pasará por la profundización en el conocimiento de los mecanismos moleculares subyacentes a las mismas.

## Bibliografía

- Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* 1951; 6: 372-5.
- Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *J Nat Cancer Inst* 1960; 25: 85-109.
- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. Gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005; 352: 1779-90.
- Rowley JD. A new chromosomal consistent abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa banding. *Nature* 1973; 243: 290-93.
- De Klein A, Van Kessel AG, Grosveld G, et al. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukemia. *Nature* 1982; 300: 765-7.
- Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2001; 344: 1031-7.
- Pikman Y, Lee BH, Mercher T, et al. MPL W515L is a novel somatic mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS* 2006; 3: e270.
- Levine RL, Gilliland DG. Myeloproliferative disorders. *Blood* 2008; 112: 2190-8.
- Tiedt R, Hao-Shen H, Sobas MA, et al. Ratio of mutant JAK2-V617F to Jak2 wild type determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood* 2008; 111: 3931-40.
- Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larrán A, Reverter JC, Villamor N, Colomer D, Cervantes F. Increased platelet and leukocyte activation as contributing mechanisms for thrombosis in essential thrombocythemia and correlation with the JAK2 mutational status. *Haematologica* 2006; 91: 169-75.
- Harrison CN, Campbell PJ, Buck G, et al. Hydroxyurea compared with anagrelide in high-risk essential thrombocythemia. *N Engl J Med* 2005; 353: 33-45.
- Landolfi R, Marchioli R, Kutti J, et al. Efficacy and safety of low-dose aspirin in polycythemia vera. *N Engl J Med* 2004; 350: 114-24.
- Lataillade JJ, Pierre-Louis O, Hasselbalch HC, et al. Does primary myelofibrosis involve a defective stem cell niche? From concept to evidence. *Blood* 2008; 112: 3026-35.
- Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood* 2009; 113: 2895-901.
- Cervantes F. Modern management of myelofibrosis. *Br J Haematol* 2005; 128: 583-92.
- Rondelli D, Barosi G, Bacigalupo A, et al. Allogeneic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning in intermediate- and high-risk patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 2005; 105: 4115-9.
- Verstovsek S, Kantarjian HM, Pardanani AD, et al. The JAK inhibitor, INCB018424, demonstrates durable and marked clinical responses in primary myelofibrosis (PMF) and post-polycythemia/essential thrombocythemia myelofibrosis (post PV/ET-MF). *Blood* 2008; 112: 622a. Abstract 1762.



# **SIMPOSIOS**





## Leucemia aguda

COORDINADORES: J. ESTEVE. *Barcelona*  
J. DÍAZ-MEDIAVILLA. *Madrid*

### Resumen del simposio

El conocimiento biológico de la leucemia aguda ha experimentado un gran avance en los últimos años, que está permitiendo dilucidar los mecanismos fisiopatológicos subyacentes. Además, este progreso tiene implicaciones clínicas evidentes, como una mayor precisión en el establecimiento del pronóstico de las diversas formas de leucemia, que es la base sobre la que se desarrollan estrategias de tratamiento adaptadas al riesgo. Un beneficio adicional es el descubrimiento de dianas terapéuticas frente a las que puedan desarrollarse fármacos específicos (*molecularly targeted therapy*). En este simposio hemos querido reunir cinco ejemplos de este progreso en la biología de la leucemia desde distintas perspectivas.

Hasta hace poco, la leucemia linfoblástica T (LLA-T) se consideraba una entidad relativamente homogénea cuyos mecanismos leucemogénicos apenas se conocían. El descubrimiento de la activación anómala de la vía de señalización NOTCH, debida a diversas mutaciones de varios de sus componentes, constituye una de las anomalías más comúnmente presentes en la LLA-T, hallazgo al que ha contribuido de manera fundamental el Dr. Adolfo Ferrando y su grupo. Así, en la actualidad se reconocen diversas subentidades en la LLA-T con pronóstico diferenciado, para los que empiezan a proponerse tratamientos diversos. Por otra parte, el descubrimiento de trastornos en la regulación de determinadas vías de señalización celular permite el diseño de nuevos fármacos, como es el caso de los inhibidores de gamma-secretasas, que contrarrestarían la activación anómala de NOTCH.

Las diversas anomalías citogenéticas reconocidas en la leucemia mieloide aguda (LMA) constituían, hasta hace poco, el campo primordial de conocimiento biológico de la enfermedad y el principal criterio pronóstico. El reconocimiento de diversas mutaciones genéticas, que afectan a factores de transcripción o vías de señalización reguladoras del ciclo celular, en muchos pacientes sin alteraciones citogenéticas ha cambiado la perspectiva de la LMA en los últimos años, a la vez que ha permitido refinar la categorización pronóstica de la LMA. Con todo, son muchas las incertidumbres alrededor de estas mutaciones, sus interacciones y los factores moduladores de su efecto. La Dra. Mireia Camós abordará en su charla el significado clínico de las principales anomalías moleculares en la LMA.

El reconocimiento del impacto pronóstico de estas lesiones moleculares debe repercutir, lógicamente, en el diseño de las estrategias terapéuticas de la LMA. Una consecuencia fundamental de ello es el establecimiento más preciso de las indicaciones de trasplante alogénico de progenitores hemopoéticos (TPH), para lo que son esenciales los análisis de los resultados del TPH basados en criterios biológicos, a lo que el Dr. Jan Cornelissen ha contribuido abundantemente. El estudio del papel de las nuevas modalidades de TPH a la luz de categorías biológicas de LMA nos debe permitir una utilización más racional de dicho procedimiento terapéutico.

Los mecanismos epigenéticos, que conllevan cambios en la expresión génica a través de procesos como la metilación de ADN o las modificaciones de las histonas, han irrumpido muy recientemente en la comprensión de la fisiopatología de la leucemia aguda. El desarrollo de herramientas tecnológicas con gran capacidad para el conocimiento del estado de metilación nos ha aportado una nueva visión de la LMA, con marcadas diferencias en el estado de metilación entre diversas subentidades, en parte conocidas gracias al trabajo de la Dra. María Figueroa. La disponibilidad de fármacos con capacidad de revertir el estado de metilación confiere todavía un interés mayor al conocimiento de las anomalías de metilación en las neoplasias mieloides.

Si bien es cierto que todo este avance de conocimiento de la biología de la LMA no ha tenido todavía una gran repercusión en el tratamiento, es evidente que se han revelado numerosas potenciales dianas moleculares y ello ha generado el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos contra dichas dianas. Alguno de estos fármacos, como los inhibidores FLT3, se encuentran en fases avanzadas de desarrollo clínico, y sus frutos clínicos se conocerán en los próximos años. La gran expectación generada por estos nuevos agentes terapéuticos será revisada por el Dr. Jordi Sierra, desde su experiencia prolongada en el diseño de protocolos terapéuticos.

## IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES RELEVANTES EN LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA AGUDA. IMPACTO CLÍNICO

M. CAMÓS<sup>1</sup>, M. TORREBADELL<sup>2</sup>,  
M. PRATCORONA<sup>2,3</sup>, M. ROZMAN<sup>2</sup>, J. ESTEVE<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departament d'Hematologia. Laboratori Clínic. Hospital Sant Joan de Déu. Esplugues de Llobregat (Barcelona). <sup>2</sup>Unitat d'Hematopatologia y <sup>3</sup>Departament d'Hematologia. IDIPABS. Hospital Clínic de Barcelona

### Introducción

La leucemia mieloblástica aguda (LMA) es una enfermedad clonal heterogénea, producida por el acúmulo en las células progenitoras hematopoyéticas de anomalías genéticas que alteran los mecanismos normales de proliferación, diferenciación y autorrenovación celular. Estas lesiones afectan a la función de diferentes moléculas de señalización, factores de transcripción y receptores de factores de crecimiento y determinan el fenotipo de la leucemia (Dohner *et al.*, 2008). El cariotipo en el momento del diagnóstico constituye, junto con la edad del paciente, el principal factor pronóstico en cuanto a la respuesta al tratamiento, riesgo de recidiva y supervivencia global (Dohner *et al.*, 2008). De esta forma, la citogenética segrega unas categorías de diferente riesgo pronóstico: favorable, con una supervivencia global superior al 60%, que incluye las LMA que afectan al *core binding factor* (LMA-CBF) y la leucemia promielocítica (LPA); desfavorable, que incluye los cariotipos complejos y, particularmente, los pacientes con monosomías como marcadores de muy mal pronóstico, con una supervivencia inferior al 10% (Breems *et al.*, 2008). Aproximadamente la mitad de casos de LMA presentan una citogenética normal (LMA-CN) y quedan englobados en una heterogénea categoría de riesgo intermedio. En los últimos años se han descrito en los casos de LMA-CN múltiples alteraciones moleculares, que incluyen mutaciones y alteraciones en la expresión de diferentes genes. La detección de alteraciones moleculares en la LMA es relevante en la práctica clínica por diferentes motivos: 1) permite el diagnóstico específico de diferentes subtipos de LMA no definidos por la citogenética convencional; 2) permite delimitar el pronóstico para cada subtipo de LMA y aplicar una terapia ajustada al riesgo específico de cada caso; 3) algunas de las alteraciones moleculares identificadas pueden constituir una diana terapéutica específica, y 4) determinadas lesiones moleculares pueden ser útiles en el seguimiento de los pacientes como marcadores de enfermedad residual mínima (ERM).

### Identificación y pronóstico de las alteraciones moleculares en la LMA-CN

Las características de las principales alteraciones moleculares descritas en pacientes con LMA se encuentran resumidas en la Tabla 1.

1. **Mutaciones de FLT3:** El gen *FMS-like tyrosine kinase 3* (FLT3), localizado en 13q12, codifica una proteína de clase III de los receptores tirosincinasa (RTK). Mediante la unión a su ligando FLT3 activa las vías de STAT5a, RAS/MAP-K y PI3-K, que incrementan la proliferación y supervivencia de las células. FLT3 se expresa en dos tercios de los casos de LMA, a niveles superiores a los observados en los progenitores hematopoyéticos normales (Renneville *et al.*, 2008). En la LMA, las mutaciones de FLT3 producen una activación constitutiva del receptor independiente de ligando y, por tanto, un aumento de la proliferación y supervivencia de las células, aunque también provocan un bloqueo de la diferenciación mieloide a través de la inhibición de CEBPA y PU.1. Se han identificado mutaciones de FLT3 en dos dominios funcionales: en el dominio yuxtamembrana en forma de duplicaciones internas en tándem (FLT3-ITD), y como mutaciones puntuales en el dominio de activación de cinasas (FLT3-TKD) (Renneville *et al.*, 2008).

La FLT3-ITD se observa en el 30-35% de los pacientes con LMA-CN y se asocia a hiperleucocitosis y a un mayor porcentaje de blastos en la médula ósea. Múltiples estudios han demostrado un impacto clínico desfavorable de la FLT3-ITD debido a un aumento del riesgo de recidiva y a una menor supervivencia libre de enfermedad (SLE) y menor supervivencia global (SG) (Gale *et al.*, 2008; Schlenk *et al.*, 2008). El pronóstico de la FLT3-ITD parece estar modulado por el nivel de alelo mutado y no depender solamente de la presencia o ausencia de la mutación. En este sentido, se ha descrito que los pacientes con FLT3-ITD y pérdida de expresión del alelo germinal tienen peor evolución (Gale *et al.*, 2008). Por otro lado, la cuantificación del nivel relativo del alelo mutado permite definir distintos subgrupos pronósticos: aquellos pacientes con una baja ratio alélica de mutación presentan una supervivencia equiparable a aquellos pacientes sin FLT3-ITD (Gale *et al.*, 2008; Torreadell *et al.*, 2009). Por otra parte, se ha sugerido que el tamaño de la duplicación también influye en el pronóstico, aunque diferentes estudios muestran resultados contradictorios (Gale *et al.*, 2008).

Las mutaciones puntuales en el dominio tirosincinasa (FLT3-TKD) se presentan en el 11-14% de los pacientes con LMA-CN, y su impacto pronóstico resulta controvertido: algunos estudios no observaron valor pronóstico de las FLT3-TKD; por el contrario, otros trabajos han señalado un impacto desfavorable o incluso favorable en la evolución de los pacientes (Bacher *et al.*, 2008; Whitman *et al.*, 2008).

Tabla 1. Características de las principales alteraciones moleculares detectadas en pacientes con LMA

		Frecuencia (%)		Leucocitos	Asociación a alteraciones citogenéticas	Asociación a alteraciones moleculares		Pronóstico	Comentarios
		Todas LMA	LMA-CN			Positiva	Negativa		
1	FLT3-ITD	20	28-34	↑	CN t(15;17) t(6;9)	NPM1 PML-RARalfa	c-KIT RAS CEBPA	Peor SG y SLE, mayor RR	Peor si mutación homocigota; valor pronóstico de la ratio alelo mutado/germinal
2	FLT3-TKD	5-10	11-14	↑	CN 14-24% inv(16)	NPM1 CBFB-MYH11		Controvertido	Importancia nivel de alelo mutado
3	NPM1	25-35	45-65	↑	CN 35-40% del9q 15% trisomía 8	FLT3-ITD (40%) FLT3-TKD	CEBPA	Genotipo favorable: NPM1mut/ FLT3wt: mejor SG y SLE	No beneficio TPH alogénico en 1.ª RC
4	CEBPA	4-9	10-18	NS	CN 40% del9q	↑ expresión BAALC	NPM1 FLT3-ITD	Mejor SG y SLE	Pronóstico favorable sólo si mutación bialélica
5	MLL-PTD	5-10	5-10	NS	50% trisomía 11		CEBPA NPM1	Mayor RR	
6	KIT	2-8	baja	↑	30% CBF	RUNX1-RUNX1T1		Peor pronóstico*	
7	N-RAS	10-15	9-14	NS	40% CBF	CBFB-MYH11	FLT3-ITD	No impacto pronóstico	Mayor sensibilidad a citarabina
8	K-RAS	5	3	NS	25% inv(3) 5-17% CBF		FLT3-ITD	No impacto pronóstico	Mayor sensibilidad a citarabina
9	WT1	10	10	↑ si FLT3-ITD asociada	CN	CEBPA FLT3-ITD ↑ expresión BAALC ↑ expresión ERG		Controvertido	Peor pronóstico si asociado a FLT3-ITD

CN: cariotipo normal; ITD: internal tandem duplication; NS: no significativo; RC: remisión completa; RR: riesgo de recidiva; SG: supervivencia global; SLE: supervivencia libre de enfermedad; TKD: tyrosine kinase domain; TPH: trasplante de progenitores hemopoyéticos. \* Controvertido, no en todos los estudios.

El estado mutacional de FLT3 puede variar durante la evolución del paciente: algunos casos no presentan la mutación original en la recidiva y otros la adquieren en ese momento. Esta inestabilidad dificulta el uso de FLT3 como marcador de ERM y sugiere que se trata de un evento genético secundario aparecido en una subclona de blastos y no en la *stem-cell* leucémica (Renneville *et al.*, 2008).

**2. Mutaciones de NPM1:** El gen nucleofosmina (NPM1, B23, numatrin, NO38), en el cromosoma 5q35, codifica una proteína con funciones oncogénicas o antioncogénicas, dependiendo del nivel de expresión, de la interacción con otras proteínas y de su localización. En condiciones normales, interviene en el transporte entre el núcleo y el citoplasma de diferentes partículas, regula la progresión del ciclo celular, la respuesta al estrés celular y la vía de arf-p53 a múltiples niveles (Dohner *et al.*, 2008; Renneville *et al.*, 2008). Las mutaciones a nivel del exón 12 del gen NPM1 representan la anomalía genética más frecuente en la LMA, ya que se observan en el 30% de LMA y en el 50-60% de LMA-CN. Aunque se han descrito más de 40 mutaciones diferen-

tes, más del 95% resultan en una inserción de 4 pb en la posición 960; esto provoca una señal adicional de salida nuclear y la pérdida de los residuos de triptófano 290 y 288, que determinan la localización nucleolar. Como consecuencia, se produce una deslocalización citoplasmática aberrante de la proteína y alteración de sus funciones. Las mutaciones de tipo A (TCTG) representan el 70-80% de los casos, mientras que las de tipo B y D suponen el 15-20% de los casos. Las mutaciones de NPM1 son estables durante la evolución de la enfermedad, lo que posibilita su uso como marcador de ERM. Se presentan preferentemente en mujeres y en leucemias hiperleucocitósicas. Morfológicamente los blastos suelen presentar un núcleo hendido (*cuplike* o signo de la impronta de dedo), y en el fenotipo destaca la negatividad para CD34 de los blastos (Dohner *et al.*, 2008; Renneville *et al.*, 2008). Las mutaciones de NPM1 son mutuamente excluyentes de las translocaciones t(8;21), inv(16) y t(15;17) y también son infrecuentes en cariotipos complejos. Respecto a otras alteraciones moleculares, se asocian a FLT3-ITD o FLT3-TKD, pero no a mutaciones de CEBPA ni del gen MLL. Se ha con-



firmado un pronóstico favorable de las mutaciones de NPM1 siempre y cuando no se acompañen de FLT3-ITD, con una supervivencia equiparable a la de pacientes de riesgo genético favorable.

**3. Mutaciones de CEBPA:** El gen *CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$*  (CEBPA), en el cromosoma 19q13.1, codifica un factor de transcripción implicado en la diferenciación de los progenitores hematopoyéticos hacia la línea mieloide madura. CEBPA inhibe la proliferación celular, disminuye la expresión de c-myc y aumenta la expresión de genes específicos de la línea granulocítica, en sinergia con otros genes como el complejo CBF y PU.1 (Lin *et al.*, 2005). CEBPA es una proteína de 42 kDa con cuatro dominios: en su parte C-terminal contiene un dominio (bZIP) que media la dimerización de la proteína y un dominio de unión a DNA; en la parte N-terminal se encuentran los dominios de regulación y transactivación TAD1 y TAD2. Las mutaciones de CEBPA pueden ser de dos tipos: las mutaciones que afectan a la parte C-terminal resultan en una deficiente dimerización y/o unión al DNA; las mutaciones en la parte N-terminal llevan al aumento de traducción de una isoforma truncada de la proteína de 30 kDa con actividad inhibitoria sobre la proteína de 42 kDa. Aunque algunos pacientes sólo presentan una mutación, otros casos presentan dobles lesiones, la mayoría bialélicas. Las mutaciones de CEBPA (9% LMA; 20% LMA-CN) se asocian a los subtipos M1-M2, y presentan un fenotipo característico (CD7+, CD34+, HLA-DR+ y CD15+) (Lin *et al.*, 2005; Marcucci *et al.*, 2008a). Se han descrito como mecanismos alternativos de inactivación de CEBPA la disminución de su expresión en las t(8;21) y el silenciamiento del promotor del gen por hipermetilación en un nuevo subgrupo de LMA identificado por su perfil de expresión génica (Figueroa *et al.*, 2009). Existe una correlación negativa con las mutaciones de NPM1 y FLT3-ITD, aunque muy infrecuentemente se han descrito casos asociados a estas lesiones. Las mutaciones de CEBPA confieren un pronóstico favorable, con una supervivencia similar a la de los pacientes de bajo riesgo citogenético. Sin embargo, el impacto pronóstico favorable parece limitarse a los casos con dobles mutaciones de CEBPA y sin FLT3-ITD (Pabst *et al.*, 2009; Renneville *et al.*, 2009; Wouters *et al.*, 2009b).

**4. MLL-PTD:** El gen MLL, localizado en 11q23, se encuentra reordenado en la LMA mediante translocaciones recíprocas o duplicaciones parciales en tándem de los exones 5 a 11 del gen (MLL-PTD). A diferencia de las proteínas quiméricas de fusión de MLL, las MLL-PTD conservan todos los dominios funcionales de la proteína y silencian el alelo MLL germinal a través de mecanismos epigenéticos. Esta alteración se detecta en el 5-11% de LMA-CN y se asocia a una menor duración de la remisión completa y menor SLE (Dohner *et al.*, 2008).

**5. Mutaciones de WT1:** El gen del tumor de Wilms (WT1), en 11p13, es un importante regulador de la transcripción de genes implicados en el crecimiento y metabolismo celular. La alteración de su función promueve la proliferación de los precursores hematopoyéticos y bloquea la diferenciación celular. WT1 se expresa en el 75-100% de las LMA y se ha utilizado como marcador de ERM en diferentes estudios. Se han descrito mutaciones de WT1 en un 10-15% de LMA-CN, preferentemente en los exones 7 y 9. A nivel molecular se han observado alteraciones concomitantes como la FLT3-ITD, mutaciones de CEBPA y de NPM1 y una elevada expresión de ERG y BAALC. El impacto pronóstico de las mutaciones de WT1 es controvertido y se ha sugerido que sólo los casos asociados a FLT3-ITD presentan un mal pronóstico (Gaidzik *et al.*, 2009; Paschka *et al.*, 2008).

**6. Mutaciones de KIT:** El protooncogén KIT, en el cromosoma 4q12, es un receptor tirosin-cinasa de clase III implicado en la transducción de señales en vías de proliferación, diferenciación y supervivencia. Se han descrito mutaciones de KIT en el 2-8% de LMA, a nivel de los exones 8 y 17 del gen. En las LMA-CBF las mutaciones de KIT representan el 12-20% de los casos y se asocian a hiperleucocitosis y a un mayor riesgo de recidivas (Mrozek *et al.*, 2008).

**7. Mutaciones de RAS:** Los oncogenes RAS regulan la transducción de señales a través de la unión a diferentes receptores de membrana como c-KIT y FLT3. Las mutaciones de N-RAS producen una activación constitutiva de la proteína y se observan en el 10-15% de LMA-CN, sin haberse demostrado un impacto pronóstico en estos casos (Neubauer *et al.*, 2008).

**8. Alteración en el nivel de expresión génica:** Diversos estudios han analizado en la LMA-CN el papel pronóstico de la elevada o baja expresión de determinados genes, como ERG, BAALC, WT1, MN1, PRA-ME, EVI1 o FOXO3a (Santamaria *et al.*, 2009a; Santamaria *et al.*, 2009b). La combinación de la expresión de estos genes permitiría refinar el pronóstico de los pacientes, aportando información adicional al estado mutacional de NPM1, FLT3 y CEBPA.

---

### Cooperación entre alteraciones moleculares

La multiplicidad de lesiones genómicas que frecuentemente coexisten en una célula leucémica refleja la sucesiva acumulación de eventos durante la leucemogénesis. Probablemente se produce en primer lugar una disregulación de genes implicados en el mantenimiento celular y reparación de DNA, lo que lleva a una inestabilidad genómica que predispone a la aparición de nuevas alteraciones moleculares (Renneville *et al.*, 2008). Estos eventos moleculares pertenecen a dos grupos complementarios: los denominados

de tipo I, que activan vías de transducción de señales y producen un aumento de proliferación y/o supervivencia de los progenitores hematopoyéticos y los eventos de tipo II, que afectan a factores de transcripción y producen un bloqueo de la diferenciación celular. Generalmente coexisten alteraciones de los dos grupos en un mismo caso y raramente coinciden dos alteraciones del mismo tipo en un mismo paciente, quizás porque esto daría lugar a una redundancia funcional (Renneville *et al.*, 2008). En la Tabla 1 se reflejan las principales asociaciones entre alteraciones moleculares en la LMA.

### Alteraciones moleculares como dianas terapéuticas

El conocimiento de las vías implicadas en las alteraciones moleculares descubiertas ha posibilitado el uso de terapias dirigidas. Así, muchas de las alteraciones moleculares descritas han sido consideradas potenciales dianas terapéuticas, a través de terapia única dirigida o bien asociada a la quimioterapia convencional. Las mutaciones que afectan a RTK (FLT3, c-KIT), pueden beneficiarse de inhibidores específicos de tirosín-cinasas. A su vez, las proteínas RAS requieren un proceso de farnesilación para ser activas, por lo que se ha estudiado el tratamiento con inhibidores de la farnesil-transferasa en casos de LMA con mutaciones de RAS. También se ha analizado el papel de la terapia epigenética con agentes hipometilantes e inhibidores de histona-deacetilasas en los casos de LMA y MLL-PTD, tratamiento bajo el cual se consiguió reactivar la transcripción del alelo MLL germinal y una mayor muerte de los blastos. En las LMA con pérdida de función de CEBPA existen datos clínicos con resultados muy favorables con regímenes de quimioterapia con altas dosis de citarabina (Renneville *et al.*, 2008). Por otra parte, se ha descrito que los pacientes con genotipo NPM1mut/FLT3wt presentan una evolución aún más favorable cuando se añade ácido *all-trans* retinoico a la quimioterapia (Schlenk *et al.*, 2009).

### Aportaciones de las nuevas tecnologías de análisis genómico

En los últimos años la introducción de nuevas tecnologías de análisis global como los *microarrays* de DNA y la secuenciación completa del genoma humano han aportado nuevos conocimientos en el estudio de la LMA. Desde el primer estudio de perfil de expresión génica (PEG) en cáncer en 1999, que confirmó una firma génica diferente de la LMA de la leucemia linfoblástica aguda (LLA), se han realizado múltiples estudios del transcriptoma en diferentes poblaciones y

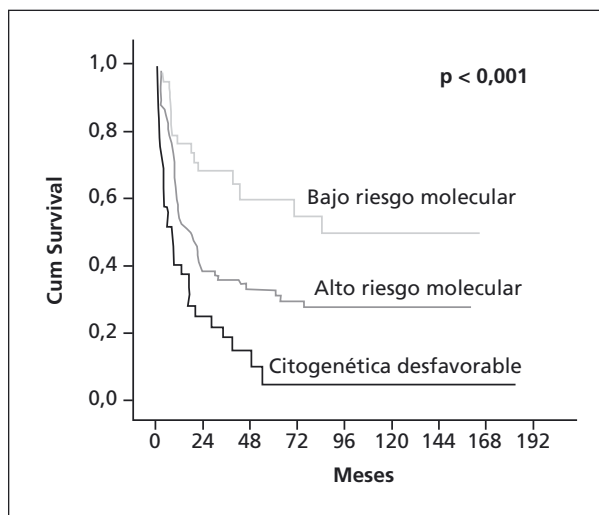


Figura 1. Supervivencia global de una serie de 181 pacientes con LMA de riesgo intermedio o desfavorable tratados homogéneamente en un solo centro (Torrebadell *et al.*, 2009). Categorías definidas por la combinación de datos genéticos y moleculares. La categoría de bajo riesgo molecular incluye los pacientes con genotipo favorable: citogenética de riesgo intermedio y NPM1mut/FLT3germinal o NPM1/FLT3-ITD con ratio alelo mutado/germinal (m/wt)  $\leq 0,31$ ; la categoría de alto riesgo molecular engloba los pacientes con citogenética de riesgo intermedio y NPM1germinal o FLT3-ITD con ratio m/wt  $> 0,31$ .

con diferentes finalidades: 1) predecir subtipos definidos por características genéticas/moleculares o por su pronóstico; 2) identificar nuevos subgrupos de LMA, y 3) identificar los genes o vías implicadas en la leucemogénesis en determinados subtipos de LMA (Wouters *et al.*, 2009a). Mediante el estudio del PEG se pueden identificar de forma consistente los casos de LMA y citogenética favorable (t(15;17), LMA-CBF). Las mutaciones de CEBPA bialélicas también presentan una firma génica distintiva, a diferencia de las mutaciones heterocigotas únicas (Marcucci *et al.*, 2008a; Verhaak *et al.*, 2009). Las LMA con mutación de NPM1 presentan un perfil de sobreexpresión de genes HOX y TALE característico pero no específico, ya que las LMA con alteración en el gen MLL o las t(6;9) muestran un perfil similar. Por el contrario, las mutaciones que afectan a vías de señalización (FLT3-ITD, RAS) no mostraron un PEG específico (Verhaak *et al.*, 2009). Por otro lado, los estudios de PEG han servido para identificar, dentro de las LMA-CBF, subgrupos con diferente evolución clínica, en los que se han podido identificar distintas vías patogénicas implicadas (Mrozek *et al.*, 2008). Recientemente, el estudio de PEG ha permitido definir un nuevo subtipo de leucemia caracterizado por un silenciamiento de CEBPA por hipermetilación de su promotor, un fenotipo inmaduro mieloides/linfocitos T y frecuentes mutaciones del gen NOTCH1 (Figueroa *et al.*, 2009). Diferentes estudios han intentado identificar firmas génicas predictivas del pronóstico

en la LMA: Bullinger *et al.* seleccionaron 133 genes que diferenciaban dos subgrupos de LMA-CN con diferente pronóstico, en parte relacionado con la presencia de FLT3-ITD (Wouters *et al.*, 2009a). En nuestro grupo hemos identificado una serie de genes relacionados con un peor pronóstico en pacientes con LMA-CN sin anomalías moleculares asociadas, relacionados con vías de proliferación y apoptosis (Camos *et al.*, 2009).

Recientemente se han incorporado otras técnicas de análisis, como el estudio de niveles de microRNA (miRNA), *arrays* para análisis de cambios en el número de copias de DNA (SNP-*arrays*, CGH-*arrays*), estudios epigenéticos y la secuenciación del DNA genómico. De forma similar al mRNA, se han identificado perfiles de miRNA para algunos subtipos de LMA (Garzon *et al.*, 2008; Marcucci *et al.*, 2008b). Diferentes estudios de SNP-*arrays* han demostrado un patrón de inestabilidad genómica y una presencia relativamente común de pérdida de heterocigosidad a través de un mecanismo de disomía uniparental parcial en LMA (Wouters *et al.*, 2009a).

## Conclusiones

En los últimos años se han realizado en amplias series de pacientes diversos análisis del valor pronóstico individual de las diferentes alteraciones moleculares descritas, así como de la combinación de diferentes anomalías en un mismo caso (Gaidzik *et al.*, 2009; Marcucci *et al.*, 2008a; Renneville *et al.*, 2009; Santamaria *et al.*, 2009b; Schlenk *et al.*, 2008; Torrebadell *et al.*, 2009; Wouters *et al.*, 2009b). Todos los trabajos confirman que el genotipo NPM1mut/FLT3wt y el genotipo CEBPAmut se asocian a una evolución favorable, con una supervivencia similar a la de la LMA-CBF. Además, estos casos no parecen beneficiarse del tratamiento con trasplante alogénico en primera remisión completa. Por tanto, los pacientes con LMA y genotipo favorable (NPM1mut/FLT3wt o CEBPAmut) deberían clasificarse dentro de la categoría de riesgo favorable (Dohner *et al.*, 2008; Schlenk *et al.*, 2008). En el resto de pacientes de genotipo no favorable se ha analizado el impacto pronóstico de otras variables moleculares, como la ratio de la mutación de FLT3 (Figura 1) o la presencia concomitante de otras alteraciones moleculares (Gaidzik *et al.*, 2009; Langer *et al.*, 2009; Marcucci *et al.*, 2008a; Paschka *et al.*, 2008; Santamaria *et al.*, 2009a; Santamaria *et al.*, 2009b; Torrebadell *et al.*, 2009).

En resumen, en la LMA las alteraciones moleculares son importantes factores predictivos de la respuesta al tratamiento y la supervivencia. Por tanto, en el diagnóstico de la LMA se deben realizar estudios citogenéticos y moleculares, ya que la combinación de los hallazgos de ambas técnicas posibilita una mejor pre-

dicción de la evolución del paciente y permite seleccionar el tratamiento más apropiado según el riesgo de cada caso, especialmente en la LMA-CN.

## Bibliografía

- 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.
- Breems, DA; van Putten, WL; De Greef, GE; Van Zelder-Bhola, SL; Gerssen-Schoorl, KB; Mellink, CH; Nieuwint, A; Jotterand, M; Hagemeyer, A; Beverloo, HB, and Lowenberg, B. (2008). Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. *J. Clin. Oncol.* (26) 4791-4797.
- Camos, M; Kalko, SG; Torrebadell, M; Pratorcorona, M; Rozman, M; Díaz-Beyá, M; Costa, D; Carrio, A; Campo, E; Montserrat, E, and Esteve, J. (2009). Gene expression profile might predict prognosis in patients with intermediate-risk acute myeloid leukemia (AML) lacking NPM1 and FLT3 mutations. Comunicación personal, EHA 14th Congress, Berlin (abstract 0292).
- Dohner, K and Dohner, H. (2008). Molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Haematologica* (93) 976-982.
- Figuerola, ME; Wouters, BJ; Skrabanek, L; Glass, J; Li, Y; Erpelinck-Verschueren, CA; Langerak, AW; Lowenberg, B; Fazzari, M; Grealley, JM; Valk, PJ; Melnick, A, and Delwel, R. (2009). Genome-wide epigenetic analysis delineates a biologically distinct immature acute leukemia with myeloid/T-lymphoid features. *Blood* (113) 2795-2804.
- Gaidzik, VI; Schlenk, RF; Moschny, S; Becker, A; Bullinger, L; Corbacioglu, A; Krauter, J; Schlegelberger, B; Ganser, A; Dohner, H, and Dohner, K. (2009). Prognostic impact of WT1 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a study of the German-Austrian AML Study Group. *Blood* (113) 4505-4511.
- Gale, RE; Green, C; Allen, C; Mead, AJ; Burnett, AK; Hills, RK, and Linch, DC. (2008). The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood* (111) 2776-2784.
- Garzon, R; Volinia, S; Liu, CG; Fernandez-Cymering, C; Palumbo, T; Pichiorri, F; Fabbri, M; Coombes, K; Alder, H; Nakamura, T; Flomenberg, N; Marcucci, G; Calin, GA; Kornblau, SM; Kantarjian, H; Bloomfield, CD; Andreeff, M, and Croce, CM. (2008). MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood* (111) 3183-3189.
- Langer, C; Marcucci, G; Holland, KB; Radmacher, MD; Maharry, K; Paschka, P; Whitman, SP; Mrozek, K; Baldus, CD; Vij, R; Powell, BL; Carroll, AJ; Kollitz, JE; Caligiuri, MA; Larson, RA, and Bloomfield, CD. (2009). Prognostic Importance of MN1 Transcript Levels, and Biologic Insights From MN1-Associated Gene and MicroRNA Expression Signatures in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia: A Cancer and Leukemia Group B Study. *J. Clin. Oncol.*
- Lin, LI; Chen, CY; Lin, DT; Tsay, W; Tang, JL; Yeh, YC; Shen, HL; Su, FH; Yao, M; Huang, SY, and Tien, HF. (2005). Characterization of CEBPA mutations in acute myeloid leukemia: most patients with CEBPA mutations have biallelic mutations and show a distinct immunophenotype of the leukemic cells. *Clin. Cancer Res.* (11) 1372-1379.
- Marcucci, G; Maharry, K; Radmacher, MD; Mrozek, K; Vukosavljevic, T; Paschka, P; Whitman, SP; Langer, C; Baldus, CD; Liu, CG; Ruppert, AS; Powell, BL; Carroll, AJ; Caligiuri, MA; Kollitz, JE; Larson, RA, and Bloomfield, CD. (2008a). Prognostic significance of, and gene and microRNA expression signatures associated with, CEBPA mutations in cytogenetically



- normal acute myeloid leukemia with high-risk molecular features: a Cancer and Leukemia Group B Study. *J. Clin. Oncol.* (26) 5078-5087.
- Marcucci, G; Radmacher, MD; Maharry, K; Mrozek, K; Ruppert, AS; Paschka, P; Vukosavljevic, T; Whitman, SP; Baldus, CD; Langer, C; Liu, CG; Carroll, AJ; Powell, BL; Garzon, R; Croce, CM; Kolitz, JE; Caligiuri, MA; Larson, RA, and Bloomfield, CD. (2008b). MicroRNA expression in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* (358) 1919-1928.
- Mrozek, K; Marcucci, G; Paschka, P, and Bloomfield, CD. (2008). Advances in molecular genetics and treatment of core-binding factor acute myeloid leukemia. *Curr. Opin. Oncol.* (20) 711-718.
- Neubauer, A; Maharry, K; Mrozek, K; Thiede, C; Marcucci, G; Paschka, P; Mayer, RJ; Larson, RA; Liu, ET, and Bloomfield, CD. (2008). Patients with acute myeloid leukemia and RAS mutations benefit most from postremission high-dose cytarabine: a Cancer and Leukemia Group B study. *J. Clin. Oncol.* (26) 4603-4609.
- Pabst, T; Eyholzer, M; Fos, J, and Mueller, BU. (2009). Heterogeneity within AML with CEBPA mutations; only CEBPA double mutations, but not single CEBPA mutations are associated with favourable prognosis. *Br. J. Cancer* (100) 1343-1346.
- Paschka, P; Marcucci, G; Ruppert, AS; Whitman, SP; Mrozek, K; Maharry, K; Langer, C; Baldus, CD; Zhao, W; Powell, BL; Baer, MR; Carroll, AJ; Caligiuri, MA; Kolitz, JE; Larson, RA, and Bloomfield, CD. (2008). Wilms' tumor 1 gene mutations independently predict poor outcome in adults with cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia group B study. *J. Clin. Oncol.* (26) 4595-4602.
- Renneville, A; Boissel, N; Gachard, N; Naguib, D; Bastard, C; de, BS; Nibourel, O; Pautas, C; Reman, O; Thomas, X; Gardin, C; Terre, C; Castaigne, S; Preudhomme, C, and Dombret, H. (2009). The favorable impact of CEBPA mutations in patients with acute myeloid leukemia (AML) is only observed in the absence of associated cytogenetic abnormalities and FLT3 internal duplication (FLT3-ITD). *Blood*
- Renneville, A; Roumier, C; Biggio, V; Nibourel, O; Boissel, N; Fenaux, P, and Preudhomme, C. (2008). Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia* (22) 915-931.
- Santamaria, CM; Chillon, MC; Garcia-Sanz, R; Perez, C; Caballero, MD; Ramos, F; de Coca, AG; Alonso, JM; Giraldo, P; Bernal, T; Queizan, JA; Rodriguez, JN; Fernandez-Abellan, P; Barez, A; Penarrubia, MJ; Vidriales, MB; Balanzategui, A; Sarasquete, ME; Alcoceba, M; az-Mediavilla, J; San Miguel, JF, and Gonzalez, M. (2009a). High FOXO3a expression is associated with a poorer prognosis in AML with normal cytogenetics. *Leuk. Res.*
- Santamaria, CM; Chillon, MC; Garcia-Sanz, R; Perez, C; Caballero, MD; Ramos, F; Garcia de, CA; Alonso, JM; Giraldo, P; Bernal, T; Queizan, JA; Rodriguez, JN; Fernandez-Abellan, P; Barez, A; Penarrubia, MJ; Balanzategui, A; Vidriales, MB; Sarasquete, ME; Alcoceba, M; az-Mediavilla, J; San Miguel, JF, and Gonzalez, M. (2009b). Molecular stratification model for prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia (CN-AML). *Blood*
- Schlenk, RF; Dohner, K; Kneba, M; Gotze, K; Hartmann, F; Del, VF; Kirchen, H; Koller, E; Fischer, JT; Bullinger, L; Habdank, M; Spath, D; Groner, S; Krebs, B; Kayser, S; Corbacioglu, A; Anhalt, A; Benner, A; Frohling, S, and Dohner, H. (2009). Gene mutations and response to treatment with all-trans retinoic acid in elderly patients with acute myeloid leukemia. Results from the AMLSG Trial AML HD98B. *Haematologica* (94) 54-60.
- Schlenk, RF; Dohner, K; Krauter, J; Frohling, S; Corbacioglu, A; Bullinger, L; Habdank, M; Spath, D; Morgan, M; Benner, A; Schlegelberger, B; Heil, G; Ganser, A, and Dohner, H. (2008). Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* (358) 1909-1918.
- Torrebadell, M; Camos, M; Pratorcorona, M; Rozman, M; Rovira, M; Martínez, C; Fernández-Avilés, F; Carrio, A; Costa, D; Montserrat, E; Carreras, E, and Esteve, J. (2009). Prognostic risk assessment based on combined cytogenetics and molecular screening for optimal choice of post-remission therapy in patients with acute myeloid leukaemia. *Bone Marrow Transplant* (43) S1 (abstract O280)-
- Verhaak, RG; Wouters, BJ; Erpelinck, CA; Abbas, S; Beverloo, HB; Lugthart, S; Lowenberg, B; Delwel, R, and Valk, PJ. (2009). Prediction of molecular subtypes in acute myeloid leukemia based on gene expression profiling. *Haematologica* (94) 131-134.
- Whitman, SP; Ruppert, AS; Radmacher, MD; Mrozek, K; Paschka, P; Langer, C; Baldus, CD; Wen, J; Racke, F; Powell, BL; Kolitz, JE; Larson, RA; Caligiuri, MA; Marcucci, G, and Bloomfield, CD. (2008). FLT3 D835/I836 mutations are associated with poor disease-free survival and a distinct gene-expression signature among younger adults with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia lacking FLT3 internal tandem duplications. *Blood* (111) 1552-1559.
- Wouters, BJ; Lowenberg, B, and Delwel, R. (2009a). A decade of genome-wide gene expression profiling in acute myeloid leukemia: flashback and prospects. *Blood* (113) 291-298.
- Wouters, BJ; Lowenberg, B; Erpelinck-Verschueren, CA; van Putten, WL; Valk, PJ, and Delwel, R. (2009b). Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood* (113) 3088-3091.

## EPIGENETIC DEREGLATION IN MYELOID MALIGNANCIES

M.E. FIGUEROA<sup>1</sup>, A. MELNICK<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Supported by an ASH Fellow Scholar Award.

<sup>2</sup>Supported by NCI R01 CA104348, the Chemotherapy Foundation, the Sam Waxman Cancer Research Foundation, and the G&P Foundation and is a Leukemia and Lymphoma Society Scholar

The term “epigenetics” refers to heritable changes in gene expression patterns that are mediated by a mechanism other than a change in the underlying nucleotide sequence of the genes involved. Epigenetic regulation of gene expression is achieved through a series of chemical modifications to either the DNA itself or its associated histone proteins. Epigenetic modifications include DNA cytosine methylation and post-translational modifications of the histone tails at specific residues, including acetylation, methylation, phosphorylation and sumoylation<sup>1,2</sup>. These epigenetic modifications help to determine chromatin structure, and contribute to regulate gene expression by determining accessibility of transcription factors and other regulatory proteins to gene promoters and regulatory regions.

DNA methylation in mammals occurs at the cytosine residue of CpG dinucleotides and is involved in development, cell differentiation, X chromosome im-

printing and silencing of repetitive elements<sup>3,5</sup>. Methylation of CpG dinucleotides at promoter regions is associated with silencing of the corresponding gene<sup>6</sup>. DNA methylation exerts its effect on gene expression by creating binding sites for repressor proteins which recognize these methylated cytosines<sup>7,8</sup>, or by disrupting the ability of transcription factors to bind to their target sequences<sup>9,10</sup>. However, regulation of gene expression through DNA methylation and other epigenetic marks is more complex, since not only is the presence of these marks important, but their localization and density also seem to play a crucial role<sup>11-13</sup>.

DNA methylation plays a critical role in tissue differentiation and homeostasis during normal development<sup>3,4</sup>. Disruption of epigenetic regulation can profoundly alter a cellular phenotype resulting in aberrant cellular proliferation and survival, both of which are associated with the process of malignant transformation of cells. Epigenetic dysregulation is currently recognized as one of the hallmarks of cancer<sup>14,15</sup>. While normal cells present with hypermethylation of CpG dinucleotides located at repetitive elements and gene bodies, and almost complete absence of methylation at promoter associated CpG islands, the distribution of DNA methylation is completely disrupted in the malignant cell. Neoplastic cells show a redistribution of their DNA methylation pattern, presenting with a global reduction in the total content of 5-methylcytosine in their genomes with an aberrant increase in methylation of promoter associated CpG islands. This altered pattern in DNA methylation can result in genomic instability, aberrant silencing of tumor suppressors, and on occasion, activation of oncogenes<sup>6,14</sup>. Abnormal epigenetic silencing through DNA methylation at promoter regions of key negative cell cycle regulators and DNA repair genes has been demonstrated in many neoplasms, including myelodysplastic syndromes and acute leukemias<sup>16-22</sup>. However, epigenetic deregulation involves not only aberrant DNA methylation patterns but also chromatin remodeling factors and changes in histone modifications<sup>23,24</sup>.

In the last decade, gene expression profiling studies have been performed with the aim of dissecting the molecular subtypes of several neoplasms, in an effort to predict accurately tumor behavior and to identify important oncogenic genes and biological pathways. These studies have revealed the presence of unique gene expression signatures distinguishing specific subgroups of cancers and have served to improve our understanding of the biology of these diseases<sup>25,26</sup>. However, as mentioned above, only part of the cellular information is contained at the messenger RNA level, and the information contained in heritable epigenetic marks is therefore missed by gene expression studies. We hypothesized that epigenetic marks distribute into specific patterns in human disease, and that these

epigenetic profiles reflect critical biological differences. Using a genome wide DNA methylation profiling method we have been able to explore the nature of aberrant epigenetic programming in AML.

Several different methods for profiling genome-wide DNA methylation patterns have been developed in the past years. We use a method called HELP (**H**paII tiny fragment **e**nrichment by **I**igation-mediated **P**CR). HELP quantifies the abundance of CpG methylation throughout the genome by comparing the hypomethylated fraction of a given patient's genome to an unselected representation of the same patient's genome. The measurement of these genome fractions can be performed using high-density oligonucleotide microarrays or by deep sequencing<sup>29-31</sup>. A pilot study integrating information from gene expression, histone modifications (measured by Chromatin Immunoprecipitation microarrays) and DNA methylation by HELP demonstrated that the amount of biologically relevant information captured by gene expression arrays could be significantly increased when all three platforms were carried out in conjunction and the information from all three was integrated. Using this approach we were capable of detecting changes in gene expression levels that were missed by gene expression arrays but were detected by changes in epigenetic marks<sup>32</sup>.

More recently we used a similar approach to epigenetically characterize a subtype of acute leukemia within a cohort of patients that could not be readily distinguished based solely on their gene expression profiles. In this study, we determined the DNA methylation profiles of a group of patients that had been identified as sharing a common gene expression profile in a previous study<sup>27</sup>. Patients in this group were shown to present with either mutations of the *CEBPA* locus and expression of a mutant protein, or with silencing of this gene's expression through hypermethylation of its promoter region of this gene<sup>33</sup>. Genome-wide DNA methylation analysis could readily distinguish between these two groups in an unsupervised analysis, indicating that differences in their DNA methylation profiles were robust enough to segregate the two types of leukemia. Comparison of the two DNA methylation profiles, revealed that cases that with hypermethylation of the *CEBPA* promoter presented with an aberrantly methylated gene signature that consisted almost entirely of hypermethylated genes<sup>34</sup>. Based on their DNA methylation profiles, we could therefore distinguish two forms of leukemia within our cohort, a *CEBPA*-mutant and a *CEBPA*-silenced form. We further compared each of these two forms to normal CD34+ hematopoietic cells and found them to have distinct aberrant DNA methylation profiles. *CEBPA*-silenced leukemias displayed extensive hypermethylation when compared to nor-



mal CD34 cells, while CEBPA-mutant cases presented an equal proportion of aberrantly hyper and hypomethylated promoters. These CEBPA-silenced leukemias which also presented with aberrant expression of T cell markers were associated with a significantly worse clinical outcome than CEBPA-mutant cases and should be considered as a distinct clinical entity<sup>34</sup>.

Epigenomic studies have now become feasible within the context of clinical trials, thus opening a new window of opportunity for us to increase our understanding of the biology of acute leukemias. Early studies by our group and others have demonstrated that epigenomic profiling approaches can be used to classify leukemias<sup>32,35</sup>. Furthermore, epigenomic studies can help identify further levels of heterogeneity by characterizing the epigenetic variability of this disease. More comprehensive studies including larger cohorts of patients will allow us to identify specific epigenomic patterns associated with the different forms of the disease and will lead to a more accurate and biologically relevant molecular classification of leukemias.

## References

- Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science*. 2001 Aug 10;293(5532):1074-80.
- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. 2002 Jan 1;16(1):6-21.
- Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*. 1992 Jun 12;69(6):915-26.
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999 Oct 29;99(3):247-57.
- Ferguson-Smith AC, Surani MA. Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes. *Science*. 2001;293(5532):1086-9.
- Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*. 2003 Nov 20;349(21):2042-54.
- Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet*. 1998 Jun;19(2):187-91.
- Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*. 1998 May 28;393(6683):386-9.
- Watt F, Molloy PL. Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev*. 1988 Sep;2(9):1136-43.
- Kanduri C, Pant V, Loukinov D, Pugacheva E, Qi CF, Wolffe A, et al. Functional association of CTCF with the insulator upstream of the H19 gene is parent of origin-specific and methylation-sensitive. *Curr Biol*. 2000 Jul 13;10(14):853-6.
- Brinkman AB, Pennings SW, Braliou GG, Rietveld LE, Stunnenberg HG. DNA methylation immediately adjacent to active histone marking does not silence transcription. *Nucleic Acids Res*. 2007 Jan 3.
- Zinn RL, Pruitt K, Eguchi S, Baylin SB, Herman JG. hTERT is expressed in cancer cell lines despite promoter DNA methylation by preservation of unmethylated DNA and active chromatin around the transcription start site. *Cancer Res*. 2007 Jan 1;67(1):194-201.
- Bernstein BE, Humphrey EL, Erlich RL, Schneider R, Bouman P, Liu JS, et al. Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jun 25;99(13):8695-700.
- Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. 2002 Jun;3(6):415-28.
- Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer*. 2006 Feb;6(2):107-16.
- Agrawal S, Hofmann WK, Tidow N, Ehrlich M, van den Boom D, Koschmieder S, et al. The C/EBP[delta] tumor suppressor is silenced by hypermethylation in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2007 Jan 18.
- Cameron EE, Baylin SB, Herman JG. p15(INK4B) CpG island methylation in primary acute leukemia is heterogeneous and suggests density as a critical factor for transcriptional silencing. *Blood*. 1999 Oct 1;94(7):2445-51.
- Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J. Methylation of p15INK4B is common, is associated with deletion of genes on chromosome arm 7q and predicts a poor prognosis in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2003;17(9):1813-9.
- Melki JR, Vincent PC, Clark SJ. Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia. *Cancer Res*. 1999 Aug 1;59(15):3730-40.
- Tessema M, Langer F, Dingemann J, Ganser A, Kreipe H, Lehmann U. Aberrant methylation and impaired expression of the p15(INK4b) cell cycle regulatory gene in chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Leukemia*. 2003 May;17(5):910-8.
- Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res*. 1999 Feb 15;59(4):793-7.
- Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jun 9;95(12):6870-5.
- Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, Herman JG, Baylin SB. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet*. 1999 Jan;21(1):103-7.
- McGarvey KM, Fahrner JA, Greene E, Martens J, Jenuwein T, Baylin SB. Silenced tumor suppressor genes reactivated by DNA demethylation do not return to a fully euchromatic chromatin state. *Cancer Res*. 2006 Apr 1;66(7):3541-9.
- Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*. 1999 Oct 15;286(5439):531-7.
- Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, Pieters R, den Boer ML, Minden MD, et al. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet*. 2002 Jan;30(1):41-7.
- Valk PJ, Verhaak RG, Beijnen MA, Erpelinck CA, Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Boer JM, et al. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2004 Apr 15;350(16):1617-28.
- Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002 Jun 20;346(25):1937-47.
- Khulan B, Thompson R, Ye K, Fazzari Mj, Suzuki M, Stasiak E, et al. Comparative isoschizomer profiling of cytosine

- methylation: the HELP assay. *Genome Research*. 2006 August 2006;16(8):1046-55.
30. Figueroa ME, Melnick A, Grealley JM. Genome-wide determination of DNA methylation by Hpa II tiny fragment enrichment by ligation-mediated PCR (HELP) for the study of acute leukemias. *Methods Mol Biol*. 2009;538:395-407.
  31. Oda M, Glass JL, Thompson RF, Mo Y, Olivier EN, Figueroa ME, et al. High-resolution genome-wide cytosine methylation profiling with simultaneous copy number analysis and optimization for limited cell numbers. *Nucleic Acids Res*. 2009 Apr 22.
  32. Figueroa ME, Reimers M, Thompson RF, Ye K, Li Y, Selzer RR, et al. An integrative genomic and epigenomic approach for the study of transcriptional regulation. *PLoS ONE*. 2008;3(3):e1882.
  33. Wouters BJ, Jorda MA, Keeshan K, Louwers I, Erpelinck-Verschueren CA, Tielemans D, et al. Distinct gene expression profiles of acute myeloid/T-lymphoid leukemia with silenced CEBPA and mutations in NOTCH1. *Blood*. 2007 Nov 15;110(10):3706-14.
  34. Figueroa ME, Wouters BJ, Skrabanek L, Glass J, Li Y, Erpelinck-Verschueren CAJ, et al. Genome-wide epigenetic analysis delineates a biologically distinct immature acute leukemia with myeloid/T-lymphoid features. *Blood*. 2009 March 19, 2009;113(12):2795-804.
  35. Krivtsov AV, Feng Z, Lemieux ME, Faber J, Vempati S, Sinha AU, et al. H3K79 Methylation Profiles Define Murine and Human MLL-AF4 Leukemias. *Cancer Cell*. 2008;14(5):355-68.

## **ALLOGENEIC STEM CELL TRANSPLANTATION IN YOUNGER PATIENTS WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA IN FIRST COMPLETE REMISSION: APPLICATION OF SIBLING AND MATCHED UNRELATED DONORS**

J.J. CORNELISSEN

*Department of Hematology, Erasmus University Medical Center, Rotterdam, the Netherlands*

### **Introduction**

Several prospective studies have addressed the role of alloSCT in patients with AML in first remission in each of the 3 commonly accepted cytogenetic subcategories. Randomized controlled trials (RCT) are generally the gold standard for the evaluation of treatment efficacy, but a randomized comparison of alloSCT versus chemotherapy or autologous SCT has so far not been performed in patients with AML in first remission. Alternatively, a genetic randomization has been proposed and has been applied by different cooperative groups. As the availability of a matched sibling donor is essentially a random process, the presence or absence of a donor can be used as a surrogate for randomization. These studies obviously require considerable numbers of patients as well as mature follow-up in order to evaluate the net effect of (long-term)

adverse and favorable effects with sufficient power. Furthermore, in order to study alloSCT in a sufficient number of patients, combining prospective studies of similar design in a meta-analysis may add to the conclusions and interpretation of each individual study.

### **AlloSCT using sibling donors for younger AML patients in first CR**

Although several individual studies had shown a significant reduction of relapse by alloSCT, no beneficial effect on overall survival was demonstrated. However, the first meta-analysis of 5 earlier studies by Yanada *et al.* clearly showed improved outcome for patients with poor-risk cytogenetics. The role of alloSCT in intermediate risk AML, however, was less clear<sup>1</sup>. The MRC study<sup>2</sup> had suggested improved survival in patients with an intermediate risk AML, but the EORTC/GIMEMA study<sup>3</sup> rather suggested a beneficial effect restricted to AML with a poor risk profile. The more recent BGMT study, using an adapted risk-index, however, showed an advantage for intermediate risk patients<sup>4</sup>. The recent study performed by the HOVON/SAKK consortium showed improved DFS in both intermediate and poor-risk patients<sup>5</sup>. Given these not entirely concordant results, the absence of a significant overall benefit in survival in intermediate risk AML, and the availability of new data from studies of similar design, a new meta-analysis was performed using the combined dataset of the HOVON/SAKK, MRC, EORTC and BGMT studies<sup>5</sup>. Relapse, NRM, DFS and OS results were analyzed by donor availability for all patients and then broken down for cytogenetic risk category. The findings from all four studies proved fairly similar with a statistically significant OS benefit of 12% (HR=0.84, CI 0.74-0.95, p=0.01) for all patients without favorable cytogenetics. While relapse was also strongly reduced in patients with a favorable risk profile, a counterbalancing NRM of approximately 20% prevented an improvement of alloSCT on survival to emerge. Therefore, myeloablative alloSCT cannot generally be recommended for patients in first complete remission with cytogenetic favorable subtypes of AML where the relapse probability is 35% or less. Collectively, these results demonstrate that in the context of a NRM of 20%, the beneficial effect of alloSCT becomes apparent as soon as the risk of relapse exceeds approximately 30-40%, irrespective of the specific type of underlying cytogenetic abnormality, that causes the higher relapse rate. Moreover, it indicates that the immunotherapeutic effect (graft versus leukemia) is similarly exerted in all those subcategories of AML.

Most patients with AML in first CR are characterized by an intermediate risk profile. While most of these leukemias lack a specific karyotypic abnormality

ty, molecular genetic markers such as gene mutations and deregulated gene expression can be identified. Approximately 50% of cytogenetically normal AML may carry a mutation in the nucleophosmin (NPM1) gene<sup>6</sup>. The prognostic value of the presence of the NPM1 mutation appeared to depend on the additional presence of the internal tandem duplication (ITD) in the FLT3 tyrosine kinase receptor (FLT3/ITD)<sup>7-10</sup>. Myeloid leukemia's characterized by the NPM1 mutation but without FLT3/ITD, appeared to exhibit a more favorable prognosis with relapse rates less than 30%. In contrast, the presence of the FLT3/ITD, either with or without mutated NPM1, identified a subset of AML clearly associated with an unfavorable prognosis. What is the role of alloSCT in these newer molecular categories of AML? First, as outlined above, in favorable cytogenetic subgroups of AML characterized by a relapse risk of less than 35%, the beneficial effect of alloSCT on relapse was offset by NRM and meta-analysis of donor versus no donor studies failed to show a beneficial effect of alloSCT<sup>(4,5)</sup>. Accordingly, it may be argued that it will be difficult, if not impossible, to show a beneficial effect of alloSCT in the newer (molecular) categories of AML that are also associated with a low relapse rate. Patients with these types of AML may then be offered an alloSCT in case of relapse, as is currently the approach for patients with cytogenetic favorable subtypes. That approach could be adhered in AML with a normal karyotype but with a NPM1 mutation without FLT3/ITD and in case of mutation of the CCAAT/enhancer binding protein (CEBPA), which also has been associated with a favorable prognosis<sup>11,12</sup>. The role of alloSCT in the treatment of FLT3/ITD positive patients is currently subject of debate<sup>13-15</sup>. Three cooperative groups have recently reported on outcome after alloSCT in FLT3/ITD-positive AML<sup>13-15</sup>. While all three studies showed a strong reduction of relapse with hazard ratio's of approximately 50%, only the German study by Schlenk *et al.* showed significantly improved survival by donor availability<sup>15</sup>. Similar to the above-described cooperative studies focusing on the cytogenetic intermediate group, these results would require a meta-analysis in a sufficient number of FLT3/ITD-positive patients. Meanwhile, it seems reasonable to offer alloSCT to all AML patients with a relapse risk exceeding 35%, because so far, these and other results do not indicate that the immunotherapeutic effect of alloSCT on relapse differs among cytogenetic<sup>5</sup> or molecular<sup>13-15</sup> subcategories of AML associated with a higher risk of relapse.

### **AlloSCT in younger AML patients in first CR using matched unrelated donors**

Currently, more than 10 million HLA-typed volunteer donors from approximately 50 registries around the

world appear in the Bone Marrow Donors Worldwide (BMDW) file ([www.bmdw.org](http://www.bmdw.org)). It has resulted in a high probability (70-80%) of finding at least one HLA-A, -B, and -DR-matched donor for any Caucasian patient. The probability of finding a match for HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ, however, is considerably less (35-40%). Recent report confirmed that the risk of GVHD, graft failure, and mortality increases progressively with the number of HLA disparities, emphasizing the importance of high-resolution HLA typing and the selection of donors with, preferably, no more than one mismatched allele out of 8. Despite improvements in supportive care and HLA matching, outcome following unrelated donor alloSCT seems still inferior to that after HLA-identical sibling transplantation<sup>18-20</sup>. However, as a result of a number of developments, NRM following unrelated donor alloSCT has gradually declined the last decades and such transplants are now also offered to AML patients in first CR<sup>19,20</sup>. Preliminary results of the German Multicenter AML 01/099 trial were reported by Krauter *et al.*<sup>21</sup>. Patients with AML in first CR and a high risk profile were in principle eligible for an unrelated donor search if no HLA-identical sibling donor was available. First results showed better overall survival in recipients of an alloSCT as compared to autologous SCT, irrespective of donor type. Importantly, while unrelated donor alloSCT may be associated with more NRM, the anti-leukemic effect may also be more pronounced as a result of the higher degree of HLA-incompatibility as compared to matched sibling donors and thereby stronger GVL-effect. As a result, net results of sibling and properly matched unrelated donor alloSCT may come very close as suggested by several studies comparing sibling and unrelated donor SCT<sup>22-24</sup>.

While it is beyond doubt that high resolution HLA typing has considerably improved matching between donor and recipient and thereby outcome<sup>25</sup>, NRM following myeloablative unrelated donor alloSCT may still be somewhat higher as compared to sibling alloSCT. The risk of NRM progressively increases with the number of HLA disparities, emphasizing the importance of high-resolution HLA typing and the selection of donors with, preferably, no more than one mismatched allele out of 8<sup>26</sup>. In the latter study, rates of NRM were estimated at 36% in recipients with low-risk disease, who received a fully 8/8 allele matched graft as compared to 45% in recipients of one allele mismatched graft. Lee *et al.* also showed that younger patients with early stage disease and 8/8 donors had excellent survival and their NRM was estimated at less than 20%<sup>26</sup>. These results show that apart from allele matching other variables such as age significantly predict for NRM, as is the case following sibling alloSCT. In our recent meta-analysis of sibling alloSCT in 4 larger AML-studies<sup>5</sup>, age significantly predicted outcome,



which effect was mainly exerted by higher NRM in patients older than 40 years. Apart from age, other variables such as CMV, cytokine polymorphism, gendercombination, and especially comorbidities may significantly predict for NRM. The Seattle group recently demonstrated the relevance of comorbidity indices for predicting outcomes in patients undergoing allogeneic SCT<sup>27-31</sup>. The hematopoietic cell transplantation (HCT) comorbidity index (CI), based on a number of comorbidities was developed in a training set of 708 SCT recipients and validated in 346 patients. In the training set a HCT-CI of 0, 1 or 2 resulted in a 2 yr NRM rate of 9, 14 and 27%, respectively, which proved equivalent to results in the validation set. A higher CI score of 3 or  $\geq 4$  resulted in NRM rates of 40-43%<sup>29</sup>. Collectively, these studies suggest that acceptable rates of NRM following myeloablative conditioning and allele matched unrelated donor SCT can be expected in younger patients or those with low comorbidity scores. Therefore, it may be argued that patients, whose AML is characterized by a relapse risk  $> 50\%$  and for whom NRM can be estimated  $< 25\%$ , qualify for an unrelated donor search and subsequent alloSCT, even in first CR, if an allele matched donor can be identified and no other risk factors for NRM are present.

## Conclusion

It has become clear that a risk adapted approach should be adhered in decision making for alloSCT in AML. Apart from risk factors associated with the underlying leukemia, also risk factors that predict for NRM should be weighed and taken into account. Patients with intermediate or poor risk AML in first CR qualify for an alloSCT from an HLA-identical sibling donor, especially in younger patients. Matched unrelated donor alloSCT may be applied in those patients if the risk of NRM, as can be estimated by age, comorbidities and degree of matching, does not exceed 25% in intermediate risk AML and 30-35% in poor-risk AML. Patients in first CR with a very high risk of relapse but without a matched unrelated donor may alternatively qualify for alloSCT using cord blood, or haploidentical family donors, but preferably within the context of prospective studies.

## References

1. Yanada M, Matsuo K, Emi N, et al. Efficacy of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation depends on cytogenetic risk for acute myeloid leukemia in first disease remission: a metaanalysis. *Cancer* 103:1652-1658, 2005.
2. Burnett AK, Wheatley AH, Goldstone RF et al. The value of allogeneic bone marrow transplant in patients with acute myeloid leukaemia at differing risk of relapse: results of the UK MRC AML10 Trial: *Br J Haematol* 118:385-400, 2002.
3. Suci S, Mandelli F, De Witte T, et al. Allogeneic compared to autologous stem cell transplantation in the treatment of patients  $< 46$  years old with acute myeloid leukemia (AML) in first complete remission (CR1): an intention to treat analysis of the EORTC/GIMEMA AML-10 trial: *Blood* 102:1232-1240, 2003.
4. Jourdan E, Boiron JM, Dastague N, et al. Early allogeneic stem-cell transplantation for young adults with acute myeloblastic leukemia in first complete remission: an intent-to-treat long-term analysis of the BGMT experience. *J Clin Oncol* 23:7676-7684, 2005.
5. Cornelissen JJ, van Putten WLJ, Verdonck LF, et al. Results of a HOVON/SAKK donor versus no-donor analysis of myeloablative HLA-identical sibling stem cell transplantation in first remission acute myeloid leukemia in young and middle-aged adults: benefits for whom? *Blood* 109:3658-3666, 2007.
6. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype (Erratum in: *N Engl J Med.* 352: 740, 2005). *N Engl J Med* 352:254-266, 2005.
7. Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood* 106:3740-3746, 2005.
8. Schnittger S, Schoch C, Kern W, et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood* 106:3733-3739, 2005.
9. Thiede C, Koch S, Creutzig E, et al. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 107:4011-4020, 2006.
10. Verhaak RGW, Goudswaard CS, van Putten W, et al. Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood* 106:3747-3754, 2005.
11. Frohling S, Schlenk RF, Stolze I, et al. CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J Clin Oncol* 22:624-633, 2004.
12. Van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Erpelinck C, et al. Biallelic mutations in the CEBPA gene and low CEBPA expression levels as prognostic markers in intermediate-risk AML. *Hematol J* 4:31-40, 2003.
13. Gale RE, Hills R, Kottaridis PD, et al. No evidence that FLT3 status should be considered as an indicator for transplantation in acute myeloid leukemia (AML): an analysis of 1135 patients excluding acute promyelocytic leukemia from the UK MRC AML10 and 12 trials. *Blood* 106:3658-3665, 2005.
14. Bornhäuser M, Illmer T, Schaich M, et al. Improved outcome after stem-cell transplantation in FLT3/ITD-positive AML (letter). *Blood* 109:2264, 2007.
15. Schlenk RF, Corbacioglu A, Krauter J, et al. Gene mutations as predictive markers for postremission therapy in younger adults with normal karyotype AML. *Blood* 108:6a, 2006 (abstr).
16. Kern W, Schoch C, Haferlach T, et al. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 56:283-309, 2005.
17. Laane E, Derolf AS, Björklund E, et al. The effect of allogeneic stem cell transplantation on outcome in younger acute myeloid leukemia patients with minimal residual disease detected by flow cytometry at the end of post-remission chemotherapy. *Haematologica* 91:833-836, 2006.
18. Sierra J, Storer B, Hansen JA, et al. Unrelated donor marrow transplantation for acute myeloid leukemia: an update for the Seattle experience. *Bone Marrow Transplant* 26:397-404, 2000.

19. Appelbaum FR Hematopoietic cell transplantation from unrelated donors for treatment of patients with acute myeloid leukemia in first complete remission. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 20:67-75, 2007.
20. Zuckerman T, Rowe JM. Alternative donor transplantation in acute myeloid leukemia: which source and when? *Curr Opin Hematol* 14:152-161, 2007.
21. Krauter J, Heil G, Hoelzer D, et al. Role of consolidation therapy in the treatment of patients up to 60 years with high risk AML. *Blood* 106:172, 2005 (abstr).
22. Moore J, Nivison-Smith I, Goh K, et al. Equivalent survival for sibling and unrelated donor allogeneic stem cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 13:601-607, 2007.
23. 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* 24:5695-5702, 2006.
24. Cutler C, Li S, Ho VT, et al. Extended follow-up of methotrexate-free immunosuppression using sirolimus and tacrolimus in related and unrelated donor peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 109: 3108-3114, 2007.
25. Petersdorf EW. HLA matching in allogeneic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol* 11:386-391, 2004.
26. Lee SJ, Klein J, Haagenson M, et al. High resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. Prepublished on September 4, 2007, as DOI 10.1182/blood-2007-06-097386.
27. Diaconescu R, Flowers CR, Storer B, et al. Morbidity and mortality with nonmyeloablative compared to myeloablative conditioning before hematopoietic cell transplantation from HLA matched related donors. *Blood* 104: 1550-1558, 2004.
28. Sorror ML, Maris MB, Storer B, et al. Comparing morbidity and mortality of HLA-matched unrelated donor hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative and myeloablative conditioning: influence of pretransplantation comorbidities. *Blood* 104:961-968, 2004.
29. Sorror ML, Maris MB, Storb R, et al. Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risks assessment before allogeneic HCT. *Blood* 106:2912-2919, 2005.
30. Sorror ML, Giral S, Sandmaier BM, et al. Hematopoietic cell transplantation-specific comorbidity index as an outcome predictor for patients with acute myeloid leukemia in first remission: combined FHCRC and MDACC experiences. Prepublished on September 14, 2007, as DOI 10.1182/blood-2007-06-096966.
31. Sorror ML, Sandmaier BM, Storer BE, et al. Comorbidity and disease status based risk stratification of outcomes among patients with acute myeloid leukemia or myelodysplasia receiving allogeneic hematopoietic cell transplantation: *J Clin Oncol* 25:4246-4254, 2007.

## NUEVOS AGENTES TERAPÉUTICOS EN LA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

J. SIERRA, S. BRUNET

*Servicio de Hematología.*

*Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona*

*Universitat Autònoma de Barcelona*

## Introducción

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una enfermedad heterogénea con gran diversidad clínica y biológica. Esta afirmación se basa en los nuevos conocimientos sobre la fisiopatología de esta enfermedad<sup>1</sup>, de modo particular en los aspectos de genética molecular. Así, se han identificado más de 100 mutaciones y/o reordenamientos de genes en la LMA<sup>2-6</sup>. Su caracterización es importante, ya que permite establecer el pronóstico con más precisión.

La leucemogénesis en la LMA es, en la mayoría de los casos, el resultado de mutaciones que cooperan entre sí y que son potenciales dianas terapéuticas<sup>(2)</sup>. La relevancia conceptual y el significado pronóstico de muchas de estas alteraciones en el genotipo han hecho que se reconozcan como marcadores de nuevas entidades, en la reciente clasificación de la Organización Mundial de la Salud<sup>7</sup>. Adicionalmente, la introducción de tratamientos dirigidos a dianas moleculares ha puesto énfasis en el valor de una caracterización precisa de la LMA<sup>8</sup>. Con todo, estos avances no restan importancia –sino que los complementan– a los hallazgos del estudio citogenético convencional que permite separar a los pacientes con LMA en tres grupos pronósticos<sup>9</sup>, favorable, intermedio (que incluye el cariotipo normal, presente en el 45% de las LMA) y adverso. Por su parte, las alteraciones moleculares más importantes que perfilan todavía mejor el pronóstico en estos grupos citogenéticos son, en el favorable, las mutaciones del gen *c-KIT*<sup>10,11</sup>, y en el pronóstico intermedio, las mutaciones del gen de la nucleofosmina (*NPM1*)<sup>12,13</sup>, la duplicación interna en tándem (*DIT*) del gen *FLT3* (*DIT/FLT3*)<sup>14,15</sup>, las mutaciones del gen *CEBPA*<sup>13,16,17</sup>, las mutaciones de los genes *RAS*<sup>18</sup>, la duplicación parcial en tándem del gen *MLL*<sup>19</sup> y la mutación del gen del tumor de Wilms (*WT1*)<sup>20</sup>.

Recientemente se ha descubierto que en la LMA, junto a las alteraciones propias de los genes, tienen una gran importancia anomalías epigenéticas como su hipermetilación o la desacetilación de las histonas. En consecuencia, se ha comenzado a investigar el tratamiento desmetilante e inhibidor de las histonas desacetilasas con resultados prometedores. También de reciente descubrimiento es la necesidad para la proliferación leucémica de neovascularización; para evitarla, se han desarrollado fármacos antiangiogénicos como la lenalidomida, particularmente eficaces en pacientes con ciertas alteraciones citogenéticas.

Estrategias menos novedosas que las anteriores pero también importantes en la LMA son el desarrollo de nuevos fármacos como la clofarabina o el amonafide, los nuevos estudios con anticuerpos monoclonales frente a dianas antigénicas, como el antígeno CD33, y los esfuerzos por modular genes y proteínas de resistencia a drogas, una estrategia poco exitosa hasta la fecha.



Tabla 1. Nuevos agentes en el tratamiento de la LMA

Clase	Fármaco	Diana
Anticuerpos monoclonales	Gemtuzumab ozogamicina	CD33
Inhibidores tirosincinasa	CEP-701, midostaurina, sunitinib, sorafenib	FLT3
Inhibidores de la farnesil transferasa	Tipifarnib	RAS
Hipometilantes	Decitabina, 5-azacitidina	Mutación ADN
Inhibidores de las HDAC	Ácido valproico, vorinostat, fenilbutirato, panobinostat	HDAC
Inhibidores del mTOR	Rapamicina, tensirolimus, RAD001	mTOR
Antiangiogénicos	Lenalidomida	VEGF
Proteasoma	Bortezomib	Proteasoma
Citotóxicos Análogos nucleósidos	Citarabina, clofarabina, troxacitabina	ADN
Alquilantes Inhibidores topoisomerasa	Cloretazina Amonafide	
Diferenciadores	ATRA	Receptor ATRA

Dado que la LMA es una enfermedad frecuente en sujetos de edad avanzada, con una mediana de edad de 70 años<sup>21-23</sup>, que con frecuencia toleran mal el tratamiento intensivo, se hacen necesarias estrategias ajustadas al riesgo<sup>21,24-27</sup> que tengan en cuenta las comorbilidades individuales<sup>28,29</sup>. Estas comorbilidades deben considerarse para decidir la opción terapéutica, junto a otros factores como la edad, la citogenética y los conocimientos genéticos antes mencionados<sup>13,26</sup>. Entre el abanico de modalidades de tratamiento deben considerarse los nuevos agentes que se revisan a continuación, que se han ensayado en la LMA no promielocítica del adulto (Tabla 1 y Figura 1).

### Anticuerpos monoclonales

Aunque no existe ningún marcador inmunofenotípico específico de LMA, suelen observarse combinaciones aberrantes ausentes en la hemopoyesis normal<sup>19,25,30</sup>. El antígeno CD33, restringido a los precursores hemopoyéticos normales, se expresa en el 90% de las células de la LMA y es por ello una buena diana terapéutica. Gemtuzumab ozogamicina (GO) es un anticuerpo monoclonal humanizado anti-CD33, unido a un potente citotóxico la calicheamicina<sup>24</sup>. Los estudios en pacientes de edad avanzada en recaída demostraron una tasa de respuestas globales del 28%, 13% de ellas

consistentes en remisión completa (RC)<sup>31</sup>. A la luz de estos resultados, la Food and Drug Administration (FDA) americana aprobó el uso de GO como agente único para pacientes con LMA CD33+ en recaída de edad superior a 60 años. Actualmente están en marcha estudios prospectivos para analizar el impacto de GO junto a quimioterapia en diferentes etapas del tratamiento de la LMA<sup>25,32</sup>. Uno de ellos, el del Medical Research Council (MRC) ha completado el reclutamiento (AML15) y observado en 1.113 pacientes menores de 60 años que la adición de GO a la inducción y consolidación (ciclos 1 y 3) tuvo un impacto positivo en la

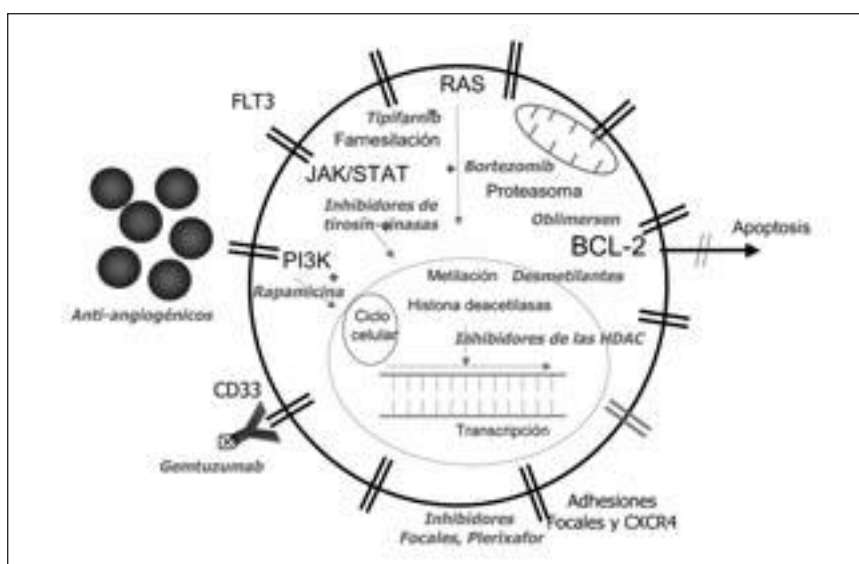


Figura 1. Fisiopatología molecular de la leucemia mieloide aguda: vías implicadas y fármacos para la terapia dirigida (en cursiva y color gris).

supervivencia global (SG) y libre de enfermedad (SLE) a los 3 años (51% vs. 40%;  $p = 0,008$ ) de los pacientes de riesgo intermedio<sup>33</sup>. Por su parte, el grupo SWOG tiene en marcha un estudio en el que añade o no GO a la quimioterapia de inducción y también aleatoriza el GO en el mantenimiento<sup>25</sup>. Un tercer protocolo, similar al del SWOG, está también activo en el grupo MRC (AML17)<sup>25</sup>.

Por otro lado, en pacientes de edad avanzada inelegibles para quimioterapia intensiva, el grupo EORTC-GIMEMA administró GO en monoterapia, seguida de 2 ciclos de consolidación con GO, con una respuesta global del 17%<sup>34</sup>. En el mismo tipo de pacientes, el grupo MRC investiga actualmente la combinación de dosis bajas de citarabina con GO<sup>25,32</sup>. Otros esquemas posibles son la administración de quimioterapia de inducción junto a dosis fraccionadas de GO. En cualquier caso, debe tenerse en cuenta el riesgo de enfermedad venooclusiva hepática cuando se administra GO y quimioterapia, una complicación que parece reducirse si se da una dosis inferior de GO a la utilizada en monoterapia<sup>25</sup>.

---

### Inhibidores de tirosincinasa

El receptor tirosincinasa FLT3 y su ligando son importantes para la proliferación y diferenciación de los precursores hematopoyéticos tempranos. Este receptor está presente en los progenitores hematopoyéticos normales, así como en los blastos de la LMA. Existen mutaciones del gen del receptor FLT3 en un 20-27% de LMA, en general duplicación interna en tándem (DIT), que conllevan su activación constitutiva. Múltiples estudios han demostrado que la presencia de DIT/FLT3 en pacientes con LMA-CN se asocia a mal pronóstico, con una SG disminuida debido a mayor riesgo de recaída (RR)<sup>4,13</sup>. El pronóstico parece particularmente desfavorable en ausencia del alelo germinal o cuando la ratio FLT3-ITD:FLT3-WT está aumentada<sup>4,13</sup>.

Por todo lo mencionado, el receptor FLT3 es una diana atractiva para el tratamiento con inhibidores<sup>3,4,15,35</sup>. Los inhibidores del gen FLT3 inactivan también otras tirosincinasas con diferente selectividad y especificidad, pero todos ellos reducen la tasa de proliferación e inducen apoptosis, debido a sobreexpresión de proteínas reguladoras. Se han ensayado o están actualmente en curso diversos estudios con inhibidores del gen FLT3: PKC-412 (midostaurin, Novartis), CEP-701 (lestaurtinib, Cephalon), MLN-518 (tandutinib, Millenium) y SU11248 (sunitinib, Pfizer) y Bay 43-9006 (sorafenib)<sup>26,32,36-38</sup>. Los estudios en fase I-II con estos compuestos administrados por vía oral muestran respuestas significativas pero transitorias<sup>37,39,40</sup>. Por ello los ensayos se dirigen ahora a su combinación con quimioterapia<sup>41,42</sup>.

El receptor tirosincinasa c-KIT se expresa en el 70% de las LMA, con mutaciones en el 10%. Este porcentaje aumenta al 30-40% si se trata de leucemias CBF y conlleva una SG inferior por mayor riesgo de recaída<sup>41</sup>. Imatinib es un potente inhibidor del c-KIT, y se han descrito respuestas transitorias en pacientes en recaída<sup>32,45</sup>. En sentido contrario, la asociación de imatinib con dosis bajas de citarabina en pacientes de edad avanzada con LMA y mutación de c-KIT no mejoró los resultados de la quimioterapia sola<sup>44</sup>. Actualmente, en pacientes con esta mutación se ensayan inhibidores más potentes como dasatinib y PKC-412<sup>10,32</sup>.

---

### Inhibidores de la farnesil-transferasa

Se detectan mutaciones de los genes RAS en un 10-15% de los pacientes con LMA; a pesar de carecer de significado pronóstico, las alteraciones de este gen constituyen una potencial diana terapéutica<sup>18</sup>. Diversos estudios han mostrado que no es necesario tener mutaciones de los genes RAS para responder a sus inhibidores. Tipifarnib es uno de los fármacos más desarrollados y evita la activación de la proteína RAS. En un estudio en fase 2 en pacientes en recaída o refractarios, una dosis de 600 mg/<sup>2</sup> por vía oral durante 21 días tuvo muy buena tolerancia pero la tasa de RC fue sólo del 4%<sup>45</sup>. Otro estudio en pacientes de edad avanzada inelegibles para tratamiento intensivo mostró una respuesta global del 23%, y la obtención de RC en un 14%, con una mediana de duración de la respuesta de 7 meses<sup>46</sup>. Recientemente, se han publicado los resultados de un estudio comparativo de tipifarnib frente al mejor tratamiento de soporte en pacientes de edad superior a 70 años con LMA *de novo*, con una tasa de RC del 8% y sin diferencias en la SG en los dos brazos del estudio<sup>47</sup>. En otra serie, la asociación de tipifarnib y etopósido oral en un régimen de 14 días ha mostrado una tasa de RC del 30%<sup>48</sup>. Por último, aunque no se trata de terapia dirigida, cabe destacar que los pacientes con LMA y mutaciones de los genes RAS parecen tener sensibilidad a las dosis altas de citarabina, tanto *in vitro* como *in vivo* con reducción de las recaídas respecto a las dosis convencionales<sup>49</sup>.

---

### Agentes hipometilantes

La metilación del ADN y otros eventos epigenéticos son de gran importancia en la progresión de las enfermedades malignas, sobre todo en las leucemias. En pacientes con hemopatías mieloides, la hipermetilación de los promotores de genes supresores tumorales como el p15 se asocia a progresión de la enferme-

dad y escasa respuesta al tratamiento. Por ello, hay un interés en desarrollar agentes hipometilantes del ADN. La decitabina es un análogo de las pirimidinas que, una vez incorporado al ADN, inhibe de manera irreversible las metiltransferasas. Ello conduce a la hipometilación de los promotores de los genes supresores tumorales, a la activación de estos genes supresores y a la diferenciación celular. Diferentes estudios apuntan que la decitabina o la 5-azacitidina pueden inducir respuestas en dosis bajas en pacientes con LMA refractaria<sup>50</sup>. La eficacia de los desmetilantes parece ser notable en pacientes con monosomía o deleción del cromosoma 7, o incluso en pacientes con cariotipo complejo. La asociación de agentes desmetilantes con inhibidores de las HDAC, como el ácido valproico, en pacientes de edad avanzada ha permitido obtener respuestas en el 50% de los pacientes en dos estudios<sup>51,52</sup>, pero con encefalopatía por valproico en uno de ellos. Otra pauta con buenos resultados en pacientes de edad avanzada fue la combinación de 5-azacitidina durante 7 días y GO el día 8, con tasas de RC del 75%<sup>53</sup>.

---

### Inhibidores de las histonas desacetilasas (HDAC)

La acetilación de las histonas facilita la transcripción de los genes. Este proceso está regulado por la acción antagónica de las histonas acetilasas y las HDAC. La desacetilación exagerada de las histonas tiene un papel en la leucemogénesis, al bloquear la transcripción y la diferenciación celular. Los inhibidores de las HDAC pretenden restaurar la acetilación normal. En estudios en fase I-II, se ha investigado una gran variedad de inhibidores HDAC como el fenilbutirato, el ácido valproico<sup>54</sup>, el vorinostat<sup>55</sup> y el panobinostat. Como monoterapia estos fármacos son poco eficaces y por ello se investigan con agentes hipometilantes. La asociación de ácido valproico con GO puede representar otra estrategia prometedora<sup>26</sup>.

---

### Inhibidores del mTOR

La diana de la rapamicina (mTOR) es un regulador clave del crecimiento y supervivencia de muchos tipos celulares. Su activación constitutiva se ha implicado en la patogénesis de varias neoplasias. Su actividad es específicamente inhibida por la rapamicina, macrólido con propiedades inmunosupresoras. En un estudio piloto de 23 pacientes la rapamicina indujo respuestas clínicas en 4 de 9 pacientes con LMA<sup>56</sup>. Actualmente se investigan otros inhibidores como tensirolimus y RAD001.

---

### Agentes antiangiogénicos

La angiogénesis tiene un papel crucial al facilitar el crecimiento tumoral y el proceso metastático. Se ha demostrado que las biopsias óseas de los pacientes con LMA muestran un aumento de la vascularización, comparado con las biopsias óseas normales. Además, las células de la LMA expresan el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)<sup>57</sup>. Diversos estudios han mostrado que la lenalidomida tiene actividad antileucémica importante e incluso permite alcanzar RC en pacientes con mielodisplasia avanzada o LMA y presencia de la alteración 5q- entre otras anomalías cromosómicas. Por otra parte, recientemente se ha demostrado, en líneas celulares de LMA y en muestras de pacientes, que la adición de un inhibidor del receptor VEGF a la idarubicina es más eficaz que la quimioterapia sola<sup>58</sup>.

---

### Inhibición del proteasoma

El bortezomib tiene actividad antileucémica y efecto sinérgico *in vitro* con los inhibidores de las HDAC<sup>57</sup>. Este agente podría ser particularmente eficaz para eliminar las células madre leucémicas. Estudios en pacientes con LMA indican mayor inducción de apoptosis *in vitro* con bortezomib que con fármacos convencionales<sup>59</sup>. En la actualidad se halla en curso en nuestro medio un estudio en fase II de la combinación de FLAG-IDA más bortezomib en pacientes con LMA refractarios o en recaída.

---

### Nuevos citotóxicos

#### Análogos de los nucleósidos

La citarabina es esencial en el tratamiento de la LMA. Además de su papel en la inducción, las dosis altas en consolidación son eficaces para evitar las recidivas de las leucemias CBF<sup>21,57</sup>. Probablemente, la citarabina en dosis alta también es beneficiosa para los pacientes con LMA y mutaciones de RAS<sup>49</sup>, así como para aquellos con CN y mutación del gen de la nucleofosmina en ausencia de DIT/FLT3<sup>13</sup>.

La troxacitabina es un análogo de la lamivudina. Estudios en fase I y II de combinación con citarabina, realizados en pacientes con LMA refractaria, mostraron un 18% de respuestas en pacientes de edad superior a 50 años<sup>32,60</sup>. La clofarabina es un análogo de las purinas con actividad en pacientes con LMA en primera recaída o refractaria<sup>57,61</sup>. Se hallan en curso estudios en fase 1 y 2 en pacientes de edad avanzada no tratados previamente<sup>32,61</sup>, con el objetivo de incrementar la tasa de RC y la duración de la respues-

ta que se obtienen con citarabina. En un estudio en fase 2 de inducción con clofarabina 40 mg/m<sup>2</sup> i.v. durante 5 días (días 2-6) y 4 horas más tarde citarabina 1 g/m<sup>2</sup> durante 5 días (días 1-5), en pacientes de edad superior a 50 años con LMA, se observó una tasa de respuestas globales del 60% (52% RC y 5 pacientes RCp)<sup>62</sup>. Recientemente, se han publicado los resultados de un estudio que compara la clofarabina frente a clofarabina y dosis bajas de citarabina como inducción en pacientes de edad superior a 60 años y LMA *de novo*. La tasa de respuestas globales fue del 56%, con diferencias significativas a favor del tratamiento combinado, 63% vs. 31%, dada la mayor mortalidad en inducción del brazo de clofarabina sola<sup>63</sup>. Los ensayos actualmente en curso combinan la administración de citarabina ± GO ± antraciclinas, en pacientes de edad avanzada, y ayudarán a definir el papel de estos compuestos.

### Agentes alquilantes

La cloretazina es un nuevo agente alquilante activo en la LMA<sup>32</sup>. En un estudio fase I, la dosis máxima tolerada fue de 600 mg/m<sup>2</sup> i.v., y se alcanzó RC en 1 paciente. Ello conllevó un nuevo estudio en fase 1 combinando cloretazina con citarabina, en 32 pacientes con LMA, de los que se alcanzó una RC en el 27%. Las dosis limitantes por mielodepresión y toxicidad gastrointestinal fueron de 500-600 mg. En consecuencia, la dosis recomendada en estudios en fase II fue: cloretazina 600 mg/día 1 y citarabina 1,5 g/m<sup>2</sup> en infusión continua durante 3 días. Estudios en fase III cloretazina-citarabina en las dosis previamente descritas vs. citarabina-placebo, en pacientes en primera recaída, han mostrado tasas más altas de RC en el tratamiento combinado pero también más *exitus* en el brazo combinado, por lo que se investigan dosis inferiores de cloretazina<sup>64</sup>. Recientemente se ha reportado un 37% de RC con cloretazina sola, en pacientes con LMA de alto riesgo y edad superior a 70 años tratados al diagnóstico.

### Inhibidores de la topoisomerasa II

El amonafide es un inhibidor catalítico de la topoisomerasa II que, a diferencia de los clásicos inhibidores de la topoisomerasa II, es ATP-independiente y no es un sustrato para la glicoproteína-P. El amonafide ha demostrado eficacia en LMA en recaída y secundaria, con tasas de respuesta en LMA secundarias del 42%<sup>32</sup>. Actualmente ha iniciado el reclutamiento un ensayo en fase III comparando este agente más citarabina vs. daunorubicina y citarabina.

### Agentes diferenciadores

El ácido *all-trans*retinoico (ATRA) revolucionó el tratamiento de la leucemia promielocítica, al ser un tratamiento diana frente al gen quimérico PML/RARalfa y, además, inducir diferenciación celular. Varios estudios sugieren la capacidad del ATRA de inducir diferenciación de los blastos mieloides. Se han realizado estudios clínicos para evaluar estas hipótesis con resultados contradictorios<sup>26</sup>. En 2004 se publicó un estudio de 242 pacientes con LMA de edad superior a 60 años en el que se demostró en el brazo de ATRA una tasa de RC superior y asimismo una SG y SLE significativamente superior. Recientemente se ha observado que solamente los pacientes con mutación de la NPM1 mutada en ausencia de DIT/FLT3 pueden ser particularmente sensibles a la asociación de quimioterapia y ATRA<sup>65</sup>.

### Conclusiones

La integración de los conocimientos moleculares adquiridos en el diagnóstico de la LMA refleja que es una enfermedad heterogénea y compleja. La combinación de diferentes modalidades de tratamiento, con agentes clásicos y terapia innovadora dirigida a corregir la fisiopatología celular, puede conducir a una mejora de los resultados en un futuro no muy lejano.

### Bibliografía

1. Löwenberg B. Acute myeloid leukemia: the challenge of capturing disease variety. *Am Soc Hematol Educ Program*. 2008;1-11.
2. Gilliland DG, Jordan CT, Felix CA. The molecular basis of leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2004;80-97.
3. Frohling S, Scholl C, Gilliland DG, Levine RL. Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. *J Clin Oncol*. 2005;23:6285-6295.
4. Mrozek 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;109:431-448.
5. Dohner K, Dohner H. Molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2008;93:976-982.
6. Renneville A, Roumier C, Biggio V, Nibourel O, Boissel N, Fenaux P, Preudhomme C. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia*. 2008;22:915-931.
7. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman J. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. . IARC Press, Lyon, 2008:109-138.
8. Ravandi S, Burnett AK, Agura ED, Kantarjian HM. Progress in the treatment of acute myeloid leukemia. *Cancer*. 2007;110:1900-1910.



9. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, Rees J, Hann I, Stevens R, Burnett A, Goldstone A. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood*. 1998;92:2322-2333.
10. Schnittger S, Kohl TM, Haferlach T, Kern W, Hiddemann W, Spiekermann K, Schoch C. C KIT-D816 mutations in AML1-ETO-positive AML are associated with impaired event-free and overall survival. *Blood*. 2006;107:1791-1799.
11. Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, Mrózek K, Chen H, Kittles RA, Vukosavljevic T, Perrotti D, Vardiman JW, Carroll AJ, Kolitz JE, Larson RA, C.D 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;24:3904-3911.
12. Falini B, Nicoletti I, Martelli MF, Mecucci C. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features. *Blood*. 2007;109:874-885.
13. Schlenk RF, Dohner K, Krauter J, Frohling S, Corbacioglu A, Bullinger L, Habdank M, Spath D, Morgan M, Benner A, Schlegelberger B, Heil G, Ganser A, Dohner H. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2008;358:1909-1918.
14. Gilliland DG, Griffin JD. Role of FLT3 in leukemia. *Curr Opin Hematol*. 2002;9:274-281.
15. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, Walker H, Wheatley K, Bowen DT, Burnett AK, Goldstone AH, Linch DC. 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;98:1752-1759.
16. Frohling S, Schlenk RF, Stolze I, Bihlmayr J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Dohner H, Dohner K. CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J Clin Oncol*. 2004;22:624-633.
17. Wouters BJ, Lowenberg B, Erpelinck-Verschueren CA, van Putten WL, Valk PJ, Delwel R. Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood*. 2009;113:3088-3091.
18. Bacher U, Haferlach T, Schoch C, Kern W, Schnittger S. Implications of NRAS mutations in AML: a study of 2502 patients. *Blood*. 2006;107:3847-3853.
19. Munoz L, Aventin A, Villamor N, Junca J, Acebedo G, Domingo A, Rozman M, Torres JP, Tormo M, Nomdedeu JF. Immunophenotypic findings in acute myeloid leukemia with FLT3 internal tandem duplication. *Haematologica*. 2003;88:637-645.
20. Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, Whitman SP, Mrozek K, Maharry K, Langer C, Baldus CD, Zhao W, Powell BL, Baer MR, Carroll AJ, Caligiuri MA, Kolitz JE, Larson RA, Bloomfield CD. Wilms' tumor 1 gene mutations independently predict poor outcome in adults with cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia group B study. *J Clin Oncol*. 2008;26:4595-4602.
21. Brunet S, Perea G, Esteve J, Berlanga J, Torres P, Queipo de Llano MP, Bueno J, Ribera JM, Tormo M, Llorente A, Bargay J, Guardia R, Pedro C, Sánchez J, Vivancos P, Martí JM, Font L, Nomdedeu JF, Montserrat E, Sierra J. Adverse impact of FLT3 internal tandem duplication in patients with poor-risk acute myeloid leukaemia allocated to autologous transplantation. *Bone Marrow Transpl*. 2004;33 (Suppl 1):(Abstr 71):S73.
22. Sekeres MA. Treatment of older adults with acute myeloid leukemia: state of the art and current perspectives. *Haematologica*. 2008;93:1769-1772.
23. Estey EH. Treatment of acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2009;94:10-16.
24. Brunet S, Sierra J. Nuevos fármacos en el tratamiento de la leucemia aguda. *Haematologica*. 2006;91 (supl1):275-278.
25. Burnett AK, Knapper S. Targeting Treatment in AML. *Am Soc Hematol Educ Program*. 2007:429-434.
26. Haferlach T. Molecular genetic pathways as therapeutic targets in acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2008;2008:400-411.
27. Sierra J, Brunet S. Risk-adapted treatment for adult acute myeloid leukemia. *Hematology Association*. 2009;3:30-37.
28. Erba HP. Prognostic factors in elderly patients with AML and the implications for treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2007:420-427.
29. Sorror ML, Sandmaier BM, Storer BE, Maris MB, Baron F, Maloney DG, Scott BL, Deeg HJ, Appelbaum FR, Storb R. Comorbidity and disease status-based risk stratification of outcomes among patients with acute myeloid leukemia or myelodysplasia receiving allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol*. 2007;25:4246-4254.
30. San Miguel JF, Vidriales MB, López-Berges C, Díaz-Mediavilla J, Gutiérrez N, Cañizo C, Ramos F, Calmuntia MJ, Pérez JJ, González M, Orfao A. Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification. *Blood*. 2001;98:1746-1751.
31. Larson RA, Boogaerts M, Estey E, Karanes C, Stadtmayer EA, Sievers EL, Mineur P, Bennett JM, Berger MS, Eten CB, Munteanu M, Loken MR, Van Dongen JJ, Bernstein ID, Appelbaum FR. Antibody-targeted chemotherapy of older patients with acute myeloid leukemia in first relapse using Mylotarg (gemtuzumab ozogamicin). *Leukemia*. 2002;16:1627-1636.
32. Amadori S, Stasi R. New agents for the treatment of acute myeloid leukemia. *Hematology Education: the education program for the Annual Congress of the European Hematology Association*. 2008;2:33-38.
33. Burnett AK, Kell WJ, Goldstone AH, Milligan D, Hunter A, Prentice AG, Russell NH, Gibson B, Wheatley K, Hills RK. The addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy for AML improves disease free survival without extra toxicity: preliminary analysis of 1115 patients in the MRC AML15 trial [abstract]. *Blood*. 2006;108:8a.
34. Amadori S, Suci S, Stasi R, Willemze R, Mandelli F, Selleslag D, Denzlinger C, Musto P, Stauder R, Berneman R, Pruijt J, Nobile F, Cassibba V, Marie J, Beeldens F, Baila L, Vignetti M, de Witte T. Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) as single-agent treatment for frail patients 61 years of age and older with acute myeloid leukemia: final results of AML-15B, a phase 2 study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer and Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto Leukemia Groups. *Leukemia*. 2005;19:1768-1773.
35. Gilliland DG. FLT3 Inhibitors in the Treatment of AML. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2004;2:708-710.
36. Stone RM, DeAngelo DJ, Klimek V, Galinsky I, Estey E, Nimer SD, Grandin W, Lebowitz D, Wang Y, Cohen P, Fox EA, Neuberg D, Clark J, Gilliland DG, Griffin JD. Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. *Blood*. 2005;105:54-60.
37. DeAngelo DJ, Stone RM, Heaney ML, Nimer SD, Paquette RL, Klisovic RB, Caligiuri MA, Cooper MR, Lecerf JM, Karol MD, Sheng S, Holford N, Curtin PT, Druker BJ, Heinrich MC. Phase 1 clinical results with tandutinib (MLN518), a novel FLT3 antagonist, in patients with acute myelogenous leu-



- mia or high-risk myelodysplastic syndrome: safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Blood*. 2006;108:3674-3681.
38. Tallman MS. New agents for the treatment of acute myeloid leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2006;19:311-320.
  39. Smith BD, Levis M, Beran M, Giles F, Kantarjian H, Berg K, Murphy KM, Dausen T, Allebach J, Small D. Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*. 2004;103:3669-3676.
  40. Stone RM, O'Donnell MR, Sekeres MA. Acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2004;98-117.
  41. Levis M, Douglas Smith B, Beran M, Baer MR, Erba HP, Cripe L, Coutre S, Advani A, Perl A, Devetten M, Stuart R, Tallman MS, Brown P, Tremmel L, Small D. A Randomized, Open-Label Study of Lestaurtinib (CEP-701), an Oral FLT3 Inhibitor, Administered in Sequence with Chemotherapy in Patients with Relapsed AML Harboring FLT3 Activating Mutations: Clinical Response Correlates with Successful FLT3 Inhibition [abstract]. *Blood*. 2005;106: 403.
  42. Stone RM, Fischer T, Paquette RL, Schiller G, Schiffer CA, Ehninger C, Cortes J, Kantarjian HM, DeAngelo DA, Yu R, Zhang L, Cohen PS, Wang Y, Phillips P, Giles F. 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 [abstract]. *Blood*. 2005;106: 404.
  43. Cortes J, Kantarjian H. Beyond chronic myelogenous leukemia: potential role for imatinib in Philadelphia-negative myeloproliferative disorders. *Cancer*. 2004;100:2064-2078.
  44. Heidel F, Cortes J, Rucker FG, Aulitzky W, Letvak L, Kindler T, Huber C, Dohner H, Kantarjian H, Fischer T. Results of a multicenter phase II trial for older patients with c-Kit-positive acute myeloid leukemia (AML) and high-risk myelodysplastic syndrome (HR-MDS) using low-dose Ara-C and Imatinib. *Cancer*. 2007;109:907-914.
  45. Harousseau JL, Lancet JE, Reiffers J, Lowenberg B, Thomas X, Huguet F, Fenaux P, Zhang S, Rackoff W, De Porre P, Stone R. A phase 2 study of the oral farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in patients with refractory or relapsed acute myeloid leukemia. *Blood*. 2007;109:5151-5156.
  46. Lancet JE, Gojo I, Gotlib J, Feldman EJ, Greer J, Liesveld JL, Bruzek LM, Morris L, Park Y, Adjei AA, Kaufmann SH, Garrett-Mayer E, Greenberg PL, Wright JJ, Karp JE. A phase 2 study of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in poor-risk and elderly patients with previously untreated acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2007;109:1387-1394.
  47. Harousseau JL, Martinelli G, Jedrzejczak WW, Brandwein JM, Bordessoule D, Masszi T, Ossenkoppelle GJ, Alexeeva JA, Beutel G, Maertens J, Vidrales MB, Dombret H, Thomas X, Burnett AK, Robak T, Khuageva NK, Golenkov AK, Tothova E, Mollgard L, Park YC, Bessems A, De Porre P, Howes AJ. A randomized phase 3 study of tipifarnib compared to best supportive care, including hydroxyurea, in the treatment of newly diagnosed acute myeloid leukemia (AML) in patients 70 years or older. *Blood*. 2009.
  48. Karp JE, Flatten K, Feldman EJ, Greer JM, Loegering DA, Ricklis RM, Morris LE, Ritchie E, Smith BD, Ironside V, Talbott T, Roboz G, Le SB, Meng XW, Schneider PA, Dai NT, Adjei AA, Gore SD, Levis MJ, Wright JJ, Garrett-Mayer E, Kaufmann SH. Active oral regimen for elderly adults with newly diagnosed acute myelogenous leukemia: a preclinical and phase 1 trial of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib (R115777, Zarnestra) combined with etoposide. *Blood*. 2009;113:4841-4852.
  49. Neubauer A, Maharry K, Mrozek K, Thiede C, Marcucci G, Paschka P, Mayer RJ, Larson RA, Liu ET, Bloomfield CD. Patients with acute myeloid leukemia and RAS mutations benefit most from postremission high-dose cytarabine: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol*. 2008;26:4603-4609.
  50. Issa JP, Garcia-Manero G, Giles FJ, Mannari R, Thomas D, Faderl S, Bayar E, Lyons J, Craig SR, Cortes J, Kantarjian HM. Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies. *Blood*. 2004;103:1635-1640.
  51. Garcia-Manero G, Kantarjian HM, Sanchez-Gonzalez B, Yang H, Rosner G, Verstovsek S, Rytting M, Wierda WG, Ravandi F, Koller C, Xiao L, Faderl S, Estrov Z, Cortes J, O'Brien S, Estey E, Bueso-Ramos C, Fiorentino J, Jabbour E, Issa JP. Phase 1/2 study of the combination of 5-aza-2'-deoxycytidine with valproic acid in patients with leukemia. *Blood*. 2006;108:3271-3279.
  52. Blum W, Klisovic RB, Hackanson B, Liu Z, Liu S, Devine H, Vukosavljevic T, Huynh L, Lozanski G, Kefauver C, Plass C, Devine SM, Heerema NA, Murgo A, Chan KK, Grever MR, Byrd JC, Marcucci G. Phase I study of decitabine alone or in combination with valproic acid in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2007;25:3884-3891.
  53. Nand S, Godwin J, Smith S, Barton K, Germano E, Stiff P. Azacitidine Plus Gemtuzumab Ozogamicin (GO): A Novel Combination in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia (AML) and High-Risk Myelodysplastic Syndromes (MDS) in the Elderly [abstract]. *Blood*. 2007;108: 1981.
  54. Kuendgen A, Schmid M, Schlenk R, Knipp S, Hildebrandt B, Steidl C, Germing U, Haas R, Dohner H, Gattermann N. The histone deacetylase (HDAC) inhibitor valproic acid as monotherapy or in combination with all-trans retinoic acid in patients with acute myeloid leukemia. *Cancer*. 2006;106:112-119.
  55. Garcia-Manero G, Yang H, Bueso-Ramos C, Ferrajoli A, Cortes J, Wierda WG, Faderl S, Koller C, Morris S, Rosner G, Loboda A, Fantin VR, Randolph SS, Hardwick JS, Reilly JF, Chen C, Ricker JL, Secrist JP, Richon VM, Frankel SR, Kantarjian HM. Phase 1 study of the histone deacetylase inhibitor vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid [SAHA]) in patients with advanced leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2008;111:1060-1066.
  56. Recher C, Beyne-Rauzy O, Demur C, Chicanne G, Dos Santos C, Mas VM, Benzaquen D, Laurent G, Huguet F, Payrastre B. Antileukemic activity of rapamycin in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2005;105:2527-2534.
  57. Tallman MS. New strategies for the treatment of acute myeloid leukemia including antibodies and other novel agents. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005:143-150.
  58. Barbarroja N, Torres LA, Luque MJ, Carretero RM, Valverde-Estepa A, Lopez-Sanchez LM, Rodriguez-Ariza A, Velasco F, Torres A, Lopez-Pedraza C. Additive effect of PTK787/ZK 222584, a potent inhibitor of VEGFR phosphorylation, with Idarubicin in the treatment of acute myeloid leukemia. *Exp Hematol*. 2009;37:679-691.
  59. Colado E, Alvarez-Fernandez S, Maiso P, Martin-Sanchez J, Vidrales MB, Garayoa M, Ocio EM, Montero JC, Pandiella A, San Miguel JF. The effect of the proteasome inhibitor bortezomib on acute myeloid leukemia cells and drug resistance associated with the CD34+ immature phenotype. *Haematologica*. 2008;93:57-66.
  60. Giles FJ, Kantarjian HM, Cortes JE, Garcia-Manero G, Verstovsek S, Faderl S, Thomas DA, Ferrajoli A, O'Brien S, Wathen JK, Xiao LC, Berry DA, Estey E. Adaptive randomized study of idarubicin and cytarabine versus troxacitabine and cytarabine versus troxacitabine and idarubicin in untreated patients 50 years or older with adverse karyotype acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2003;21:1722-1727.
  61. Musto P, Ferrara F. Clofarabine: in search of combinations for the treatment of patients with high-risk acute myeloid leukemia. *Cancer*. 2008;113:1995-1998.

62. Faderl S, Verstovsek S, Cortes J, Ravandi F, Beran M, Garcia-Manero G, Ferrajoli A, Estrov Z, O'Brien S, Koller C, Giles FJ, Wierda W, Kwari M, Kantarjian HM. Clofarabine and cytarabine combination as induction therapy for acute myeloid leukemia (AML) in patients 50 years of age or older. *Blood*. 2006;108:45-51.
63. Faderl S, Ravandi F, Huang X, Garcia-Manero G, Ferrajoli A, Estrov Z, Borthakur G, Verstovsek S, Thomas DA, Kwari M, Kantarjian HM. A randomized study of clofarabine versus clofarabine plus low-dose cytarabine as front-line therapy for patients aged 60 years and older with acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2008;112:1638-1645.
64. Giles FJ. Laromustine: the return of alkylators to non-myeloablative therapy of AML. *Leuk Res*. 2009;33:1022-1023.
65. Schlenk RF, Döhner K, Kneba M, Götze K, Hartmann F, del Valle F, Kirchen H, Koller E, Fischer JT, Bullinger L, Habdank M, Späth D, Groner S, Krebs B, Kayser S, Corbacioglu A, Anhalt A, Benner A, Fröhling S, Döhner H. Gene mutations and response to treatment with all-trans retinoic acid in elderly patients with acute myeloid leukemia. Results from the AMLSG Trial AML HD98B. *Haematologica*. 2009;94:54-60.

## **Linfomas T cutáneos**

COORDINADORES: A. LÓPEZ GUILLERMO. *Barcelona*  
R.M.<sup>a</sup> PUJOL. *Barcelona*

## CARACTERÍSTICAS CITOGENÉTICAS DE LOS LINFOMAS T CUTÁNEOS

B. ESPINET, R. SALGADO

*Laboratori de Citogenètica Molecular.*

*Servei de Patologia. Hospital del Mar. Barcelona*

### Introducción

Los linfomas cutáneos primarios constituyen un grupo heterogéneo de neoplasias linfoides originadas a partir del tejido linfoide asociado a la piel (SALT, *skin associated lymphoid tissue*) sin evidencia de afectación extracutánea en el momento del diagnóstico. Estos linfomas son el segundo grupo más frecuente de linfomas no Hodgkin extranodales, después de los linfomas primarios gastrointestinales. Aproximadamente un 75% de los linfomas cutáneos primarios corresponden a linfomas de estirpe T (LCPCT)<sup>1,2</sup>. La micosis fungoide (MF) es el LCPCT más frecuente. Posee una variante leucémica, el síndrome de Sézary (SS), de evolución agresiva. Los LCPCT diferentes de la MF/SS representan en conjunto de entre el 10 y el 20% del total de LCPCT y, entre ellos, los más frecuentes son los LCPCT CD30 positivos (LCPCT-CD30+), procesos de curso habitualmente indolente con múltiples recurrencias cutáneas y excepcional afectación extracutánea, a diferencia del linfoma anaplásico de célula grande nodal CD30+, de curso habitualmente agresivo.

En los últimos años, el conocimiento sobre las alteraciones genéticas, tanto a nivel genómico (alteraciones numéricas y/o estructurales en los cromosomas, mutaciones, etc.) como sobre expresión de ARN de determinados genes o sobre mecanismos epigenéticos (metilación del ADN, acetilación de histonas, etc.) ha avanzado notablemente. Se han delineado algunas alteraciones genéticas y/o moleculares recurrentes relacionadas con los distintos subtipos de LCPCT, aunque aún no se han identificado los mecanismos patogénicos implicados en el desarrollo de estas entidades. Las lesiones genéticas (traslocaciones específicas, mutaciones específicas, expresión de oncogenes, secuencias virales, etc.) descritas en los linfomas nodales no han sido demostradas en sus contrapartidas histopatológicas cutáneas. Por otro lado, diferentes estudios han demostrado que los linfomas cutáneos poseen un comportamiento clínico y un pronóstico diferente al de sus equivalentes nodales. Por estas razones, los LCPCT deben considerarse un grupo patogénicamente diferente de los linfomas T sistémicos.

### Técnicas citogenéticas

#### *Citogenética convencional*

Los estudios cromosómicos con la técnica de citogenética convencional han sido esenciales en la caracterización de las distintas hemopatías. Tal y como se recoge en la reciente clasificación de la Organización Mundial de la Salud<sup>2</sup>, cada vez son más numerosas las neoplasias hematológicas que se clasifican según una determinada alteración citogenética y, por otra parte, algunas aberraciones cromosómicas tienen un importante valor pronóstico. La ventaja de la citogenética convencional radica en la visualización de todos los cromosomas. Sin embargo, esta técnica presenta una serie de limitaciones, entre las cuales destacan la necesidad de obtener suficientes células neoplásicas en división y cromosomas de buena calidad para poder establecer el cariotipo correctamente. En los LCPCT, los estudios citogenéticos son escasos debido a la dificultad de obtener células patológicas en división del tejido tumoral cutáneo. No obstante, existen diferentes series de estudios citogenéticos realizados en sangre periférica de pacientes con síndrome de Sézary.

#### *Citogenética molecular*

Las técnicas de citogenética convencional se han visto complementadas por las técnicas de citogenética molecular, todas ellas basadas en la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH, *fluorescent in situ hybridization*).

En los LCPCT se han realizado estudios con sondas de FISH "convencionales", esencialmente sondas centroméricas y de locus específico, sobre tejido paraafinado o improntas. Por otra parte, en algunos casos de los cuales se obtuvieron metafases, principalmente en el síndrome de Sézary, también se han realizado estudios de FISH multicolor. Entre ellos destaca la aplicación de las técnicas de *spectral karyotyping* (SKY) y multicolor-FISH (M-FISH), las cuales utilizan una batería de sondas de pintado cromosómico, marcadas de forma combinatoria con 5 fluorocromos, que permiten la clasificación de los 24 cromosomas humanos a partir de 7 colores diferentes<sup>3</sup>. En los dos casos, el resultado de la hibridación permite visualizar simultáneamente cada par cromosómico de un color diferente. Las técnicas de M-FISH y SKY son muy útiles para determinar de forma inequívoca cariotipos complejos y cromosomas no identificables con las técnicas de bandeado (cromosomas marcadores). Sin embargo, estas tecnologías no permiten el reconocimiento de algunos puntos de rotura, como los asociados con deleciones, inserciones y adiciones que afectan al mismo cromosoma o par cromosómico (marcado del mismo color) y

translocaciones de pequeño tamaño (inferiores a 500-1.500 Kb), para los cuales es necesario utilizar sondas de locus específico. En 1997 apareció la técnica de *cross species color banding* FISH (Rx-FISH), que permite la generación de un patrón de bandas de distintos colores para cada cromosoma<sup>4</sup>. Dicha metodología se basa en las homologías genómicas que existen entre la especie humana y diferentes especies de gibón. Las ventajas que ofrece respecto a las técnicas de M-FISH o SKY radican en que permite identificar alteraciones estructurales dentro de un mismo cromosoma (inversiones y translocaciones). De esta manera, los puntos de rotura de los posibles reordenamientos pueden ser localizados con mayor exactitud. La técnica de Rx-FISH permite determinar cariotipos complejos y cromosomas no identificables con las técnicas de bandas G (cromosomas marcadores) pero tiene la limitación, como M-FISH y SKY, de necesitar células en división.

Por otra parte, en los LCPCT también se han aplicado las técnicas de **hibridación genómica comparada**<sup>5</sup> (CGH, *comparative genomic hybridization*) y **arrayCGH**<sup>6</sup>. Éstas permiten detectar cambios numéricos de secuencias de ADN (pérdidas/delecciones, ganancias/amplificaciones) en un tejido tumoral sin necesidad de obtener metafases. Dichas técnicas se basan en la hibridación de ADN tumoral y ADN control normal, marcados con fluorocromos de distinto color, sobre metafases normales (en la CGH convencional) o bien sobre micromatrices con miles de sondas de ADN (en el caso de arrayCGH). La ventaja de esta última metodología es su elevada resolución (50 Kb a 1 Mb), aunque la complejidad técnica y la gran cantidad de datos que se generan necesitan de personal altamente especializado, por lo cual esta tecnología se aplica en proyectos de investigación.

---

## Síndrome de Sézary

El síndrome de Sézary es el LCPCT más estudiado por técnicas de citogenética convencional, debido a la facilidad de obtener células en división de sangre periférica. Para incrementar el número de células tumorales en división, habitualmente los cultivos celulares se han suplementado con mitógenos para células T, tales como la fitohemaglutinina (PHA), la interleucina 2 (IL-2) y la interleucina 7 (IL-7). Sin embargo, obtener metafases procedentes de cultivos de piel afecta ha sido más dificultoso. Cabe destacar que gran parte de los estudios incluyen casos con MF/SS, no únicamente SS.

Los estudios citogenéticos muestran que el SS presenta alteraciones citogenéticas, mayoritariamente en forma de cariotipos complejos, en más del 50% de los pacientes<sup>7-11</sup>. En una revisión de la literatura sobre 274 casos con MF/SS, 166 mostraron un cario-

tipo alterado. Las alteraciones más frecuentes fueron las pérdidas del cromosoma 10, deleciones de 1p, isocromosoma 17q, adiciones en 17p y 19p, y translocaciones que afectan a 1p, 10q y 14q<sup>9,10</sup>. La elevada complejidad de los cariotipos que se encuentran en el SS ha impedido su correcta interpretación y puede haber dificultado el hallazgo de alteraciones recurrentes. Algunos autores han realizado estudios aplicando técnicas de citogenética molecular como SKY<sup>11</sup>, M-FISH<sup>9</sup>, Rx-FISH<sup>10</sup> y CGH<sup>9</sup>, que han permitido definir mejor algunas de las regiones cromosómicas, así como definir algunos casos aislados con reordenamientos recurrentes como der(8)t(8;17)<sup>8</sup>, der(1)t(1;10), y der(14)t(14;15)<sup>9</sup>. Recientemente, Vermeer *et al.*<sup>12</sup> han realizado un estudio de alteraciones cromosómicas en SS utilizando la tecnología de array-CGH. Este trabajo ha delineado una serie de regiones frecuentemente alteradas, como las ganancias en 17q23q25 y 8q24.1q24.3, y las pérdidas en 17p13.1 y 10q25. Teniendo en cuenta los resultados hallados, a partir de los cuales se ha identificado la posible implicación de una serie de oncogenes y genes supresores de tumores, este grupo ha postulado tres posibles mecanismos relevantes en la patogénesis del SS: en primer lugar, las ganancias de *MYC* (8q24.3) y las pérdidas de antagonistas de *MYC*, como *MXI1* (10q25) y *MNT* (17q13.3), se observaron en el 75%, 40% y 55% de los pacientes, respectivamente. Estos resultados se asociaron a desregulación de la expresión génica, y se confirmó la presencia de heterodímeros proteicos *MYC/MAX* en SS. En segundo lugar, la región que contiene *TP53* y los genes de mantenimiento del genoma (*RPA1/HIC1*) se perdían en la mayoría de los pacientes. Finalmente, la vía de IL-2 se veía alterada por ganancias de *STAT3/STAT5* y el receptor de IL-2 en un 75% y 30% de los pacientes, respectivamente, y pérdidas de *TCF8* y *DUSP5* en al menos un 45% de los casos. En resumen, el genoma de los pacientes con SS se caracteriza por una elevada inestabilidad cromosómica, con ganancias y pérdidas recurrentes. Parece que las vías de *MYC* e IL-2 estarían implicadas en la patogénesis de este LCPCT. Los resultados de los estudios más relevantes sobre alteraciones genéticas en el SS se detallan en la Tabla 1.

---

## Micosis fungoide

La micosis fungoide es un tumor relativamente poco estudiado con técnicas de citogenética convencional, debido a la dificultad de obtener células en división procedentes del tejido neoplásico cutáneo. Sin embargo, existen diferentes publicaciones en las cuales se analizan las células tumorales en sangre periférica, por lo que es difícil separar los resultados obtenidos en MF y SS<sup>11,13</sup>.



**Tabla 1. Resumen de las series más destacadas que analizan las alteraciones citogenéticas en SS**

Publicación	n	Técnica aplicada	Alteraciones recurrentes
Karenko <i>et al.</i> J Invest Dermatol, 1999	7	HGC	Pérdidas: 10q, 13q
Mao <i>et al.</i> Br J Dermatol, 2002	18	CC FISH CGH	Ganancias: 4/4q, 18, 17/17q Pérdidas: 1p, 10/10q, 17p, 19
Mao <i>et al.</i> Blood, 2003	5	ArrayCGH	Ganancias: 3p25, 8p11, 8p22, 19p13, 20q13, 22q11
Mao <i>et al.</i> Genes Chromosomes Cancer, 2003	28	CC FISH M-FISH CGH	T. recurrentes: der(1)t(1;10), y der(14)t(14;15) Ganancias: 17q, 18 Pérdidas: 1p, 10/10q, 17p, 19
Fischer <i>et al.</i> J Invest Dermatol, 2004	4	CGH	Ganancias: 8/8q, 17q Pérdidas: 17p
Espinete <i>et al.</i> , Haematologica, 2004	21	CC RxFISH	Alt. numéricas: -9, -10, +18 Alt. estructurales: 1q, 2q, 6q23q27, 8q22
Batista <i>et al.</i> Genes Chromosomes Cancer, 2006	11	CC FISH SKY	Alt. estructurales: 1p32p36, 6q22q25, 17p11.2p13, 10q23q26, 19p13.3
Vermeer <i>et al.</i> Cancer Res, 2008	20	ArrayCGH	Ganancias: 17q21.31q23, 8q24.1q24.3 Pérdidas: 10p11.2, 10q22q26, 17p11.2p13.1

Los estudios más destacados son los publicados por Padilla-Nash *et al.*<sup>14</sup> y Batista *et al.*<sup>11</sup>. En el primer trabajo se estudiaron 4 pacientes afectos de MF en estadios iniciales de los cuales se establecieron 4 líneas celulares a partir de la biopsia cutánea. De todos ellos, se procedió al análisis cromosómico mediante SKY. Se observó que 2 de los 4 pacientes presentaron cariotipos normales. Los 2 pacientes restantes presentaron clones aislados, siendo las alteraciones más recurrentes la trisomía 21, del(5)(p15.1), del(17)(p12) y la del(18)(p11.2). Con respecto a las alteraciones estructurales detectadas, ninguna de ellas se pudo considerar recurrente<sup>14</sup>. Batista *et al.*<sup>11</sup> procedieron al estudio mediante SKY de un conjunto de 19 pacientes afectos de MF/SS a partir de sangre periférica. Ocho de éstos correspondían a pacientes afectos de MF en estadios avanzados. Únicamente 2 de los pacientes presentaron alteraciones citogenéticas que no pudieron considerarse recurrentes entre los distintos pacientes.

Debido a la dificultad de obtener células tumorales en división, la técnica de CGH es la que más se ha utilizado para la caracterización genética de las MF. Los estudios de CGH en MF han descrito a los cromosomas 1, 8, 9, 10, 11, 12 y 17 como los más afectados en las distintas series<sup>15-18</sup>. Aunque se han publicado muchos estudios que describen alteraciones genéticas recurrentes, y algunas de ellas se han asociado con un pronóstico desfavorable, parece que la importancia de estos marcadores es limitada, debido a que se han es-

tablecido a partir de estudios realizados en series heterogéneas de pacientes. El trabajo más destacable es el de Prochazkova *et al.*<sup>19</sup>, en el cual se ha estudiado una serie homogénea de pacientes diagnosticados de MF en estadios avanzados. Las alteraciones recurrentes identificadas fueron las pérdidas de 17p, 10q, 2q36qter, 9p21 y las ganancias del cromosoma 7 y de 17q, 9q34qter, 8q.

La aplicación de la técnica de arrayCGH al estudio de la MF ha permitido el hallazgo de genes candidatos implicados su patogénesis. Carbone *et al.*<sup>20</sup> han estudiado 16 pacientes con MF en estadios iniciales. Las alteraciones más recurrentes fueron la monosomía del cromosoma 19 seguida de las deleciones de las regiones 12q24.31, 7p22.1, 7q11.1q11.23, 9q34.12, 16q22.3q23.1 y las ganancias de 8q22.3q23.1 y 21q22.12. Estos autores han centrado sus estudios en las deleciones recurrentes de la región 12q24.31, en la cual se hallan los genes supresores de tumores *BCL7A*, *SMAC/DIABLO* y *RHOF*, que tienen un papel importante en las neoplasias hematológicas. Estas regiones cromosómicas y genes podrían estar implicados en las fases iniciales del desarrollo de la MF. Sin embargo, los resultados hallados en este estudio no coinciden con los descritos en fases más avanzadas de la enfermedad, por lo cual sería necesario validar estos hallazgos en la población tumoral seleccionada de biopsias de MF en estadios iniciales.

Con respecto a estadios más avanzados, en un primer estudio realizado por Van Doorn *et al.*<sup>21</sup>, se ana-

**Tabla 2. Resumen de las series más destacadas que analizan las alteraciones citogenéticas específicamente en micosis fungoide en fases avanzadas (IIB a IVB)**

Publicación	n	Técnica aplicada	Alteraciones recurrentes
Karenko <i>et al.</i> J Invest Dermatol, 1999	4	CGH	No observaron alteraciones
Mao <i>et al.</i> Br J Dermatol, 2002	6	CGH	Pérdidas: 1p y 17p en el 25% de los casos
Mao <i>et al.</i> Blood, 2003	2*	ArrayCGH	Ganancias: 3p25, 8p11, 8p22, 19p13, 20q13, 22q11
Fischer <i>et al.</i> J Invest Dermatol, 2004	5	CGH	Ganancia: 8q
Prochazkova <i>et al.</i> Genes Chromosomes Cancer, 2007	11	CGH	Ganancias: 1p36, 7, 9q34, 17q24qter y 19 Pérdidas: 2q36qter, 9p21 y 17p
Van Doorn <i>et al.</i> Blood, 2009	22	ArrayCGH	Ganancias: 7q36, 7q21q22 Pérdidas: 5q13, 9p21
Salgado <i>et al.</i> J Invest Dermatol, 2009	42	ArrayCGH	Ganancias: 7q33q35, 17q21.1, 8q24.21, 9q34qter, 10p14 Pérdidas: 9p21.3, 9q31.2, 17p13.1, 13q14.11, 6q21.3, 10p11.2, 16q23.2, 16q24.3

lizaron 22 pacientes empleando un microarray de BAC que incluía 3.500 sondas. Las alteraciones citogenéticas más frecuentemente halladas fueron las ganancias de 7q36, 7q21-7q22 y las pérdidas de las regiones 5q13, 9p21 y 13q14. En un segundo estudio realizado por nuestro grupo<sup>22</sup>, el cual incluyó 41 pacientes, se aplicó un microarray de oligonucleótidos que incluía 44.000 sondas, con una resolución mayor. En dicho análisis, se halló un patrón genético similar al descrito por Van Doorn *et al.*<sup>21</sup>. De esta manera, se confirma en una serie más amplia de pacientes la existencia de un patrón genético específico de MF en fase tumoral caracterizado por la ganancia total o parcial del cromosoma 7 (*BRAF*), seguido de 17q21.1 (*STAT3*, *STAT5*), 8q24.21 (*MYC*), 9q34qter (*NOTCH*, *TRAF2*, *CARD9*) y 10p14 (*GATA3*), y las pérdidas de las regiones 9p21.3 (*CDKN2A*, *CDKN2B*, *MTAP*) seguidas de 9q31.2, 17p13.1 (*TP53*), 13q14.11 (*RB*), 6q21.3, 10p11.22 (*TCF8*), 16q23.2 y 16q24.3. Además, en ambos trabajos se establecieron marcadores genéticos con posible valor pronóstico, como las deleciones de 9p21.3 (*CDKN2A*, *CDKN2B* y *MTAP*) y 10q26qter (*MGMT*, *EBF3*, *TXNL2* y *BNIP3*), y ganancias de 1q21q22 (*MCL1*) y 8q24.21 (*MYC*)<sup>21,22</sup>. Los resultados de los estudios más relevantes sobre alteraciones genéticas en la MF se detallan en la Tabla 2.

### **Linfoma anaplásico de célula grande CD30+ primario cutáneo**

Existen escasos estudios de citogenética convencional realizados en muestras tumorales de piel de linfoma anaplásico de célula grande CD30+ primario cutáneo (LACG-CD30+-PC), por las mismas razones que en la

MF (dificultad de obtener células en división, etc.), con el agravante de que este tumor es mucho menos frecuente. A diferencia de los LACG-CD30+ sistémicos, los LACG-CD30+-PC no presentan la t(2;5)(p23;q35) *NPM/ALK*<sup>23</sup>.

Las tres series más largas que describen alteraciones genéticas en LACG-CD30+-PC publicadas hasta el momento son los trabajos de Mao *et al.*<sup>24</sup>, Prochazkova *et al.*<sup>25</sup> y Zettl<sup>26</sup> *et al.* El primer estudio<sup>24</sup> analizó 15 pacientes utilizando las técnicas de CGH y arrayCGH (AmpliOnc I DNA array, 59 clones de 57 oncogenes, Vysis). De los 15 enfermos, en 8 se encontraron alteraciones citogenéticas (53%), principalmente ganancias de 1/1p, 5, 6, 7, 8/8p y 19. Posteriormente, Prochazkova *et al.*<sup>25</sup> estudiaron 9 casos de LACG-CD30+-PC con CGH, y en 1 de ellos realizaron estudio de citogenética convencional del tejido tumoral cutáneo. Las regiones más frecuentemente alteradas fueron ganancias en 9q33q34 y pérdidas en 6q21 y 18p11.3, en una serie de 79 pacientes con linfomas T estudiados por CGH, incluyeron 11 pacientes con LACG-CD30+-PC<sup>26</sup>. En este trabajo no se pudieron establecer alteraciones citogenéticas recurrentes. Los resultados de CGH que se han comunicado hasta el momento han sido muy dispares debido a la ausencia de estudios en series amplias de pacientes.

Nuestro grupo ha realizado un estudio en LACG-CD30+-PC utilizando un microarray de oligonucleótidos con 44.000 sondas<sup>27</sup>. Se han analizado 23 pacientes, y un 78% de los casos han mostrado alteraciones citogenéticas. Como anomalías recurrentes son de destacar las pérdidas de las regiones 13q34 y 16q22.1. Actualmente se están analizando estas regiones con el objetivo de buscar posibles genes candidatos asociados a la patogénesis de este tumor. Los resultados de

**Tabla 3. Resumen de las series más destacadas que analizan las alteraciones citogenéticas en linfomas anaplásicos de célula grande CD30+ primarios cutáneos**

Publicación	n	Técnica aplicada	Alteraciones recurrentes
Mao <i>et al.</i> Genes Chromosomes Cancer, 2003	15	CGH ArrayCGH	Ganancias: 1/1p, 5, 6, 7, 8/8p, 19
Prochazkova <i>et al.</i> J Pathol, 2003	9	CC FISH CGH	Ganancias: 9 Pérdidas: 6q21, 18p11.3
Gellrich <i>et al.</i> J Invest Dermatol, 2003	4	CGH	Ganancias: 7
Fischer <i>et al.</i> J Invest Dermatol, 2004	4	CGH	Pérdidas: 13
Zettl <i>et al.</i> Am J Pathol, 2004	11	CGH	Ganancias: 6p21
Sánchez-Schmidt <i>et al.</i> (no publicado)	21	ArrayCGH	Pérdidas: 13q34, 16q22.1

los estudios más relevantes sobre alteraciones genéticas en los LACG-CD30+-PC se detallan en la Tabla 3.

### Bibliografía

- Willemze R, Jaffe ES, Burg G, Cerroni L, Berti E, Swerdlow SH, et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood*. 2005 May 15;105(10):3768-85.
- WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. editors. Lyon: IARC, 2008.
- Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, et al. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science*. 1996 Jul 26;273(5274):494-7.
- Müller S, Rocchi M, Ferguson-Smith MA, Wienberg J. Toward a multicolor chromosome bar code for the entire human karyotype by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet*. 1997 Aug;100(2):271-8.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 1992 Oct 30;258(5083):818-21.
- Pinkel D, Segraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet*. 1998 Oct;20(2):207-11.
- Solé F, Woessner S, Vallespí T, Domingo A, Pérez Losada A, Florensa L, et al. Cytogenetic abnormalities in seven patients with the Sezary syndrome. *Sangre*. 1995 Oct;40(5):431-3.
- Thangavelu M, Finn WG, Yelavarthi KK, Roenigk HH Jr, Samuelson E, Peterson L, et al. Recurring structural chromosome abnormalities in peripheral blood lymphocytes of patients with mycosis fungoides/Sézary syndrome. *Blood*. 1997 May 1;89(9):3371-7.
- Mao X, Lillington DM, Czepulkowski B, Russell-Jones R, Young BD, Whittaker S. Molecular cytogenetic characterization of Sézary syndrome. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003 Mar;36(3):250-60.
- Espinete B, Salido M, Pujol RM, Florensa L, Gallardo F, Domingo A, et al. Genetic characterization of Sézary's syndrome by conventional cytogenetics and cross-species color banding fluorescent in situ hybridization. *Haematologica*. 2004 Feb;89(2):165-73.
- Batista DA, Vonderheid EC, Hawkins A, Morsberger L, Long P, Murphy KM, et al. Multicolor fluorescence in situ hybridization (SKY) in mycosis fungoides and Sézary syndrome: search for recurrent chromosome abnormalities. *Genes Chromosomes Cancer*. 2006 Apr;45(4):383-91.
- Vermeer MH, van Doorn R, Dijkman R, Mao X, Whittaker S, van Voorst Vader PC, et al. Novel and highly recurrent chromosomal alterations in Sézary syndrome. *Cancer Res*. 2008 Apr 15;68(8):2689-98.
- Karenko L, Hyytinen E, Sama S, Ranki A. Chromosomal abnormalities in cutaneous T-cell lymphoma and in its premalignant conditions as detected by G-banding and interphase cytogenetic methods. *J Invest Dermatol*. 1997 Jan;108(1):22-9.
- Padilla-Nash HM, Wu K, Just H, Ried T, Thestrup-Pedersen K. Spectral karyotyping demonstrates genetically unstable skin-homing T lymphocytes in cutaneous T-cell lymphoma. *Exp Dermatol*. 2007 Feb;16(2):98-103.
- Karenko L, Kähkönen M, Hyytinen ER, Lindlof M, Ranki A. Notable losses at specific regions of chromosomes 10q and 13q in the Sézary syndrome detected by comparative genomic hybridization. *J Invest Dermatol*. 1999 Mar;112(3):392-5.
- Mao X, Lillington D, Scarisbrick JJ, Mitchell T, Czepulkowski B, Russell-Jones R, et al. Molecular cytogenetic analysis of cutaneous T-cell lymphomas: identification of common genetic alterations in Sézary syndrome and mycosis fungoides. *Br J Dermatol*. 2002 Sep;147(3):464-75.
- Mao X, Orchard G, Lillington DM, Russell-Jones R, Young BD, Whittaker SJ. Amplification and overexpression of JUNB is associated with primary cutaneous T-cell lymphomas. *Blood*. 2003 Feb 15;101(4):1513-9.
- Fischer TC, Gellrich S, Muche JM, Sherev T, Audring H, Neitzel H, et al. Genomic aberrations and survival in cutaneous T cell lymphomas. *J Invest Dermatol*. 2004 Mar;122(3):579-86.
- Prochazkova M, Chevret E, Mainhaguier G, Sobotka J, Vergier B, Belaud-Rotureau MA, et al. Common chromosomal abnormalities in mycosis fungoides transformation. *Genes Chromosomes Cancer*. 2007 Sep;46(9):828-38.
- Carbone A, Bernardini L, Valenzano F, Bottillo I, De Simone C, Capizzi R, et al. Array-based comparative genomic hybridization in early-stage mycosis fungoides: recurrent deletion of tumor suppressor genes BCL7A, SMAC/DIABLO, and RHOE. *Genes Chromosomes Cancer*. 2008 Dec;47(12):1067-75.
- van Doorn R, van Kester MS, Dijkman R, Vermeer MH, Mulder AA, Szuhai K, et al. Oncogenomic analysis of mycosis fungoides reveals major differences with Sezary syndrome. *Blood*. 2009 Jan 1;113(1):127-36.

22. Salgado R, Servitje O, Gallardo F, Vermeer MH, Ortiz-Romero PL, Karpova MB, et al. Oligonucleotide Array-CGH Identifies Genomic Subgroups and Prognostic Markers for Tumor Stage Mycosis Fungoides. *J Invest Dermatol* 2009 Sep 17. [Epub ahead of print].
23. DeCoteau JF, Butmarc JR, Kinney MC, Kadin ME. The t(2;5) chromosomal translocation is not a common feature of primary cutaneous CD30+ lymphoproliferative disorders: comparison with anaplastic large-cell lymphoma of nodal origin. *Blood*. 1996 Apr 15;87(8):3437-41.
24. Mao X, Orchard G, Lillington DM, Russell-Jones R, Young BD, Whittaker S. Genetic alterations in primary cutaneous CD30+ anaplastic large cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003 Jun;37(2):176-85.
25. Prochazkova M, Chevret E, Beylot-Barry M, Sobotka J, Vergier B, Delaunay M, et al. Chromosomal imbalances: a hallmark of tumour relapse in primary cutaneous CD30+ T-cell lymphoma. *J Pathol*. 2003 Nov;201(3):421-9.
26. Zettl A, Rüdiger T, Konrad MA, Chott A, Simonitsch-Klupp I, Sonnen R, et al. Genomic profiling of peripheral T-cell lymphoma, unspecified, and anaplastic large T-cell lymphoma delineates novel recurrent chromosomal alterations. *Am J Pathol*. 2004 May;164(5):1837-48.
27. Sánchez-Schmidt J, Salgado R, Gallardo F, Servitje O, Muniesa C, Estrach T, et al. Caracterización citogenética de los linfomas cutáneos de células CD30+ mediante estudio de arrays de hibridación genómica comparada. 2<sup>nd</sup> International Meeting of Dermatology. Madrid, Spain. 12-14 March 2009.

## Anemia ferropénica

COORDINADORES: A. REMACHA. *Toledo*  
J.A. MUÑOZ. *Cádiz*

### Resumen del simposio

En el presente simposio se ha revisado varios temas actuales relacionados con la anemia ferropénica, todos ellos de gran importancia en el diagnóstico y tratamiento de la carencia de hierro.

La Dra. Martí ha tratado el tema de la anticoagulación y la anemia ferropénica. La tríada anticoagulación con acenocumarol, sangrado digestivo recurrente por angiodisplasia y anemia ferropénica rebelde al tratamiento es todo un reto, primero diagnóstico y muchas veces terapéutico, que lleva a situaciones límite de anemia en pacientes mayores con cardiopatías de base. Además, del uso de heparinas de bajo peso molecular, una de las posibles utilidades de los nuevos anticoagulantes orales pueden ser estas situaciones.

El Dr. Muñoz *et al.* han realizado una exhaustiva puesta al día del tratamiento oral y parenteral de la anemia ferropénica. Como ellos destacan es necesario primero un diagnóstico clínico-biológico adecuado y un diagnóstico etiológico eficiente de la anemia ferropénica. El tratamiento siempre será sustitutivo, comenzando por sales ferrosas, en la gran mayoría de los casos, con lo que se resolverá la anemia. En casos seleccionados tiene su papel el hierro endovenoso (intolerancia, falta de respuesta al hierro oral, etc.). Entre los nuevos preparados destaca la presencia del hierro carboximaltosa que permite usar dosis elevadas de hierro, en relación con la severidad de la anemia ferropénica.

Los Dres. Benavente y González han revisado un factor que desde hace un par de décadas se considera más y más en la ferropenia. Se trata de la infección gástrica por *Helicobacter pylori*, que también se relaciona con el déficit de vitamina B<sub>12</sub>. Se caracteriza por una anemia ferropénica que responde mal al hierro y que presentan intolerancia oral al hierro. Los autores han revisado los mecanismos fisiopatológicos que pueden llevar a la ferropenia en caso de infección por *Helicobacter pylori*.

Los Dres. Ramsey *et al.*, por último, han completado este simposio con una puesta al día de un tema nuevo. La anemia ferropénica no respondedora al Fe oral, el denominado IRIDA, esta enfermedad congénita se debe a una anomalía de la proteína matriptasa 2 (TMPPRS6). La han puesto en el contexto de otras anemias ferropénicas congénitas, para su diagnóstico diferencial, y nos han revisado este tipo serin-proteasas transmembrana y su posible mecanismo de acción hasta llevar a un aumento de la hepcidina, consecuencia de la falta de control de la matriptasa 2 sobre la hemojuvelina. Es un ejemplo magnífico de cómo lesiones moleculares en proteínas que hasta hace poco no se sabían su implicación en el metabolismo férrico están ensanchando nuestros conocimientos en la ferropenia. Conviene conocer esta enfermedad y tenerla en cuenta en enfermos jóvenes con ferropenia no explicada.



## ANEMIA FERROPÉNICA EN EL PACIENTE ANTICOAGULADO

E. MARTÍ SÁEZ

Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona

### Introducción

La anemia ferropénica es la alteración hematológica de mayor prevalencia a escala mundial. De ahí la importancia del diagnóstico y tratamiento adecuados<sup>1</sup>. Los grupos de mayor riesgo son los niños y las mujeres en edad fértil. Fuera de estos dos grupos la causa más frecuente de anemia ferropénica son las pérdidas sanguíneas por tubo digestivo. Se sabe que la anticoagulación aumenta el riesgo de hemorragia digestiva y, por tanto, de anemia ferropénica<sup>2,3</sup>.

Con el aumento de la población en riesgo y la demostración de su beneficio clínico, la utilización de forma crónica de fármacos anticoagulantes se ha visto incrementada de forma notable, con lo que han aumentado también las complicaciones hemorrágicas<sup>4</sup>. Los principales fármacos utilizados de forma crónica son los AVK. Su eficacia ha sido establecida por ensayos clínicos bien diseñados para la prevención primaria y secundaria del tromboembolismo venoso y como profilaxis en la fibrilación auricular o en portadores de válvulas cardíacas mecánicas<sup>5-8</sup>.

Una complicación mayor del tratamiento anticoagulante y en concreto, del tratamiento con antagonistas de la vitamina K (AVK) es el sangrado. La hemorragia gastrointestinal es el tipo de sangrado más frecuente en pacientes tratados con estos fármacos. El riesgo de hemorragia digestiva alta es tres veces mayor en pacientes que reciben AVK<sup>3</sup>. Diversos factores influyen en el mayor riesgo de sangrado. El más importante es la intensidad del tratamiento anticoagulante<sup>4,8,9</sup>. Otros factores de riesgo son la edad avanzada, el uso concomitante de otros fármacos, como los antiinflamatorios no esteroideos o la aspirina, y la comorbilidad<sup>8-10</sup>. Algunos autores han evaluado el impacto del tratamiento anticoagulante en la recidiva de los episodios hemorrágicos y concluyen que el tratamiento anticoagulante no sólo es un factor de riesgo para el primer episodio hemorrágico, sino que los pacientes anticoagulados tienen un elevado riesgo de recidiva<sup>12,13</sup>.

Es difícil calcular el número total de pacientes en tratamiento crónico con estos fármacos, pero su número va en aumento. Se calcula que en España hay aproximadamente unos 600.000 pacientes en tratamiento crónico con AVK. La edad y la presencia de comorbilidad en estos pacientes también ha aumentado, lo que supone un incremento de las complicaciones hemorrágicas<sup>14</sup>.

### Causas de hemorragia digestiva recurrente y de origen oscuro

La hemorragia digestiva en pacientes anticoagulados es un problema asistencial importante, ya que tiene una elevada morbimortalidad y se trata de una situación de difícil manejo, por la necesidad de ingreso y atención hospitalaria frecuente, la necesidad de realizar procedimientos invasivos y transfusiones y la percepción negativa por parte del paciente de su propia salud. Pese a los avances en la monitorización de la hemorragia gastrointestinal en estos pacientes, hemorragias mayores ocurren en hasta un 20% de ellos<sup>2</sup>. En muchos de estos pacientes el sangrado es recurrente y en estos casos el manejo a largo plazo se complica.

Las causas de hemorragia digestiva no relacionada con varices esofágicas en la población general son en primer lugar la úlcera péptica, seguida del síndrome de Mallory-Weiss, la diverticulosis colónica, la hemorragia digestiva de origen desconocido, las angiodisplasias y, por último, las neoplasias. Las angiodisplasias suponen un 4% de las hemorragias digestivas y la causa más importante de anemia inexplicada o hemorragia digestiva de origen oscuro y son la segunda causa de hemorragia digestiva en el anciano<sup>15</sup>.

El diagnóstico etiológico de los pacientes que presentan anemia de probable origen digestivo o bien que han presentado episodios recurrentes de hemorragia digestiva grave es complicado, puesto que las pruebas convencionales (colonoscopia y gastroscopia) en muchas ocasiones son normales. Con el uso de la cápsula endoscópica y la enteroscopia con doble balón muchos de estos pacientes pueden ser diagnosticados. La etiología del sangrado de origen oscuro en general depende de la edad del paciente. En los pacientes más jóvenes predominan los pequeños tumores intestinales, divertículos de Meckel o la enfermedad inflamatoria intestinal. Los pacientes mayores de 40 años tienden a sangrar por lesiones vasculares o angiodisplasias, que suponen más del 40% de todas las causas<sup>16</sup>. Pese a todo, un 20% de estos pacientes se quedan sin diagnóstico.

Las angiodisplasias son malformaciones arteriovenosas presentes en la mucosa y submucosa del tubo digestivo. Se trata de lesiones adquiridas de etiopatogenia poco clara, probablemente resultado de un proceso degenerativo asociado al envejecimiento. Son lesiones generalmente pequeñas, de 2 a 5 mm de diámetro, únicas o múltiples y que consisten en capilares mucosos que drenan a una vena tortuosa en la submucosa. Su incidencia en la población se desconoce, puesto que la mayoría son asintomáticas. Su espectro clínico es muy variable, desde lesiones asintomáticas a otras que se presentan como una hemorragia gastrointestinal aguda o como anemia ferropénica. El tratamiento con AVK aumenta tanto el grado de anemia,

como la frecuencia y la gravedad de los episodios hemorrágicos. En una serie de pacientes con angiodisplasia el 28% de los asintomáticos presentaban algún tipo de coagulopatía<sup>17</sup>.

---

### Manejo clínico

En todos los pacientes, pero especialmente en los pacientes tratados con AVK, una vez las lesiones angioplásticas han empezado a sangrar, son frecuentes las hemorragias recurrentes y la anemia ferropénica persistente, pese al tratamiento con hierro, y la necesidad de transfusiones repetidas. El manejo de estos pacientes es complejo. Se han propuesto diversas soluciones terapéuticas, con poco éxito. El tratamiento local con fotocoagulación con plasma-argón es efectivo en el 80% de los pacientes con angiodisplasias accesibles mediante endoscopia, pero no parece ser una solución definitiva, ya que en muchos pacientes se produce una recurrencia del sangrado<sup>18</sup>. Otra alternativa terapéutica en los pacientes sangrantes por angiodisplasias es la terapia hormonal con etinil-estradiol y noretisterona, aunque en un estudio de cohortes llevado a cabo por Junquera *et al.* no encontró beneficio en la rama tratada con terapia hormonal<sup>17</sup>.

Otra forma de abordar el manejo de estos pacientes es realizar un cambio en la terapia anticoagulante. Dado que los pacientes anticoagulados con AVK presentan un riesgo aumentado de hemorragia digestiva, sobre todo los pacientes con factores de riesgo, como haber presentado episodios hemorrágicos previos, la edad avanzada o la comorbilidad, una solución posible sería la retirada del tratamiento anticoagulante. Pero esta decisión es controvertida y antes es necesario realizar una evaluación del riesgo-beneficio. La mayoría de estos pacientes presentan un riesgo trombotico moderado o alto, por lo que el tratamiento anticoagulante no puede ser interrumpido a largo plazo. Una alternativa al tratamiento con AVK podría ser el uso de heparina de bajo peso molecular (HBPM).

---

### Alternativas a los AVK en pacientes con hemorragia digestiva recurrente

Hay pocos estudios en que se utilice la HBPM como alternativa a los AVK en este tipo de pacientes, aunque sí existen estudios en otros escenarios clínicos en que pacientes tratados con HBPM tienen una menor tasa de complicaciones hemorrágicas mayores y menores que aquellos tratados con AVK. En su estudio Santamaría *et al.* mostraron que pacientes afectados de tromboembolismo venoso tratados con bemiparina (una HBPM de última generación) tenían tasas de sangrado menores a los pacientes tratados con AVK<sup>19</sup>. La causa

de la menor tasa de complicaciones hemorrágicas podría ser que la HBPM presenta un mejor perfil farmacocinético, con un efecto anticoagulante predecible en función de la dosis. Pese a que la seguridad a largo plazo de la HBPM en los pacientes portadores de válvulas protésicas no está demostrada, existen algunos estudios, la mayoría realizados en embarazadas portadoras de prótesis, en los que la HBPM parece ser segura, es decir, presenta una baja incidencia de complicaciones tromboticas<sup>20</sup>.

En los últimos años se han hecho importantes progresos en el desarrollo de nuevos fármacos anticoagulantes con un mejor perfil farmacocinético y con buena biodisponibilidad por vía oral. El desarrollo de pequeñas moléculas activas por vía oral inhibitoras de directas de la trombina o el factor X activado (Xa) y con una respuesta anticoagulante predecible y bajo potencial de interacciones farmacológicas probablemente cambiará el escenario actual del tratamiento anticoagulante oral. El factor Xa parece ser la diana terapéutica más atractiva, ya que está posicionado al inicio de la vía común de la coagulación, y, dado que la cantidad de serinproteasas se amplifica en cada paso de la cascada, la inhibición selectiva de factores por encima de la trombina podría ser una estrategia antitrombótica altamente eficaz. Además, al no inhibir la actividad de la trombina directamente, se permite que trazas de trombina escapen a la neutralización, facilitando la hemostasia y llevando a un perfil de seguridad favorable con respecto a la aparición de hemorragia. De los nuevos anticoagulantes orales actualmente en desarrollo o aprobados para otra indicación, existe un inhibidor directo de la trombina (dabigatrán) y dos inhibidores del factor Xa (rivaroxabán y el apixabán). Dos estudios en fase II han examinado el tratamiento con rivaroxabán en trombosis venosa profunda (TVP) aguda sintomática. El estudio ODIX<sub>3</sub>-DVT aleatorizó 613 pacientes a dos dosis al día de 10, 20 o 30 mg o una dosis de 40 mg frente al tratamiento estándar con enoxaparina y AVK durante 12 semanas. Aunque el objetivo primario (regresión del trombo mediante ultrasonografía) no difirió significativamente entre ambos tratamientos, la tasa de recurrencia sintomática y de sangrado mayor fueron menores en la rama tratada con rivaroxabán<sup>21</sup>.

Estudios en fase III con el rivaroxabán para otras indicaciones, como la fibrilación auricular y el tromboembolismo venoso pulmonar, están todavía en marcha, pero parecen corroborar los resultados de los estudios previos.

---

### Conclusiones

El aumento de pacientes anticoagulados con AVK junto con el aumento de la edad y comorbilidad de los

mismos en los últimos años ha llevado a un aumento de las complicaciones hemorrágicas. La hemorragia digestiva en forma de episodios agudos recurrentes o como anemia ferropénica es una complicación relativamente frecuente en estos pacientes. Además, supone un problema asistencial importante, por la morbimortalidad y el difícil manejo.

La mayoría de las lesiones causantes de esta complicación son las angiodisplasias intestinales. Dado que el tratamiento local como el sistémico de las mismas parece poco eficaz, puesto que reaparecen y se produce en la mayoría de los casos la recidiva hemorrágica; la solución puede estar en un cambio en la terapia anticoagulante. Los AVK tienen una tasa de complicaciones hemorrágicas elevada, sobre todo en pacientes con factores de riesgo, por lo que una solución sería el cambio de terapia por HBPM, con un perfil farmacocinético y un efecto anticoagulante predecible en función de la dosis.

Este escenario puede cambiar con la aparición de los nuevos fármacos anticoagulantes orales, que parecen tener un perfil de seguridad con respecto a las complicaciones hemorrágicas muy favorable. Hasta entonces, la valoración del riesgo-beneficio, la eliminación o control de los factores de riesgo y la valoración de la retirada del tratamiento con AVK y cambio o no por HBPM, son las únicas herramientas para el manejo de estos pacientes.

## Bibliografía

1. Junca, J. Un algoritmo diagnóstico para la ferropenia. *Med Clínica (Barc)* 2001; 116: 146-9.
2. Landefeld CS, Beyth RJ. Anticoagulant-related bleeding: clinical epidemiology, prediction, and prevention. *Am J Med* 1993; 95: 315-28.
3. Johnsen SP, Sorensen HT, Mellemkjoer L, Blot WJ, Nielsen GL, McLaughlin JK, et al. Hospitalisation for upper gastrointestinal bleeding associated with use of oral anticoagulants. *Thromb Haemost* 2001; 86: 563-8.
4. Fihn SD, McDonell M, Martin D, Henikoff J, Vermes D, Kent D, et al. Risk factors for complications of chronic anticoagulation. A multicenter study. Warfarin optimized outpatient follow-up study group. *Ann Intern Med* 1993; 118: 511-20.
5. Petersen P, Boysen G, Godtfredsen J, Andersen ED, Andersen B. Placebo-controlled, randomised trial of warfarin and aspirin for prevention of thromboembolic complications in chronic atrial fibrillation. *Lancet* 1989; 1: 175-9.
6. Stroke prevention in atrial fibrillation Investigators. Stroke Prevention in Atrial Fibrillation study: final results. *Circulation* 1991; 84: 527-39.
7. Hull R, Delmore T, Carter C, Hirsh J, Genton E, Gent M, et al. Warfarin sodium versus low-dose heparin in the long-term treatment of venous thrombosis. *N Engl J Med* 1979; 301: 855-58.
8. Cannegieter SC, Rosendaal FR, Wintzen AR, Van der Meer FJ, Vandembroucke JP, Briët E. Optimal oral anticoagulant therapy in patients with mechanical heart valves. *N Engl J Med* 1995; 333: 11-7.
9. Van der Meer FJ, Rosendaal FR, Vandembroucke JP, Briët E. Bleeding complications in oral anticoagulant therapy. An analysis of risk factors. *Arch Intern Med* 1993; 153: 1557-62.

10. Palareti G, Leali N, Coccheri S, Poggi M, Manotti C, D'Angelo A, et al. Bleeding complications of oral anticoagulant treatment: an inception cohort, prospective collaborative study (ISCOAT). Italian study on complications of oral anticoagulation. *Lancet* 1996; 348: 423-8.
11. Torn M, Bollen WL, Van der Meer FJ. Risks of anticoagulant therapy with increasing age. *Arch Intern Med* 2005; 165: 1527-32.
12. Ananthasubramaniam K, Beattie JN, Rosman HS, Hayam V, Borzac S. How safely and for how long can warfarin therapy be withheld in prosthetic heart valve patients hospitalized with a major hemorrhage? *Chest* 2001; 119: 478-84.
13. Wolf AT, Wasan SK, Saltzman JR. Impact of anticoagulation on rebleeding following endoscopic therapy for non-variceal upper gastrointestinal hemorrhage. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 290-6.
14. Navarro JL, César JM, Fernández MA, Fontcuberta J, Reverter JC, Gol-Freixa J. Morbilidad y mortalidad en pacientes con tratamiento anticoagulante oral. *Rev Esp Cardiol* 2007; 60: 1226-32.
15. Garrido A, Márquez JL, Guerrero FJ, Leo E, Pizarro MA, Trigo C. Changes in the etiology, outcome, and characteristics of patients with acute gastrointestinal bleeding between 1999 and 2005. *Rev Esp Enf Dig* 2007; 9: 275-9.
16. Gupta N, Longo WE, Vernava AM. Angiodysplasia of the lower gastrointestinal tract: an entity readily diagnosed by colonoscopy and primarily managed nonoperatively. *Dis Colon Rectum* 1995; 38: 979-82.
17. Junquera F, Feu F, Papo M, Videla S, Armengol JR, Bordas JM, et al. A multicenter, randomized clinical trial of hormonal therapy in the prevention of rebleeding from gastrointestinal angiodysplasia. *Gastroenterology* 2001; 121: 1073-9.
18. Mathus-Vliegen EM. Laser treatment of intestinal vascular abnormalities. *Int J Colorectal Dis* 1989; 4 (1): 20-5.
20. Santamaria A, Juárez S, Reche A, Gómez-Outes A, Martínez-González J, Fontcuberta J. Low molecular weight heparin, bempiparin, in the outpatient treatment and secondary prophylaxis of venous thromboembolism in standard clinical practice: the SFERA Study. *Int J Clin Pract* 2006; 60: 518-25.
21. James AH, Brancaccio LR, Gehrig TR, Wang A, Ortel TL. Low-molecular weight heparin for thromboprophylaxis in pregnant women with mechanical heart valves. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2006; 19: 543-9.
22. Agnelli G, Gallus A, Goldhaber SZ, Haas S, Huisman MV, Hull RD, et al. Treatment of proximal deep-vein thrombosis with the oral direct factor Xa inhibitor rivaroxaban (BAY 59-7939): the ODIXa-DVT (Oral Direct Factor Xa Inhibitor BAY 59-7939 in Patients With Acute Symptomatic Deep-Vein Thrombosis) study. *Circulation* 2007; 116: 180-7.

## HIERRO ORAL O ENDOVENOSO. NUEVOS PREPARADOS

J.A. MUÑOZ<sup>1</sup>, R. JIMÉNEZ<sup>1</sup>, C.E. RISUEÑO<sup>2</sup>, C. DE COS HÖHR<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Servicio de Hematología del Hospital Universitario Puerta del Mar. Cádiz.

<sup>2</sup> IES Fuerte de la Cortadura. Cádiz

La ferropenia es un estado frecuente dentro de la patología humana, afecta al 15-25% de la población y se distinguen una serie de estadios: eritropoyesis ferropé-

nica, ferropenia latente y anemia ferropénica. Estos estadios son progresivos si no se actúa sobre la causa y se realiza un tratamiento sustitutivo<sup>1,2</sup>.

Las principales causas productoras de ferropenia son: a) Aumento de las necesidades de hierro, como ocurre en la infancia, gestación, lactancia, etc. Esta causa debe ser valorada adecuadamente ya que no suelen existir ferropenias exclusivamente relacionadas con ella; b) Pérdida de hierro, fundamentalmente de origen ginecológico (meno-metrorragias) o digestivo pero no debemos olvidar las relacionadas con hemoglobinuria, hematuria, hemoptisis, etc. En este grupo podemos englobar las secundarias a pruebas diagnósticas o las relacionadas con la donación reiterada de sangre; c) Disminución de la absorción del hierro por errores dietéticos, celiaquía, cirugía gastrointestinal, infecciones, etc.

Todas estas causas nos provocarán la deficiencia de hierro, que debe ser diagnosticada por la historia clínica (obtendremos datos relacionados con la anemia en sí, con el tipo y la causa de la anemia), la exploración física y las pruebas biológicas, que comprenden fundamentalmente:

1. Hemograma con reticulocitos y estudio del frotis sanguíneo.
2. Metabolismo del hierro (sideremia, transferrina, ferritinemia y receptor soluble de la transferrina).

Se realizarán las pruebas oportunas para llegar a un diagnóstico biológico y etiológico de la anemia con el fin de proceder al tratamiento, que incluye:

1. Hemoterapia cuando las condiciones hemodinámicas del paciente lo requieran pero sin olvidar obtener las muestras adecuadas para el estudio de anemia previamente a realizar la transfusión; posteriormente se debe valorar la eficacia transfusional.
2. Tratamiento etiológico, si es posible.
3. Tratamiento sustitutivo con hierro oral (de elección) o parenteral.

---

## Hierro oral

Es el tratamiento de elección en las deficiencias de hierro y deben utilizarse sales ferrosas por una mayor eficacia debido a su mejor absorción. La dosificación es de 2-3 mg Fe<sup>++</sup>/kg peso/día durante 60-100 días según se trate de una ferropenia sin anemia o con ella, aunque un control seriado de los pacientes nos pondrá el límite a la suspensión del tratamiento.

Clásicamente el hierro se ha administrado en ayunas, sin embargo, produce frecuentemente intolerancia digestiva que hace que el grado de abandono del tratamiento sea alto. Para evitar este problema nosotros recomendamos la administración de los preparados media hora después de comer o cenar pero evitando los alimentos que inhiban la absorción del hierro

tales como la leche y sus derivados, el café y té por su contenido en taninos, las leguminosas y cereales (fitatos), etc. Por otra parte, se procurará tomar alimentos favorecedores de la absorción del hierro tales como la fruta y sus derivados por su alto contenido en vitamina C así como carnes y/o pescados. Esta pauta trae consigo una adecuada tolerancia y muy pocos abandonos o incumplimientos terapéuticos.

Las sales ferrosas interaccionan con: a) Antiácidos e inhibidores de la bomba de protones (omeprazol y similares), provocando una disminución de la absorción del hierro, por lo que la toma de ambos medicamentos debe separarse al menos dos horas; b) Se debe evitar la asociación con metildopa, quinolonas, tetraciclinas y levotiroxina ya que disminuye su absorción, reduciéndose su biodisponibilidad y su efecto clínico.

Los efectos secundarios principales de las sales ferrosas son los derivados de la intolerancia digestiva (náuseas, vómitos, epigastralgia, diarrea, estreñimiento) y menos frecuentes la erupción cutánea y el sabor metálico. No debemos olvidar advertir a los pacientes de dichos efectos secundarios y su manejo así como del color negro de las heces. La sobredosificación aguda que puede dar lugar a cuadros graves inmediatos y tardíos (fallo hepático) es una rara complicación del tratamiento.

El tratamiento sustitutivo debe completarse hasta un mínimo de 60-100 días aunque depende de la actuación sobre la causa productora de la ferropenia y de los valores biológicos obtenidos, ya que el objetivo inicial es la elevación de los niveles de hemoglobina con el fin de evitar o minimizar la hipoxia. Este primer objetivo se puede conseguir entre los 15 y 20 días de iniciado el tratamiento. El objetivo final es la normalización de los niveles de hemoglobina y la reposición de los depósitos de hierro (ferritinemia); esto depende no sólo de la adecuada duración del tratamiento sino también de la solución del problema causante de la ferropenia.

Los parámetros biológicos a evaluar son el hemograma con reticulocitos<sup>3</sup> y el estudio del metabolismo del hierro. Nuestros resultados en un grupo de 87 pacientes con anemia ferropénica se muestran en la Tabla 1, donde se expresan los valores biológicos más relevantes a los 16 y 98 días de tratamiento.

Uno de los problemas más importantes en el manejo de la ferropenia es la falta de respuesta, pudiendo obedecer a intolerancia digestiva con incumplimiento del tratamiento; diagnóstico erróneo (mala utilización del hierro en lugar de deficiencia); persistencia de la causa de la anemia; malabsorción del hierro; trastorno de conducta (pica, síndrome de Lathénie de Ferjol), etc. La actuación en estos casos se debe limitar a conocer la causa y actuar sobre ella, y en los casos de intolerancia digestiva proceder a cambiar el preparado comercial pero manteniendo siempre sales ferrosas y si persiste la intolerancia grave iniciar tratamiento parenteral.



Los preparados de hierro más comúnmente utilizados en el tratamiento de la anemia ferropénica se recogen en la Tabla 2.

### Hierro parenteral

Es el tratamiento de segunda línea en el manejo de las deficiencias de hierro y sus indicaciones<sup>4</sup> están limitadas a la intolerancia oral grave, la falta de respuesta a la terapia convencional (gastritis atrófica autoinmune, gastritis en relación a *H. pylori*, etc.) o malabsorción del hierro. También se utiliza en la anemia renal con componente ferropénico tanto en fase de diálisis como en prediálisis<sup>5,6</sup>, en el tratamiento con eritropoyetina, la donación autóloga perioperatoria, la anemia preoperatoria<sup>7</sup>, la anemia asociada a la enfermedad inflamatoria intestinal y las anemias ferropénicas graves gestacionales y postparto<sup>8</sup>, pero no debe utilizarse en el primer trimestre de la gestación, ya que no es segura la ausencia de manifestaciones teratógenas y debe usarse con precaución en la insuficiencia hepática, infección aguda o crónica, pacientes con historia de asma, eczema o alergias.

Los preparados disponibles han ido cambiando a lo largo de los años y en España hemos pasado de utilizar hierro dextrano de alto peso y gluconato a hierro sacarosa, hierro dextrano de bajo peso molecular (presenta hasta un 5% de manifestaciones adversas dependientes, generalmente, de la dosis y en un porcentaje no despreciable de casos hay un riesgo de reacción anafiláctica aguda y grave que limita su uso). En la actualidad, estamos comenzando a utilizar el hierro carboximaltosa que es una de las novedades de la terapia con hierro parenteral junto al ferumoxytol, debido a su facilidad de uso, así como a su seguridad y eficacia.

El **ferumoxytol**<sup>9</sup> es un coloide con partículas de 30 nm y pm de 750 Kd. Cada mL contiene 30 mg de Fe elemental y 40 mg de manitol. La dosificación no está totalmente establecida ya que aún no está disponible para su uso generalizado aunque los resultados son muy esperanzadores<sup>10,11</sup>.

El **hierro-sacarosa** es un complejo de hidróxido de hierro con sacarosa que tiene un peso molecular aproximado de 43 Kda y en el plasma se une a la transferrina para su transporte al eritroblasto. Tiene una escasa eliminación renal y las reacciones adversas son poco frecuentes y excepcionales las anafilácticas. No se han descrito casos letales con el uso de estos preparados de hierro. El cálculo de dosis se realiza con la fórmula:

$$[\text{Peso corporal (kg)} \times \Delta \text{Hb (g/dL)} \times 2,4] + 500$$

Factor 2,4: cada g de Hb contiene 3,4 mg de hierro y el volumen de sangre es 70mL/kg peso. Hierro de depósito: 500, si el peso es > 35 kg; 15 mg/kg peso, si el peso < 35 kg. El incremento de Hb debe ser establecido individualmente.

Tabla 1. Valores biológicos en el tratamiento con sales ferrosas v.o. de las 87 anemias ferropénicas seguidas en el servicio de hematología durante el año 2008

	Basal	16 días	98 días
Hb (g/dL)	8,9 ± 1,6	10,7 ± 1,4	12,7 ± 1,4
VCM (fL)	72,3 ± 8,0	77,8 ± 7,1	84,4 ± 5,4
RDWSD (fL)	47,2 ± 7,2	60,0 ± 10,4	50,6 ± 8,1
Retx10 <sup>3</sup> /μL	52,1 ± 22,9	91,6 ± 41,2	46,8 ± 20,0
LFR %	83,2 ± 8,5	79,9 ± 9,8	89,9 ± 5,5
RetHe (pg)	19,8 ± 4,6	26,5 ± 4,8	28,2 ± 3,3
Fe (μg/dL)	23,8 ± 15,3		53,7 ± 32,4
TIBC (μg/dL)	439,3 ± 79,7		387 ± 85
Ferritina (ng/mL)	5,1 ± 4,9		13,6 ± 6,4
RTrf (mg/L)	7,6 ± 2,5		4,2 ± 2,6

Tabla 2. Preparados de hierro vía oral más comúnmente utilizados para la deficiencia férrica

Compuesto	Presentación
Ferroglicina sulfato	· Cápsulas de 100 mg Fe <sup>++</sup> · Solución de 30 mg Fe <sup>++</sup> /mL
Gluconato ferroso	· Comprimidos efervescentes de 25 y 80 mg Fe <sup>++</sup>
Lactato ferroso	· Viales de 37,5 mg Fe <sup>++</sup>
Sulfato ferroso	· Gotas de 25 mg Fe <sup>++</sup> /mL · Cápsulas de 106 mg Fe <sup>++</sup> · Grageas de 80 mg Fe <sup>++</sup>

y la dosis total se administra en fracciones de 100 mg/d x 3 dosis a la semana y en casos excepcionales a dosis de 200 mg/d x 3 dosis a la semana.

La droga es eficaz y segura incluso en niños<sup>12</sup> y los efectos secundarios son escasos, incluyendo irritación local y flebitis, sabor metálico, hipotensión, mareo, cefalea, coloración de la piel si se produce extravasación y que puede llegar a desarrollar necrosis debido a que es una solución muy alcalina e irritante. En nuestra serie de 24 ciclos de tratamiento correspondientes a 18 casos tratados con hierro sacarosa hemos encontrado que el sabor metálico es el efecto indeseable más frecuente, afectando al 21% de los casos, le siguen los casos de hipotensión y mareos de carácter leve y sólo hemos tenido un caso de extravasación del medicamento con dolor intenso, flebitis y necrosis en la zona.

El preparado no debe utilizarse en los casos de anemia no atribuibles a un déficit de hierro o en las anemias de trastorno crónico sin ferropenia asociada y para ello es necesario que antes de iniciar este tipo de tratamiento se diagnostique correctamente la deficiencia de hierro mediante la historia clínica, exploración física y pruebas biológicas, que deben incluir la sideremia, transferrina, ferritina y receptor sólo-



**Tabla 3. Valores biológicos en el tratamiento con hierro sacarosa de 24 anemias ferropénicas pertenecientes a 18 pacientes seguidas en el servicio de hematología durante 2008**

	Basal	9 días	30 días
Hb (g/dL)	8,6 ± 2,0	10,7 ± 1,0	12,4 ± 1,0
VCM (fL)	73,6 ± 6,2	81,7 ± 4,9	83,3 ± 5,3
RDWSD (fL)	46,9 ± 4,3	67,5 ± 7,6	58,4 ± 10,5
Retx10 <sup>3</sup> /μL	47,3 ± 15,9	64,6 ± 23,0	48,5 ± 22,7
LFR (%)	88,7 ± 5,3	89,8 ± 5,7	91,7 ± 4,0
RetHe (pg)	21,8 ± 5,3	30,7 ± 3,9	29,7 ± 3,3
Fe (μg/dL)	20,3 ± 10,1		43,5 ± 10,2
TIBC (μg/dL)	465,3 ± 45,9		275 ± 36
Ferritina (ng/mL)	4,8 ± 4,0		64,6 ± 20,7
RTrf (mg/L)	6,7 ± 2,1		3,5 ± 1,3

ble de la transferrina así como haptoglobina, proteína C reactiva, citocinas proinflamatorias, etc., todo ello con el fin de evitar los efectos indeseables de la terapia férrica<sup>13</sup>.

En nuestra serie de 24 tratamientos (Tabla 3) hemos observado una adecuada eficacia con escasos efectos secundarios, salvo la extravasación de la medicación. El primer objetivo del tratamiento se obtuvo a los 9 días y a los 30 días el nivel de hemoglobina era similar al observado con las sales ferrosas a los 98 días del tratamiento oral.

El **hierro-carboximaltosa** es un complejo macromolecular polinuclear de hierro(III) con una cubierta de carbohidratos (carboximaltosa)<sup>14</sup>. Esta conformación especial le permite el acceso directo a los macrófagos, uniéndose a la apoferritina para formar ferritina, que va liberando hierro conforme a las necesidades del organismo.

Su peso molecular es de 150,000 d. Contiene unos 1.000 átomos de hierro (27%); es soluble en agua y muy estable, no generando hierro lábil.

Las indicaciones son similares a las enunciadas anteriormente y la posología se tiene que calcular mediante la fórmula indicada con el hierro sacarosa.

Presenta la ventaja de admitir una dosis única máxima en infusión intravenosa de 1.000 mg, que puede administrarse una vez por semana. Además se trata de un preparado con baja inmunogenicidad por lo que no requiere comenzar con dosis pequeñas de prueba.

Varios estudios clínicos han comparado carboximaltosa de hierro con sulfato ferroso (se expone un resumen en la Tabla 4) con un adecuado perfil de seguridad y de eficacia manifestada por la rapidez en la subida de los niveles de hemoglobina y en la restitución de los depósitos de hierro; buena tolerancia y baja incidencia de efectos secundarios gastrointestinales.

Por todo ello, el hierro carboximaltosa constituye una buena opción de tratamiento en pacientes en los que los preparados orales se han mostrado ineficaces, que son intolerantes a los mismos o en aquellos que, por sus circunstancias sociales o su comorbilidad requieren reducir el número de administraciones intravenosas o de estancias hospitalarias<sup>19</sup>.

En resumen, el diagnóstico clínico-biológico así como el etiológico son fundamentales para el tratamiento de la deficiencia de hierro, que debe ser sustitutivo y etiológico, debiéndose demostrar la eficacia del mismo. Las sales ferrosas por vía oral son el tratamiento de elección en la deficiencia férrica por su efectividad, seguridad y comodidad.

La vía parenteral debe quedar reservada para casos de intolerancia grave, falta de respuesta a la terapia oral o situaciones especiales. Los preparados actuales (hierro sacarosa y hierro carboximaltosa) son seguros y eficaces en la corrección de la deficiencia de hierro.

**Tabla 4. Estudios clínicos sobre la eficacia de la carboximaltosa férrica (CMF) frente al sulfato ferroso (FeSO<sub>4</sub>) en diferentes patologías**

Características	Dosis CMF	Dosis FeSO <sub>4</sub>	Objetivo principal	Resultados	
				FeSO <sub>4</sub>	CMF
Anemia ferropénica en el posparto. (344 pacientes) <sup>15</sup>	Máximo 1.000 mg/sem 3 sem máximo	200 mg/día 12 semanas	Δ Hb (g/L)	32,9 g/L	33,7 g/L Resultados similares
Anemia ferropénica en el posparto. (361 pacientes) <sup>16</sup>	Máximo 1.000 mg/sem Dosis máxima 2.500 mg	975 mg/día 6 semanas	Δ Hb ≥ 2 g/dL (% pacientes)	94%	96% Resultados similares
Anemia ferropénica en el posparto. (291pacientes) <sup>17</sup>	Máximo 1.000 mg/sem Dosis máxima 2.500 mg	975 mg/día 6 semanas	Hb ≥12 g/dL (% pacientes)	67%	91% Significación estadística
Anemia ferropénica secundaria a enfermedad inflamatoria intestinal (196 pacientes) <sup>18</sup>	Máximo 1.000 mg/sem 3 semanas máximo	200 mg/día 12 semanas	Δ Hb (g/L)	37,5 g/L	38,3 g/L Resultados similares

Tanto la carboximaltosa férrica como el ferumoxytol aportan la posibilidad de ser administrados de una sola dosis, lo que supone una disminución de la estancia en los hospitales de día y una ventaja para determinados pacientes en situación especial (ancianos, comorbilidad acusada, etc.).

## Bibliografía

- Muñoz I, Reinoso FL, López A, Hernández F. Trastornos del metabolismo del hierro. *Medicine* 2008; 10: 1318-25.
- Clark SF. Iron deficiency anemia: diagnosis and management. *Curr Opin Gastroenterol* 2009; 25: 122-28.
- Kim JM, Ihm CH, Kim HJ. Evaluation of reticulocyte haemoglobin content as marker of iron deficiency and predictor of response to intravenous iron in haemodialysis patients. *Int Jnl Lab Hem* 2008; 30: 46-52.
- Auerbach M, Coyne D, Ballard H. Intravenous iron: From anathema to standard of care. *Am J Hematol* 2008; 83: 580-8.
- Rosen Zvi B, Gafter-Gvili A, Paul M, et al. Intravenous versus oral iron supplementation for the treatment of anemia in CKD: Systematic review and meta-analysis. *A J Kidney* 2008; 52: 897-906.
- Fishbane S. Anemia in chronic kidney disease: status of new therapies. *Curr Opin Nephrol Hyperens* 2009; 18: 112-5.
- Muñoz M, García-Erce JA, Villar I, Thomas D. Blood conservation strategies in major orthopaedic surgery: efficacy, safety and European regulations. *Vox sanguinis* 2009; 96: 1-13.
- Milman N. Prepartum anaemia: prevention and treatment. *Ann Hematol* 2008; 87: 949-59.
- Balakrishnan VS, Rao M, Kausz AT, et al. Physicochemical properties of ferumoxytol, a new intravenous iron preparation. *Eur J Clin Invest* 2009; 39: 489-96.
- Singh A, Hertel J, Patel T, et al. Safety of ferumoxytol in patients with anemia and CKD. *Am J Kidney Dis* 2008; 52: 907-15.
- Spinowitz BS, Kausz AT, Batista J, et al. Ferumoxytol for treating iron deficiency anemia in CKD. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 1599-605.
- Pinsk V, Levy J, Moser A, et al. Efficacy and safety of intravenous iron sucrose therapy in a group of children with iron deficiency anemia. *Isr Med Assoc J* 2008; 10: 335-8.
- Katodritou E, Verrou E, Zervas K. Intravenous iron: A useful therapeutic tool but not a panacea. *Am J Hematol* 2008; 83: 521-3.
- Lyseng-Williamson KA, Keating GM. Ferric carboxymaltose: a review of its use in iron-deficiency anaemia. *Drugs* 2009; 69: 739-56.
- Breymann C, Gliga F, Bejenariu C, Strizhova N. Comparative efficacy and safety of intravenous ferric carboxymaltose in the treatment of postpartum iron deficiency anemia. *Int J gynaecol Obstet* 2008; 10: 67-73.
- Van Wyck DB, Martens MG, Seid MH, Baker JB, Mangione A. Intravenous ferric carboxymaltose compared with oral iron in the treatment of postpartum anemia: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 2007; 110: 267-78.
- Seid MH, Derman RJ, Baker JB, Banach W, Goldberg C, Rogers R. Ferric carboxymaltose injection in the treatment of postpartum iron deficiency anemia: a randomized controlled clinical trial. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 199: 435.e1-7.
- Kulnigg S, Stoinov S, Simanenkov V, Dudar LV, Karnafel W, Garcia LC, et al. A novel intravenous iron formulation for treatment of anemia in inflammatory bowel disease: the ferric carboxymaltose (FERINJECT) randomized controlled trial. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 1182-92.

- Peebles G, Fenwick S. Intravenous iron administration in a short-stay hospital setting. *Nurs Stand* 2008; 22: 35-41

## HELICOBACTER PYLORI Y ANEMIA FERROPÉNICA

C. BENAVENTE, F.A. GONZÁLEZ  
*Servicio de Hematología y Hemoterapia.  
 Hospital Clínico San Carlos. Madrid*

La gastritis por *Helicobacter pylori* (Hp) ha sido asociada en los últimos años a diferentes enfermedades no gástricas. Su posible implicación en la patogénesis de estas enfermedades, se fundamenta en que la inflamación local gástrica puede causar efectos sistémicos e inducir una respuesta inmune capaz de producir lesiones en otros territorios. Y que además, la erradicación de la bacteria mejora estas patologías<sup>1</sup>.

La infección gástrica por Hp ha surgido como una nueva causa de anemia ferropénica en pacientes que no responden al tratamiento con hierro. La relación entre Hp y metabolismo del hierro se basa en datos clínicos, ferrocinéticos y microbiológicos. Sin embargo, los mecanismos biológicos por los cuales induce una alteración en los depósitos del hierro no son bien conocidos, aunque parecen implicadas varias vías como pequeñas hemorragias gástricas, descenso en la absorción de hierro y aumento de la captación de hierro por parte de la bacteria.

## Datos clínicos

El primer caso de anemia ferropénica asociada a infección por Hp fue publicado en 1991. Se trataba de una adolescente de 15 años de edad que ingresó en el hospital después de una semana de astenia y fatiga progresiva, sin síntomas gástricos asociados. Las pruebas diagnósticas revelaron una gastritis crónica activa asociada a Hp. La paciente fue tratada para la infección de Hp sin suplementos de hierro. Junto con la erradicación del Hp, desaparecieron las lesiones hemorrágicas gástricas y se normalizaron los niveles de hemoglobina<sup>2</sup>.

El segundo caso fue publicado en 1993, se trataba de un niño de siete años de edad con una larga historia de anemia ferropénica refractaria al tratamiento con hierro, de etiología no filiada (en el estudio realizado no se había demostrado sangrado gastrointestinal ni problemas en la absorción de hierro). El único hallazgo patológico fue una antritis micronodular, debida a una gastritis crónica superficial no activa Hp positiva sin síntomas gástricos. La hipótesis de la

implicación del Hp en el metabolismo del hierro fue sugerida porque la anemia no se corrigió hasta que se erradicó la infección por Hp<sup>3</sup>.

Mientras que en el primer caso la anemia podía ser atribuida a las pérdidas gatrointestinales por sangrado, la mayoría de casos publicados posteriormente son pacientes sin evidencia de sangrado gastrointestinal con una respuesta al tratamiento con hierro vía oral subóptima, en los que se había descartado déficit de aporte nutricional, sangrado digestivo, infección por parásitos y otras causas comunes de anemia ferropénica. En la mayoría de los pacientes la anemia se corrigió después de erradicar la infección por Hp. Inicialmente los casos publicados eran de niños y adolescentes pero posteriormente también se han publicado casos en adultos (Tabla 1).

En los últimos años han sido realizados varios estudios epidemiológicos en los que se asocia la infección por Hp a estados de ferropenia y anemia ferropénica.

Uno de los primeros estudios fue llevado a cabo en 102 sujetos asintomáticos con edades comprendidas entre 66 y 101 años. Este estudio mostró niveles de Hb, ferritina, sideremia y transferrina sérica similares entre sujetos infectados y no infectados por Hp. Pero dado que la prevalencia de infección por Hp era muy alta en esa población (82-86%) es posible que la muestra no tuviese un tamaño adecuado para poder demostrar diferencias significativas<sup>4</sup>.

En Dinamarca se realizó un estudio con 2.794 sujetos. En hombres y en mujeres postmenopáusicas se apreció un nivel de ferritina significativamente más bajo en sujetos seropositivos frente a seronegativos. El riesgo de ferropenia (ferritina < 15 µg/L) sólo se observó en mujeres posmenopáusicas seropositivas (6,5 vs. 2,3% en

seronegativas). No se vieron diferencias entre los niveles de Hb ni de anemia ferropénica en relación con la seropositividad<sup>5</sup>. En un estudio realizado en Australia se encontró asociación entre niveles bajos de ferritina en mujeres infectadas por Hp, respecto a no infectadas. Esta asociación no se evidenció en varones. Sin embargo, en un estudio realizado en Nueva Zelanda esta relación apareció en varones y no en mujeres<sup>6</sup>. También en otro estudio de Alemania con 1.806 sujetos mayores de 18 años se observó relación del estado de ferropenia con pacientes infectados por Hp frente a no infectados<sup>7</sup>. Asimismo, en un estudio realizado en Alaska en 2.080 sujetos, se asoció un mayor riesgo de ferropenia (ferritina < 12 µg/L) en sujetos infectados por Hp frente a no infectados (13%)<sup>8</sup>. Un estudio epidemiológico realizado en Estados Unidos en 7.462 sujetos evidencia un riesgo de anemia ferropénica de 2,6 veces más en sujetos seropositivos respecto a seronegativos<sup>9</sup>.

Weyermann *et al.* estudiaron el impacto de la infección por Hp en la anemia durante el embarazo. Estudiaron 898 mujeres mediante test del aliento cinco días después del parto. Se revisaron los niveles de Hb durante el embarazo. La prevalencia de anemia fue del 28,1% en mujeres infectadas por Hp frente al 17,5% en las no infectadas. La Hb inicial fue más baja en mujeres infectadas que en las no infectadas, así como una peor respuesta al tratamiento durante el embarazo. El efecto de la infección por Hp en la Hb de las mujeres embarazadas apoyó el papel de la infección por Hp en el desarrollo de anemia en condiciones en las que se necesitan altos requerimientos de hierro como es el embarazo<sup>10</sup>.

Existen estudios epidemiológicos sólo en población pediátrica. En un estudio realizado en Corea del Sur se

Tabla 1. *Helicobacter pylori* y anemia ferropénica (AF): casos publicados

Autor	Año	País	Tipo de estudio	Población	Casos (n)	Resultados
Blecker	1991	Bélgica	Caso	Adolescente	1	Resolución de la AF después de erradicar Hp asociada a gastritis
Dufour	1993	Italia	Caso	Pediátrica	1	Resolución de la AF después de erradicar Hp asociada a gastritis
Bruel	1993	Francia	Caso	Pediátrica	1	Resolución de la AF después de erradicar Hp asociada a gastritis
Marignani	1997	Italia	Caso	Adolescente	1	Resolución de la AF después de erradicar Hp asociada a gastritis
Carnicer	1997	España	Caso	Pediátrica	1	Resolución de la AF después de erradicar HP asociada a gastritis
Babarino	1999	Italia	Serie de casos	Pediátrica	4	Resolución de la AF después de erradicar HP asociada a gastritis
Choe	1999	Corea	Aleatorizado	Adolescente	43	AF+HP, mejoría de la Hb después de tratamiento erradicador HP frente a placebo
Konno	2000	Japón	Serie de casos	Adolescente	6	Resolución de la AF después de erradicar HP asociada a gastritis
Ashorn	2001	Finlandia	Serie de casos	Pediátrica	7	Resolución de la AF después de erradicar HP asociada a gastritis
Sugiyama	2002	Japón	Serie de casos	Mujeres	2	Resolución de la AF después de erradicar HP asociada a gastritis
Kostaki	2003	Grecia	Serie de casos	Pediátrica	3	Resolución de la AF después de erradicar HP asociada a gastritis
Yoshimura	2003	Japón	Serie de casos	Adultos	2	Resolución de la AF después de erradicar HP asociada a gastritis
Hacihanefioglu	2004	Turquía	Serie de casos	Mujeres	14	Incremento de la Hb, sideremia e IST. Sin cambios en la ferritina

demostró una prevalencia de infección por Hp de 31% en niños con anemia ferropénica frente al 15,5% en niños sin ella<sup>11</sup>. Se demostró que esta asociación era mayor en niños atletas, por lo que se pensó que podía estar en relación con unos mayores requerimientos de hierro. También se encontró asociación entre la infección por Hp y estado de ferropenia<sup>12</sup>. Sin embargo, en otro estudio realizado también en Corea del Sur, en niños en edad escolar entre 9 y 12 años, no se encontró esta asociación<sup>13</sup>. Una posible explicación es la corta edad de los niños con poco tiempo de exposición a la infección por Hp, y no tener requerimientos nutricionales excesivos.

Tienen especial interés los estudios clínicos con intervención terapéutica. El primer estudio fue realizado por Choe *et al.* en Corea del Sur<sup>14</sup>. Se trata de un estudio doble ciego, en 43 chicas adolescentes y preadolescentes con anemia ferropénica, sin evidencia de sangrado gastrointestinal. En 25 pacientes se evidenció infección por Hp por gastroscopia y fueron aleatorizadas en tres grupos de tratamiento: a) tratamiento erradicador de Hp más hierro oral, b) tratamiento erradicador de Hp más placebo oral y c) hierro oral más placebo de tratamiento erradicador de Hp. Se evaluó la respuesta a las ocho semanas de finalizado el tratamiento y, se vio un aumento significativo de Hb en los grupos en los que se había erradicado el Hp (*a* y *b*, con una mayor respuesta en el grupo *a*). En el grupo *c* no se encontró un aumento significativo de los niveles de Hb, a pesar del tratamiento con hierro oral. Este estudio muestra una clara relación entre la anemia ferropénica y la infección por Hp. El tratamiento de la infección se asocia con una respuesta más rápida que con hierro solo. La erradicación de la infección por Hp conduce a una mejora en el metabolismo del hierro incluso cuando no se recibe hierro por vía oral.

Recientemente se ha llevado a cabo un estudio en Bangladesh, donde la prevalencia en la población pediátrica de anemia ferropénica es muy alta (> 50%), así como la infección por HP (60% en menores de 5 años)<sup>15</sup>. Se diseñó el estudio para demostrar la relación causal entre la infección por HP y anemia ferropénica, y también si dicha infección era un factor responsable en la falta de respuesta a los suplementos de hierro en niños de países menos desarrollados. Se trata de un estudio aleatorizado de 1.498 niños entre 2 y 5 años en los que no existían carencias nutricionales. De ellos se aleatorizaron 200 niños con anemia ferropénica e infección por HP en cuatro grupos: 1) tratamiento erradicador de HP y suplemento de hierro, 2) tratamiento erradicador de HP, 3) suplemento de hierro y 4) placebo. Los niños que recibieron suplementos de hierro tuvieron menos fracasos terapéuticos que aquellos que no lo recibieron (11% en los anti-HP y hierro, 0% en los de hierro solo, 33% en los de sólo anti-HP y 45% en los de placebo). También se evaluó en los subgru-

pos si había diferencias de la Hb y de los estudios de hierro entre los pacientes en que se había conseguido erradicar la infección por HP frente a los que persistía la infección, y no se apreciaron diferencias significativas. A la luz de estos hallazgos, los autores concluyeron que la infección por HP no es una causa de refractariedad al tratamiento en estos niños y que no interviene en la absorción del hierro. En áreas con alta prevalencia de HP y ferropenia, ni la prevención, ni el diagnóstico, ni el tratamiento de HP en edades muy tempranas, parece ser una estrategia eficaz para reducir la ferropenia ni la anemia ferropénica.

---

## Mecanismos biológicos

Varios estudios han sugerido diferentes mecanismos biológicos por los cuales la infección por HP induce la depleción de los depósitos de hierro en el huésped.

### Cambios en la fisiología e histología gástrica

Pacientes con infección por HP cuya forma de presentación es anemia ferropénica presentan algunas características histopatológicas y cambios en la fisiología gástrica, tales como una reducción del ácido ascórbico y la elevación del pH gástrico, que pueden reducir la absorción intestinal de hierro de la dieta. Por tanto, se piensa que estos hallazgos pueden estar implicados en el desarrollo de la ferropenia.

Se sabe que el pH ácido del jugo gástrico desempeña un papel importante en la reducción del hierro de forma férrica a ferrosa, que es la forma química soluble capaz de atravesar la membrana de la mucosa intestinal. Esta reacción es favorecida por el ácido ascórbico, el cual es considerado como el potenciador más importante en la absorción de hierro desde el estómago. El pH ácido y el ácido ascórbico son necesarios para la absorción de hierro de la dieta.

Zhang *et al.* evaluaron el impacto de la infección por HP en el ácido ascórbico gástrico. Llevaron a cabo un estudio en 115 pacientes en los que se había realizado una gastroscopia por dispepsia<sup>16</sup>. Las concentraciones de jugo gástrico y ácido ascórbico fueron significativamente más bajas en los pacientes infectados por HP que en aquellos que no lo estaban. Se observó una mayor reducción cuando la inflamación gástrica progresaba desde normal a gastritis antral difusa y a pangastritis. La influencia negativa del HP en el ácido ascórbico gástrico era reversible después de un tratamiento erradicador y de curada la infección.

Ciacci *et al.* midieron directamente el impacto de la infección por HP en la absorción del hierro<sup>17</sup>. En el estudio participaron 55 enfermos a los que se les había realizado gastroscopia por sospecha de infección por



HP. La absorción del hierro fue calculada como la diferencia en el hierro sérico de muestras de sangre obtenidas de los pacientes justo antes de la administración de 1 mg/kg de hierro ferroso y dos horas después. Los pacientes infectados por HP tuvieron una absorción significativamente menor que aquellos no infectados. Después de estratificar por sexos esta diferencia sólo fue significativa en las mujeres. La absorción de hierro mejoró después de corregida la infección.

### **Aumento del consumo de hierro por el HP**

La depleción de los depósitos de hierro puede ocurrir en presencia de la infección por HP como resultado del incremento de las necesidades de la bacteria para su crecimiento. Se sabe que todas las bacterias necesitan hierro para su crecimiento e incluso compiten con el huésped por sus depósitos de hierro.

Babarino *et al.* llevaron a cabo un estudio de ferrocínica en cuatro niños con anemia ferropénica en la que el único hallazgo era la gastritis por HP<sup>18</sup>. Los resultados obtenidos no fueron los típicos de una anemia ferropénica. En las anemias ferropénicas por aporte insuficiente de hierro, sangrado gastrointestinal o mala absorción, el hierro marcado tiene una vida media plasmática muy corta porque es utilizado por la médula ósea, y a los diez días, más del 90% de los hematíes circulantes tienen hierro marcado. En el caso de los pacientes con anemia ferropénica asociada a HP, el hierro marcado tenía una vida media muy corta pero a los diez días los hematíes circulantes marcados eran pocos, lo cual hacía pensar que el hierro podía ser utilizado por un foco extramedular (el antro infectado por HP). Esta hipótesis no pudo ser confirmada en el estudio por problemas técnicos de medicina nuclear.

El efecto antagónico de la respuesta de los suplementos de hierro fue analizado en un estudio aleatorizado en la India en 169 niños. La infección asintomática por HP no se asociaba con una mayor ferropenia o anemia ferropénica, pero sí con una menor respuesta al tratamiento con suplementos de hierro<sup>19</sup>.

La regulación del consumo de hierro es en parte diferente al de otras bacterias. Algunos sistemas de consumo de hierro en el HP son expresados, probablemente para la adaptación de la bacteria al medio del estómago que puede presentar carencia o sobrecarga de hierro.

Las bajas concentraciones de hierro libre en la mucosa y en los tejidos es una de las primeras medidas de defensa del huésped en la infección bacteriana. Este fenómeno es conocido como hiposideremia de la infección. Se piensa que hay dos mecanismos implicados: uno, el aumento de producción de ferritina por el hígado y, otro, la liberación de lactoferrina de los neutrófilos. En estados de déficit de hierro, la lactoferrina

captura el hierro de la transferrina. El complejo hierro-lactoferrina es fijado por los macrófagos circulantes e incorporado al sistema reticuloendotelial.

En 1993, Husson demostró *in vitro* que la lactoferrina humana era un soporte de crecimiento del HP en ausencia de otras fuentes de hierro<sup>20</sup>. Esta propiedad de usar la lactoferrina humana como aporte de hierro puede representar un papel en la virulencia del HP. En 1997 Dhaenens identificó una proteína de unión de la lactoferrina en la membrana del HP que sólo se expresaba cuando la bacteria crecía en medios carentes de hierro, lo cual podía ser un mecanismo para evitar la hiposideremia defensiva del huésped<sup>21</sup>.

Estudios posteriores demostraron *in vivo* niveles altos de lactoferrina en el tejido y jugo gástrico de pacientes con gastritis por HP y estos niveles se correlacionan con el grado inflamatorio de la mucosa. Además, la erradicación del HP se asociaba con descenso de los niveles de lactoferrina<sup>22</sup>.

Estudios recientes demuestran que la propiedad de desarrollar mecanismos de absorción de hierro por HP en estados de carencia no es igual en todas las cepas de la bacteria, y que podrían tener gran importancia en la virulencia de la misma. Así, se ha demostrado que cepas de HP que se asocian con anemia ferropénica tienen una mayor expresión de proteínas con capacidad para absorber hierro (IROMPs)<sup>23</sup>.

### **Pequeñas hemorragias ocultas gastrointestinales**

Una de las posibles explicaciones de la relación entre la infección por HP y la reducción de los depósitos de hierro son pequeñas pérdidas gastrointestinales inducidas por la infección. Desde mínimos sangrados por pequeñas erosiones de la mucosa gástrica hasta sangrado masivo por úlcera péptica o carcinoma gástrico. La mayoría de los casos y series publicadas no han detectado lesiones de sangrado en las gastroscopias y/o test de hemorragias ocultas en heces. Esto va en contra de este mecanismo en la patogénesis de la anemia ferropénica, pero hay otros estudios en los cuales sí se puede considerar.

### **Conclusiones**

En el momento actual existen datos clínicos que relacionan la infección por HP con anemia ferropénica. En la mayoría de estos pacientes, el único hallazgo es la gastritis por HP. La respuesta de la anemia al tratamiento con hierro oral no es adecuada y ésta sólo se consigue después de la erradicación de la bacteria, algunas veces incluso sin suplementos de hierro. Por lo que en la práctica clínica hay que tener en cuenta esta etiología en pacientes con anemia ferro-



pénica no filiada y/o una respuesta subóptima al tratamiento.

Los mecanismos fisiopatológicos por los cuales la infección por HP puede contribuir a la anemia ferropénica son aún desconocidos. Sin embargo, existen posibles explicaciones: la hemorragia oculta producida por gastritis crónica erosiva, la disminución de la absorción de hierro por hipo o aclorhidria y el aumento del consumo de hierro por la propia bacteria. Parece que existen mecanismos complejos en la regulación y absorción del hierro en los que están implicados la interacción de la propia bacteria y el huésped.

Son necesarios más estudios para confirmar si existe una relación causal de la infección por HP con anemia ferropénica y déficit de hierro. Así como para estudiar sus mecanismos fisiopatológicos.

## Bibliografía

1. A Barabino. Helicobacter pylori-related iron deficiency anemia: a review. *Helicobacter* 2002; 7: 71-5.
2. Blecker U, Renders F, Lanciers S, Vandenplas Y. Syncope leading to the diagnosis of a Helicobacter pylori positive chronic active haemorrhagic gastritis. *Eur J Pediatr* 1991; 150: 560-1.
3. Dufour C, Brisigotti M, Fabretti G, Luxardo P, Mori PG, Barabino A. Helicobacter pylori gastric infection and sideropenic refractory anemia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993; 17: 225-7.
4. Pilotto A, Fabrello R, Franceschi M, et al. Helicobacter pylori infection in asymptomatic elderly subjects living at home or in a nursing home: effects on gastric function and nutritional status. *Age Ageing* 1996; 25: 245-9.
5. Milman N, Rosenstock S, Andersen L, Jorgensen T, Bonnevie O. Serum ferritin, hemoglobin, and Helicobacter pylori infection: a seroepidemiologic survey comprising 2794 Danish adults. *Gastroenterology* 1998; 115: 268-74.
6. Collett JA, Burt MJ, Frampton CM, et al. Seroprevalence of Helicobacter pylori in the adult population of Christchurch: risk factors and relationship to dyspeptic symptoms and iron studies. *N Z Med J* 1999; 112: 292-5.
7. Berg G, Bode G, Blettner M, Boeing H, Brenner H. Helicobacter pylori infection and serum ferritin: a population-based study among 1806 adults in Germany. *Am J Gastroenterol* 2001; 96:1014-8.
8. Parkinson AJ, Gold BD, Bulkow L, et al. High prevalence of Helicobacter pylori in the Alaska native population and association with low serum ferritin levels in young adults. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7: 885-8.
9. Cardenas VM, Mulla ZD, Ortiz M, Graham DY. Iron deficiency and Helicobacter pylori infection in the United States. *Am J Epidemiol* 2006; 163: 127-34.
10. Weyermann M, Rothenbacher D, Gayer L, et al. Role of Helicobacter pylori infection in iron deficiency during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192: 548-53.
11. Choe YH, Kim SK, Hong YC. Helicobacter pylori infection with iron deficiency anaemia and subnormal growth at puberty. *Arch Dis Child* 2000; 82: 136-40.
12. Choe YH, Kwon YS, Jung MK, Kang SK, Hwang TS, Hong YC. Helicobacter pylori-associated iron-deficiency anemia in adolescent female athletes. *J Pediatr* 2001; 139: 100-4.
13. Choi JW. Does Helicobacter pylori infection relate to iron deficiency anaemia in prepubescent children under 12 years of age? *Acta Paediatr* 2003; 92: 970-2.
14. Choe YH, Kim SK, Son BK, Lee DH, Hong YC, Pai SH. Randomized placebo-controlled trial of Helicobacter pylori eradication for iron-deficiency anemia in preadolescent children and adolescents. *Helicobacter* 1999; 4: 135-9.
15. Sarker SA, Mahmud H, Davidsson L, Alam NH, Ahmed T, Alam N, et al. Causal relationship of Helicobacter pylori with iron-deficiency anemia or failure of iron supplementation in children. *Gastroenterology* 2008; 135: 1534-42.
16. Zhang ZW, Patchett SE, Perrett D, Katelaris PH, Domizio P, Farthing MJ. The relation between gastric vitamin C concentrations, mucosal histology, and CagA seropositivity in the human stomach. *Gut* 1998; 43: 322-6.
17. Ciacci C, Sabbatini F, Cavallaro R, et al. Helicobacter pylori impairs iron absorption in infected individuals. *Dig Liver Dis* 2004; 36: 455-60.
18. Barabino A, Dufour C, Marino CE, Claudiani F, De Alessandri A. Unexplained refractory anemia associated with Helicobacter pylori gastric infection in children: further clinical evidence. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999; 28: 116-9.
19. Mahalanabis D, Islam MA, Shaikh S, et al. Haematological response to iron supplementation is reduced in children with asymptomatic Helicobacter pylori infection. *Br J Nutr* 2005; 94: 969-75.
20. Husson MO, Legrand D, Spick G, Leclerc H. Iron acquisition by Helicobacter pylori: importance of human lactoferrin. *Infect Immun* 1993; 61: 2694-7.
21. Dhaenens L, Szczebara F, Husson MO. Identification, characterization and immunogenicity of the lactoferrin-binding protein from Helicobacter pylori. *Infect Immun* 1997; 65: 514-8.
22. Nakao K, Imoto I, Ikemura N, et al. Relation of lactoferrin levels in gastric mucosa with Helicobacter pylori infection and with the degree of gastric inflammation. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 1005-11.
23. Lee JH, Choe YH, Choi YO. The expression of iron-repressible outer membrane proteins in Helicobacter pylori and its association with iron deficiency anemia. *Helicobacter* 2009; 14: 36-9.

## THE MOLECULAR SIGNIFICANCE AND FUNCTIONAL RELEVANCE OF MATRIPTASE-2 MUTATIONS IN THE DEVELOPMENT OF IRON-REFRACTORY IRON DEFICIENCY ANEMIA

A.J. RAMSAY<sup>1</sup>, A. REMACHA<sup>2</sup>, V. QUESADA<sup>1</sup>, A. KWARCIAK<sup>1</sup>, C. LÓPEZ-OTÍN<sup>1</sup>, G. VELASCO<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Instituto Universitario de Oncología. Oviedo.  
<sup>2</sup>Servicio de Hematología. Complejo Hospitalario de Toledo

### Abstract

Matriptase-2 is a proteolytic regulator of iron homeostasis. Prior reports have identified human matriptase-2 mutations in iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA) patients from European, African and African American ancestries. These loss-of-func-

tion mutations include frameshift, splice junction, missense and nonsense mutations that predominantly encode matriptase-2 proteins lacking essential residues for proteolytic activity. The recent works by our laboratory and Silvestri and colleagues have expanded the pre-existing repertoire of known IRIDA mutations and delineated that mutations originating in protease regions other than the catalytic domain have a profound impact on enzyme function. In conjunction with similar stem region mutations observed for corin and TMPRSS3 in individuals with hypertension and congenital deafness respectively, these studies further underscore the importance of the stem region domains for the normal and pathological function of type II transmembrane serine proteases. This mini-review updates our current understanding of the functional relevance of matriptase-2 loss-of-function mutations in IRIDA patients.

### Iron homeostasis

Maintaining iron levels within precise limits is an essential process in mammalian physiology. As the capacity for iron excretion is limited, systemic iron levels are regulated by iron absorption in mature enterocytes of the duodenum and extracellular iron release from macrophages and hepatocytes. This process is exquisitely controlled by the hepatic peptide hormone, hepcidin<sup>1,2</sup>. Hepcidin mediates the internalization and degradation of the iron export molecule ferroportin, located on the surface of intestinal enterocytes, macrophages and hepatocytes, thereby negatively regulating iron entry into the plasma<sup>3</sup>. Consistently, mice deficient in hepcidin<sup>4</sup> and humans with mutations of this gene develop severe iron overload disorders<sup>5</sup>. Conversely, mice with increased transgenic expression of hepcidin in the liver manifest severe iron deficiency anemia<sup>6</sup>. Recent studies have delineated that hepcidin expression is attenuated by the type II transmembrane serine protease (TTSP), matriptase-2 (TMPRSS6). Mice deficient in matriptase-2 (*Tmprss6*<sup>-/-</sup> and *mask* mice) have a marked up-regulation in hepcidin transcription and demonstrate an overt phenotype of alopecia and severe iron deficiency anemia<sup>7,8</sup>. Further, the *Tmprss6*<sup>-/-</sup> mice have reduced protein levels of ferroportin on the basolateral membrane of enterocytes of the duodenum, leading to the retention of iron within these cells. Supplementation of plasma iron levels through subcutaneous delivery of iron dextran effectively rescues the phenotype, reversing the hematological deficiencies and restoring normal hair growth. *In vitro* demonstration of hemojuvelin degradation by matriptase-2 has causally linked this mechanism to negative hepcidin regulation<sup>9</sup>. Hemojuvelin is synthesized by hepato-

cytes as a membrane GPI-linked protein that behaves as a co-receptor for stimulation of hepcidin expression by BMP-2, -4 and -6 *in vitro*<sup>10-12</sup> and BMP-6 *in vivo*<sup>13,14</sup>. Further, a soluble form of hemojuvelin, produced by the liver and skeletal muscle, antagonizes BMP-stimulated hepcidin expression<sup>15</sup>. Consistently, high dose administration of soluble hemojuvelin induces an increase in serum iron levels *in vivo* by suppressing hepcidin production<sup>11</sup>.

### Loss-of-function matriptase-2 mutations

Hepcidin expression is modulated by a variety of physiological stimuli, including inflammation, iron status, erythropoiesis and hypoxia<sup>16</sup>. Further, in accordance with its role in coordinating body iron levels, alterations in the genes encoding hepcidin<sup>5</sup> or its key regulators<sup>17-19</sup> induce iron overload syndromes such as hereditary hemochromatosis (HH). Consistently, HH disorders result from inadequate hepcidin production relative to body iron stores<sup>20</sup>. Conversely, elevated hepcidin levels have been described in iron deficiency anemia patients that are insensitive to oral iron therapy and display an incomplete hematological recovery after parenteral iron administrations, a condition termed iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA)<sup>21</sup>. Reverse genetic studies have discovered that IRIDA patients harbor defects in the *TMPRSS6* gene. Heterozygous and homozygous biallelic human matriptase-2 mutations have now been identified in 17 IRIDA patients from Spanish (Ramsay *et al.*, submitted), French<sup>22</sup>, Italian<sup>23</sup>, Turkish, African, African American<sup>21</sup> and English ancestries<sup>24</sup>. As displayed in Table 1, hematological parameters of IRIDA patients mirror those of *Tmprss6*<sup>-/-</sup> and *mask* mice, including a congenital hypochromic, microcytic anemia, low corpuscular erythrocyte volume, low transferrin saturation and abnormal iron absorption. The mutations, as summarized in Table 1 and Figure 1, include frameshift, splice junction, missense and nonsense mutations. Predominately, the identified mutations, including 1906\_1907insGC, 1813delG, IVS13+1G>A, IVS15-1G>C, 1383delA, IVS6+1G>C, 1179T>G, 1795C>T and 2172\_2173insCCCC encode matriptase-2 proteins which lack essential residues for proteolytic activity. *In vitro*, these matriptase-2 proteins lacking proteolytic residues display an inability to degrade membrane hemojuvelin, and consistently, an inability to suppress hepcidin transcription when co-expressed with hemojuvelin<sup>9</sup>. *In vivo*, over-expression of a protease domain-deficient human matriptase-2 resulted in reduced hemoglobinization in comparison to wild-type human matriptase-2<sup>9</sup>.

Recent studies by our laboratory and Silvestri and colleagues have demonstrated that matriptase-2 pro-

Tabla 1. Hematological parameters of *Trmpss6<sup>-/-</sup>* mice, mask mice and IRIDA patients

	<i>Trmpss6<sup>-/-</sup></i> mice (Folgueras et al.)	"mask" mice (Du et al.)	IRIDA patients (Finberg et al.)	IRIDA patient (Melis et al.)	IRIDA patient (Guillem et al.)	IRIDA patients (Ramsay et al.)	IRIDA patients (Silvestri et al.)
Matriptase-2 allele and encoded protein mutations	null/null	IVS14-2A>G/IVS14-2A>G (C566fs)/(C566fs)	1906_1907 ins GC/1906_1907ins GC (K636fs)/(K636fs) IVS15-1G>C/IVS15-1G>C (D622fs)/(D622fs) 1813de1G/IVS13+1G>A (A605fs)/(E527fs) 1324G>A/1561G>A (G442R)/(D521N) 1065C>A/1383de1A (Y355X)/(E461fs) IVS16+1G>C/not identified (G713fs)/- 2320C>T/not identified (R774C)/-	IVS6+IG>C/IVS6+1G>C (S288fs)/(S288fs)	1179T>G/1795C>T (Y393X)/(R599X)	476C>A & 468C>T/2172_2173insCCCC (A118D)/(P686fs)	1561G>A/1564G>A (D521N)/(E522K)
Hemoglobin	low	low	low	low	low	low	low
Hepcidin levels	High (liver mRNA)	High (liver mRNA)	High (urine protein)	High (urine/serum protein)	High (serum protein)	High (urine protein)	High (serum protein)
Iron absorption	Impaired	Impaired	Impaired	Impaired	impaired	impaired	impaired
Iron stores	ND	high in spleen	ND	normal in liver	ND	normal in liver	ND
MCV	low	low	low	low	low	low	low
Reticulocytes	ND	ND	low	ND	low	ND	ND
Serum iron	low	low	ND	low	low	low	low
Transferrin saturation	low	ND	low	low	low	low	low

For IRIDA patients, "low" refers to values below the standard reference range. "Low" in *Trmpss6<sup>-/-</sup>* and mask mice refers to values significantly lower than wild-type counterparts. Impaired iron absorption was determined by dietary iron uptake (mask mice), duodenal enterocyte iron retention (*Trmpss6<sup>-/-</sup>*) and lack of response to oral iron treatment (IRIDA patients). MCV, mean cell volume; ND, not determined.

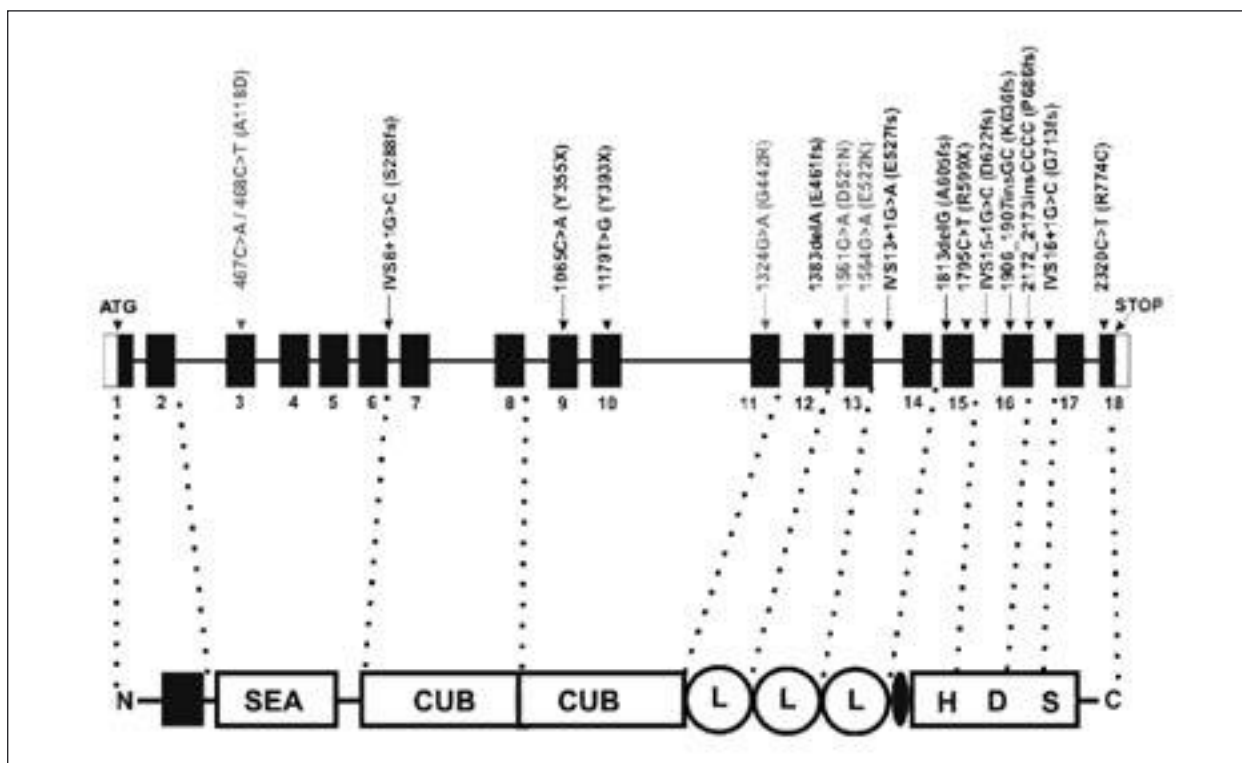


Figura 1. Matriptase-2 gene structure and locations of IRIDA mutations. The upper panel of the figure depicts the genomic organization of matriptase-2 with black and white boxes representing coding and non-coding regions, respectively. All currently identified IRIDA patient mutations are marked with arrows corresponding to their genomic locations. Mutation nomenclatures in black are mutations affecting

to point mutations in the stem region of matriptase-2. The encoded protein is shown in the lower panel. Dashed lines mark exon encoding boundaries for each of the matriptase-2 protein structural domains, including transmembrane (black box), one SEA, two CUB, three LDLa (L), activation (black oval) and proteolytic (boxed HDS).

teins with a functional protease domain but containing the point mutations c.467C>A / c.468C>T (A118D) (Ramsay *et al.*, submitted), c.1561G>A (D521N), c.1564G>A (E522K) or 1324G>A (G442R)<sup>22</sup> in the SEA (sea urchin sperm protein, enteropeptidase, agrin), 2<sup>nd</sup> LDLa (low density lipoprotein receptor class A), 2<sup>nd</sup> LDLa and 2<sup>nd</sup> CUB (Cls/Clr, urchin embryonic growth factor and bone morphogenic protein 1) domains of the stem region respectively, cause loss of enzyme function. Analysis of the less apparent molecular implications of these mutations has revealed that the enzyme maturation process is abolished or impaired by each of the mutations. We have reported previously that homology modeling of the SEA domain mutation (A118D) predicts the forced insertion of an aspartic acid residue into the hydrophobic core of the protein. Further, energy minimizations suggest that this situation leads to destabilization of the h1  $\alpha$ -helix, potentially affecting folding of the SEA domain and as a consequence leading to structural destabilization.

We have performed homology modeling of each of the other identified stem domain point mutations as previously described (Ramsay *et al.*, submit-

ted). The G442R mutation is likely to affect the packing of the CUB domain. Given the difference in size and charge between glycine and arginine, this mutation is expected to be difficult to accommodate in the normal folding of the domain. Unfortunately, residue 442 is located close to the C-terminal tail of this domain, where matriptase-2 is highly divergent with other CUB domain-containing proteins of known structure, making more definitive predictions difficult. Similarly, mutations D521N and E522K are expected to affect the folding of the C-terminal tail of the third LDLa domain of matriptase-2. Both residues form hydrogen bonds with the main chain of nearby residues.

These bonds appear to maintain the shape of the C-terminus of this domain. These mutations might hamper the proper alignment of C509 and C524, thereby disrupting the disulphide bridge pattern of the mutated protein. Further, alanine<sup>118</sup>, aspartic acid<sup>521</sup>, glutamic acid<sup>522</sup> and glycine<sup>442</sup> residues, signifying their potential importance for enzyme function (data not shown). Overall, our homology modeling results in conjunction with previous *in vitro* experiments, suggest that structural alterations in



matriptase-2 stem region domains render the enzyme activation deficient.

Based on their amino acid sequences, TTSPs are likely synthesized as single chain zymogens before proteolytic activation following an arginine or lysine residue present in their highly conserved activation domains<sup>25</sup>. Collectively, the newly described stem domain mutations illustrate the importance of the stem region for the activation of matriptase-2. The stem region of the TTSPs contain mosaics of 1 to 11 protein domains of 6 different types, these are SEA domains, LDLa domains; SR (group A scavenger receptor) domains; frizzled domains; CUB domains; and MAM (a mephrin, A5 antigen, and receptor protein phosphatase  $\mu$ ) domains<sup>25</sup>. The observations of stem domain dependent activation of matriptase-2 are accordant with the maturation process of the TTSPs matriptase and corin. Missense mutations in the 2<sup>nd</sup> frizzled domain of corin impair enzyme activation and abate proteolytic conversion of pro-ANP, potentially contributing to hypertensive disease in humans<sup>26</sup>.

Activation of the highly homologous matriptase requires two sequential endoproteolytic cleavages, the first of which occurs within the SEA domain by an unknown proteolytic activity, and the second within the highly conserved activation cleavage site in the serine protease domain<sup>27</sup>. Furthermore, in addition to several frameshift, splice junction and nonsense mutations reported for TMPRSS3 in patients with nonsyndromic recessive hearing loss, point mutations in the LDLa (D103G) and SR (R109W and C194F) domains have been documented<sup>28</sup> and impart defective enzyme proteolysis in a recombinant assay system<sup>29</sup>.

Activation site cleavage in matriptase requires proteolytic activity, as mutations in any of the residues of the catalytic triad abrogate activation site cleavage<sup>27</sup>. Similarly we have shown that a matriptase-2 mutant truncated after the catalytic histidine, excluding the proteolytic serine residue (2172\_2173insCCCC), displays absent enzyme activation (Ramsay *et al.*, submitted). This suggests that like matriptase, matriptase-2 maturation involves auto-activation, which is corroborated by our prior biochemical characterization describing that bacterially produced recombinant matriptase-2 undergoes auto-activation<sup>30</sup>. Functionally, the disruption of matriptase-2 maturation by the A118D, D521N, E522K and G442R mutations is manifested in an inability to reduce hepcidin transcription as effectively as the wild-type enzyme *in vitro*, concomitant with absent proteolysis of hemojuvelin by D521N and E522K variants and reduced proteolysis by the G442R variant, clarifying the augmentation of hepcidin levels in the IRIDA patients.

## Perspectives

The role of matriptase-2 in iron homeostasis has identified another essential role in mammalian biology for a TTSP family member. Despite structural similarities and shared biochemical traits, TTSPs participate in a diverse range of physiological processes such as blood pressure maintenance, inner ear development, food digestion and epidermal barrier formation. However, of the 17 TTSP members identified in humans, only a few have had their *in vivo* roles delineated. Further, pathogenic mutations like those identified in the *TM-PRSS6* gene of IRIDA patients are found in the genes encoding enteropeptidase, corin, TMPRSS3 and matriptase of patients with the clinical conditions congenital enteropeptidase deficiency, congenital deafness, hypertensive disease and ichthyosis with hypotrichosis, respectively. Therefore, continued *in vivo* characterization of TTSP functional roles is critical, not only for our understanding of normal physiology, but potentially to human disease conditions that may be associated with loss-of-function TTSP mutations.

## Acknowledgements

*Our work is supported by grants from Ministerio de Ciencia e Innovación-Spain, Fundación M. Botín, and the European Union (FP7-Microenvimet). The Instituto Universitario de Oncología is supported by Obra Social Cajastur-Asturias, Spain.*

## References

1. Camaschella C, Silvestri L. New and old players in the hepcidin pathway. *Haematologica* 2008; 93 (10): 1441-4.
2. Muckenthaler MU. Fine tuning of hepcidin expression by positive and negative regulators. *Cell Metab* 2008; 8 (1): 1-3.
3. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 2004; 306 (5704): 2090-3.
4. Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, et al. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98 (15): 8780-5.
5. Roetto A, Papanikolaou G, Politou M, Alberti F, Girelli D, Christakis J, et al. Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet* 2003; 33 (1): 21-2.
6. Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, Mativet S, Beaumont C, Grandchamp B, et al. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99 (7): 4596-601.
7. Folgueras AR, De Lara FM, Pendas AM, Garabaya C, Rodríguez F, Astudillo A, et al. Membrane-bound serine protease matriptase-2 (Tmprss6) is an essential regulator of iron homeostasis. *Blood* 2008; 112 (6): 2539-45.
8. Du X, She E, Gelbart T, Truksa J, Lee P, Xia Y, et al. The serine protease TMPRSS6 is required to sense iron deficiency. *Science* 2008; 320 (5879): 1088-92.



9. Silvestri L, Pagani A, Nai A, De Domenico I, Kaplan J, Camaschella C. The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell Metab* 2008; 8 (6): 502-11.
10. Xia Y, Babitt JL, Sidis Y, Chung RT, Lin HY. Hemojuvelin regulates hepcidin expression via a selective subset of BMP ligands and receptors independently of neogenin. *Blood* 2008; 111 (10): 5195-204.
11. Babitt JL, Huang FW, Xia Y, Sidis Y, Andrews NC, Lin HY. Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance. *J Clin Invest* 2007; 117 (7): 1933-9.
12. Babitt JL, Huang FW, Wrighting DM, Xia Y, Sidis Y, Samad TA, et al. Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet* 2006; 38 (5): 531-9.
13. Meynard D, Kautz L, Darnaud V, Canonne-Hergaux F, Coppin H, Roth MP. Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. *Nat Genet* 2009; 41 (4): 478-81.
14. Andriopoulos B, Corradini E, Xia Y, Faasse SA, Chen S, Grigorevic L, et al. BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nat Genet* 2009; 41 (4): 482-7.
15. Lin L, Goldberg YP, Ganz T. Competitive regulation of hepcidin mRNA by soluble and cell-associated hemojuvelin. *Blood* 2005; 106 (8): 2884-9.
16. De Domenico I, McVey Ward D, Kaplan J. Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9 (1): 72-81.
17. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 1996; 13 (4): 399-408.
18. Camaschella C, Roetto A, Cali A, De Gobbi M, Garozzo G, Carella M, et al. The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nat Genet* 2000; 25 (1): 14-5.
19. Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH, MacDonald ML, Franchini PL, Dube MP, et al. Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet* 2004; 36 (1): 77-82.
20. Nemeth E, Ganz T. Regulation of iron metabolism by hepcidin. *Annu Rev Nutr* 2006; 26: 323-42.
21. Finberg KE, Heeney MM, Campagna DR, Aydinok Y, Pearson HA, Hartman KR, et al. Mutations in TMPRSS6 cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Nat Genet* 2008; 40 (5): 569-71.
22. Silvestri L, Guillem F, Pagani A, Nai A, Oudin C, Silva M, et al. Molecular mechanisms of the defective hepcidin inhibition in TMPRSS6 mutations associated with iron-refractory iron deficiency anemia. *Blood* 2009 Apr 8.
23. Melis MA, Cau M, Congiu R, Sole G, Barella S, Cao A, et al. A mutation in the TMPRSS6 gene, encoding a transmembrane serine protease that suppresses hepcidin production, in familial iron deficiency anemia refractory to oral iron. *Haematologica* 2008; 93 (10): 1473-9.
24. Guillem F, Lawson S, Kannengiesser C, Westerman M, Beaumont C, Grandchamp B. Two nonsense mutations in the TMPRSS6 gene in a patient with microcytic anemia and iron deficiency. *Blood* 2008; 112 (5): 2089-91.
25. Ramsay AJ, Hooper JD, Folgueras AR, Velasco G, López-Otin C. Matriptase-2 (TMPRSS6): a proteolytic regulator of iron homeostasis. *Haematologica* 2009.
26. Wang W, Liao X, Fukuda K, Knappe S, Wu F, Dries DL, et al. Corin variant associated with hypertension and cardiac hypertrophy exhibits impaired zymogen activation and natriuretic peptide processing activity. *Circ Res* 2008; 103 (5): 502-8.
27. Oberst MD, Williams CA, Dickson RB, Johnson MD, Lin CY. The activation of matriptase requires its noncatalytic domains, serine protease domain, and its cognate inhibitor. *J Biol Chem* 2003; 278 (29): 26773-9.
28. Guipponi M, Antonarakis SE, Scott HS. TMPRSS3, a type II transmembrane serine protease mutated in non-syndromic autosomal recessive deafness. *Front Biosci* 2008; 13: 1557-67.
29. Lee YJ, Park D, Kim SY, Park WJ. Pathogenic mutations but not polymorphisms in congenital and childhood onset autosomal recessive deafness disrupt the proteolytic activity of TMPRSS3. *J Med Genet* 2003; 40 (8): 629-31.
30. Velasco G, Cal S, Quesada V, Sánchez LM, López-Otin C. Matriptase-2, a membrane-bound mosaic serine proteinase predominantly expressed in human liver and showing degrading activity against extracellular matrix proteins. *J Biol Chem* 2002; 277 (40): 37637-46.

# Herramientas informáticas en el laboratorio de hematología

COORDINADORES: J. DE BLAS. *Sevilla*  
J.L. VIVES CORRONS. *Barcelona*

## Resumen del simposio

La organización del laboratorio de hematología, y del banco de sangre, ha sufrido una transformación profunda en las últimas décadas. En los años 70 las técnicas manuales todavía dominaban el trabajo del laboratorio; el mayor esfuerzo de los técnicos de los laboratorios en esa época se dedicaba a la realización manual del hemograma y de las pruebas básicas de coagulación, a menudo con alto grado de inexactitud e imprecisión. Muchos recordamos la gran inversión en tiempo y personas que era necesaria para realizar un número bastante corto (hoy sería casi irrisorio) de recuentos celulares, fórmulas leucocitarias, grupos sanguíneos o pruebas de compatibilidad pretransfusional. En la década de los 80 se produce la revolución: las técnicas más tediosas, sobre todo la hematimetría y las pruebas de coagulación, y posteriormente la inmunohematología, se automatizan, obteniéndose con facilidad resultados rápidos y muy fiables. Ello tuvo (y todavía tiene) como consecuencia, un rápido incremento de la demanda analítica. La necesidad de manejar la ingente cantidad de datos que aportaban los nuevos sistemas analíticos, y de dar solución a los flujos de trabajo que se crearon en estos nuevos laboratorios automatizados, hizo imprescindible el desarrollo e implantación en la década de los 90 de los sistemas informáticos de los laboratorios. Esto pudo hacerse realidad gracias al desarrollo paralelo de la informática en esos años, con la aparición de potentes servidores y el perfeccionamiento de los ordenadores personales. Hoy en día, no se concibe un laboratorio hospitalario sin el apoyo de la informática, que ha ido progresivamente suministrando al hematólogo que trabaja en el laboratorio y el banco de sangre, herramientas hechas a la medida de sus necesidades.

Los analizadores hematológicos han evolucionado tecnológicamente, hasta conseguir instrumentos muy precisos y exactos que, no sólo proporcionan los parámetros del hemograma clásico, sino que han ido enriqueciéndose con la aparición de nuevos parámetros, cuya interpretación requiere un conocimiento profundo de los principios básicos de su funcionamiento. Además, proporcionan una serie de alarmas que alertan sobre la posibilidad de que diversas anomalías puedan estar presentes en la muestra analizada. La validación de resultados en hematimetría es posiblemente la más compleja del laboratorio clínico. Se trata de dar conformidad a resultados anómalos, verificando su autenticidad mediante una serie de reglas de decisión predefinidas, que a menudo precisan la realización de determinadas acciones entre las que con frecuencia se incluye la realización de un frotis de sangre periférica. El Dr. Furundarena, en su ponencia, hace un análisis detallado de estas reglas de decisión, así como de su incorporación a sistemas expertos, que automatizan el proceso de validación de resultados en hematimetría, disminuyendo la variabilidad de la intervención humana, mejorando el tiempo de respuesta y posiblemente ahorrando tiempo y dinero.

Muchos laboratorios de hematología han estado inmersos en los últimos años en procesos de certificación por la norma ISO-9001 o, más recientemente, de acreditación por la norma ISO-15189. Los centros y servicios de transfusión desde hace muchos años y los laboratorios de progenitores hematopoyéticos más recientemente, se acreditan por normas específicas (CAT, JACIE). A menudo, la puesta en funcionamiento de un sistema de gestión de la calidad ha sido percibida más como un problema burocrático, con un soporte documental exhaustivo y excesivo que supone un notable aumento de la carga de trabajo, que como una solución organizativa que mejora nuestros resultados y revierte en la satisfacción de los clientes del laboratorio o del servicio de transfusión. En los últimos años han aparecido algunas herramientas informáticas ideadas para facilitar la gestión documental y de los procesos, que se han hecho casi indispensables para aquellos servicios de hematología que han optado por implantar un sistema de calidad. El Dr. Anguita hace una excelente revisión sobre estas herramientas, analizando sus características y funcionalidades, y haciendo hincapié en los beneficios que comporta su utilización.

El examen morfológico de sangre periférica sigue suponiendo una carga de trabajo importante para muchos laboratorios. Los analizadores, a pesar de los adelantos tecnológicos, no son capaces de clasificar células inmaduras o identificar anomalías morfológicas muy relevantes desde el punto de vista diagnóstico. Esta tarea es tediosa, consume tiempo y recursos humanos del laboratorio, y requiere personal bien entrenado, con experiencia en la observación microscópica de sangre periférica. Sin embargo, cada vez hay menos personal técnico capacitado, y el entrenamiento de los médicos residentes es cada vez más difícil porque sus rotaciones por el laboratorio se van haciendo más cortas. La realización de la fórmula leucocitaria mediante tratamiento digital de imágenes es la respuesta tecnológica a este problema. Las posibilidades de este tipo de microscopios digitales son múltiples y sin duda van a cambiar las perspectivas en el campo de la hematimetría, agilizando la realización de la fórmula leucocitaria, facilitando la docencia de postgrado en citología y posiblemente dando soporte a la telecitología. La Dra. Briggs y el Dr. Machin, con el provocativo título de “¿Puede el análisis automatizado del frotis de sangre periférica reemplazar a la fórmula leucocitaria manual?”, nos refieren en su ponencia su experiencia con una de estas herramientas, cuyo éxito, en un futuro próximo, es más que previsible.

El número de pacientes anticoagulados continúa creciendo. Se calcula que, en España, más de 650.000 pacientes toman anticoagulantes orales. Si hay un área de la hematología en el que la introducción de sistemas informáticos expertos ha sido de importancia capital, por su repercusión sanitaria y social, éste es el del control del tratamiento anticoagulante oral (TAO). La Dra. Vinuesa nos aporta en su ponencia su amplia experiencia en este campo, haciendo un análisis del pasado, del presente y de lo que previsiblemente nos depara el futuro, así como de la trascendencia que las herramientas informáticas han tenido en la organización y gestión del TAO.

## HERRAMIENTAS DE AYUDA A LA VALIDACIÓN DE RESULTADOS EN HEMATIMETRÍA

J.R. FURUNDARENA SALSAMENDI

*Laboratorio de Hematología.*

*Laboratorio Unificado. Hospital Donostia. San Sebastián*

---

### Herramientas de ayuda a la validación de resultados en hematimetría

Hoy en día hay muy pocos pacientes hospitalizados a los que no se les pida uno o varios hemogramas con recuento diferencial durante el ingreso. En el medio extrahospitalario también es muy frecuente solicitar hemogramas incluso en pacientes asintomáticos.

Los laboratorios se ven sometidos a presupuestos cada vez más ajustados asociados a una creciente demanda<sup>1</sup>. En nuestro laboratorio las solicitudes de hemogramas tanto de rutina como urgentes tienen un crecimiento anual en torno al 3%. Ello nos obliga a una mayor productividad y a mejorar la eficiencia.

---

### Evolución tecnológica. Nuevos analizadores y sistemas de transporte automatizado de muestras

Durante las dos últimas décadas los contadores hematológicos han experimentado una evolución tecnológica formidable gracias a la introducción de nuevos principios básicos y a la mejora progresiva de su *software*. Los resultados analíticos obtenidos han mejorado en eficiencia y ha aumentado la información aportada, aunque ello exige un conocimiento más especializado para conseguir una mejor aplicación clínica.

Se han consolidado determinaciones como conteo de eritroblastos y granulocitos inmaduros (fórmula leucocitaria expandida), mientras que otros parámetros están menos estandarizados como la fracción de plaquetas inmaduras, parámetros reticulocitarios, fragmentos eritrocitarios, etc. Recientemente se ha publicado una revisión del estado de arte en cuanto a contadores hematológicos<sup>2</sup>.

La mayoría de los fabricantes de autoanalizadores han introducido extensores-teñidores automatizados para ser usados junto a ellos.

Hayashi<sup>3,4</sup> hace referencia a la integración de sistemas de transporte de muestras en el laboratorio de hematología. El sistema ideal debería tener las siguientes características:

- Tiene que ser un sistema flexible que tenga información de los analizadores con menos muestras cargadas y con esa información debe saber enrutar óptimamente las muestras.

- El sistema debe funcionar aunque alguno de sus componentes esté averiado.

- Debe ser un sistema flexible que permita diferentes combinaciones de aparatos que se adapten a las necesidades de cada laboratorio. También debe posibilitar la incorporación de nuevas generaciones de analizadores.

- Debe conseguir un aprovechamiento del espacio del laboratorio.

Todo ello con los siguientes objetivos:

- Aumentar la eficiencia.
- Mayor velocidad de procesamiento de las muestras.
- Capacidad para soportar mayores cargas de trabajo.
- Menor margen de errores de identificación de muestras.
- Mejor tiempo de respuesta de resultados.
- Menor exposición a riesgos biológicos.
- Posibilidad de dedicar el tiempo a otras tareas.
- Disminución de pasos manuales.

---

### Criterios de revisión de los hemogramas

Los analizadores hematológicos todavía necesitan de una alta implicación por parte del personal técnico-médico para la verificación de los resultados y revisión de resultados anormales basándose en reglas de decisión propias.

La revisión de un hemograma está encaminado a corroborar resultados numéricos, demostrar la veracidad de las alarmas de sospecha y a detectar alteraciones morfológicas que escapan al analizador (hipogranulación, p. ej.).

Cada laboratorio debe tener en cuenta los analizadores hematológicos que utiliza, su comportamiento al generar alarmas morfológicas, la posibilidad de obtener fórmulas leucocitarias expandidas (eritroblastos, granulocitos inmaduros...).

Hay que tener en cuenta los datos demográficos del paciente en cuanto a edad, sexo, servicio de procedencia y diagnóstico.

Hace años el personal técnico del laboratorio se volvía experto en morfología de sangre periférica debido a la frecuencia con la que se revisaban los resultados del hemograma con una extensión mirada al microscopio. Cada vez es más difícil contar con técnicos formados en morfología de sangre periférica debido a recortes de personal, rotación en laboratorios de producción o *core* que combinan hematología y bioquímica, menor cantidad de extensiones a revisar, etc.

El recuento leucocitario diferencial manual es caro debido a que requiere personal cualificado y requiere tiempo. El tiempo medio empleado en hacer una fórmula manual sobre 100 células varía de unos grupos a otros de 1,9 a 6 minutos<sup>5</sup>.

Por tanto, es muy importante hacer una buena selección de los criterios de revisión.

Hay que tener en cuenta la variabilidad estadística esperable en el conteo diferencial que es mayor cuantas menos células sean contadas. El autoanalizador cuenta un número de células mucho mayor que el conteo manual por lo que es más exacto y preciso en los resultados.

Es posible llegar a acuerdos con los servicios para realizar menos fórmulas leucocitarias, por ejemplo en la Clínica Mayo llegaron a un acuerdo para que a los pacientes ingresados sólo se les hiciera hemograma con conteo diferencial automatizado una vez por semana tras un estudio sobre 4.840 pacientes. También vieron que si se informa la fórmula leucocitaria en cifras absolutas evitando porcentajes hay que hacer menos extensiones<sup>5</sup>.

Cuando los hallazgos en el examen de esa extensión son no familiares, raros o potencialmente significativos para un diagnóstico o una actitud terapéutica un médico debe revisar los hallazgos. El médico puede tomar decisiones que aceleren y concreten un diagnóstico y tomar decisiones para poner en marcha otras determinaciones analíticas para completar el diagnóstico. Además ello puede contribuir a reducir la estancia hospitalaria.

Es imposible definir unos criterios estrictos para que una extensión deba ser revisada por el médico ya que dependen del tipo de muestras que reciba el laboratorio y del grado de cualificación del personal técnico que procesa las muestras.

Se han publicado varias encuestas sobre cantidad de extensiones de sangre periférica que realizan los laboratorios y con qué criterios. Chapman<sup>6</sup> recoge los criterios de revisión de hemogramas en cuatro centros que procesan muestras de una población de referencia muy diferente: un gran laboratorio que procesa 3.000 muestras diarias, un laboratorio *core*, un laboratorio de un hospital universitario terciario y un centro dedicado al cáncer.

Los criterios son muy diferentes en cuanto a:

- Límite superior e inferior por parámetros para decidir determinada acción.
- Criterios de revisión de morfología eritrocitaria.
- Criterios de revisión para alarmas de sospecha (blastos, agregados plaquetas, NRBC...). En muchos casos el protocolo es hacer un rastreo y fórmula completa si es necesario.
- Criterios de revisión para alarmas de IG/bandas 1 y IG/bandas 2. Hay que tener en cuenta que la utilidad del conteo de cayados es muy controvertida.

Novis<sup>7</sup> publica los datos recogidos durante el año 2004 por el Colegio Americano de patólogos dentro del programa de calidad de los laboratorios. Pudieron recoger datos de 263 instituciones (254 americanas) con el objetivo de medir productividad y el

grado de revisión manual de extensiones de sangre periférica.

Definiciones:

- Conteo diferencial manual: se revisa la extensión manualmente y se hace un conteo diferencial de 100 leucocitos.

- Revisión manual de la extensión: puede referirse a un rastreo manual de la extensión y/o a un conteo diferencial manual.

- Rastreo manual de la extensión: se trata de un examen visual de la extensión con un objetivo muy concreto (por ejemplo confirmar el conteo de plaquetas) pero sin evaluar detalladamente los hallazgos morfológicos ni hacer el diferencial leucocitario.

Eran laboratorios muy heterogéneos hospitalarios o no, públicos o privados y con prácticas diarias muy diferentes. Más del 80% carecían de sistemas de autovalidación de los resultados.

Se recogieron datos sobre 95.141 hemogramas de los que se hizo revisión manual con extensión en el 16,2% incluyendo un 6,5% para rastreo manual y un 9,7% para conteo diferencial.

Como media se hacía rastreo manual en el 11,1% de los hemogramas y conteo diferencial manual en el 17,6%, es decir, se revisaba una extensión en el 28,7% de los hemogramas. En un extremo había aproximadamente un 10% de instituciones que revisaban el 0,8% y en el otro extremo había otro 10% que revisaban con extensión el 23,6% de los hemogramas.

En una tabla recogen las causas que originaron la revisión manual de la extensión. Había mucha variación al establecer límites predeterminados en algunos parámetros en el analizador como causa de revisión.

Según las respuestas recogidas la revisión manual aportó información adicional a la del autoanalizador en el 35,7% de los casos. No se valoró el grado de importancia de esta aportación.

Galloway<sup>8</sup> publica los resultados de una encuesta voluntaria hecha dentro del National Pathology Benchmarking Study en Gran Bretaña en cuanto a la cantidad e indicaciones de verificación de los resultados del hemograma con revisión de una extensión de sangre.

Se recogieron respuestas de 93 laboratorios gestionados por 46 empresas por lo que la valoración se hace sobre 46 ya que se supone que actúan con las mismas instrucciones. 15 eran de hospitales con docencia, 14 hospitales eran de grandes distritos y 17 de distritos intermedios.

Por lo que puede verse en un gráfico se hacen extensiones en un 5-10% de los hemogramas en la mayoría de los laboratorios y entre un 10-20% en algunos. En algunos casos estas extensiones no se llegan a informar ya que aunque se hayan preparado finalmente el médico puede decidir que no hace falta revisarlo.

No encontraron relación con el tipo de autoanalizador utilizado.



De las 46 empresas, 42 tenían criterios escritos con indicaciones de cuando hacía falta hacer una extensión de sangre pero sólo en 9 esos criterios estaban integrados en los sistemas informáticos del laboratorio.

En pacientes sin hemogramas previos comparan los criterios de límites superiores e inferiores para los diferentes parámetros que obligan a revisar una extensión y ven que la práctica es muy diferente. También lo comparan con los criterios del grupo internacional de consenso<sup>9)</sup> y ven que hay mucha diferencia en los límites utilizados. No valoraron la actitud ante alarmas de sospecha del analizador por no complicar mucho la encuesta.

Dicen que en un siguiente paso quieren estudiar el impacto que tendría la aplicación de las reglas del gru-

po internacional de consenso en el número de extensiones a realizar y se tendría un modelo de buena práctica con el que compararse.

En el año 2002, B. Houwen organizó una reunión de 20 expertos de 15 laboratorios en la que consiguieron ponerse de acuerdo en aproximadamente 80 reglas de revisión de hemogramas para su validación<sup>9)</sup>. Para confirmar la validez de estas reglas cada laboratorio se comprometió a recoger los datos de 1.000 hemogramas al azar representativos de su casuística particular (800 casos sin hemogramas previos y 200 con hemogramas previos) haciendo extensión y valoración morfológica de todos ellos.

Todos los datos fueron enviados a un comité que decidió los criterios para considerar los hallazgos de la revisión de una extensión como positivos (Tabla 1).

Se revisaron los datos de 13.298 hemogramas analizados en diferentes analizadores (*Abbott Cell-Dyn 4000, Bayer Advia 120, Beckman Coulter GenS, LH750, Sysmex SE-9000 y XE-2100*) y los resultados fueron similares para todos los laboratorios a pesar de utilizar diferentes analizadores. Los resultados globales pueden verse en la Tabla 2.

Hubo un 2,9% de falsos negativos cuyas causas pueden verse en la Tabla 3. Los autores creen que las reglas de validación que se acepten en un laboratorio deben tener un porcentaje de falsos negativos inferior al 5% y de lo contrario deben revisarse.

El porcentaje de falsos positivos fue similar en todos los laboratorios con una media global del 18,6% que en gran medida es provocado por las alarmas de sospecha de los analizadores sin que se encontraran diferencias entre unos aparatos y otros.

Teniendo en cuenta estos resultados finalmente redujeron a 41 las reglas de validación de hemogramas (22 referidos a valores numéricos, 7 de alarmas de sospecha de serie roja y plaquetar, 7 de alarmas de sospecha de leucocitos y 2 de reticulocitos).

El grupo plantea estas reglas de consenso como una guía para los laboratorios clínicos de hematología que deberán validar su operatividad en su laboratorio particular antes de ponerlas en uso.

Muñoz<sup>10)</sup> hace un estudio sobre la difusión en la aplicación de las reglas de validación del grupo de consenso internacional en un área de EE UU para lo que envía una encuesta. Por otro lado explora el efecto que tendría en su laboratorio.

Según la encuesta el 35,3% no conoce las reglas, el 13,5% los usan en su totalidad, el 27,4% en su mayoría, el 17,4% algunas de las reglas y el 4,7% ninguna.

El autor refiere que en su laboratorio el 50% de los contajes manuales son debidos a alarma de posibles bandas y que en el grupo de consenso esa alarma no es valorada, por lo que podría evitar muchas fórmulas manuales.

**Tabla 1. Grupo de Consenso Internacional. Criterios para considerar los hallazgos de una extensión como positivo<sup>9)</sup>**

<b>Morfología</b>	
Morfología de serie roja de 2+/moderada o mayor (en el paludismo basta con ver un parásito)	
Morfología plaquetar (plaquetas gigantes) de 2+/moderada o mayor	
Agregados de plaquetas > raro/ocasional	
Cuerpos de Döhle de 2+/moderada o mayor	
Granulación tóxica de 2+/moderada o mayor	
Vacuolas de 2+/moderada o mayor	
<b>Células anormales</b>	
Blastos ≥ 1%	
Metamielocitos > 2%	
Mielocitos o promielocitos ≥ 1	
Linfocitos atípicos > 5%	
Eritroblastos ≥ 1	
Células plasmáticas ≥ 01	

**Tabla 2. Grupo de Consenso Internacional. Resultados<sup>9)</sup>**

	n	Porcentaje
Positivo verdadero	1.483	11,2
Falso positivo	2.476	18,6
Negativo verdadero	8.953	67,3
Falso negativo	386	2,9
Total de muestras	13.298	

**Tabla 3. Grupo de Consenso Internacional. Causas de falsos negativos<sup>9)</sup>**

	Porcentaje
Metamielocitos, mielocitos, promielocitos	52
Blastos	1,3
Linfocitos atípicos	3,1
Eritroblastos	6,6
Morfología de eritrocitos	18,5
Morfología de plaquetas	14,5
Morfología de leucocitos	4,0

Por otro lado, dicen que aplicando las reglas de consenso aunque disminuirían el número de contajes diferenciales manuales, no bajarían las revisiones de extensiones.

Creen que se debería extender el conocimiento de estas reglas de consenso.

Rowbotham<sup>11</sup> analiza la repercusión que tiene la introducción de las reglas de validación del Grupo de Consenso Internacional. Concretamente miden tres reglas de validación: trombopenia  $< 100 \times 10^9/L$ , hemoglobina  $< 70 \text{ g/L}$  y VCM  $> 105 \text{ fL}$  y lo comparan con las reglas que tenían previamente en su laboratorio.

De 2.524 hemogramas que analizan, con sus propios criterios se autovalidaron 1.765 y se revisaron 759. En 505 (20%) se hicieron extensiones. Los técnicos cambiaron los resultados del diferencial leucocitario del autoanalizador en 100 casos y añadieron comentarios adicionales en 53.

El uso de las tres reglas citadas del grupo de consenso internacional hubiera evitado la revisión de la extensión en 151 casos de las 505 extensiones (30%). En 11 de estos 151 hemogramas se añadió un comentario a los resultados pero este comentario se podría generar por un sistema experto de validación sin revisar la extensión.

Por tanto, defienden el uso de las reglas internacionales de validación que pueden ayudar a reducir el número de revisiones.

La Comisión para la Acreditación de Laboratorios del Colegio Americano de Patólogos (CAP) obliga a que cada laboratorio disponga de un listado de criterios específicos para revisar extensiones de sangre periférica<sup>12</sup>. Dicha revisión es definida como un examen microscópico cuidadoso de la extensión hecha por un hematomorfólogo. Se revisa la morfología de todos los tipos celulares. Por otro lado, distinguen la fórmula diferencial manual que se hace para confirmar los hallazgos del analizador y que puede ser hecha por personal de menor graduación entrenado adecuadamente.

Gulati<sup>12</sup> cree que sería conveniente que el CAP editara una guía con los criterios, pero mientras esto no sea así lo más adecuado es que los criterios los establezca un hematomorfólogo. Publican sus criterios en dos tablas.

En su hospital de 600 camas se procesan 700 hemogramas al día y se hacen 185 fórmulas manuales. Refieren que con sus criterios tienen que hacer revisión de la extensión en un 3% (2-5%) y que es adecuado que en otro 5% se haga revisión como un elemento de control de los diferenciales manuales y comprobación de la competencia de la plantilla.

Peterson *et al.*<sup>13</sup> dan su opinión sobre las razones por las cuales un médico debe revisar una extensión pero no dejan de ser unos criterios muy generales.

Lantis<sup>14</sup> publica su experiencia en el laboratorio de hematología de un hospital que realiza 340.000 hemo-

gramas al año y 180.000 recuentos diferenciales automatizados con analizadores Coulter GenS.

De entrada trabajaban con unos criterios escritos que dependiendo de los resultados y alarmas del analizador conllevan hacer extensión para rastreo o para recuento diferencial manual sobre 100 células.

Ahora cambian la sistemática de trabajo y dependiendo de los resultados y alarmas del analizador el primer paso siempre es un rastreo y sólo hacen fórmula manual si ven células que el analizador no puede contar (células linfomatosas, blastos...) o en el caso de que la fórmula automatizada presente interferencias y es incompleta.

Con la nueva sistemática han conseguido disminuir el número de fórmulas manuales diarias desde un 24% de las solicitudes de hemograma con recuento diferencial automatizado hasta un 6%.

---

### Sistemas expertos de validación

Los nuevos analizadores han supuesto avances en la calidad de los resultados y la introducción de nuevos parámetros. Sin embargo, todo su potencial no se materializa si no se integran bien en el sistema de procesamiento de datos que exista en el laboratorio.

Algunos laboratorios han empezado a incorporar decisiones o acciones basadas en reglas que se pueden incorporar en el sistema informático del laboratorio (SIL) o en el propio analizador hematológico. Ello puede contribuir a disminuir el porcentaje de revisiones teniendo en cuenta criterios de edad, sexo, servicio de procedencia y límites críticos y acciones específicas derivadas de esos criterios. Eliminar cualquier revisión manual innecesaria y automatizar este proceso ahorra tiempo y dinero. Además estos sistemas pueden servir para validar automáticamente resultados disminuyendo la intervención directa del personal.

Las reglas pueden incorporar también los límites *delta check* que sería el porcentaje de subida o bajada en el resultado de un parámetro con respecto al resultado previo.

En un medio en el que la tendencia es a contar con menos personal técnico entrenado, que trabaja a turnos y con dedicación a diferentes áreas del laboratorio resulta difícil memorizar los criterios de revisión adecuados lo que conlleva un riesgo de incumplimiento y una disminución en la calidad de los resultados. Por tanto es necesaria la puesta en marcha de sistemas expertos de validación que sean capaces de analizar gran cantidad de datos de forma rápida, consistente y exacta.

Ayats<sup>15</sup> cree que los requerimientos que debe cumplir un sistema de ayuda a la validación deben ser los siguientes:

- Validación automática de todos los resultados que cumpla determinados requisitos.

- Bloqueo en la validación de algunos resultados de acuerdo a unos criterios preestablecidos.

- Capacidad de aplicar reglas básicas de valoración que impliquen determinadas acciones: generar pruebas complementarias, validar o bloquear algunos resultados.

- Marcar resultados que cumplan un *delta check* pre-determinado.

- Visualizar de forma clara resultados y gráficos.

- Posibilidad de cambiar los resultados de la fórmula leucocitaria y de que recalcule las cifras absolutas.

- Capacidad de recalcular la cifra total de leucocitos en casos de que haya que corregirla por presencia de eritroblastos.

- Posibilidad de introducir comentarios que queden grabados y visibles.

- Uso de códigos individualizados que identifiquen al validador.

Los sistemas expertos aportarían las siguientes ventajas:

- Escrutinio más consistente y exacto de los resultados y mejor práctica de comunicación de resultados por teléfono, repetición de resultados y revisión manual de resultados.

- Comparación automática y *delta-check* con resultados previos.

- Acortamiento del tiempo de formación del personal técnico de laboratorio.

- Mejora de tiempos de respuesta.

- Aumento de la eficiencia y mejor gestión de la carga de trabajo.

- Posibilita la emisión de resultados parciales (se informa de hemoglobina y del recuento leucocitario mientras se comprueba si hay agregados de plaquetas).

- Puede adaptarse a las necesidades de cada laboratorio.

### **Experiencia en robotización y sistemas expertos de validación**

Burgess<sup>16</sup> refiere la experiencia de un laboratorio de hematología de Australia ubicado en un hospital de 1.000 camas que procesa 600 hemogramas diarios y abierto las 24 horas a diario y que desarrolla un sistema computarizado para el manejo de los datos suministrados por analizadores *Bayer H1*.

Una vez que el sistema informático recibe los resultados del analizador van a ser valorados por el sistema experto que va a indicar si hay que hacer extensión, si validar la fórmula leucocitaria automática, si avisar telefónicamente por resultados de pánico, etc. Estos mensajes salen por una impresora.

A.J. Arnot<sup>17</sup> describe la organización de su laboratorio que procesa varios cientos de hemogramas a diario. Consta de los siguientes elementos: 2 analizadores *Coulter STKS* cada uno con su PC y programa propio de gestión de datos, un servidor que recibe los datos de los analizadores y los presenta en una red local de ordenadores personales y que además está conectado al *host*.

Los analizadores envían los resultados numéricos y gráficos de los leucocitos al sistema informático (según los autores fueron los primeros que publicaron esta posibilidad).

Los datos esenciales para la validación se presentan en una sola pantalla. Los autores dicen que han reducido el tiempo de validación e impresión de resultados a 2 horas en los hemogramas de rutina y 1 hora en los urgentes.

Schwarzinger<sup>18</sup> publica la experiencia de un laboratorio suizo que procesa 150-200 hemogramas con o sin fórmula leucocitaria incluida. Describen el sistema informático *Häma-COM* que permite una conexión bidireccional con el SIL desde donde puede capturar datos demográficos. Creen que es un sistema rápido y de fácil uso, adaptable a muchos laboratorios con diferentes analizadores y necesidades.

MacDonald<sup>19</sup> describe su experiencia con el sistema automatizado *Sysmex HST 330* más un sistema experto de validación. Todos los hemogramas con resultados fuera de los límites configurados o con alarmas morfológicas son catalogadas como "positivas" por el analizador y al principio el sistema hacía una extensión a todos ellos pero con esa sistemática se vio que sólo en el 25% se llegaba a mirar la extensión. Por ello crearon un conjunto de reglas en el programa informático para que el propio sistema decidiera a qué muestras hacían una extensión.

Cuando introducen el sistema en su laboratorio se hacen 600 hemogramas diarios con una presencia alta de hemogramas complejos de un hospital terciario y tienen un nivel de revisión por extensión del 30-40%. 6 meses después de introducir el sistema habían reducido la revisión por extensión del 40 al 20% y los conteos leucocitarios manuales del 16 al 7%.

Concluye diciendo que la automatización descrita les ha permitido aumentar la eficiencia de los flujos de trabajo, reducir los tiempos de respuesta, absorber un 5% más de muestras y reducir personal técnico.

Födinger<sup>20</sup> describe cómo en su laboratorio trabajaban con dos *Coulter STKS* aislados y un *Sysmex R-1000* para hacer los reticulocitos haciendo y tiñendo a mano las extensiones de sangre.

Introducen el sistema *Sysmex HS-430* que incluye dos analizadores *Sysmex NE-8000*, un *Sysmex R-3000* para reticulocitos y un *Sysmex SP* para extensiones y tinciones junto a una cadena transportadora de muestras. El sistema es coordinado por un sistema informático conectado al SIL.

Evalúan el sistema midiendo tiempos para la realización de las diferentes partes del procesamiento de muestras en 8 series de 612 muestras de media cada una. De forma resumida encuentran que mejoran el tiempo de sustitución de reactivos por mayor capacidad de los nuevos, el tiempo de análisis medio de las muestras, el tiempo necesario para hacer una extensión, teñirla e identificarla.

Durante el proceso de análisis el tiempo necesario de actuación del técnico de laboratorio mejora. Debido a la automatización disminuye el margen de error al identificar las muestras para reticulocitos y para extensión. Las extensiones se preparan inmediatamente tras el hemograma con el sistema automatizado *Omron*.

Con sus criterios internos refieren que hacen extensión en el 26% de los hemogramas.

El laboratorio de hematología del Hospital Johns Hopkins procesa a diario 900 hemogramas, 190 hemogramas con fórmula leucocitaria automatizada y 70 reticulocitos<sup>21</sup>. Para ello contaban con 2 *Coulter STKS*, un *Sysmex R-1000* para reticulocitos y preparan y tiñen las extensiones de sangre periférica a mano.

Introducen un sistema robotizado *Sysmex HS-330* que incluye 2 analizadores *Sysmex NE-8000*, 1 analizador de reticulocitos *Sysmex R-3000* y un extensor-teñidor *Sysmex SP-1*.

Programan el sistema para que haga extensión-tinción a las muestras que sean marcadas como positivas por el analizador.

Se hizo una valoración sobre tiempos en 300 muestras repartidas en 6 lotes de 50 muestras cada uno. De cada lote se hicieron reticulocitos en 25 muestras. El tiempo medio de procesamiento de las muestras con el sistema previo fue de 77 minutos y con el sistema nuevo de 54 minutos, es decir, se redujo el tiempo necesario en 23 minutos.

Burgess<sup>22</sup> describe la experiencia de tres hospitales australianos con el uso del sistema experto de hematología *Cerner Millennium Discern Expert*.

El sistema experto descrito por los autores funciona básicamente de esta manera:

- Una regla es puesta en marcha si el hemograma procesado en un *Cell-Dyn* da una alarma de invalidado.
- Se hizo una lista de criterios que se querían incorporar al sistema experto.
- Se crearon 3 campos tipo texto de base de datos para que aparecieran junto a los resultados del hemograma: acción, teléfono y microscopio.

En definitiva gracias al sistema experto consiguen una reducción en el número de extensiones realizadas. Entre los 3 hospitales tienen 1.300 camas, hacen 1.220 hemogramas diarios sin necesidad de extensión en el 70-77%, extensión para revisión de serie roja-plaquetar en el 12-20%, extensión para revisión de serie blanca sin fórmula manual en el 7% y extensión con fórmula manual en el 7-8%.

Takeda<sup>23</sup> describe una aplicación informática denominada SIS (*Sysmex Information System*) que trabaja en plataforma Windows NT y que hace de puente entre los analizadores y el SIL.

Permite configurar reglas de validación, puede generar nuevos parámetros o repeticiones que son enviados al sistema de transporte de muestras del laboratorio.

La validación puede hacerse por autovalidación de los resultados que no cumplan ninguna regla de invalidación y el resto se validan manualmente.

Jenny<sup>24</sup> publica su experiencia en el laboratorio de hematología en un hospital suizo de 700 camas con el sistema SIS que contiene 42 reglas de validación: 12 en relación con las plaquetas, 12 en relación con la serie roja y 18 referidos a los leucocitos.

El SIS con este conjunto de reglas expertas de validación sustituye al técnico en el proceso de validación. Hacen un seguimiento de 2 meses tras la introducción de este sistema y lo comparan con el sistema previo.

El tiempo de respuesta medio con el sistema de validación previo fue de 9,3 minutos para hemogramas sin fórmula y de 41 minutos para hemogramas con fórmula. El 95% de los hemogramas sin fórmula estaban validados en 28 minutos y en 3 horas para los hemogramas con fórmula.

Con la introducción del SIS el tiempo de respuesta medio fue de 0,8 minutos para hemogramas sin fórmula y de 3,3 minutos para hemogramas con fórmula. El 95% de todos los hemogramas con y sin fórmula estaban validados en 0,2 minutos.

No se hizo comparación para el conteo diferencial manual ya que estos casos siguieron gestionándolos por el SIL previo.

Tras 3 meses de manejo hacen una encuesta al personal técnico que valora el sistema como seguro, rápido y de ayuda siendo aún más apreciado en los turnos de noche y de fin de semana.

McFadden<sup>25</sup> relata su experiencia en un laboratorio core norteamericano en un hospital terciario de 1.100 camas.

Para una mayor eficiencia el laboratorio cuenta con un manejo automatizado de las muestras y unos criterios de revisión rigurosos que ha reducido las revisiones de hemogramas al 20%: un 10% se revisan resultados previos para confirmar una continuidad en los resultados y en otro 10% se requiere una extensión que será revisada por el técnico o por el patólogo.

En el año 2001 sustituyen 2 *Coulter STKS* por 2 *Coulter GenS* que permiten aplicar reglas configuradas por el propio usuario y que pueden incluir mensajes escritos que guían al técnico en el proceso de revisión de los resultados del hemograma. Esto evita tener que contar con instrucciones escritas separadas.



Además introdujeron el sistema *Aqueduct* que se conecta por un lado a varios autoanalizadores y por otro al SIL permitiendo el *delta-check*. Este sistema permite también configurar sus propias reglas de validación.

Hacen unas mediciones de tiempos de trabajo sobre un total de 156 muestras comparando ambos tipos de contadores. En primer lugar ven que el tiempo medio de análisis por muestra fue de 40 y 44 segundos respectivamente y en segundo lugar miden el tiempo de revisión y decisión de aceptación de resultados o decidir procedimientos adicionales que fue de 22 y 23 segundos respectivamente, es decir, que no hubo diferencias con ambos tipos de autoanalizadores.

Posteriormente, miden el tiempo de revisión-decisión usando el sistema *Aqueduct* y ven que se redujo a una media de 13 segundos por muestra. Un 79% de las muestras fueron autovalidadas y transmitidas al SIL. Para una carga de trabajo de 1.000 hemogramas diarios calculan un ahorro de tiempo de 2,81 horas.

La Porta<sup>26</sup> refiere los resultados de su laboratorio *core* que procesa 110.000 muestras hematológicas al año. Utilizan el tubo con EDTA para hemogramas, VSG, hemoglobina A1c y electroforesis de hemoglobinas.

Primeramente introdujeron 2 analizadores *Coulter LH 750* y notaron una mejoría en la productividad gracias a las mejoras tecnológicas que supone, a un mayor porcentaje de hemogramas que se pueden autovalidar y a una menor necesidad de extensión para revisión<sup>27</sup>.

Teniendo en cuenta que había muchos pasos del proceso que se hacían manualmente ven necesaria una solución que contemple una robotización y automatización. En el 2002 ven la posibilidad de introducir el sistema robotizado *Beckman Coulter LH1500*.

El sistema consta de una estación de entrada para 200 muestras, un transportador de muestras, un analizador *Coulter LH750*, 1 analizador *Coulter LH 755* que incluye analizador más extensor-teñidor, una estación de salida de 200 muestras y un archivador de 1.000 muestras. Una vez que las muestras son cargadas en la estación de entrada éstas son procesadas de forma automatizada para hemograma, reticulocitos, extensiones, repeticiones y llegan a la estación de salida cuando tienen otros test como los que hemos citado previamente. Los analizadores tienen configuradas una reglas de autovalidación de las muestras y están conectados de forma bidireccional con el sistema informático del laboratorio.

Previo a la robotización identifican 28 pasos en las fases preanalítica, analítica y postanalítica del proceso previo. La automatización total consigue eliminar 7 pasos y disminuir el tiempo o frecuencia requerido en otros 6 pasos con la consiguiente mejora de los tiempos de trabajo y disminución de los riesgos biológicos principalmente en la realización de las extensiones.

Calculan que ha supuesto un ahorro de 4.000 horas al año, es decir, 2 puestos de trabajo que según refieren era lo que les había disminuido la plantilla y pueden dedicar más atención a las muestras que verdaderamente necesitan ser revisadas.

Barnes describe cómo en su laboratorio de hematología en 1996 introdujeron el sistema robotizado de primera generación *Coulter/IDS* cuyos primeros resultados fueron ya publicados<sup>28</sup>. Este sistema incluye 2 analizadores *Coulter STKS*, un extensor-teñidor *Omron* y un archivador de muestras. El propio hospital creó un *software* que permitía usar algoritmos de autoverificación, *delta-check*, repeticiones y test reflejos.

En el año 2004 lo sustituyen por el sistema robotizado de tercera generación *Coulter LH 1502* que incluye 2 analizadores *Coulter LH 755* (analizador + extensor-teñidor) y un archivador de muestras<sup>29</sup>.

Tras un periodo de funcionamiento hacen una valoración de las ventajas que ha aportado cada sistema.

La necesidad de hacer extensiones para confirmar el diferencial leucocitario se redujo en un 13,9% con la primera robotización gracias a la automatización de las repeticiones y tests reflejos. Con la segunda robotización se redujo un 20% más. Esta segunda reducción la relacionan con una mejoría del sistema de alarmas del nuevo analizador hematológico.

Consiguen reducir los tiempos de respuesta. Lo miden como percentil 90, es decir, el tiempo necesario para validar el 90% de los hemogramas. En rutina con la introducción de primera y segunda robotizaciones el tiempo de respuesta descendió desde 106 minutos a 65 y 47 minutos respectivamente. En muestras urgentes los tiempos respectivos disminuyeron de 61 minutos a 50 y 28 minutos.

Finalmente, hacen referencia a las ventajas habituales de la robotización que ya hemos citado repetidamente.

Muñoz<sup>30</sup> cita cómo en su laboratorio procesan 500 hemogramas diarios, 100 VSG y 200 muestras de coagulación. Han introducido el sistema *PSM* de *Roche* con la configuración de reglas CAR de hematimetría y de coagulación.

En hematimetría han diseñado reglas de validación que separan unas 70 muestras diarias de las que finalmente se revisan al microscopio 15-20.

Refieren que la implementación de reglas CAR ha permitido optimizar el tiempo que el hematólogo dedica a la validación, ha mejorado el flujo de trabajo y ha disminuido el tiempo de entrega de resultados.

---

## Nuestra organización

La carga de trabajo actual de la línea de hematimetría es la siguiente:



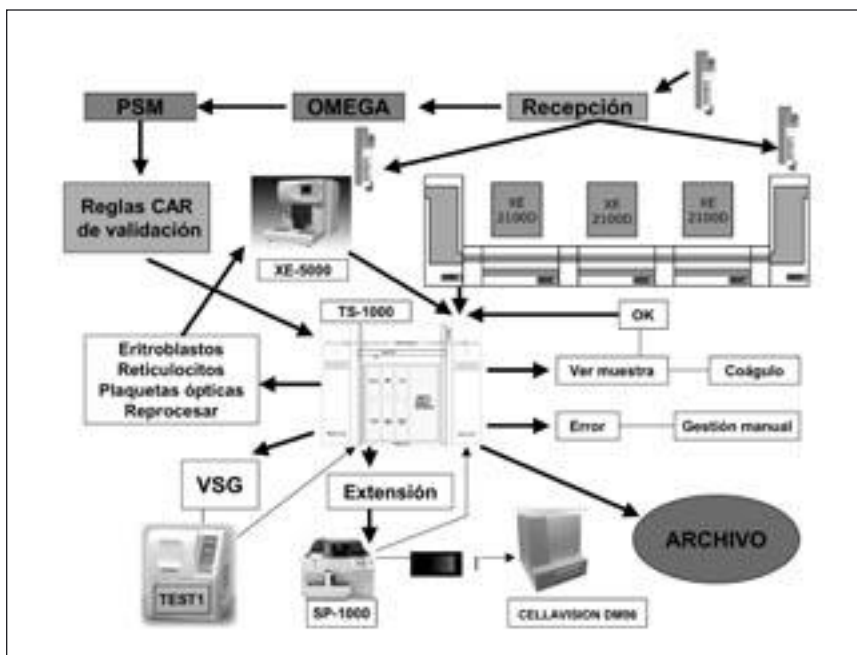


Figura 1. Automatización del laboratorio de hematología-core. Flujo de las muestras.

- 305.000 hemogramas no urgentes anuales de los que se revisa extensión en el 2,0% (con fórmula leucocitaria manual el 1,52%).
- 100.000 hemogramas urgentes anuales de los que se revisa extensión con fórmula leucocitaria manual en el 5,9%.
- VSG: 78.000 determinaciones anuales con la misma muestra que el hemograma.

El laboratorio cuenta con un sistema informático (SIL) denominado OMEGA (Roche). Por otro lado disponemos del módulo preanalítico llamado PSM (Preanalytic System Manager) desarrollado por Roche Diagnostics, que permite gestionar con la máxima automatización, agilidad y seguridad todos los procesos implicados en la clasificación, destinación y control a tiempo real de las muestras recibidas en un laboratorio, cubriendo así la fase preanalítica del mismo.

El registro de solicitudes se hace en el sistema OMEGA y se usan etiquetas de códigos de barras de 8 cifras. El sistema OMEGA vuelca los datos al PSM que a partir de ese momento muestra el recorrido de las muestras por los diferentes destinos definidos previamente (Figura 1). La conexión del PSM con los analizadores es bidireccional.

Como puede verse en la Figura 2 en nuestro laborato-

rio trabajamos con una cadena automatizada Sysmex HST (Hematology Sample Transportation System) configurada de la siguiente manera:

- Primer módulo constituido por 3 contadores hematológicos básicos Sysmex XE-2100D.
- Clasificador de muestras TS1000: situado entre el primer y segundo módulos.
- Segundo módulo formado por un contador hematológico Sysmex XE-5000 y un extensor-teñidor Sysmex SP-1000.

El personal técnico de laboratorio comprueba que la muestra que recibe aparezca registrada en el PSM y la introduce en la cadena que lo transporta a un analizador donde se procesa el hemograma.

Posteriormente, las muestras son transportadas al clasificador de muestras TS1000 donde se han configurado varios destinos: errores en la lectura de código de barras o en la lectura de resultados, ver muestra para comprobar si tiene coágulos, reprocesar, reprocesar tras incubación a 37°, extensión para valoración morfológica, reticulocitos, plaquetas ópticas, eritroblastos, VSG o archivo. Dependiendo de las pruebas pendientes que tenga la muestra será clasificada en una u otra posición del clasificador de donde podrá ser fácilmente enrutada al siguiente destino. En nuestro caso aprovechamos la unidad de salida de racks para que salgan aproximadamente el tercio de muestras con petición de VSG que son fácilmente llevadas al analizador respectivo.

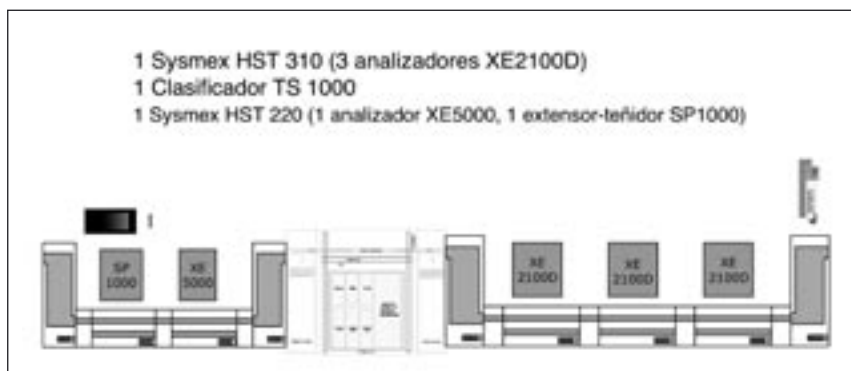


Figura 2. Automatización del laboratorio de hematología-core. Sistema modular Sysmex HST.

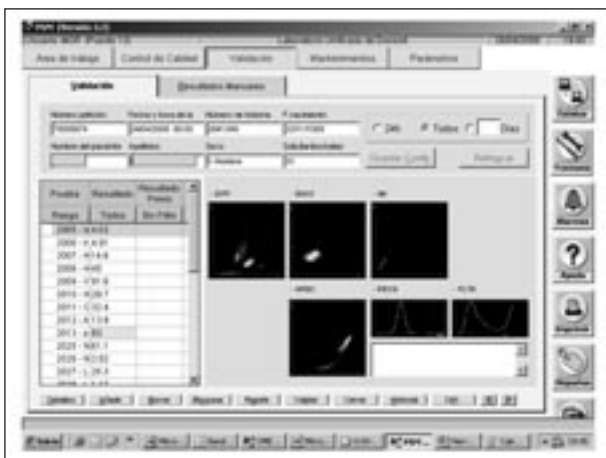


Figura 3. Sistema PSM. Visualización de los gráficos del hemograma.

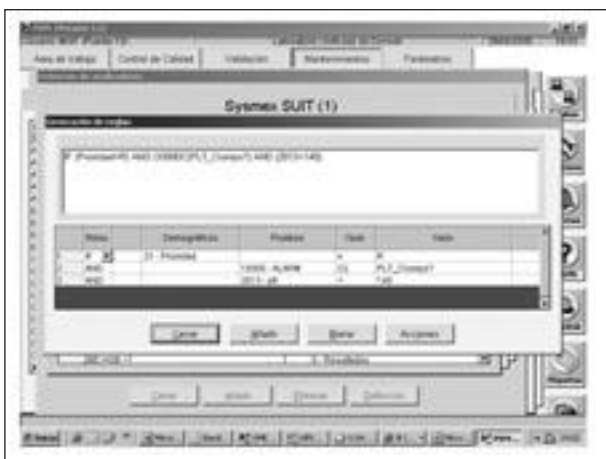


Figura 4. Sistema PSM. Generación de reglas CAR para validación de hemogramas. Hallazgos a cumplir.



Figura 5. Sistema PSM. Generación de reglas CAR para validación de hemogramas. Acciones.

Las muestras urgentes tienen un rango de numeración concreto y un color amarillo en la parte superior de la etiqueta de identificación y se gestionan a través de un módulo de urgencias del OMEGA y el PSM. Las muestras se introducen en racks de color rojo para un seguimiento más fácil.

Tenemos un analizador *Sysmex XE-5000* para trabajar en modo *stand-alone* donde procesamos todas las muestras preferentes de hematología, muestras de neonatos que se procesan en modo manual, líquidos biológicos, peticiones de reticulocitos, muestras con alarma de eritroblastos y muestras que se reprocesan para medir plaquetas ópticas.

También disponemos de un extensor-teñidor *Sysmex SP-1000* que imprime en el cristal la identificación de la muestra en código de barras y numérico.

El PSM recibe los resultados de los diferentes analizadores así como de los destinos por donde haya pasado la muestra permitiendo el seguimiento de todos los pasos hasta el archivo final con su posición. Los resultados pueden visualizarse tanto en formato numérico o de texto como en gráficos de histogramas y de dispersión del láser (Figura 3).

El PSM permite configurar reglas expertas de validación en forma de reglas CAR con condiciones de tipo IF...AND...OR... Para ello se sirve de los datos demográficos recibidos desde OMEGA y los resultados de los analizadores y genera una serie de acciones: comentarios de ayuda a la validación, alta de pruebas (reticulocitos, plaquetas ópticas, eritroblastos, extensión), repetir hemograma, mirar si la muestra tiene coágulo... (Figuras 4 y 5).

Los resultados son volcados al sistema OMEGA donde pueden ser validados. Tanto en el PSM como en el OMEGA se pueden definir rangos de tolerancia de resultados tanto superior como inferior así como valores de pánico. Los resultados en rangos dentro de los límites de tolerancia y sin alarmas de sospecha serán validados de forma automática. En breve, quedarán implantadas las reglas expertas de validación de tal manera que esperamos aumentar el número de resultados con validación automática.

Por otro lado hemos introducido el sistema *Cellavision DM96* para la realización de fórmulas leucocitarias por tratamiento digital de imágenes (31-34). Los portas son introducidos en unos racks específicos que se procesan en el *Cellavision DM96* que es capaz de preclasificar 35-40 fórmulas leucocitarias por hora dependiendo del número de leucocitos de las muestras. El técnico de laboratorio o hematólogo visualiza en su propio ordenador las imágenes grabadas y establece y valida la clasificación definitiva de las células, pudiendo transmitir los resultados al OMEGA. Los comentarios deseados se introducen también en OMEGA.

Tabla 4. Características de algunos sistemas expertos de validación

Nombre	PSM	HEMALINK	ABX Pentra ML	HEMAGEST
Distribuidor	ROCHE	SIEMENS	ABX	BECKMAN-COULTER
N.º de analizadores que se pueden conectar	Ilimitado	Ilimitado	3	Ilimitado
Conexión bidireccional sí/no	Sí	Sí	Sí	Sí
Permite identificar usuario que valida sí/no	Sí	Sí	Sí	Sí
Visualiza los gráficos de los resultados sí/no	Sí	Sí	Sí	Sí
N.º de hemogramas con resultados que puede almacenar con gráficos	(a)	(b)	20.000	(c)
N.º de hemogramas con resultados que puede almacenar sin gráficos	(a)	(b)	90.000	(c)
Permite autovalidación sí/no	Sí	Sí	Sí	Sí
Permite entrada manual de resultados fórmula leucocitaria y recalcula las cifras	Sí	Sí	Sí	Sí
Permite entrada manual de comentarios: morfología...	Sí	Sí	Sí	Sí
Permite configurar reglas de validación sí/no	Sí	Sí	Sí	Sí
Tiene preconfiguradas reglas de validación sí/no	No	Sí	Sí	No
Puede generar test reflexivos sí/no	Sí	Sí	Sí	Sí
Puede generar repeticiones sí/no	Sí	Sí	Sí	
Herramientas de ayuda		Se puede conectar el sistema automático de procesamiento de fórmulas manuales HemaCam. Permite integrar imágenes citológicas en el informe	Incluye atlas citológico	Permite integrar imágenes citológicas en el informe

(a) Depende del servidor. En nuestro laboratorio guarda gráficos de una semana y resultados de 3 meses (se quiere mejorar servidor).

(b) Con un disco duro de 1000 GB podría almacenar 3 años de resultados y gráficos para 1.000 hemogramas diarios.

(c) Depende del servidor. Aconsejan instalar uno que guarde resultados y gráficos durante un año.

## Otros sistemas informáticos de validación en nuestro medio

Se han resumido en la Tabla 4 las principales características de otros sistemas expertos de validación disponibles en nuestro medio.

## Conclusiones

Los avances tecnológicos de los analizadores hematológicos, la mejora de su *software*, el proceso de automatización de los múltiples pasos manuales junto a la integración informática de reglas expertas de validación y la opción de hacer fórmulas leucocitarias por tratamiento digital de imágenes nos coloca en una nueva era de la hematimetría. De esta manera podemos aumentar la productividad, abaratar costes, mejorar los tiempos de respuesta, disminuir los riesgos biológicos y dedicar más tiempo a los casos que verdaderamente necesitan mayor atención.

## Bibliografía

1. Koepke JA. Laboratory hematology after Y2K. *Sysmex J Int* 1999; 9: 105-08.
2. Buttarello M, Plebani M. Automated blood cell counts: state of the art. *Am J Clin Pathol* 2008; 130 (1): 104-16.
3. Hayashi M. The Sysmex total hematology system. *Sysmex J Int* 1992; 2: 96-102.
4. Hayashi M, Inagaki A. Hematology sample transport systems: from concept to development. *Sysmex J Int* 1993; 3: 144-53.
5. Pierre RV. Peripheral blood film review. The demise of the eyecount leukocyte differential. *Clin Lab Med* 2002; 22: 279-97.
6. Chapman M. Hematology review criteria and its impact on workflow and productivity. *Lab Hematol* 1997; 3: 48-52.
7. Novis DA, Walsh M, Wilkinson D, St Louis M, Ben-Ezra J. Laboratory productivity and the rate of manual peripheral blood smear review: a College of American Pathologists Q-Probes study of 95,141 complete blood count determinations performed in 263 institutions. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130 (5): 596-601.
8. Galloway MJ, Osgerby JC. An audit of the indications for the reporting of blood films: results from the National Pathology Benchmarking Study. *J Clin Pathol* 2006; 59: 479-81.

9. Barnes PW, McFadden SL, Machin SJ, Simson E. The international consensus group for hematology review: suggested criteria for action following automated CBC and WBC differential analysis. *Lab Hematol* 2005; 11:83-90.
10. Muñoz O, Lehman C. Efficiency in the hematology laboratory. *Int Jnl Lab Hem* 2008; 30 (Suppl 1): 145-46.
11. Rowbotham B, Bryant G, Amott A, Wordsworth H, Keng TB, Phan H, Gyer K. Modeling the effect of use of consensus rules from the International Consensus Group for haematology review on reporting in a large community laboratory. XIX International Symposium ISLH. Amsterdam 2006. Abstract 59.
12. Gulati GL, Alomari M, Kochar W, Schwarting R. Criteria for blood smear review. *Lab Med* 2002; 33: 374-7.
13. Peterson P, Blomberg D, Rbinovitch A, Cornbleet PJ; Hematology and Clinical Microscopy Resource Committee of the College of American Pathologists. Physician review of the peripheral blood smear: when and why. An opinion. *Lab Hematol* 2001; 7: 175-79.
14. Lantis KL, Harris RJ, Davis G, Renner N, Finn WG. Elimination of instrument-driven reflex manual differential leukocyte counts. Optimization of manual blood smear review criteria in a high-volume automated hematology laboratory. *Am J Clin Pathol* 2003; 119: 656-62.
15. Ayats R. Control posanalítico de los hemogramas. *Roche Diagnostics informa*. Octubre 2005: 14-20.
16. Burgess PR, Kershaw GW, Coleman RH, Robin H, Coad CD, Gibson J, Kronenberg H. A computerized expert system for handling the output of the Technicon H1 haematology analyser. *Clin Lab Haematol* 1993; 15: 21-32.
17. Amott AJ, Copson P. A network-based laboratory data processing system for use with the Coulter STKS haematology analyser. *Clin Lab Haematol* 1994; 16: 65-74.
18. Schwarzwinger I. The Häma-COM laboratory data management system (LDS): tailor-made computerization of the individual working procedures arising in a haematology laboratory with a high throughput of pathologic samples. *Ann Hematol* 1997; 75: 47-54.
19. MacDonald AJ, Dradshaw AE, Holmes WA, Lewis SM. The impact of an integrated haematology screening system on laboratory practice. *Clin Lab Haem* 1996; 18: 271-6.
20. Födinger M, Speiser W, Karabentcheva S, Scherrer R, Veitl M, Schwarzwinger I. Evaluation of a total hematology analysis system (Sysmex HS-430). Benefits for large laboratories by reducing manual work load and optimizing screening efficacy for pathologic samples. *Am J Clin Pathol* 1995; 104 (5): 503-9.
21. Rothe M, Wingfield S, Barranco P, Charache S. Robotics in the hematology laboratory. An evaluation of the productivity of the Sysmex HS-330. *Am J Clin Pathol* 1995; 103 (2): 154-8.
22. Burgess P, Robin H, Langshaw M, Kershaw G, Pathiraja R, Yuen S, Coad C, Xiros N, Mansy G, Coleman R, Brown R, Gibson J, Holman R, Hubbard J, Wick V, Lammers M, Johnson R, Huffman K, Bell J, Ibrahim A, Estepa F, Lovegrove J, Joshua D. Rule based processing of the CD4000, CD3200 and CD Sapphire analyser output using the Cerner Discern Expert Module. *Int Jnl Lab Hem* 2008 August 8.
23. Takeda M, Ijiri S, Fujiwara T, Yoshioka H, Kawaguchi T. Outline of the SIS™ (Sysmex Information System). *Sysmex J Int* 1999; 9: 144-50.
24. Jenny A, Senn F, Wey J, Tschopp M, Wuillemin WA, Linssen J. Comparison of the technical validation before and after implementation of the work area manager SIS 2.0 with standard rule package. *Sysmex J Int* 2005; 15: 7-12.
25. McFadden S. Automating the review process to improve productivity in the Hematology Laboratory. *Lab Hematol* 2002; 8: 225-9.
26. La Porta AD, Bowden AS, Barr S. Workflow improvement and impact of the New Beckman Coulter LH 1500 high throughput automated hematology workcell laboratory hematology. *Lab Hematol* 2004; 10 (2): 95-101.
27. La Porta AD, Bowden AS, Barr S. Impact of the Coulter LH 750 on productivity, turnaround time, and workflow in a core laboratory. *Lab Hematol* 2002; 8: 218-24.
28. Barnes PW. Evaluating performance characteristics of the Coulter/IDS robotic automation system. *Lab Hematol* 1998; 4: 1-6.
29. Barnes PW. Comparison of performance characteristics between first- and third-generation hematology systems. *Lab Hematol* 2005; 11 (4): 298-301.
30. Muñoz L, Obiols J, Cebollero A, Perea G, Guiu J, Torra M. Utilización de reglas CAR (Conjunto articulado de reglas de decisión) en el flujo de trabajo de automatización y en la validación de resultados. *Haematologica* 2008; 93 (Extraordinario nº 2) Abstract COS-047.
31. Kratz A, Bengtsson HI, Casey JE, Keefe JM, Beatrice GH, Grzybek DY, Lewandrowski KB, Van Cott M. Performance evaluation of the Cellavision DM96 system. *Am J Clin Pathol* 2005; 124: 770-81.
32. Ceelie H, Dinkelaar RB, Van Gelder W. Examination of peripheral blood films using automated microscopy; evaluation of Diffmaster Octavia and Cellavision DM96. *J Clin Pathol* 2006; 60: 72-9.
33. Cornet E, Perol JP, Troussard X. Performance evaluation and relevance of the Cellavision™ DM96 system in routine analysis and in patients with malignant hematological diseases. *Int J Lab Hematol* 2008; 30: 536-42.
34. Briggs C, Longair I, Slavik M, Thwaite K, Mills R, Thavara V, Foster A, Romanin D, Machin SJ. Can automated blood film analysis replace the manual differential? An evaluation of the Cellavision DM96 automated image analysis system. *Int J Lab Hematol* 2009; 31: 48-60.

## **APLICACIONES INFORMÁTICAS PARA LA GESTIÓN DOCUMENTAL DE LOS SISTEMAS DE CALIDAD EN EL LABORATORIO CLÍNICO**

**J. ANGUITA, A. PÉREZ**

*Servicio de Hematología y Hemoterapia.*

*Hospital General Universitario Gregorio Marañón.*

*Madrid*

Como primera referencia a la documentación de los sistemas de gestión, conviene mencionar que, clásicamente, los sistemas de aseguramiento de la calidad se han estado soportando en una documentación que ha permitido recoger los procedimientos, los cuales, a su vez, han servido para ejecutar unas determinadas tareas. Al mismo tiempo, esta documentación permitía el cumplimiento de los requisitos de la ISO 9001 de 1994 donde se establecía la necesidad de disponer de una serie numerosa de procedimientos documentados.

Este soporte documental se ha caracterizado por una cierta estructura jerárquica o piramidal, donde los documentos más genéricos se encontraban en la parte superior y los documentos más operativos en la parte inferior, con el fin de facilitar el manejo de dicha documentación por los diferentes usuarios.



A pesar de ello, esta documentación ha acabado convirtiéndose en muchos casos en un fin en sí misma en lugar de constituir un medio para la gestión de las actividades y recursos de una organización orientado a la calidad de los productos o servicios prestados. Este hecho puede estar motivado por un mal entendimiento de las normas de referencia o por un exceso de protagonismo de los procedimientos documentados en la norma de referencia utilizada.

Con el enfoque basado en procesos de los sistemas de gestión de la calidad que propugnan los actuales modelos de gestión (como la familia de normas ISO y el modelo de excelencia EFQM) el “protagonismo” deja de estar centrado en la documentación y pasa a estar ocupado solo en los procesos y su gestión. La documentación será, en este contexto, la necesaria para asegurar que los procesos sean eficaces.

Dentro del ámbito de la implantación de las normas ISO 9001 y 15189, lo anterior no significa que haya que prescindir de documentos que antes sí existían y ahora no son exigidos por la norma sino que se debe de disponer de la documentación al servicio de los diferentes procesos, y de una manera operativa, ágil y manejable. Hay que recordar que, en gran medida, los servicios han realizado un importante esfuerzo por recoger su “como lo hacemos” o *know how* en los procedimientos escritos, como primer paso para la implantación de su sistema de calidad, y pueden emplearse como base para iniciar al mejora continua.

Esta necesidad, junto al auge de las tecnologías de la información y la comunicación, ha potenciado la utilización de representaciones gráficas para la aplicación del enfoque basado en procesos en los sistemas de gestión, lo que además es compatible con la existencia de otros sistemas de documentación clásicos.

Hoy en día, es prácticamente impensable prescindir de las tecnologías de la información disponibles para dar soporte a un sistema de gestión de la calidad con un enfoque basado en procesos.

En la actualidad, los servicios de hematología al igual que cualquier organización pueden optar por llevar a cabo el diseño de sus procesos de manera personalizada mediante aplicaciones informáticas a medida, o a través de aplicaciones comerciales que se pueden encontrar en el mercado muchas veces distribuidas a través de las diferentes compañías comerciales de diagnóstico clínico. En cualquiera de los casos la herramienta informática es, precisamente, una herramienta, y como tal no permite gestionar nada si “alguien” no “acciona” la misma, y para ello, es necesario saber en qué consiste y, por supuesto, los fundamentos de una gestión basada en procesos como representan las normas ISO-9001.

Es importante no caer en el error de convertir la aplicación informática y la representación gráfica de los procesos en protagonistas absolutos. En ocasiones las aplicaciones informáticas comerciales suelen permitir una

descripción de cuanto se quiera y al nivel que se desee; sin embargo, el objetivo principal que debemos perseguir en nuestro trabajo diario, no es una descripción exhaustiva de los procesos, sino la obtención de resultados fiables y de acuerdo a las necesidades de nuestros clientes.

---

## Presente y pasado de los sistemas de calidad en los servicios de hematología

El planteamiento de un servicio de hematología ante las aplicaciones informáticas para la gestión de calidad lo podemos relacionar directamente con el presente y el pasado de la implantación de los sistemas de calidad en nuestros servicios. Hace ya casi una década que se certificaron los primeros laboratorios de hematología. Comenzamos con estos temas como una cierta obligación. No siempre relacionábamos el sistema de calidad con los resultados. La mayor parte del personal técnico y muchas veces de la propia dirección creía de poca utilidad todo el trabajo que conllevaba. Se identificaba la certificación con un “papeleo” o burocracia que no revertía en el trabajo diario. A menudo incluso se interpretaba como una cuestión con un cierto coste para la organización y desde luego algo que todos nosotros hemos sufrido, la implantación y mantenimiento de un sistema de calidad certificado suponía una carga de trabajo adicional.

En la actualidad, la visión del futuro de los sistemas de gestión de la calidad en nuestros laboratorios ha cambiado:

Los sistemas de calidad implantados se ven como una herramienta de gestión inseparable de nuestro trabajo puramente asistencial u operativo-técnico. Muchos de nosotros comenzamos a verlo como una herramienta para la toma de decisiones. Consideramos que el sistema es una fuente de datos útiles para la mejora de nuestro servicio. Tenemos una descripción real de todos nuestros procesos. Todo el personal del servicio participa. Se ha instalado entre nosotros la visión de la mejora continua y la satisfacción del cliente.

Es posible que en un futuro no muy lejano las palabras excelencia y calidad estén presentes en nuestros laboratorios.

Las herramientas informáticas, de alguna manera, han estado presentes a lo largo de estos años. En la mayoría de los servicios es frecuente encontrar alguna aplicación del entorno de la ofimática adaptada a nuestras necesidades. Generalmente coexiste con la documentación en papel y no suele ir más allá de la gestión documental desde un punto de vista de archivador. En los últimos años han aparecido algunas aplicaciones para la gestión de la calidad enormemente útiles y que integran todas y cada una de las partes de cualquier sistema de calidad moderno aplicable a cualquiera de nuestros servicios.



---

## **Beneficios de las aplicaciones informáticas para la gestión del sistema de calidad en los laboratorios de hematología y servicios de transfusión**

### **Eficacia**

Representa una mayor eficacia en la administración de la información.

Aporta un ahorro de tiempo al reducir y simplificar las tareas administrativas.

Facilita la integración de los diferentes sistemas de gestión que se puedan dar en un mismo hospital o incluso en un mismo servicio (ISO, acreditación 15189, CAT, JACIE).

### **Agilidad**

Se pueden obtener informes, gráficos, listados, tendencias y cualquier consulta en general de manera rápida y sencilla.

### **Versatilidad**

Son herramientas flexibles, adaptables a cada servicio con independencia del tamaño, la complejidad o actividad.

Facilita la gestión tanto de la información como de sus recursos y conocimientos.

Se pueden tener registros totalmente personalizados para mediciones y controles.

### **Optimización de tareas**

Se basan en estructuras sencillas y homogéneas.

Ahorran esfuerzos en la gestión y distribución de la documentación y la información generada.

Suponen una centralización de toda la información del sistema, facilitando la búsqueda y la rápida obtención de resultados e informes.

Conllevan la eliminación de los registros en papel y virtualmente pueden considerarse como sistemas de calidad con papel "cero".

### **Mejora continua**

Aprovecha totalmente el llamado *know how* del servicio, de las fuentes de información y de los indicadores.

Simplifica el análisis de resultados y la toma de decisiones en las revisiones por la dirección para po-

der establecer planes de mejora y objetivos de calidad.

### **Entorno web frente a otros sistemas**

El entorno web como forma de trabajo de estas aplicaciones aporta unas ventajas adicionales como pueden ser:

Utilización desde cualquier ordenador con acceso a la red sin necesidad de instalación.

Se puede acceder en cualquier momento.

La instalación es sencilla y no requiere nada más que un navegador.

Se puede utilizar la red para la notificación de tareas o avisos. Tendríamos una herramienta para la comunicación interna.

---

## **Funcionalidades de las herramientas informáticas para la gestión total de los sistemas de calidad**

Se pueden integrar varias organizaciones servicios o sistemas a la vez.

Gestión del personal: fichas de personal, definición de puestos de trabajo, organigrama, perfiles de acceso individualizados a las diferentes partes del sistema.

Definición de procesos, áreas y procedimientos: formatos específicos, fichas de procesos, mapa de procesos, interrelaciones, diagramas de flujo, etc.

Planificación de indicadores de calidad, mediciones, representaciones gráficas, comparativas entre periodos, tendencias, validaciones de procesos y equipos, y registros de resultados.

Gestión de equipos e infraestructuras: fichas de equipos, planificación de mantenimiento, calibraciones, verificaciones y registros.

Definición de productos o servicios y seguir su evolución.

Gestionar datos de clientes y proveedores: mediciones de satisfacción con encuestas, representaciones gráficas y comparativas entre años y clientes. Definición de proveedores homologados. Seguimientos y evaluaciones.

Gestión de los requisitos legales con enlaces a todas las normas y legislación aplicable a nuestros laboratorios en tiempo real.

Formación: planificación, registro, evaluaciones. Validaciones del personal según definición de criterios previos. Paneles de conocimientos del personal de tu servicio.

Registros de incidencias, no conformidades. Posibilidad de seguimientos y análisis. Comprobaciones de eficacia.

Acciones correctivas, preventivas y de mejora. Registros, análisis, planificación y seguimientos.

Reclamaciones. Registro, análisis, seguimiento, generación de informes.

Herramientas de comunicación interna que permiten lanzar avisos personalizados a los usuarios así como simple elemento de información.

---

### **Características de las aplicaciones informáticas para la gestión total de la calidad en los laboratorios de hematología y servicios de transfusión**

Existen en el mercado nacional numerosas aplicaciones informáticas para la gestión “total” no solo documental de un sistema de calidad. En la página web de la asociación española de calidad ([www.aec.es](http://www.aec.es)) se pueden consultar hasta 120 aplicaciones distintas orientadas a diferentes organizaciones. En el ámbito sanitario y más concretamente en el sistema hospitalario del sistema público podemos destacar las aplicaciones BDI 9000® de TecnoQuality Consulting SL, Certool® de AENOR o Sacilab® de Vitro. Si consultamos directamente los listados publicados por estas compañías más de 20 hospitales o centros de transfusión de España cuentan con alguna de estas aplicaciones informáticas implantadas.

A modo de resumen se describen las funcionalidades de estos programas:

#### **Caraterísticas de BDI 9000®**

- Estructura de la organización o el servicio.
- Requerimientos legales y de sociedades científicas.
- Accesibilidad a los procesos a través de mapa de procesos.
- Documentación específica y del sistema de gestión de la calidad. Incluye control integral de la documentación con posibilidad de “papel cero”.
- Planificación de la calidad.
- Revisión del sistema de gestión de la calidad.
- Comunicación interna.
- Gestión de personal.
- Gestión de la formación. Validación de personal.
- Compras.
- Calibración y mantenimiento de equipos.
- Indicadores de calidad de proceso y de productos.
- Auditorías internas y externas.
- Incidencias. No conformidades.
- Reclamaciones.
- Estudios de opinión de clientes.
- Acciones correctoras preventivas y de mejora.

#### **Características de Certool®**

- Empresas o centros.
- Definición de procesos. Integración con el programa Microsoft Visio.
- Procesos-indicadores.
- Infraestructuras (equipos).
- Productos y servicios.
- Referencias legales.
- Clientes y proveedores.
- Generación de documentos. Revisión de documentos. Visor de documentos.
- Gestión de mediciones. Formatos. Registro de mediciones. Gráficos e informes.
- No conformidades. Acciones de mejora.
- Empleados.
- Formación.

#### **Características de Sacilab®**

- Aplicación escalable para adaptarse a un laboratorio se cualquier tamaño.
- Aplicación multiunidad y multiservicio.
- Gestión del personal. Formación y definición de puestos de trabajo.
- Gestión de entidades (proveedores).
- Gestión del diccionario de términos.
- Integración de normas de calidad y otros requisitos.
- Módulo de comunicaciones.
- Control del instrumental (equipos).
- Formulario de control integral de la información.
- Control integral de la documentación.
- Gestión de registros de calidad (incidencias, no conformidades, reclamaciones).
- Gestión de indicadores y objetivos.

---

### **Consideraciones finales**

Las aplicaciones informáticas para la gestión de la calidad utilizadas en los laboratorios y servicios de transfusión hematológicos se presentan actualmente como una herramienta indispensable para la realización de nuestro trabajo diario manteniendo los niveles más altos de calidad. Aportan una operatividad total de nuestro laboratorio, accediendo fácilmente a toda la información así como a su planificación, análisis y seguimiento. Indudablemente esta mejora incide positivamente sobre los sistemas de calidad de nuestros laboratorios así como la percepción que las personas implicadas tienen de ellos.

La mayoría de los programas disponibles en nuestro entorno son adaptables a todos los servicios y facilitan la implantación de un sistema de calidad hecho a medida.

## CAN AUTOMATED BLOOD FILM ANALYSIS REPLACE THE MANUAL DIFFERENTIAL?

C. BRIGGS, S.J. MACHIN

*Department of Haematology.*

*University College London Hospitals. London, UK*

Recent years has seen increasing demands for haematological tests with clearly defined turnaround times as well as cost containment. Staff members represent the major expenditure in most laboratories so staff numbers have remained static or have even been reduced; there is now more work for fewer laboratory scientists. Fortunately there have been advances in blood cell counting instrumentation resulting in a reduction in manual blood film reviews and white blood cell (WBC) differentials. The examination of blood films by microscopy is a labour intensive procedure and a reduction the number of films examined without missing important diagnostic information remains a challenge. Instrument differentials provide limited information on cell morphology using abnormal cell flags and are often unable to reliably classify abnormal and immature cells. A blood film is examined for a variety of reasons: to explain an unexpected blood count, to examine red cell and platelet morphology, to confirm an abnormal automated leucocyte count or to undertake an extended differential including immature and abnormal cells. The examination of blood films can be time consuming, imprecise and labour intensive but also requires highly trained staff.

The earliest automated imaging systems did not classify abnormal cells accurately and failed to provide significant improvements in workflow. However faster, more accurate systems have recently including the CellaVision DM96 (CellaVision AB, Lund Sweden). This instrument scans slides at low power to identify potential WBCs and takes digital images at high magnification for analysis by an artificial neural network and pre-classifies cells according to WBC class. Cells are presented on a com red cell and platelet morphology and estimation of the platelet count. The instrument does not however scan the edge or tail of the blood film which could mean that platelet clumps in the tail or occasional blast cells at the edge of the film are missed.

We have evaluated accuracy and precision of the DM96 in classification of leucocytes including abnormal and immature cells. Results from manual differentials from five different laboratory scientists' and those from the DM96 were compared with a standard reference manual differential. The accuracy of the differential from the DM96 is as good as that by a labo-

ratory scientist. However it is essential that the laboratory scientist operating the DM96 is skilled in blood cell morphology. The instrument precision is comparable to that of several individuals performing manual differentials on the same sample. The DM96 was faster than laboratory scientists, including those with considerable morphological experience.

For any automated image system to be introduced in the haematology laboratory it must demonstrate that it is at least as reliable, in correctly identifying WBC as the routine manual method and should also provide labour and cost savings to the laboratory.

## APLICACIONES INFORMÁTICAS PARA LA DESCENTRALIZACIÓN DEL TAO

M. VINUESA VILELLA

*Sección de Coagulación*

*y Servicio de Hematología y Hemoterapia.*

*Hospitales Universitarios Virgen del Rocío. Sevilla*

---

### Introducción

La prolongación de la esperanza de vida y por tanto, la edad media de los pacientes, la prevalencia de patologías susceptibles de tratamiento anticoagulante oral (TAO) y la mayor actividad quirúrgica de estas últimas décadas hace que la incidencia y prevalencia de la enfermedad tromboembólica venosa (ETV) se vaya incrementado.

A pesar de la profilaxis anti-trombótica tanto en pacientes médicos como quirúrgicos, la incidencia real de ETV se estima en 70-160 casos por 100.000 habitantes/año<sup>4</sup>; ello significa que estamos ante un grave problema de salud con una alta morbimortalidad.

En estos momentos, en España hay más de 650.000 pacientes en TAO; la utilidad y efectividad de este tratamiento está perfectamente contrastada tanto en la profilaxis primaria como secundaria. El problema reside en que esta cifra sigue incrementándose anualmente un 10-15% y en paralelo su necesidad asistencial (control analítico + control clínico).

En estos últimos cinco años hemos asistido y participado activamente en la organización de este colectivo tan numeroso y no menos importante que otros. A través del conocimiento, profesionalmente adquirido, se ha desarrollado en nuestro entorno un notable cambio cultural al implicar a otros profesionales sanitarios directamente relacionados con el tratamiento y seguimiento del paciente anticoagulado.

La descentralización está siendo un hecho irreversible surgido como solución a un problema de masifi-

cación en los servicios de hematología de nuestro país pero la diana u objetivo prioritario que ha impulsado este cambio ha sido el optimizar la atención al paciente anticoagulado, acercarle esa atención a su domicilio y a su centro de salud con el apoyo y respaldo de su hospital de referencia.

Las nuevas tecnologías de la información y comunicación (TIC) están colaborando a facilitar todo el proceso.

## Pasado

En el año 2000 se inició la era de la informatización en las secciones de coagulación de los hospitales de España. ¡Adiós cartillas cumplimentadas a mano! ¡vamos a tener un *ordenata* con una base de datos para los *sintroneros*! el  $\frac{1}{2}$  y el  $\frac{1}{4}$  va a salir dibujado en el informe...

¿Quién no recuerda la participación de la encuesta a escala nacional para conocer la realidad de la anticoagulación en nuestro medio?<sup>2</sup>

En el 2001 hay 380.000 paciente en TAO y coexisten ya tres modelos de gestión: centralizado (52,7%), el paciente acude al hospital para su control y pauta; descentralizado (3,9%), los pacientes se controlan y pautan sólo en los centros de salud, y mixto (43,4%), los pacientes se dosifican en el hospital pero la extracción se realiza en el centro de salud.

En ese momento sólo un 10% de los profesionales encuestados consideraba que el sistema ideal era el modelo de la descentralización. El 27,9% apostaba por el modelo centralizado y el 55,8% por el modelo mixto. El autocontrol se conocía pero, prácticamente, no se contemplaba.

La puesta en escena y utilización de los nuevos coagulómetros portátiles, fiables y de fácil manejo iba a favorecer y empujar el cambio.

Los estudios comparativos entre INR de tubo/citrato con sangre obtenida por venopunción *versus* INR por punción digital realizados en todas las consultas TAO del país con magníficos índices de correlación superiores a 0,8 favoreció la implantación de la punción digital y la realización de la primera parte de la descentralización o descentralización analítica hacia los centros de salud (CS) o centros de atención primaria (CAP) incluida la realización de la misma en el domicilio del paciente.

Empieza la era de los faxes, de los envíos, de las impresoras remotas que se quedan sin papel en el momento más inoportuno...

Se vislumbra la ventaja que supone que no todos los pacientes tengan que acudir al hospital para su control, que la realización de la punción digital con la obtención del INR inmediato acorta notablemente el proceso y que las salas de espera de las consultas podrían estar un poco menos masificadas.

El ensayo ACOA (Alternativa al Control Oral Anticoagulante)<sup>6</sup>, iniciado en el 2001 y desarrollado por el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona, marca un hito al valorar que un alto porcentaje (90%) de pacientes, sin condicionantes de edad ni nivel educativo, eran capaces de practicar ellos mismos el autocontrol en su domicilio, previa formación adecuada.

Pero en el hospital, el hematólogo necesitaba tiempo, espacio y un sistema informático capaz de dar una respuesta a las necesidades que estaban surgiendo en este colectivo cada vez más numeroso y complicado.

La indicación de la anticoagulación en pacientes con FA en la 6.ª Conferencia de Consenso Americana sobre tratamiento antitrombótico en el 2000<sup>(1)</sup> influyó directamente sobre las indicaciones cardiológicas y agravó la masificación.

La solución del programa informático no sólo debía servir para un determinado centro sino que debía ser un sistema que de forma bidireccional coordinara a tiempo real a todos los implicados: pacientes, enfermeras y médicos, en el proceso.

Necesitábamos una gran base de datos con los históricos clínicos y analíticos de los pacientes, sus complicaciones, datos sociodemográficos que a su vez pudiera ser compartida entre el hospital y los centros dependientes del mismo porque ni los sistemas aislados hospitalarios ni los módulos básicos que se utilizaban y utilizan todavía en atención primaria eran y son útiles.

En el 2002 la AEHH consensúa y edita las recomendaciones, todavía hoy vigentes, en las que el hematólogo, ante cualquier modelo de gestión de la descentralización del colectivo de pacientes anticoagulados es el responsable final<sup>(3)</sup>.

En el 2002-2003 se inicia la formación de la enfermería de los centros de salud, tanto para la determinación del INR por punción digital y el manejo del coagulómetro como los conocimientos sanitarios básicos de atención al paciente anticoagulado; se alerta sobre incidencias clínicas con o sin sangrado.

Se establecen controles de calidad programados mensualmente en los centros periféricos.

En 2005 en los Hospitales Universitarios Virgen del Rocío tuvimos la oportunidad de participar en el desarrollo de un sistema informático e-TAO junto a la Escuela Superior de Ingenieros y el Grupo de Investigación y desarrollo tecnológico del hospital que permitió objetivar a través de un sistema basado en estándares de comunicación, la coordinación a distancia pero *on line*, del hospital y centro de salud del área sanitaria obteniendo la disminución o acortamiento del tiempo real del proceso en más de 6 horas, manteniendo el histórico del paciente y uti-

lizando criterios de manejo básicos auspiciados por el hematólogo, ello permitía ya la descentralización del proceso<sup>5</sup>.

A nivel nacional se estaba tomando conciencia de que en los distintos sistemas sanitarios deberíamos poder disponer de soluciones informáticas que nos sirvieran de apoyo para el control y tratamiento del paciente anticoagulado y, efectivamente, se fueron adaptando estrategias y soluciones sobre la base de dos premisas:

1. El TAO no es sólo un control analítico sino un programa de salud con consulta propia, agenda, personal específico y objetivos anuales fijados en contrato programa.

2. Es un proyecto con repercusión sanitaria y social en el que también hay que valorar sea el modelo de descentralización que se plantee, un análisis de coste-efectividad.

## Presente

La situación actual va contemplando, en la mayor parte de los centros hospitalarios, una descentralización global del TAO hacia los centros de salud o de atención primaria, para ello es necesario disponer de una necesidades mínimas imprescindibles<sup>10</sup>.

PC o computadora con programa Adobe Reader.

Línea con conexión a Internet Explorer y al servidor del hospital.

Impresora conectada al PC.

Acceso, vía web, del programa informático que constituya la gran base de datos única y que a su vez garantice capacidad de crecimiento y estabilidad de funcionamiento, programa que pueda ser utilizado por niveles o perfiles de usuarios definibles tanto en atención especializada como en atención primaria y al cual se pueda acceder desde cualquier punto de la red del área sanitaria del hospital de referencia.

Programa que pueda garantizar la trazabilidad o rastreo del sistema quedando registrados: fecha, hora, control, cada usuario y centro.

Formación técnica de manejo del programa y del coagulómetro portátil y formación sanitaria para enfermería y médicos.

Manual de implantación en el que se incluya la formación, recomendaciones y se contemple un plan de contingencias.

Disponibilidad de autoanalizadores en número suficiente tanto para la consulta externa del hospital como para los centros de primaria, incluidos los necesarios para atención domiciliaria. Deben dar resultados en INR con rango:

< 1 hasta > 8; incluirán memoria de almacenamiento (30-40 resultados) y control interno y externo de ca-

Tabla 1. Asignación funcional del TAO

Atención especializada	Atención primaria
Pacientes nuevos	Pacientes estables
Altas hospitalarias	Protocolos quirúrgicos
Desplazados primera vez	Desplazados segunda vez y siguientes
Pacientes de alto riesgo	
Trombótico o hemorrágico	
Pacientes inestables*	
Pacientes con INR > 8	

\* Pacientes ya derivados a su centro de salud que en dos controles sucesivos distintos en el tiempo tengan INR 1-1,5.

lidad continua.

Tiras reactivas, estables a temperatura ambiente para los autoanalizadores.

Sistemas de punción digital automáticos y desechables para un máximo de unos 30 microlitros por punción.

Teléfono de contacto corporativo y/o línea directa al exterior.

Fax para poder utilizar frente a un plan de contingencia.

Espacio físico suficientemente amplio para poder desarrollar la consulta de enfermería y médica en acto único, ya sea en las consultas externas del hospital como en los centros de primaria.

Definir, antes de iniciar todo el procedimiento, **la asignación funcional del TAO** teniendo en cuenta que el flujo puede variar según la experiencia que vayan adquiriendo los profesionales implicados; se muestra un modelo propio que puede servir de base (Tabla 1).

## Ventajas de la descentralización global desarrollada a través de un sistema informático capaz. Resultados de un modelo organizativo en HH UU Virgen del Rocío

### Para los profesionales sanitarios: hematólogos, generalistas y enfermeros

Acceso a una base de datos única con información de los pacientes a tiempo real y desde distintos puntos asistenciales: 19.744 pacientes registrados en base de datos unificada y compartida (mayo-2009).

Mejora de la coordinación entre atención primaria y especializada para optimizar el seguimiento de los pacientes que planteen dudas o complicaciones; cambio cultural y una nueva realidad; 352 médicos, 413 enfermeros formados de 41 centros de salud, de 3 distritos sanitarios, en 10 cursos y sus talleres correspondientes.



Posibilidad de crear estadísticas locales, por centro, globales y comparativas.

**Para los pacientes**

Acerca el control y tratamiento a su entorno natural evitando desplazamientos al hospital: 65% de los pacientes estables ya se atienden en sus respectivos centros de salud.

Su médico y personal de enfermería de su centro de salud participan directamente de sus controles y tratamientos y son los primeros en detectar complicaciones con derivación *on line*, presencial o consultan por teléfono corporativo.

Acortan el tiempo de espera tras la visita y control, pudiendo disponer del informe de forma inmediata, si se organiza, como consultas de acto único.

**Para los gestores de la sanidad**

Posibilidad de diseñar estadísticas globales o por centros y obtener datos para estudios epidemiológicos y/o sociodemográficos.

Diseñar y obtener en este colectivo un plan de acción con menos costo y con más beneficio en términos de salud a medio y largo plazo, a través de distintas modalidades de control o de nuevos tratamientos anticoagulantes.

**Futuro**

Los profesionales implicados necesitamos que se mejoren los programas o sistemas informáticos a fin de **integrar en esa gran base de datos** o estación clínica central a:

- Pacientes internos hospitalizados.
- Pacientes externos del área sanitaria del hospital de referencia.
- Pacientes regionales que, a pesar de que no utilicen los mismos programas, puedan compatibilizarse.

Contemplar y recoger **distintas modalidades de control realizados** en distintos escenarios: hospital, centros periféricos, domicilio. En autocontrol o sólo en autoanálisis (Tabla 2).

**Desarrollar y potenciar el autocontrol**<sup>(7)</sup> a los pacientes anticoagulados que lo deseen. Formarles, diseñar y establecer relaciones paciente-centro de atención primaria-centro de atención especializada a través de sistemas informáticos conexiónados y personal sanitario ya preparado.

**Convencer a las consejerías de sanidad** de que la contribución a la financiación del coagulómetro portátil y, por tanto, al autocontrol de los pacientes anticoagulados, es una medida coste-beneficio eficaz<sup>(8,9)</sup>. A corto plazo, los costes adicionales se compensan por una mayor efectividad y repercusión positiva en términos de salud y negativa en cuanto a complicaciones. A medio-largo plazo (3-5 años), el coste es menor y mayor la efectividad (Figura 1).

En términos sanitarios globales se ha estimado que la introducción del autocontrol en un 30% de los pacientes españoles en TAO evitaría más de 18.000 complicaciones mayores y 10.000 muertes a los 5 años de su implantación.

Proporcionar **distintas modalidades de respuesta** a través de **teleasistencia** a partir de la posibilidad de varias salidas del sistema:

PC/web y correo electrónico, teléfono convencional o móvil y fax, tratando de obtener la normalización del paciente crónico.

Tabla 2

		Extracción	Técnica	Análisis	Dosificación y profesional	
<b>Hospitalario</b>	1	Hospitalario	Punción venosa Punción capilar	Hospital	Hospital hematológico	↑ Procesos centralizados
	2	Centro de salud	Punción venosa	Hospital	Hospital hematológico	
<b>Centro de salud</b>	3	Centro de salud	Punción capilar	Centro de salud	Hospital hematológico	↓ Procesos descentralizados
	4	Centro de salud	Punción capilar	Centro de salud	Centro de salud Médico de familia	
<b>Autocontrol</b>	5	Domicilio	Punción capilar	Domicilio	CS (médico) H (hematólogo)	↓ Procesos descentralizados
	6	Domicilio	Punción capilar	Domicilio	Domicilio Paciente	

Fuente: Elaboración propia Antares Consulting.

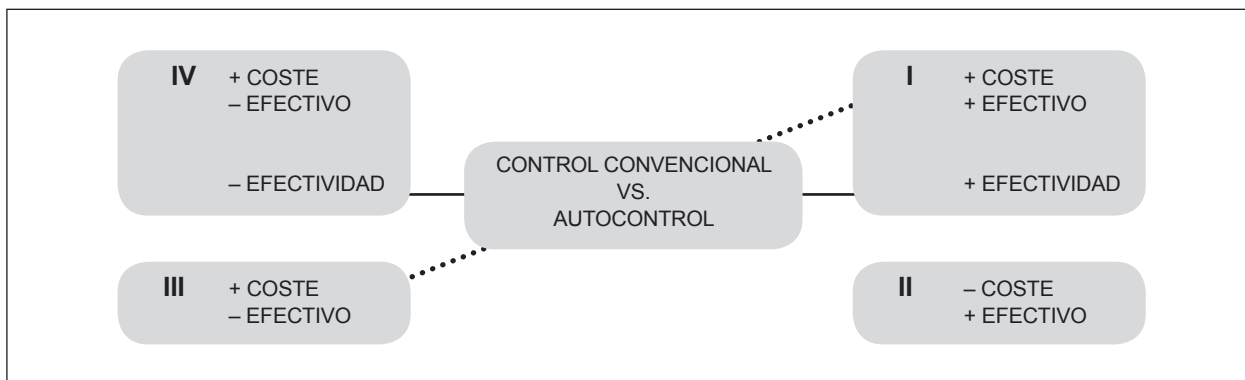


Figura 1. Análisis de coste-efectividad aplicado al TAO. I: coste de oportunidad ¿vale la pena plantearlo?; II: teoría dominante con repercusión efectiva en años de vida ganados.

## Conclusiones

- El hematólogo sigue siendo el responsable último de la organización y diseño de la descentralización en cualquier modelo asistencial.
- La descentralización global del TAO es prioritaria para la optimización de la atención del paciente anticoagulado y debe ir incluyendo paulatinamente, el autocontrol como cambio tecnológico necesario.
- Las tecnologías de la información y comunicación deben aportar soluciones que favorezcan la gestión integral de estos pacientes y todas las modalidades de control.
- Los distintos modelos de programas informáticos deben contemplar todos los escenarios posibles y favorecer las interconexiones.
- El desarrollo de la teleasistencia es ya una necesidad y su aplicación debe ser preferente para agilizar, todavía más, las respuestas.

## Bibliografía

1. Sexta Conferencia de Consenso sobre Tratamiento Antitrombótico. CHEST VOL.119/1 (Supl). Enero 2001.
2. López MF, et al. Situación actual de la gestión de la anticoagulación en España; resultados de la Encuesta Nacional. XLIII Reunión Nacional de la AEHH y XVII Congreso Nacional de la SETH, A Coruña 24-27, Octubre 2001.
3. Martínez Brotons, et al. Documento de Consenso y Posicionamiento Oficial de la AEHH y SETH. Octubre 2002.
4. White RH. The epidemiology of venous thromboembolism. Circulation 2003; 107: 1-4.
5. Leal S, Pérez P, Parra C, Ramos JM. Descentralización del servicio de atención a pacientes con tratamiento anticoagulante oral: rediseño del proceso asistencial. X Congreso Nacional de Informática de la Salud. Sistemas de información sanitaria, balance y perspectivas de futuro; 2007. p. 47-52.
6. Menéndez-Jándula B, Souto JC, Oliver A, et al. Comparing self-management of oral Anticoagulant therapy with clinic management. Annals of Internal Medicine 2005; 142: 1-10 Trial EC/00/111/1439 HCSCSP (Suppl II: 75-78).
7. Souto JC. Estrategia integral del control del tratamiento antitrombótico. Propuesta para los próximos años. Haematologica (ed esp) 2006; 91 (Supl 1).
8. Jowet S, Bryan S, et al. Patient self-management of anticoagulation therapy: a trial based cost-effectiveness analysis. BJH 2006; 134: 632-9.
9. Regier DA, Suderji R, Lynd LD, Gin K, et al. Cost-effectiveness of self-managed versus physician-managed oral anticoagulation therapy. CMAJ 2006; 174: 1847-52.
10. Vinuesa M, Monedero M, Digón J, Benot S, et al. Manual de implantación para la descentralización global del tratamiento con anticoagulantes orales (v.2.0), Servicio de Hematología y Hemoterapia y Subdirección de Centros Diagnósticos Hospitales Universitarios Virgen del Rocío. Sevilla 2008.

# Endotelio y plaquetas: de la biología al tratamiento

COORDINADORES: P. GARCÍA DE FRUTOS. *Barcelona*  
J.A. PÁRAMO. *Pamplona*

## Resumen del simposio

El papel de las células endoteliales y las plaquetas, decisivas en los procesos de hemostasia y trombosis, será el tema que se abordará en profundidad en el simposio.

El endotelio vascular, la capa monocelular que recubre el interior de los vasos, es un órgano complejo que se encuentra estratégicamente situado en la interfase entre la sangre y los tejidos para responder a diversos estímulos fisiológicos y patológicos. Mientras que el endotelio sano podría considerarse un “barómetro” de salud cardiovascular, la pérdida de funcionalidad endotelial se asocia con numerosas condiciones clínicas relacionadas con fenómenos trombóticos. Encontrar un método de determinación del estado de la función endotelial se ha convertido en un objetivo biomédico de gran interés. El Dr. G. Lip *et al.* (Birmingham, RU) plantean si existen en la actualidad herramientas útiles para determinar la función endotelial, que puedan ser aplicadas con finalidad diagnóstica, pronóstica o terapéutica. Para ello definen el concepto de disfunción endotelial como una alteración de las funciones reguladoras del endotelio, que conllevan un fenotipo proinflamatorio, proliferativo y protrombótico. La función endotelial puede determinarse directamente, con métodos invasivos o no invasivos, o indirectamente, midiendo los niveles circulantes de biomarcadores liberados por las células endoteliales en respuesta a una agresión. Entre los métodos invasivos destacan la capacidad vasodilatadora endotelial mediada por óxido nítrico en respuesta a estímulos farmacológicos (acetilcolina) o la pletismografía, que permite evaluar la función de arterias de resistencia. Entre los métodos no invasivos se puede determinar el flujo y actividad metabólica coronaria mediante tomografía con positrones (PET) o la dilatación de una arteria (generalmente braquial) mediada por flujo (FMD), en respuesta a estímulos químicos o mecánicos, midiendo dicho flujo con ultrasonidos o láser. Sin embargo, son técnicas que requieren equipos y personal especializado, por lo que están restringidas al ámbito de la investigación clínica. Entre los marcadores de disfunción endotelial, el factor von Willebrand (FvW), la endotelina-1 (ET-1), VCAM-1, selectina-E, proteína C-reactiva (PCR) y células endoteliales circulantes (CEC) podrían ser de interés para determinar el grado de disfunción, sin que en el momento actual pueda decirse que existe un marcador “universal” de función endotelial.

Un aspecto que está cobrando cada vez más relevancia clínica es el papel de las micropartículas (MP), fragmentos de membrana liberados tras activación o apoptosis por diversos tipos celulares, como células endoteliales, plaquetas y monocitos, en patologías trombóticas. Las MP poseen actividad procoagulante en su superficie al exponer fosfolípidos, como fosfatidilserina, que activan la coagulación. El Dr. E. Anglés-Cano (Caen, Francia) formula un nuevo papel de las MP a raíz de experimentos recientes de su grupo. Las MP endoteliales expresan también actividad fibrinolítica, ya que tras estimulación puede generarse plasmina en su superficie. Sus trabajos demuestran que activadores y receptores fibrinolíticos, como u-PA y u-PAR, están presentes en la superficie de las MP, lo que favorece la activación del plasminógeno. A través de este mecanismo, las MP podrían jugar un papel fundamental, no sólo en el proceso fibrinolítico, sino también en la inflamación, migración celular y angiogénesis. Un aspecto interesante es que MP con potencial fibrinolítico pueden ser detectadas a nivel de la circulación en pacientes con procesos cardiovasculares y, por lo tanto, usadas en el diagnóstico.

Más allá de su participación fundamental en el proceso hemostático, como primera línea de defensa antihemorrágica tras una lesión vascular, las plaquetas juegan un papel clave en la inflamación, almacenando y liberando numerosos factores proinflamatorios. La Dra. T. Santos (Valencia) revisa este importante aspecto de la participación plaquetaria en la aterotrombosis, incluyendo los procesos de adhesión celular, al interaccionar con un endotelio disfuncionante, así como con células endoteliales progenitoras, el reclutamiento

de células inflamatorias al vaso, la interacción con leucocitos a través de selectina-P, la liberación de quimioquinas como RANTES y de citocinas como CD40L, y su papel en la coagulación y proteólisis. Se presentan evidencias de que las plaquetas intervienen decisivamente en la inflamación y que ésta, a su vez, puede activar las plaquetas. Finalmente, se discute el hecho de que agentes farmacológicos con acciones antiplaquetarias también poseen propiedades antiinflamatorias.

En diversas patologías cardiovasculares, la aplicación de doble terapia anticoagulante/antiagregante, incluso triple terapia antitrombótica, está justificada por la marcada activación plaquetaria y de la coagulación. Sin embargo, su administración no está exenta de complicaciones hemorrágicas. La Dra. M. Heras (Barcelona) discute el papel de la terapia anticoagulante/antiagregante en la prevención secundaria de la cardiopatía isquémica en pacientes con alto riesgo embólico, en prótesis valvulares con cardiopatía isquémica o ACV embólico, y en fibrilación auricular con riesgo embólico, sobre la base de su gran experiencia personal y las recientes recomendaciones y guías clínicas. El tratamiento antitrombótico triple con dicumarínicos/aspirina/clopidogrel está indicado en pacientes con *stent* e indicación para anticoagulación. Se revisan, asimismo, los factores predictores de hemorragia grave que pueden tener un impacto desfavorable en términos de mortalidad y sobre la incidencia de eventos isquémicos. Se concluye que la selección adecuada de pacientes tributarios de doble o triple terapia antitrombótica será, por consiguiente, fundamental para evitar graves complicaciones.

## THE EVALUATION OF THE ENDOTHELIUM: RECENT CONCEPTS

A. BLANN, S. APOSTOLAKIS,  
E. SHANTSILA, G.Y.H. LIP

*Haemostasis Thrombosis and Vascular Biology Unit,  
University Department of Medicine. City Hospital,  
Birmingham, UK*

The endothelium is a monolayer of cells uniquely positioned at the interface between the vessel wall and the flowing blood. Structural heterogeneity of endothelium along the vascular tree and complexity of its biological activities exerts multiple important functions for maintenance of vascular homeostasis including the regulation of coagulation and vascular permeability, the modulation of the vessel tone, participation in inflammatory processes, adaptation to haemodynamic changes and many others. Moreover, the endothelium acts as a barrier and thereby controls the adhesion and invasion of immune competent cells.

The integrity of the endothelial monolayer is crucial to preserve these functions. The purpose of the present review is to answer the question whether we currently possess reliable tool(s) to assess endothelial function as well as whether we can apply these approaches for diagnostic and prognostic purposes or disease management. In order to understand the complexity of these questions it is however essential to present the evolution of our knowledge on a structure of endothelium is increasingly appreciated as the most biologically active component of the vascular wall.

---

### The past: fifteen centuries of unappreciation

The endothelium was structurally identified a century ago but only recently it has been recognized as a physiologically distinct organ. Moreover, the concept of a functional vascular wall was overlooked for centuries. Interestingly, Hippocrates and Galen considered that the vasculature consisted of two, unlinked systems: arteries and veins

Indeed, Galen believed that arteries contained air and vital spirits, whereas veins carried blood that was continuously formed in the liver<sup>1</sup>. This erroneous theory of the circulation dominated medical science for more than 15 centuries. In the beginning of the 17<sup>th</sup> century, the English physician William Harvey disproved Galen's theory and was the first scientist in the western world to describe correctly and accurately the systemic and pulmonary circulation<sup>1</sup>. Through a series of elegant physiological experiments, he demonstrated that arteries and veins are in fact connected and that blood

is contained within a closed circulation. Harvey first described the anatomy of the cardiovascular system, but technical limitations of his era prevent him from identifying the complexity of the microcirculation and vascular wall structure. Subsequently, compound microscopy enabled the Italian physician Marcello Malpighi to actually observe blood capillaries in 1661<sup>1</sup>.

However, the term 'endothelium' was introduced in the scientific literature only two centuries later by the Swiss anatomist Wilhelm His<sup>1</sup>. The initial definition of endothelium included the cells lining blood and lymphatic vessels, and mesothelial-lined cavities. Consequently the definition would narrow to include only the inner cell layer of blood vessels and lymphatics<sup>1</sup>.

---

### The present: structural and functional complexity

In the 1950s, the use of electron microscopy provided a new powerful insight into the structure of endothelium. It was soon revealed that endothelium structure is actually rather complex and diversity of the endothelial phenotype was demonstrated to be organ-specific<sup>1,2</sup>. Additionally, the evolution of biochemistry and cellular biology paralleled with recognition that endothelial (ECs) are capable of producing of numerous biologically active substances in response to both mechanical and chemical stimuli. These findings have placed the endothelium in a unique position as a structurally and functionally complex organ<sup>1,2</sup>.

The structural heterogeneity of ECs makes the definition of the endothelium challenging. Many of the characteristic structural features of the endothelium, such as Weibel-Palade bodies or fenestrae, are not present in every EC<sup>1,3</sup>. Developmentally, the endothelium arises from mesoderm via the differentiation of hemangioblasts and/or angioblasts. However, other cell lineages may transdifferentiate into ECs. Of note, there are also currently no protein or mRNA markers that are both specifically and uniformly expressed in the endothelium<sup>1</sup>. In addition to the structural diversity, from the functional standpoint, the endothelium also displays a remarkable heterogeneity. For example, ECs that line the post-capillary venules are primarily responsible for mediating leukocyte trafficking, whilst arteriolar ECs are critical for the regulation of vasomotor tone<sup>3</sup>.

In the following sections, we will summarize the main functions of the endothelium. The biological activities of the endothelium are complex and many pathways interact with each other. For instance, the endothelium is largely responsible for the balance between preservation of blood fluidity without clotting and prompt response to vascular injury. Of note, many



biological responses of the endothelium have only been observed in culture, where artificial conditions may dramatically alter the profile of gene expression as compared to the naturally functioning cells. Therefore, caution should be taken in translating these *in vitro* results to *in vivo* biochemical pathways.

### **Endothelium and blood flow**

The healthy endothelium is a metabolically active interface between the blood and extravascular tissues. Its intimal surface is anticoagulant and antithrombotic, partly due to the negatively charged glycocalyx, which is made up of glycoproteins, glycosaminoglycans, chondroitin sulfate, and heparan sulfate<sup>4</sup>. Additionally, healthy endothelium actively produce anticoagulant substances: thrombomodulin, tissue factor pathway inhibitor, tissue activator of plasminogen, as well as constitutively express natural inhibitors of platelet activity: cAMP and nitric oxide (NO). Regulation of the transference of fluidics between intravascular space and tissues is largely dependant of permeability of the endothelium serving as a barrier for loss of fluid through the vessel wall. Moreover, ECs can sense shear stress and respond to its fluctuations via short-term and long-term effects. Alterations in shear stress rapidly modulate the production of vasoactive substances, such as NO, prostacyclin, histamine and endothelin (ET), and regulates macromolecule permeability and endocytosis. Long-term effects mediated by vascular wall shear stress are associated with adaptive vessel growth and angiogenesis. Although it is known that endothelial cells can differentiate various modes of shear forces the details of the mechanisms underlying sensing of blood flow or shear stress changes and resulting in intracellular signaling are still to be discovered. Perhaps the cytoskeleton provides a structural framework to transmit mechanical forces between luminal, abluminal and junctional surfaces of ECs and their interior. It has been also proposed that intracellular calcium and the membrane potential are involved in the mechanical-sensing mechanism of ECs<sup>5</sup>. Nonetheless, biomechanics of the endothelium is an active and challenging field of research, investigating the pathways involved in blood flow-dependent vessel growth and in vascular remodeling.

### **Vascular tone and flow regulation**

The endothelium plays a vital role in the control of vasomotor tone by synthesizing both vasodilating and vasoconstricting factors<sup>6</sup>. Endothelium-dependant vasodilation is largely mediated by prostacyclin and nitric oxide (NO). Prostacyclin is derived

from arachidonic acid metabolism with the enzyme cyclooxygenase being responsible for its synthesis in EC. Prostacyclin produces vasodilation by stimulating adenylate cyclase, which increases cyclic adenosine monophosphate levels in vascular smooth muscle cells (VSMCs). The release of prostacyclin is stimulated by either shear stress or endogenous mediators such as bradykinin, thrombin and serotonin. A second potent vasodilating agent produced by ECs is endothelium derived relaxing factor, which was identified as NO. Nitric oxide is synthesized in the ECs by the reaction of NO-synthase on L-arginine. NO diffuses from the ECs towards the VSMCs where it stimulates soluble guanylate cyclase, which increases cyclic guanine monophosphate (cGMP). This leads to a decrease in intracellular calcium, VSMCs relaxation and subsequently vasodilatation. NO is generated by EC continuously but its production can substantially increase in response to physiologic shear stress and numerous vasoactive substances, including acetylcholine, bradykinin, and thrombin. NO has a very short half life since it is rapidly inactivated in the blood by hemoglobin or superoxide radicals in the vascular wall<sup>6</sup>. Another vasodilating factor released by EC following stimulation by acetylcholine has been described as endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF). Although its exact biological nature is still miraculous EDHF is considered to be a substance and/or an electrical signal that is generated in the endothelium and can cause transient changes in the membrane potential of VSMCs<sup>6</sup>. When acetylcholine activates M1 muscarinic receptors, NO is released, whereas activation of M2 muscarinic receptors leads to EDHF expression.

To warrant a balanced regulation of vascular tone and ultimately blood flow distribution endothelium is also equipped with several vasoconstrictors. In fact the endothelium can release the most potent of currently known active vasoconstrictive compound, endothelin 1, with a potency 10 times greater than that of angiotensin II. Endothelins are 21-amino acid vasoconstricting peptides, but only endothelin-1 is exclusively expressed by ECs. Three different endothelin receptors (ET<sub>A</sub>, ET<sub>B</sub>, and ET<sub>C</sub>) have been identified. Among them ET<sub>A</sub> has higher affinity for endothelin-1 than do the other two isoforms. ET<sub>A</sub> is found on VSMCs where it induces vasoconstriction<sup>7</sup>. Finally ECs can indirectly confer to vasoconstriction by producing angiotensin-converting enzyme (ACE)<sup>8</sup>.

### **Thrombosis and haemostasis**

ECs play significant role in both the promotion and the inhibition of coagulation<sup>9</sup>. Platelet activating factor, a potent stimulus for platelet aggregation, is se-

creted by ECs activated by either trauma or exposure to various cytokines. The endothelium also synthesizes von Willebrand factor (vWF), a platelet adhesion protein that is found mainly in the subendothelium and extracellular matrix, areas that do not normally interact with platelets unless exposed by injury. Endothelial cells stimulated by thrombin secrete vWF from storage vesicles called Weibel-Palade bodies. Tissue factor (TF) can also be expressed on activated ECs. Factor VII binds to TF, becomes activated on the EC surface, and remains active only as long as it is bound to TF<sup>1,9</sup>.

On the other hand, ECs possess many mechanisms to inhibit clotting. One is mediated by the tissue factor pathway inhibitor (TFPI). TFPI is a protein found in plasma and bound to the endothelium. TFPI forms a complex with factor Xa and reversibly inhibits it – hence, preventing thrombin generation. Additionally factor Xa-TFPI complex can inhibit the factor VIIa-TF complex. Endothelium can also prevent excessive coagulation via protein C/protein S pathway. Thrombin binds to the EC receptor thrombomodulin, which activates protein C. Activated protein C reacts with the membrane-bound protein S and inactivates clotting factors Va and VIIIa<sup>1,9</sup>.

### **Cell to cell interaction and response to injury**

When injured by mechanical or biochemical stimuli, ECs exhibit a spectrum of responses. Acute endothelial responses to injury or inflammatory stimuli occur within the first minutes of stimulation and do not depend on de novo mRNA synthesis. These responses include the release of numerous endothelial derived bio-active compounds such as vasodilators and vasoconstrictors, modulators of platelet function, prothrombotic and pro-inflammatory compounds. Local generation of endothelial-derived platelet activating factor and P-selectin plays an important role in the activation and adhesion of circulating polymorphonuclear leukocytes. ECs can also produce leukotrienes (eg, LTB<sub>4</sub>), important mediators of inflammation. LTB<sub>4</sub> have a chemotactic effect on neutrophils promoting their migration to tissues and is implicated in the regulation of vascular permeability<sup>10</sup>.

Dysfunctional endothelium also produce various chemokines. These low molecular weight chemotactic cytokines create a concentration gradient targeting the damaged area and promote activation of circulating monocytes as well as their adhesion to the endothelial surface and accumulation into the vascular wall<sup>(11)</sup>. The process of leukocyte recruitment is comprehensively regulated by different adhesion molecules expressed both on the leukocyte and endothelial membrane. In the early phases of inflammation,

leukocytes transiently adhere to the vessel wall in a process termed “rolling”. Rolling of leukocytes is mediated by a family of adhesion molecules called selectins, expressed both on the leukocyte and endothelial surface. Other adhesion molecules and chemotactic agents act in a complementary way, with selectins stabilizing polymorphonuclear cell adhesion and mediating their transendothelial migration into the inflamed foci<sup>11</sup>. However, exact details on how leukocytes can migrate through the inter-endothelial junctions are poorly understood. An interesting possibility is that leukocyte adhesion to ECs could trigger intracellular signals that in turn can mediate junction disassembly<sup>10,11</sup>.

### **The concept of endothelial dysfunction**

In 1980 Furchgott and Zawadzki first observed that vessel rings relax when exposed to substances such as acetylcholine in the presence of an intact endothelium but contract under conditions of endothelial injury<sup>12</sup>. Since then our knowledge on the pathophysiology of ED has evolved leading to the currently prevailing theory of atherosclerosis that considers injury of the endothelium as the initial stage of atherogenesis.

The integrative effect of healthy endothelium is the generation of an antithrombotic, anti-inflammatory, antiproliferative, and anticonstrictive vascular environment. Obviously, upon mechanical removal of the endothelium these beneficial effects are eliminated. Interestingly, the very same consequences are observed under the effect of various biochemical and physical factors associated with cardiovascular disease, including hypercholesterolemia and hyperglycemia. Even though these factors do not structurally affect ECs, they do alter EC functionally leading to the development of a prothrombotic, pro-inflammatory, proproliferative, and proconstrictive shift in the vascular environment.

To denote the dynamic nature of these changes, the term endothelial activation has been increasingly suggested in addition to the commonly used term ‘endothelial dysfunction’ (ED). Defining ED is nevertheless challenging<sup>13</sup>. The classic concept of ED involves the impairment of the regulatory function of the endothelium most markedly reflected in the impairment of endothelium-dependent vasorelaxation. The classic view of ED denotes the systemic nature of the condition and now includes disruption in mechanisms of endothelial repair. Hence, ED is best defined as an alteration of the regulatory function of the endothelium that leads to prothrombotic, pro-inflammatory, proproliferative, and proconstrictive activation of ECs with impairment in endothelial repair<sup>13</sup>.

## **The future: the endothelium in disease management practices**

### ***The endothelium as a disease marker***

Loss of the functional integrity of the endothelium, is commonly seen in the presence of cardiovascular risk factors. ED may be considered as the initial step of atherogenesis and recognition of ED could be the earliest marker of subclinical cardiovascular disease. Prospective studies demonstrated that impaired NO-mediated vasodilation is a reliable characteristic of ED and an independent predictor of adverse cardiac events<sup>14</sup>. Although the number of established techniques can assess NO-mediated vasodilatation none of the existing methods has been proved clinically applicable and most of them are restricted to research facilities. Moreover, the concept of ED does not merely involve reduced NO bioavailability and other endothelial activities can also be affected (eg, changes in permeability, coagulation regulation and proinflammatory shift)<sup>13</sup>. These biological actions are often undervalued in as potential markers of ED.

### ***Measuring endothelial dysfunction***

Endothelial function can be assessed directly or indirectly. Direct measurement of ED can be performed invasively or non-invasively and is largely based on quantitative evaluation of endothelium dependent vasodilatation. Indirect measurement of ED is merely based on plasma concentrations of biomarkers released by the injured ECs.

### ***Invasive assessment of endothelial dysfunction***

Direct in vivo measurement of endothelial vasomotor activity is currently the 'gold standard' for the assessment of ED. It is performed by estimation the magnitude of the vasodilatation following stimulation with pharmacological compounds that enhance the endothelial release of NO<sup>18</sup>. Usually, an invasive technique is applied for the assessment of coronary endothelial function. During coronary angiography, quantitative angiography is performed before and after intracoronary injection of acetylcholine, which triggers NO release from ECs. Acetylcholine causes vasodilatation in the presence of normal endothelial function, whereas in the presence of ED paradoxically results in vasoconstriction<sup>8,18</sup>. Coronary ED has been proved a powerful predictor of cardiovascular events.

Ex vivo testing can be applied for the study of the endothelium of subcutaneous fat resistance arter-

ies. Arteries are obtained from gluteal or anterior abdominal region biopsies made under local anesthesia and are mounted immediately after biopsy and dissection on an isometric or a pressurized myograph. Comparative studies of the endothelium and non-endothelium relaxation are performed after vessels precontraction (usually with norepinephrine). The advantages of this technique are the direct, precise and reliable assessment of the structural changes of the small arteries. However, this method requires invasive acquisition of tissue. Moreover, it is not yet known whether endothelial function in subcutaneous microvasculature is representative of other vascular beds, in particular, of the cerebral and cardiac circulation<sup>8,19</sup>.

Finally, endothelial function can also be assessed invasively in the forearm by using plethysmography. The measurement of forearm blood flow response to vasoactive agents using strain-gauge plethysmography is the 'gold standard' for assessing endothelial function in resistance arteries. Limb blood flow is measured by utilizing venous occlusion plethysmography following intra-arterial infusion of endothelium-independent or endothelium-dependent vasodilator substances. Plethysmography has been utilized in the assessment of the effects of various cardiovascular risk factors on endothelial function and its response to therapeutical intervention<sup>19</sup>.

### ***Non-invasive assessment of endothelial dysfunction***

The main potential clinical implication of endothelial function evaluation is risk stratification of patients with suspected subclinical cardiovascular disease. Therefore, less invasive methods for the evaluation of endothelial function have been developed. Coronary blood flow and metabolic activity can be quantified with positron emission tomography (PET). Furthermore, the calculation of coronary flow reserve is possible by measuring basal and hyperaemic blood flow after pharmacological stimulation with intravenously injected dipyridamole or adenosine. This technique was also utilised to demonstrate ED in asymptomatic healthy subjects with cardiovascular risk factors including dyslipidaemia and hypertension<sup>20</sup>. However, the high costs and limited availability render this technique unsuitable for routine endothelial function testing.

The commonest non-invasive method for the investigation of endothelial function is measurement of flow-mediated dilation (FMD) of a selected artery. Infusion of endothelial stimulators (eg, acetylcholine) or increased shear stress (eg, with the test with reactive hyperemia) is employed to judge va-

somotor activity of endothelium. It is presumed that magnitude of FMD reflects NO release by ECs in response to a stimulus applied. FMD is calculated as percentage of changes of an artery diameter (usually brachial or radial artery is used) registered using high-resolution high-frequency ultrasound. FMD has been proven to be an accurate and reproducible tools for investigation of endothelial performance. Its main attraction relates to its non-invasive nature and opportunity to make repeated measurements. Nonetheless, FMD requires specialized and rather expensive equipment and a skilled operator to produce valid, reproducible data. Additionally, a researcher should keep in mind the number of factors that can affect its result. For example, FMD is very sensitive to the environment and the temperature should be maintained at the same levels by air conditioning. A patient should rest in a relaxed position for 15-20 minutes prior the test. All medicines which may affect vascular tone (eg, nitrates, ACE inhibitors, calcium blockers) have to be temporarily stopped in advance. Finally diurnal variations of endothelial activity are well described. These relative disadvantages restrict the use of this method to dedicated clinical research centers. However, new technologies, such as improved imaging, computer analysis of the ultrasound sequences and wall tracking system, are expected to advance this technique, possibly making it a suitable for routine clinical practice<sup>20</sup>.

Whilst FMD assessment is a popular choice for evaluation of endothelial performance of bigger arteries, laser Doppler flowmetry is a method of choice for assessment of microvascular endothelial function. Coherent light emitted by a laser can not penetrate deeply into the tissues but warrant sufficient resolution to analyze endothelial-dependent dynamics of microcirculation (eg, on arteriolar level). Application of acetylcholine by iontophoresis is often used to investigate endothelium-dependent response. Although the approach is non-invasive and relative non-expensive it also has several limitations. First of all it can be applied on to the surface tissues and techniques where internal tissues are scanned (eg, during surgery) should be considered as invasive. Results of microvascular blood flow measurement may depend on content of melanin in skin and thus should be considered as semi-quantitative. Accordingly changes in the registered 'blood flow' rather than absolute numbers are used for analyses.

Importantly, to obtain valuable results simultaneous measurement of endothelial-independent response (eg, with GTN for FMD and sodium nitroprusside) should always be performed. Finally, reproducibility of the approach chosen should be verified department before it is used.

### **Plasma and cellular biomarkers of endothelial dysfunction**

There two major reasons of plasma elevation of markers characteristic of ED. Firstly, injury to the endothelium may lead to the discharge of various substances from ECs, which are then detectable in the plasma. Secondly, dysfunctional endothelium may up-regulate expression of different proteins, some of which can serve useful markers of endothelial damage/dysfunction<sup>14</sup>.

von Willebrand factor (vWF) is released from endothelial Weibel-Palade bodies of dysfunctional ECs. It is considered a reliable measure of endothelial damage and has been found increased in various cardiovascular diseases. Plasma vWF can be measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Of note, although plasma vWF has been proven to be a sensitive prognostic marker of cardiovascular disease lack of specificity limits its clinical applications<sup>14</sup>.

The potential role endothelin 1 as a marker of ED has been justified on the basis of its association with strong vasoconstrictor, mitogenic, and pro-inflammatory effects. Additionally, endothelin release is also enhanced by hypoxia, shear stress, pro-inflammatory cytokines, and angiotensin II. Elevated endothelin 1 levels have been found to parallel with ED in hypertension, dyslipidaemia, type 2 diabetes mellitus, atherosclerosis, heart failure, and acute myocardial infarction<sup>(8,9)</sup>.

Vascular cell adhesion molecule-1 is a protein expressed on the surface of activated ECs. Part of the protein may be shed into the blood and can be detected as soluble VCAM. Endothelial overexpression of VCAM-1 is an early manifestation of atherosclerosis, but the marker further up-regulated in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy. Despite some promising data, soluble VCAM has still not been sufficiently tested in clinical settings to judge its role as a diagnostic or prognostic parameter of cardiovascular disease<sup>8,15,16</sup>.

E-selectin, is a cell adhesion molecule exclusively expressed by ECs activated by inflammatory stimuli. E-selectin mediates the interaction between leukocytes, platelets and the endothelium. As healthy ECs hardly express E-selectin whilst the molecule actively produced in the settings of endothelial activation: hypertension, diabetes mellitus, coronary artery disease. Moreover, plasma E-selectin levels appear to correlate well with cardiovascular mortality among patients with coronary artery disease<sup>16</sup>.

Plasma levels of NO have also been proposed as a potential marker of ED and can be evaluated using gas chromatography or chemiluminescence. However, given that the life span of NO is very short the measurement of stable NO products such NO<sub>2</sub>. Addi-



tionally, cGMP, a second messenger closely involved in transferring the signal of NO to VSMCs, can be detected in urine and reflect changes in NO production rates *in vivo*. However, NO and its metabolites may originate from non-endothelial sources. Furthermore, these assays are strongly dependent on nutritional intake, which can vary widely from day to day, rendering these methods impractical for routine use<sup>15</sup>.

C-reactive protein (CRP) is a recognized marker of vascular inflammation having a predictive power of long-term prognosis in patients with stable or unstable coronary artery disease and even in apparently healthy men. Several studies have recently shown that elevated CRP levels are closely associated with impaired endothelial vasodilator function. Currently circulating high-sensitivity CRP can be considered not only as the most sensitive and accurate marker of vascular inflammation but also as the only clinically applicable marker of ED<sup>9,16</sup>.

Normally ECs are extremely rare in the circulation, but under certain pathological conditions ECs can be shed into circulation and detected as circulating endothelial cells (CECs) and serve as a marker of endothelial damage. CECs well correlate to other indices of ED, such as plasma vWf and impaired flow mediated dilation (FMD) and increased various inflammatory, immune, infectious, neoplastic and cardiovascular disease<sup>17</sup>. More recently, bone marrow-derived circulating endothelial progenitor cells (EPCs) have been shown to migrate into damaged endothelium and restore its integrity. In contrast to CECs, cardiovascular risk factors such as diabetes mellitus, hypertension and smoking result in a depletion of EPCs. Consequently, the ratio of EPCs to CECs has been suggested as a potential characteristic of balance of endothelial damage/recovery.

In summary, there is currently no universal marker of ED and it is unlikely that any future biomarker would be able to reliably characterize the universe of endothelial activities. More probably the future directions will be related to characterization of specific aspects of endothelium function (eg, pro- or anticoagulant activity) in the context of the correspondent system in general (eg, haemostatic/coagulant system).

### **The endothelium as therapeutic target**

The endothelium is a highly attractive therapeutic target. It is rapidly and preferentially exposed to systemically administered agents. Nevertheless, an important challenge is to learn how to determine the nature of that ideal state of endothelial activation since the transition between EC function and dysfunction is not al-

ways clear. EC dysfunction usually arises from otherwise adaptive responses that are now excessive and sustained. It is therefore important to avoid over depression of the desired effects and remember that an active endothelium is often a healthy endothelium. Another concern when searching for endothelium based therapies is that ECs vary structurally and functionally based on their location in the vascular tree. Modulation of endothelial function non-specifically in the vasculature could be catastrophic. For instance, blocking monocyte-EC interaction in the coronary circulation could act favorably attenuating atherosclerosis. However the same effect in the pulmonary microcirculation could make the host vulnerable to lethal respiratory tract infections.

Thus, the endothelium due to its strategic, ubiquitous interface position between blood and the surrounding tissue performs a variety of critical responses to both physiologic and pathophysiologic stimuli. Although originally considered as a passive inert vascular lining cell, we now know that the ECs play important roles in the regulation of vascular tone, coagulation, cell proliferation, and immune responses. Our understanding of EC physiology has increased exponentially over the last two decades, but we are only now begging to apply *in vitro* derived knowledge in disease management practices. It seems like the endothelium will remain the center of attention in cardiovascular research for the years to come. Future advances in diagnosis and therapy will rely on increasing our detailed understanding of EC function and structural complexity.

---

### **References**

1. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res* 2007; 100: 158-73.
2. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res* 2007; 100: 1741-90.
3. Aird WC. Endothelium in health and disease. *Pharmacol Rep* 2008; 60: 139-43.
4. Busse R, Fleming I. Vascular endothelium and blood flow. *Handb Exp Pharmacol* 2006; 2: 43-78.
5. Li YS, Haga JH, Chien S. Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells. *J Biomech* 2005; 38: 1949-71.
6. Villar IC, Francis S, Webb A, Hobbs AJ, Ahluwalia A. Novel aspects of endothelium-dependent regulation of vascular tone. *Kidney Int* 2006; 70: 840-53.
7. Nava E, Lüscher TF. Endothelium-derived vasoactive factors in hypertension: nitric oxide and endothelin. *J Hypertens Suppl* 1995; 13: S39-48.
8. Nadar S, Blann AD, Lip GY. Endothelial dysfunction: methods of assessment and application to hypertension. *Curr Pharm Des* 2004; 10: 3591-605.
9. Felmeden DC, Lip GY. Endothelial function and its assessment. *Expert Opin Investig Drugs* 2005; 14: 1319-36.



10. Gerritsen ME, Bloor CM. Endothelial cell gene expression in response to injury. *FASEB J* 1993; 7: 523-32.
11. Apostolakis S, Papadakis EG, Krambovitis E, Spandidos DA. Chemokines in vascular pathology. *Int J Mol Med* 2006; 17: 691-701.
12. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-6.
13. Herrmann J, Lerman A. The endothelium – the cardiovascular health barometer. *Herz* 2008; 33: 343-53.
14. Constans J, Conri C. Circulating markers of endothelial function in cardiovascular disease. *Clin Chim Acta* 2006; 368: 33-47.
15. Kowalska I, Straczkowski M, Szlachowska M, Kinalska I, Prokop J, Bachórzewska-Gajewska H, Stepien A. Circulating E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1, and intercellular adhesion molecule-1 in men with coronary artery disease assessed by angiography and disturbances of carbohydrate metabolism. *Metabolism* 2002; 51: 733-6.
16. Fichtlscherer S, Zeiher AM. Endothelial dysfunction in acute coronary syndromes: association with elevated C-reactive protein levels. *Ann Med* 2000; 32: 515-8.
17. Watson T, Goon PK, Lip GY. Endothelial progenitor cells, endothelial dysfunction, inflammation, and oxidative stress in hypertension. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10: 1079-88.
18. Lind L, Hall J, Johansson K. Evaluation of four different methods to measure endothelium-dependent vasodilation in the human peripheral circulation. *Clin Sci (Lond)* 2002; 102: 561-7.
19. Joannides R, Bellien J, Thuillez C. Fundam Clinical methods for the evaluation of endothelial function – a focus on resistance arteries. *Clin Pharmacol* 2006; 20: 311-20.
20. Korkmaz H, Onalan O. Evaluation of endothelial dysfunction: flow-mediated dilation. *Endothelium* 2008; 15: 157-63.

## ENDOTHELIAL MICROPARTICLES IN THROMBOSIS AND THROMBOLYSIS: DETECTION AND CLINICAL IMPLICATIONS

E. ANGLÉS-CANO

*Inserm U919. Serine proteases in neurovascular pathology. GIP Cycecon. Bd H Becquerel. Caen, France*

Upon activation by specific stimuli, endothelial cells express tissue plasminogen activator (tPA) or urokinase PA (uPA) depending on their quiescent or migratory phenotype. One of the earliest responses to endothelial cell activation is the shedding of microparticles (MP) that behave as conveyors of biomolecules from the parent cell, e.g. phosphatidylserine and TF. MPs have thus being associated to development of thrombosis in various cardiovascular and inflammatory settings. We recently assigned a new function to microparticles: they can express a profibrinolytic function, thereby complementing their procoagulant activity. We demonstrated (*Blood* 2007,110,2432) that plasmin can be generated on the surface of microparticles derived from TNF- $\alpha$ -stimulated endothelial cells.

Employing many approaches we provided convincing evidence that endogenous uPA and uPAR are present on the microparticle surface and, furthermore, that engagement of uPAR by exogenous uPA on the microparticles enhances plasminogen activation. Plasminogen interacts with the microparticles via its lysine binding sites, and  $\alpha$ -enolase is identified as a pivotal receptor in mediating this interaction. Plasmin is capable of degrading fibrin and extracellular matrix proteins, activating various matrix metalloproteases, and participating in cytokine and growth hormone processing. Thus, plasmin not only contributes to fibrinolysis and maintenance of vascular patency, but also is a critical regulator of cell migration and has been implicated in inflammation and angiogenesis. We demonstrated that microparticles and their regulation of plasmin generation are implicated in angiogenesis. We now show that microparticles with fibrinolytic potential are present in circulating blood of patients with cardiovascular accidents and are able to activate fibrin-bound plasminogen and mediate fibrinolysis. Furthermore, microparticles derived from leukocytes also bind and enhance activation of plasminogen, suggesting that microparticles are involved in plasmin generation *in vivo*. Our recent data suggest that plasminogen present at the surface of platelets may be activated by cells or EMP carrying plasminogen activators and participate thereby in clot dissolution.

## MÁS ALLÁ DE LA HEMOSTASIA: PAPEL DE LAS PLAQUETAS EN PROCESOS TROMBOINFLAMATORIOS

M.T. SANTOS, J. VALLÉS,  
A. MOSCARDÓ

*Hospital Universitario La Fe. Valencia*

Las plaquetas activadas interactúan con distintos tipos celulares mediante procesos adhesivos y/o vía productos solubles liberados. Con estos mecanismos, las plaquetas participan en la hemostasia y en la trombosis. También juegan un papel en distintos procesos inflamatorios como la aterosclerosis, la sepsis, la artritis reumatoide, etc. En este artículo nos referiremos principalmente al papel de la plaqueta en procesos tromboinflamatorios.

La aterosclerosis es un proceso inflamatorio crónico y la inflamación es un componente importante de los síndromes coronarios agudos<sup>1</sup>. La interacción de las plaquetas con el endotelio y también con los leucocitos representa una importante conexión entre la inflamación y la aterogénesis<sup>2</sup> (Figura 1). Las

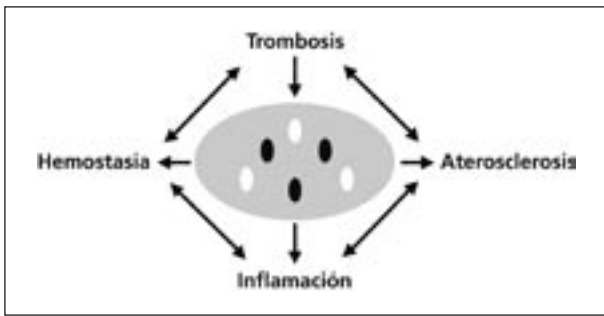


Figura 1. Las plaquetas mediante procesos de adhesión y liberación de sustancias granulares o producidas en el curso de su activación interactúan con otras células sanguíneas y el endotelio, participando como un elemento importante de regulación en la hemostasia, la trombosis, la aterosclerosis y la inflamación, todos ellos procesos multicelulares.

plaquetas son fuente de mediadores inflamatorios y, a su vez, la inflamación del endotelio puede activar a las plaquetas<sup>3</sup>, creándose mecanismos de retroalimentación entre activación plaquetaria e inflamación en la interfase endotelial aún no totalmente esclarecidos.

### El endotelio

El endotelio es una superficie dinámica y compleja que actúa como una interfase entre los vasos sanguíneos y la sangre, manteniendo su fluidez. Posee mecanismos bioquímicos antitrombóticos y fibrinolíticos que pueden ser alterados por la disfunción endotelial, el daño vascular o la formación de una placa de aterosclerosis, transformándose en una superficie trombogénica. La disfunción endotelial induce la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1, selectinas (P-selectina, E-selectina),  $\alpha\beta3$  o el FvW, que facilita la adhesión de distintos tipos de leucocitos y de las plaquetas al endotelio<sup>2,4</sup>. Estos procesos adhesivos propician la proximidad física entre diversos tipos de células, lo que constituye un factor importante en la regulación de la activación plaquetaria, la inflamación

del vaso y la generación de trombina, la cual inicia la coagulación sanguínea. Adicionalmente, el endotelio alterado y la activación de los monocitos infiltrados en el endotelio liberan/exponen sustancias biológicamente activas como factores de crecimiento, factores quimiotácticos, citocinas proinflamatorias, metaloproteasas y exponen factor tisular. Estos productos inducen el reclutamiento de leucocitos y de plaquetas, la progresión de la aterosclerosis y sus consecuencias clínicas aterotrombóticas<sup>2,4</sup>.

El flujo sanguíneo es un importante condicionante de las interacciones y adhesiones celulares al endotelio<sup>3</sup>. Es conocido que el flujo laminar alterado, como el que tiene lugar en zonas de bifurcación de vaso o por la presencia de una placa de aterosclerosis. La alteración del flujo favorece la inflamación y la secreción de los gránulos Weibel-Palade del endotelio que contiene P-selectina y factor von Willebrand, esenciales para las interacciones iniciales de plaquetas y leucocitos sobre el endotelio<sup>(5)</sup>. La alteración del flujo también propicia una mayor interacción de las plaquetas con el endotelio y con las células sanguíneas, lo que puede modificar los equilibrios homeostáticos y la influencia en la reactividad de las plaquetas por otras células sanguíneas<sup>6-8</sup>.

### Adhesión y activación plaquetaria

Las plaquetas disponen de receptores de membrana y moléculas expuestas en la activación que median su unión al endotelio y a los leucocitos<sup>2,4,9,10</sup>. Algunas se muestran en la Figura 2.

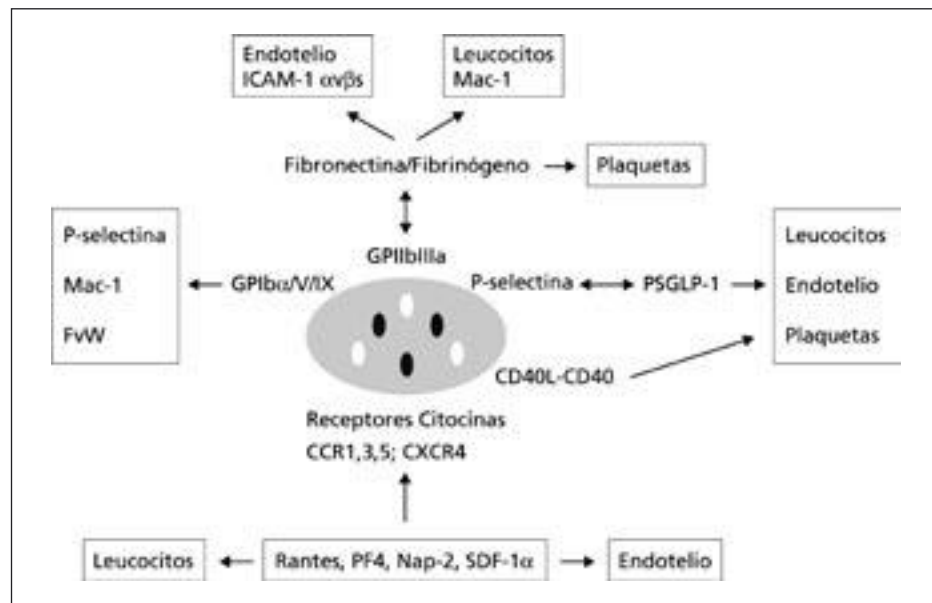


Figura 2. Las plaquetas activadas exponen en su membrana receptores y proteínas adhesivas que participan en las interacciones celulares de las plaquetas con los leucocitos y el endotelio.

**Tabla 1. Productos granulares que secretan o exponen las plaquetas activadas**

Gránulos densos	
Nucleótidos adenina: ATP, ADP	Nucleótidos de guanina: GTP, GDP
Serotonina, histamina, catecolaminas	Cationes bivalentes
Gránulos $\alpha$	
Moléculas adhesivas	Factores mitogénicos
P-selectina , PSGL-1 PECAM-1/CD31 GPIIb/IIIa, GPIb/IX/V, GPVI Trombospondina, vitronectina, fibronectina, FvW	PDGF, EGF, TGF- $\beta$ , VEGF Factores de la coagulación Fibrinógeno, plasminógeno, plasmina factores V, XI, XIII, FvW proteína S, quininógenos, antitrombina
Quimiocinas	Inhibidores de proteasas
PF4 (CXCL4), ( $\beta$ -TG, NAP-2) (CXCL7)	$\alpha_2$ -antiplasmina, inhibidor C1
RANTES (CC5L),	PAI-1,
MIP-1 $\alpha$ (CCL3)	TFPI
Ena-78 (CXCL5),	Metaloproteasas
SDF-1 (CXCL12)	MMP-1
MCP-1 (CCL2)	MMP-2
IL-8 (CXCL8)	MMP-9
Citocinas	Lisosomas
IL-1 $\beta$	Proteasas
CD40 ligando	Glicosidasas
	Proteínas catiónicas

La interacción de las plaquetas con un endotelio disfuncional o que exponga sus componentes subendoteliales, como el colágeno, inicia la adhesión y activación plaquetaria. La unión de las plaquetas con el FvW vía GPIb/V/IX detiene a las plaquetas sobre el endotelio e inicia la secuencia de activación plaquetaria, induciendo el cambio conformacional de la glicoproteína GPIIb/IIIa a su forma adhesiva, capaz de unir fibrinógeno y otras moléculas adhesivas presentes en el vaso dañado, como la fibronectina o la vitronectina<sup>3</sup>. La glicoproteína GPIIb/IIIa es el punto final necesario para la agregación plaquetaria y también juega un papel esencial en los procesos adhesivos de las plaquetas con el endotelio o los leucocitos. Cuando GPIIb/IIIa tiene fibrinógeno unido se une al ICAM-1 del endotelio, al colágeno subendotelial o al receptor Mac-1 de los leucocitos. La P-selectina y el FvW endotelial favorecen el rodamiento de las plaquetas sobre el endotelio mediado por la unión con PSGL-1 y GPIb en las plaquetas, respectivamente, produciéndose después la adhesión firme mediada por la GPIIb/IIIa de las plaquetas, formando puentes fibrinógeno con ICAM-1 o  $\alpha v \beta 3$  del endotelio si la activación endotelial es permanente<sup>(2-4)</sup>; en otro caso, las plaquetas se desprenden por un mecanismo mediado por ADAMTS 135 .

La adhesión permanente de las plaquetas a zonas de activación del endotelio contribuye al desarrollo de le-

siones crónicas; y si la placa se rompe, a trombosis. Existen estudios experimentales que indican que las plaquetas se adhieren al vaso antes de la adhesión de leucocitos y en ausencia de lesión aterosclerosa manifiesta. En sistemas experimentales se ha comprobado que este proceso adhesivo de las plaquetas induce expresión de genes inflamatorios en el endotelio y que el bloqueo de receptores adhesivos en las plaquetas reduce la lesión aterosclerótica en distintos modelos experimentales de ratón<sup>11</sup>.

El contacto de las plaquetas con el colágeno subendotelial o la generación de trombina iniciada por la exposición de factor tisular en el endotelio dañado desencadena la secuencia de activación plaquetaria. Ésta tiene lugar con la participación de complejos mecanismos de transmisión de señales, que conducen a la activación del receptor integrina GPIIb/IIIa, cambios estructurales en la membrana y en el citoesqueleto<sup>12</sup>, liberación de los gránulos citoplasmáticos, activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub> citosólica<sup>13</sup>, síntesis de eicosanoides derivados de la ciclooxigenación y lipooxigenación del

ácido arquidónico (AA)<sup>7</sup> y desarrollo de la actividad procoagulante en las plaquetas. A su vez, la liberación por las plaquetas activadas de los componentes de sus gránulos y de otras sustancias metabólicas al medio extracelular inicia la etapa de reclutamiento de otras plaquetas al trombo, unos efectos potenciados por la interacción eritrocito-plaqueta, que de este modo contribuye indirectamente al proceso aterotrombótico<sup>7,14,15</sup>. Adicionalmente, los productos de los gránulos alfa secretados por las plaquetas activadas son ricos en citocinas, factores de crecimiento y sustancias quimiotácticas que juegan un papel importante en el reclutamiento de células inflamatorias al vaso<sup>4,9</sup> (Tabla 1).

En condiciones fisiológicas estos procesos, en la interfase del endotelio, altamente regulados y multicelulares, evitan eficazmente la hemorragia y los leucocitos actúan en defensa del huésped. Sin embargo, en condiciones patológicas esta regulación puede fallar, pudiendo dar lugar a una diátesis hemorrágica, a la progresión de la aterosclerosis o a la trombosis.

### Interacción de las plaquetas con las células progenitoras endoteliales

También puede jugar un papel en los equilibrios homeostáticos la capacidad de las plaquetas para unir

células endoteliales progenitoras (CEP, CD34+). Las plaquetas sirven de puente entre el endotelio y las CEP, que carecen de la capacidad de unión directa, particularmente a flujos altos. Adicionalmente, las plaquetas son capaces de orquestar la diferenciación de las CEP a células endoteliales maduras, favoreciendo la reparación endotelial y la reendotelización<sup>16</sup> o a macrófagos y células espumosas, lo que favorecería la aterosclerosis<sup>17</sup>. La unión de células CD34+ a las plaquetas inmovilizadas en el vaso se reduce por el tratamiento con anticuerpos dirigidos a PSGLP-1, integrinas  $\beta_2$  y  $\beta_1$  y la P-selectina plaquetaria<sup>4</sup>. La presencia de coagregados plaqueta-CD34+ se incrementan en procesos tromboinflamatorios, como el síndrome coronario agudo<sup>18</sup>.

### La interacción plaqueta-leucocito

Las plaquetas activadas, además de unirse a leucocitos adheridos al vaso, se unen a leucocitos circulantes y los reclutan al vaso dañado. Estas uniones están mediadas por P-selectina-PSGL-1, que subsiguientemente se refuerzan por uniones entre GPIIb/IIIa-fibrinógeno y GPIb $\alpha$  en plaquetas con Mac-1 (CD11b/CD18) en los leucocitos<sup>2</sup>. La liberación de sustancias por las plaquetas activadas como los eicosanoides y el contenido de los gránulos alfa<sup>4,9</sup> (Tabla 1), y también del ADP y ATP liberados de los gránulos densos, activa los receptores P2Y4 y P2Y6 de los leucocitos<sup>19</sup> e induce modificaciones en los leucocitos que incluyen la exposición de factor tisular, sustancias con actividad quimiotáctica y proinflamatoria y capacidad para unirse al endotelio, por sí mismos o mediada por su unión a las plaquetas. A su vez, los leucocitos pueden modificar algunos aspectos de la bioquímica y la función de las plaquetas. Esto puede tener lugar vía componentes de su metabolismo oxidativo, compuestos liberables de los gránulos azurofílicos, como la catepsina G o la elastasa, mediadores lipídicos (PAF, eicosanoides), o por la síntesis de óxido nítrico<sup>20</sup>.

### Productos liberados o expuestos por plaquetas

Como se ha comentado, las plaquetas activadas liberan productos metabólicos y numerosas sustancias contenidas en sus gránulos, algunas indicadas en la Tabla 1. Entre ellas, nos referiremos brevemente a algunas que consideramos con una función en la tromboinflamación más consolidada en la literatura.

### P-selectina

Entre las sustancias liberadas y expuestas en la membrana de las plaquetas activadas es importante la P-

selectina por su papel en los procesos adhesivos con el endotelio, los leucocitos y las células endoteliales progenitoras, como se ha comentado. La P-selectina es un ligando específico para la P-selectina glicoproteína-1 (PSGL-1), un receptor glicoprotéico de alta afinidad presente en leucocitos (monocitos, neutrófilos y linfocitos), el endotelio y las propias plaquetas. La PSGL-1 juega un papel importante en las interacciones célula endotelial-leucocito y leucocito-plaqueta<sup>21</sup>. En el endotelio, la unión vía P-selectina de leucocitos se cree que es el mecanismo por el que los leucocitos circulantes se detienen y ruedan sobre el endotelio mediante asociaciones-disociaciones de la superficie, para posteriormente anclarse de forma más firme mediante otros mecanismos adhesivos<sup>21</sup>. La interacción plaqueta-leucocito vía P-selectina inicia transmisión de señales activantes en los leucocitos, la activación de la integrina Mac-1 (CD11b/CD18)<sup>22</sup> y la exposición de factor tisular y de fosfatidil serina en los leucocitos, que contribuye a la coagulación<sup>23</sup>. Adicionalmente, la estimulación plaquetaria con agonistas fuertes induce la liberación de micropartículas que contienen P-selectina, que pueden interactuar con células que expresan PSGL-1 como monocitos, endotelio o las propias plaquetas. También las micropartículas que expresan PSGL-1 y TF pueden interactuar con P-selectina del endotelio<sup>24</sup>.

### Citocinas y quimiocinas

Las citocinas y quimiocinas liberadas de los gránulos alfa de las plaquetas son muy numerosas e inducen el reclutamiento y la diferenciación de otras células vasculares y hematológicas<sup>10</sup>; algunas de ellas se muestran en la Tabla 1. Adicionalmente, mediante la secreción de estas sustancias, algunas como CXCL4, CXCL7 y CC5L, con efectos bactericidas, las plaquetas participan en la defensa del huésped y reaccionan ante la colonización del endotelio por virus, bacterias y hongos<sup>9</sup>.

Una citocina particularmente importante en la inflamación es la IL-1 $\beta$ , ya que induce la activación de las células endoteliales, la expresión de proteínas adhesivas (ICAM-1,  $\alpha v\beta 3$ ) y la liberación de proteínas quimiotácticas (IL-6, IL-8, MCP-1), promoviendo la adhesión de monocitos y neutrófilos al endotelio<sup>2</sup>.

También interesante por su implicación tromboinflamatoria es el CD40L. Se encuentra en el citoplasma de plaquetas en reposo y se libera y expone en la membrana plaquetaria con la activación, de la que se desprende, dando lugar a un fragmento soluble estable (sCD40L). CD40L induce una respuesta inflamatoria en el endotelio, promoviendo la generación de radicales de oxígeno y la expresión endotelial de moléculas de adhesión, citocinas, quimiocinas y factor tisular.



lar, que favorece la tromboinflamación<sup>25</sup>. CD40L también actúa en otras células que expresan CD40, como monocitos, macrófagos y las propias plaquetas. CD40 induce la expresión de Mac-1 en leucocitos y su reclutamiento, así como la formación de neointima en el endotelio dañado<sup>26</sup>. El bloqueo de la unión CD40L-CD40 en animales de experimentación inhibe la formación de la placa de ateroma y la acumulación de lípidos en el endotelio<sup>(4)</sup>. En humanos, niveles elevados de sCD40L se han asociado a un mayor riesgo de eventos vasculares<sup>27</sup>.

Las quimiocinas son citocinas con propiedades quimiotácticas que, dependiendo de la posición de cisteínas en el N-amino terminal, se clasifican en distintas familias: CXCL, CCL, CX3CL y XCL1/2; estas quimiocinas también señalizan sobre las propias plaquetas mediante receptores transmembrana unidos a proteínas G tipo CXCR y CCR. En plaquetas, estos receptores incluyen CCR1, CCR3, CCR4, CXR4 y CX3CR110. En terminología más clásica, ejemplos de quimiocinas CXCL son PF4, proteína básica (PB),  $\beta$ -tromboglobulina, NAP-2 o IL-8; y de quimiocinas CCL: RANTES, MCP-3, etc.

Las más abundantes en las plaquetas son CXCL4 (PF4) y CXCL7 (transformación de PB a  $\beta$ -TG y a la forma activa de ésta, el NAP-2). De CXCL7 sólo Nap-2 tiene actividad quimiotáctica<sup>10</sup>. En cambio, el PF4 tiene efectos más marcados: induce la expresión de E-selectina en células endoteliales, promoviendo la adhesión y degranulación de los neutrófilos, la activación de los monocitos y su diferenciación a macrófagos y células espumosas<sup>9,28</sup>.

La quimiocina RANTES (CCL5) se libera de los gránulos alfa de las plaquetas activadas y se expresa en la membrana. Participa en la interacción plaqueta-leucocito y en la atracción de leucocitos al vaso dañado. Se ha sugerido su participación en la progresión de la aterosclerosis, ya que promueve la síntesis de MCP-1 por los monocitos, acumulación de macrófagos y crecimiento de la íntima<sup>29</sup>. No obstante, el papel de las quimiocinas en la aterosclerosis está, actualmente, lejos de ser establecido.

### Mediadores lipídicos en las interacciones celulares

La liberación de ácido araquidónico de las plaquetas y de los productos de su metabolismo por lipooxigenación o ciclooxigenación constituye la base de lo que se conoce como metabolismo transcelular. El metabolismo transcelular tiene lugar entre las distintas células de la sangre, y entre éstas y las células endoteliales. En este proceso, el ácido araquidónico, compuestos de su metabolismo intermediario o productos finales específicos de una célula son transformados por otra

en productos específicos de la segunda, o en nuevos compuestos que ninguna de las dos células puede sintetizar de un modo independiente. Ejemplos de esta cooperatividad metabólica en la síntesis de mediadores lipídicos se han descrito entre plaquetas y células endoteliales, plaqueta-neutrófilo, plaqueta-eritrocito, célula endotelial-neutrófilo y neutrófilo-eritrocito. Esta cooperatividad metabólica se refiere a productos que median la trombosis (TxA<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>) o la inflamación, como los leucotrienos y lipoxinas<sup>6,30</sup>. Los efectos beneficiosos de las dietas ricas en ácidos  $\omega$ 3 podrían actuar, en parte, por esta vía al sustituir el AA de las células por el eicosapentanoico, con propiedades más antitrombóticas, ya que el TxA<sub>2</sub> no tiene propiedades agonistas para las plaquetas, mientras que la PGI<sub>2</sub> mantiene sus propiedades antiplaquetarias<sup>6,7,30</sup>. Experimentalmente se ha asociado el bloqueo del receptor del leucotrieno B<sub>4</sub>, proinflamatorio, a la reducción de reestenosis del *stent*, la reducción del contenido de macrófagos en la lesión y a menores niveles de metaloproteasas 2 y 9<sup>31</sup>. Los lípidos biológicamente activos en las micropartículas también pueden participar en el metabolismo transcelular del ácido araquidónico<sup>32</sup>. Otros mediadores lipídicos con potencial capacidad para influir en la aterosclerosis son los isoprostanos, una familia de isómeros de prostaglandinas generados por mecanismos catalizados por radicales libres a partir del AA<sup>33</sup>. Su producción elevada se asocia a procesos aterotrombóticos y, aunque no activan directamente a las plaquetas, potencian el efecto de otros agonistas<sup>34</sup>.

### Aspectos farmacológicos

Desde un punto de vista farmacológico, la reducción del riesgo clínico de recurrencia en pacientes con patología vascular por el tratamiento con fármacos antiagregantes como aspirina y/o clopidogrel es prueba convincente del papel relevante del papel de las plaquetas en la trombosis. Adicionalmente, los fármacos antiplaquetarios han mostrado efectos en la reducción de la inflamación sistémica<sup>35</sup> y de marcadores de inflamación en pacientes con patología vascular<sup>36,37</sup>. Un aspecto negativo de la inhibición farmacológica de las plaquetas es el posible incremento de procesos infecciosos en pacientes tratados<sup>38</sup>.

La síntesis de TxA<sub>2</sub> juega un papel importante en la trombosis, y también puede influir en el desarrollo de la aterosclerosis. En este sentido, en modelos experimentales se ha comprobado que la inhibición del TxA<sub>2</sub> plaquetario o el bloqueo del receptor de TxA<sub>2</sub> retrasa el desarrollo de aterosclerosis<sup>41</sup>. Últimamente está teniendo una amplia repercusión en la literatura el hecho de que exista una variabilidad individual en el efecto antiplaquetario de la aspirina, también deno-



minado “resistencia a aspirina”. En un estudio reciente encontramos, no sin cierta sorpresa, que la aspirina no inhibe apropiadamente la síntesis de  $\text{TxA}_2$  en un 34% de los pacientes con síndrome coronario agudo (SCA) en las primeras 24 horas de la aparición del evento, y que presentan, por tanto, una elevada incidencia de resistencia a aspirina monitorizada por su diana farmacológica específica, la síntesis de  $\text{TxA}_2$ . Adicionalmente, esta falta de inhibición se traduce en una mayor extensión del daño miocárdico monitorizado por troponina y otros marcadores biológicos<sup>42</sup>.

Las estatinas son fármacos con efectos antiinflamatorios y antioxidantes que han demostrado un beneficio clínico en la regresión de la placa de ateroma y en la inflamación monitorizada por niveles de proteína C reactiva<sup>37</sup>. También ha demostrado un notable beneficio en pacientes con SCA, un momento donde coexisten trombosis e inflamación<sup>39</sup>. Adicionalmente, las estatinas han mostrado un efecto inhibitorio de la función plaquetaria, aunque todavía no bien caracterizado<sup>40</sup>. El efecto beneficioso de las estatinas en los pacientes con SCA se pensó que sería independiente de la síntesis de  $\text{TxA}_2$ , ya que es esencial tratar a todos los pacientes con SCA con aspirina. No obstante, teniendo en cuenta el estudio previo<sup>42</sup>, propusimos la hipótesis de que el tratamiento con atorvastatina de los pacientes con SCA pudiese reducir la síntesis de  $\text{TxA}_2$ . Nuestros resultados indican que la atorvastatina reduce la resistencia a la aspirina mediada por la síntesis de  $\text{TxA}_2$  y sus consecuencias funcionales agregatorias y secretoras en estos pacientes<sup>43</sup>. Por este mecanismo, además de sus conocidos efectos hipolipemiantes, antiinflamatorios y antioxidantes, las estatinas podrían también contribuir a la reducción de la inflamación endotelial mediada por activación de las plaquetas.

## Conclusiones y perspectivas de futuro

Aunque el papel esencial de las plaquetas en la trombosis/hemostasia esta bien consolidado y disponemos de fármacos antiplaquetarios capaces de reducir la recurrencia trombótica, el mayor conocimiento de los mecanismos reguladores de la interacción de las plaquetas con las células sanguíneas y el endotelio es muy probable que proporcione en el futuro nuevas dianas para el tratamiento tromboinflamatorio.

También parece establecido que las plaquetas son un elemento importante en la inflamación. Como hemos comentado, existe una pléyade de posibilidades bioquímicas de la participación de las plaquetas en la inflamación demostradas *in vitro* e *in vivo* en animales de experimentación, y es posible que fármacos con alguna acción antiinflamatoria puedan aportar beneficios clínicos adicionales.

Finalmente, hay que tener en cuenta que tanto los mecanismos de hemostasia/trombosis como de inflamación patológica/defensa del huésped se basan en delicados equilibrios que se alteran por la presencia de factores de riesgo de aterosclerosis, por lo que los aspectos de prevención siguen siendo esenciales.

## Agradecimientos

Grupo de investigación financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III (PI07/0463), Programas Redes (Red RENEVAS RD06/0026) y Fundación Mutua Madrileña 2006.

## Bibliografía

- Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1685-95.
- Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* 2005; 115: 3378-84.
- Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* 2002; 8: 1227-34.
- May AE, Seizer P, Gawaz M. Platelets: inflammatory firebugs of vascular walls. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: s5-10.
- Wagner DD, Frenette PS. The vessel wall and its interactions. *Blood* 2008; 111: 5271-81.
- Marcus AJ. Platelets: their role in hemostasis, thrombosis and inflammation. In: Gallin JI, Snyderman R, editors. *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1999. pp. 77-95.
- Santos MT, Valles J, Marcus AJ, Safier LB, Broekman MJ, Islam N, et al. Enhancement of platelet reactivity and modulation of eicosanoid production by intact erythrocytes. *J Clin Invest* 1991; 87: 571-80.
- Vallés J, Santos MT, Marcus AJ, Safier LB, Broekman MJ, Islam N, et al. Downregulation of human platelet reactivity by neutrophils. Participation of lipoxygenase derivatives and adhesive proteins. *J Clin Invest* 1993; 92: 1357-65.
- Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev* 2009; 23: 177-89.
- Gleissner CA, von Hundelshausen P, Ley K. Platelet chemokines in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 1920-7.
- Massberg S, Brand K, Gruner S, Page S, Muller E, Muller I, et al. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med* 2002; 196: 887-96.
- Santos MT, Moscardó A, Valles J, Martínez M, Pinon M, Aznar J, et al. Participation of tyrosine phosphorylation in cytoskeletal reorganization, alpha(IIb)beta(3) integrin receptor activation, and aspirin-insensitive mechanisms of thrombin-stimulated human platelets. *Circulation* 2000; 102: 1924-30.
- Moscardó A, Vallés J, Piñón M, Aznar J, Martínez-Sales V, Santos MT. Regulation of cytosolic PIA2 activity by PP1/PP2A serine/threonine phosphatases in human platelets. *Platelets* 2006; 17: 405-15.
- Vallés J, Santos MT, Aznar J, Marcus AJ, Martínez-Sales V, Portoles M, et al. Erythrocytes metabolically enhance collagen-induced platelet responsiveness via increased thromboxane production, ADP release, and recruitment. *Blood* 1991; 78: 154-62.
- Vallés J, Santos MT, Aznar J, Martínez M, Moscardó A, Piñón M, et al. Platelet-erythrocyte interactions enhance

- alpha(I**b**)beta(3) integrin receptor activation and P-selectin expression during platelet recruitment: down-regulation by aspirin *ex vivo*. *Blood* 2002; 99: 3978-84.
16. Langer HF, May AE, Vestweber D, De Boer HC, Hatzopoulos AK, Gawaz M. Platelet-induced differentiation of endothelial progenitor cells. *Semin Thromb Hemost* 2007; 33: 136-43.
  17. Daub K, Langer H, Seizer P, Stellos K, May AE, Goyal P, et al. Platelets induce differentiation of human CD34+ progenitor cells into foam cells and endothelial cells. *FASEB J* 2006; 20: 2559-61.
  18. Stellos K, Bigalke B, Langer H, Geisler T, Schad A, Kogel A, et al. Expression of stromal-cell-derived factor-1 on circulating platelets is increased in patients with acute coronary syndrome and correlates with the number of CD34+ progenitor cells. *Eur Heart J* 2009; 30: 584-93.
  19. Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz JM, Morelli A, et al. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 2001; 97: 587-600.
  20. Santos MT, Vallés J, Aznar J, Moscardó M, Piñón M. Las plaquetas y su interacción con hematíes y leucocitos. Implicaciones funcionales y farmacológicas. *Haematologica* 2001; 86 (Supl 1): 125-32.
  21. Yang J, Furie BC, Furie B. The biology of p-selectin glycoprotein ligand-1: its role as a selectin counterreceptor in leukocyte-endothelial and leukocyte-platelet interaction. *Thromb Haemost* 1999; 81: 1-7.
  22. Evangelista V, Manarini S, Sideri R, Rotondo S, Martelli N, Piccoli A, et al. Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction: p-selectin triggers protein-tyrosine phosphorylation-dependent CD11b/CD18 adhesion: role of PSGL-1 as a signaling molecule. *Blood* 1999; 93: 876-85.
  23. Furie B. P-selectin and blood coagulation: it's not only about inflammation any more. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 877-8.
  24. Barry OP, Pratico D, Savani RC, Fitzgerald GA. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest* 1998; 102: 136-44.
  25. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Mullerberghaus G, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998; 391: 591-4.
  26. Li G, Sanders JM, Bevard MH, Sun Z, Chumley JW, Galkina EV, et al. CD40 ligand promotes Mac-1 expression, leukocyte recruitment, and neointima formation after vascular injury. *Am J Pathol* 2008; 172: 1141-52.
  27. Schonbeck U, Varo N, Libby P, Buring J, Ridker PM. Soluble CD40L and cardiovascular risk in women. *Circulation* 2001; 104: 2266-8.
  28. Weber C. Platelets and chemokines in atherosclerosis: partners in crime. *Circ Res* 2005; 96: 612-6.
  29. 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.
  30. Marcus AJ. Thrombosis and inflammation as multicellular processes: pathophysiologic significance of transcellular metabolism. *Blood* 1990; 76: 1903-7.
  31. Hlawaty H, Jacob M-P, Louedec L, Letourneur D, Brink C, Michel J-B, et al. Leukotriene receptor antagonism and the prevention of extracellular matrix degradation during atherosclerosis and in-stent stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 518-24.
  32. Barry OP, Pratico D, Lawson JA, Fitzgerald GA. Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest* 1997; 99: 2118-27.
  33. Morrow JD. Quantification of isoprostanes as indices of oxidant stress and the risk of atherosclerosis in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 279-86.
  34. Pratico D, Smyth EM, Violi F, Fitzgerald GA. Local amplification of platelet function by 8-epi prostaglandin F-2 alpha is not mediated by thromboxane receptor isoforms. *J Biol Chem* 1996; 271: 14916-24.
  35. Winning J, Reichel J, Eisenhut Y, Hamacher J, Kohl M, Deigner HP, et al. Anti-platelet drugs and outcome in severe infection: clinical impact and underlying mechanisms. *Platelets* 2009; 20: 50-7.
  36. Antonino MJ, Mahla E, Bliden KP, Tantry US, Gurbel PA. Effect of long-term clopidogrel treatment on platelet function and inflammation in patients undergoing coronary arterial stenting. *Am J Cardiol* 2009; 103: 1546-50.
  37. Packard RRS, Libby P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem* 2008; 54: 24-38.
  38. Blasco-Colmenares E, Perl TM, Guallar E, Baumgartner WA, Conte JV, Alejo D, et al. Aspirin plus clopidogrel and risk of infection after coronary artery bypass surgery. *Arch Intern Med* 2009; 169: 788-96.
  39. Patti G, Pasceri V, Colonna G, Miglionico M, Fischetti D, Sardella G, et al. Atorvastatin pretreatment improves outcomes in patients with acute coronary syndromes undergoing early percutaneous coronary intervention: results of the ARMYDA-ACS randomized trial. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49: 1272-8.
  40. Liao JK. Effects of statins on 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibition beyond low-density lipoprotein cholesterol. *Am J Cardiol* 2005; 96: 24F-33F.
  41. Kobayashi T, Tahara Y, Matsumoto M, Iguchi M, Sano H, Murayama T, et al. Roles of thromboxane A(2) and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J Clin Invest* 2004; 114: 784-94.
  42. Vallés J, Santos MT, Fuset MP, Moscardó A, Ruano M, Pérez F, et al. Partial inhibition of platelet thromboxane A(2) synthesis by aspirin is associated with myonecrosis in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2007; 99: 19-25.
  43. Santos MT, Fuset MP, Ruano M, Moscardó A, Vallés J. Atorvastatin on platelet TxA<sub>2</sub> synthesis in aspirin-treated patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2009 (En prensa).

## INDICACIONES ACTUALES PARA LA TERAPÉUTICA COMBINADA ANTIAGREGANTE/ ANTICOAGULANTE

M. HERAS

*Jefe de Sección de Cardiología Clínica.*

*Servicio de Cardiología. Hospital Clínic. Barcelona*

La activación de la coagulación y la agregación plaquetaria son dos procesos que causan una gran parte de las enfermedades cardiovasculares. Es importante entender cuál de ellos es predominante en cada enfermedad para poder escoger el tratamiento óptimo. No obstante, hay diversas situaciones en las que coexisten ambas activaciones, por lo que es obligado asociar fármacos para inhibir los dos procesos. En este caso, el riesgo de complicaciones hemorrágicas aumenta y es fundamental conocer el riesgo/beneficio de cada tra-

tamiento en cada subgrupo de pacientes, para escoger la combinación con un mejor perfil de eficacia y tolerabilidad.

En líneas generales, el tratamiento anticoagulante está indicado cuando predomina el problema de estasis, como es en la fibrilación auricular, trombosis intraventricular o prótesis valvulares, mientras que el tratamiento antiagregante se utiliza para la prevención y el tratamiento de la aterotrombosis coronaria, asociada a aumentos de la velocidad de cizallamiento por estenosis arteriales y donde las plaquetas juegan un papel básico.

Como se ha dicho anteriormente, algunos pacientes tienen más de una enfermedad cardiovascular. La mayoría de las veces es una cardiopatía isquémica asociada a valulopatía, fibrilación auricular o procesos embólicos previos. En esta ponencia vamos a discutir las indicaciones actuales para el tratamiento combinado anticoagulante y antiagregante, según las últimas recomendaciones de las sociedades científicas.

### **Tratamiento antitrombótico doble**

Se refiere a la utilización simultánea de dicumarínicos y aspirina a dosis bajas (75-100 mg/24 h) o clopidogrel 75 mg/24 h, en caso de intolerancia a la aspirina. Esta asociación se ha recomendado en las siguientes situaciones:

#### **Prevención secundaria de la cardiopatía isquémica en pacientes con alto riesgo embólico**

Diversos estudios demostraron que el tratamiento anticoagulante en pacientes que habían tenido un infarto de miocardio era eficaz en la prevención secundaria, ya que reduce el reinfarcto y la mortalidad. Así pues, la aspirina se podría sustituir por dicumarínicos en pacientes con infarto de miocardio y trombo intraventricular, o en presencia de fibrilación auricular o en los portadores de prótesis mecánicas. Otros estudios han evaluado también la eficacia y seguridad del tratamiento anticoagulante asociado a aspirina. Un metanálisis que incluye a más de 10.000 pacientes con infarto de miocardio previo demostró que la asociación de aspirina y dicumarínicos era eficaz y segura; en los casi 4.000 pacientes con un INR de 2,0-3,0 el tratamiento combinado evitó tres eventos mayores y hubo una hemorragia mayor por cada 100 pacientes tratados en comparación con los que sólo tomaron aspirina<sup>1</sup>. La asociación de ximelagatran, un inhibidor directo oral de la trombina, con aspirina se utilizó en el estudio ESTEEM, que incluyó a 1.833 pacientes con un infarto de miocardio reciente. El trata-

miento combinado a los 6 meses redujo la aparición de muerte, reinfarcto y necesidad de revascularización urgente en un 24% en comparación con aspirina sola; las hemorragias mayores fueron de 0,8% y del 1,9% para el grupo de aspirina o tratamiento combinado, respectivamente<sup>2</sup>. No obstante, ximelagatran provocó alteraciones hepáticas y el fármaco no llegó a ser comercializado. En este momento se están evaluando en ensayos de fase II o III diversos inhibidores orales del FX y FII; estos fármacos tienen un efecto anticoagulante más previsible y uniforme, son de prescripción más simple y no necesitan control, por lo que es probable que en el futuro puedan jugar un papel importante en sustitución de los dicumarínicos.

En resumen, la combinación de anticoagulante con aspirina parece ser una buena opción terapéutica para la reducción de eventos isquémicos y embólicos en pacientes con infarto de miocardio y riesgo elevado de embolia. La recomendación para estas indicaciones se recoge en la Tabla 1<sup>3</sup>.

#### **Prótesis valvulares con cardiopatía isquémica asociada o/y AVC embólico**

Las guías de práctica clínica de la Sociedad Europea de Cardiología recomiendan la asociación de fármacos antiplaquetarios en los pacientes que tienen enfermedad arterial asociada, particularmente aquellos con cardiopatía isquémica<sup>4</sup> y en los que han tenido un episodio embólico estando bien anticoagulados y con un INR adecuado a la prótesis. En estos casos es indispensable hacer un estudio exhaustivo del posible foco embolígeno para aplicar el mejor tratamiento<sup>5</sup>.

En pacientes con prótesis mecánicas y colocación de *stent* intracoronario, además del tratamiento dicumarínico, debe asociarse aspirina y clopidogrel (ver apartado **Stent coronario**). Debido al incremento del riesgo hemorrágico, esta combinación debe reducirse al mínimo tiempo posible y se recomienda utilizar *stents* metálicos y evitar los fármacoactivos siempre que ello sea posible<sup>6,7</sup>. En la Tabla 1 se resumen las recomendaciones para el tratamiento antitrombótico combinado en pacientes portadores de válvulas mecánicas.

#### **Fibrilación auricular con riesgo embólico moderado y alto y cardiopatía isquémica**

La incidencia de embolia en la fibrilación auricular depende del número y la gravedad de los factores de riesgo de cada paciente; la Tabla 2A muestra la clasificación de los mismos y en la Tabla 2B se describe la indicación de tratamiento antitrombótico según el riesgo<sup>8</sup>. De acuerdo a estas recomendaciones, cualquier paciente con algún factor de riesgo alto o más de uno

de riesgo moderado debe recibir dicumarínicos con un INR entre 2,0 y 3,0 para la prevención de embolia.

Los pacientes con cardiopatía isquémica crónica deben recibir aspirina 100 mg/d para la prevención secundaria de nuevos eventos cardiovasculares. Hay amplia evidencia de que esta dosis es suficiente para reducir la muerte, el reinfarto y el accidente cerebrovascular en aproximadamente un 25%<sup>9</sup>. Por lo tanto, en pacientes con fibrilación auricular no valvular asociada a cardiopatía isquémica, se indica la asociación de dicumarínicos y aspirina, siempre que el riesgo de hemorragia sea bajo (Tabla 1).

### Tratamiento antiagregante doble en el stent coronario

El *stent* es una malla metálica que se expande sobre una placa aterosclerosa arterial con el objetivo de reducir la estenosis luminal y prevenir la reestenosis. En los síndromes coronarios agudos se produce una ruptura de la placa con trombosis añadida; el paciente acude con dolor y características clínicas de alto riesgo, con troponinas positivas y cambios

Tabla 1. Recomendaciones de las guías de práctica clínica de la ESC/SEC para el tratamiento antitrombótico combinado en cardiología

Recomendaciones	Clase	Nivel
Infarto Agudo De Miocardio		
Anticoagulante oral con el INR recomendado cuando esté clínicamente indicado (fibrilación auricular, trombo en el VI, válvula mecánica)	I	A
Anticoagulante oral (con un INR de 2-3) además de aspirina a dosis bajas (75-100 mg) en pacientes con alto riesgo de eventos tromboembólicos	Ila	B
Anticoagulante oral además de aspirina y clopidogrel (implantación reciente de <i>stents</i> además de indicación de anticoagulación oral)*	Ilb	C
Anticoagulante oral además de clopidogrel o aspirina (implantación reciente de <i>stents</i> además de indicación de anticoagulación oral y riesgo elevado de sangrado)	Ilb	C
Válvulas mecánicas		
Anticoagulante oral (con un INR adecuado a la prótesis) más aspirina a dosis bajas (75-100 mg) en pacientes con enfermedad coronaria u otra enfermedad aterosclerosa importante	Ila	C
Anticoagulante oral (con un INR adecuado a la prótesis) más aspirina a dosis bajas (75-100 mg) en pacientes que han tenido una embolia a pesar de anticoagulación adecuada, tras investigación exhaustiva de las causas	Ila	C
Anticoagulante oral (con un INR adecuado a la prótesis) además de aspirina y clopidogrel en pacientes con implantación reciente de <i>stents</i>	Ilb	C
Fibrilación auricular		
Anticoagulante oral además de clopidogrel o aspirina después de intervencionismo coronario percutáneo para la prevención de isquemia miocárdica	Ilb	C

ESC: European Society of Cardiology; SEC: Sociedad Española de Cardiología

Para la definición de clase de recomendación y nivel de evidencia ver referencias 3, 5 y 8

\*Las guías del ACC/AHA recomiendan el triple tratamiento antitrombótico con una indicación 1 y evidencia C (referencia 18)

Tabla 2A. Clasificación de los factores de riesgo de embolia en pacientes con fibrilación auricular

Factor riesgo debil	Factor riesgo moderado	Factor riesgo alto
· Sexo femenino	· Edad ≥ 75 años	· AVC, AIT o embolia sistémica
· Edad 65-74 años	· Hipertensión arterial	· Estenosis mitral
· Enfermedad coronaria	· Insuficiencia cardiaca	· Válvula protésica mecánica
· Tirotoxicosis	· Fracción eyección < 35%	
	· Diabetes mellitus	

AVC: accidente vascular cerebral; AIT: accidente isquémico transitorio

Tabla 2B. Recomendaciones de las guías de práctica clínica de la ESC/SEC para el tratamiento antitrombótico en pacientes con fibrilación auricular según el riesgo de embolia

Tipo de riesgo	Tratamiento recomendado
· Sin factores de riesgo	· Aspirina 81-325 mg/d
· 1 factor riesgo moderado	· Aspirina 81-325 mg/d, o dicumarínico (INR 2,0-3,0)
· Riesgo alto o >1 factor riesgo moderado	· Dicumarínico (INR 2,0-3,0)

ESC: European Society of Cardiology; SEC: Sociedad Española de Cardiología



en el ECG. El tratamiento de estas lesiones con *stents* intracoronarios activa la agregación plaquetaria, ya que se colocan en zonas con fuerzas de cizallamiento altas (arterias de pequeño diámetro) y sobre sustratos muy trombógenos. Actualmente, se indica la revascularización coronaria percutánea en pacientes con infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST<sup>3</sup> y también en los pacientes de alto riesgo sin elevación del ST<sup>10</sup>. Datos actuales muestran que se implanta un *stent* en casi el 90% de los procedimientos de revascularización coronaria percutánea<sup>11</sup>. Los estudios iniciales con *stents* metálicos determinaron que el mejor tratamiento antitrombótico para reducir las complicaciones de muerte, reinfarto y trombosis del *stent* era la doble antiagregación, en comparación con la asociación de anticoagulante y antiagregante. En el estudio de Schöming los pacientes tratados con dicumarínicos y aspirina tuvieron un 6,2% de eventos isquémicos adversos y un 6,5% de hemorragias graves en comparación con el 1,2% de eventos isquémicos en los que tomaron aspirina y ticlopidina, que además no produjo ninguna hemorragia grave<sup>12</sup>.

Posteriormente se desarrollaron los *stents* farmacológicos, que son mejores en la prevención de la reestenosis y que se utilizan en las situaciones en que ésta es muy prevalente, como en pacientes diabéticos, vasos de pequeño calibre, lesiones largas y en bifurcaciones. Debido a su reendotelización tardía, las guías recomiendan que el tratamiento antiagregante doble se mantenga entre 6 y 12 meses para evitar trombosis del *stent*, mientras que para los *stents* metálicos es de un mes<sup>6</sup>. Datos muy recientes han desmentido una falsa alarma sobre el exceso de trombogenicidad y aumento de mortalidad en pacientes tratados con *stents* farmacológicos. Su seguridad y mayor eficacia en comparación con los *stents* metálicos se han confirmado en 262,700 pacientes registrados en el National Cardiovascular Data Registry<sup>13</sup>.

Por tanto, para pacientes con indicación de tratamiento anticoagulante crónico y que requieran la implantación de un *stent*, es mejor escoger un *stent* metálico, siempre que sea posible, ya que la doble antiagregación se administra sólo durante 30 días.

### Tratamiento antitrombótico triple

Se refiere a la utilización simultánea de dicumarínicos, aspirina (100 mg/24h) y clopidogrel 75 mg/24 h.

Esta asociación está indicada en pacientes tratados con un *stent* intracoronario que, además, tengan indicación de anticoagulación por valvulopatía, prótesis valvular, fibrilación auricular, trombosis intraventricular o embolia previa. El objetivo es evitar los eventos tromboembólicos, pero tiene un riesgo obvio, que es la hemorragia, y por tanto debe aplicarse cuando

sea estrictamente necesaria y durante el menor tiempo posible.

Las indicaciones de este tratamiento triple se basan en el consenso de expertos, ya que hasta ahora no se dispone de estudios bien diseñados para conocer su eficacia y seguridad. Todos los datos actuales provienen de estudios retrospectivos. Orford *et al.* describieron por primera vez en 66 pacientes tratados con aspirina, clopidogrel y warfarina durante 6 meses la incidencia de hemorragias, que fue del 9,2%, mientras que no se produjo ninguna muerte ni trombosis del *stent*<sup>7</sup>. Nguyen, en una muestra de 800 pacientes, evaluó retrospectivamente los eventos isquémicos y embólicos en el grupo de pacientes con tratamiento triple (n = 580) en comparación con los pacientes que solamente recibieron anticoagulante y un antiagregante (n = 220). No demostró ninguna diferencia durante el seguimiento en relación a reinfarto o isquemia recurrente ni en la incidencia de hemorragias graves, que fue similar en ambos grupos<sup>14</sup>. Ruiz-Nodar *et al.* evaluaron la incidencia de hemorragia grave, eventos cardiovasculares mayores y muerte de cualquier causa en una muestra de 426 pacientes con fibrilación auricular y *stent* que continuaron con el tratamiento antitrombótico triple en comparación con tratamiento antiagregante doble (n = 174), con un amplio seguimiento. Su estudio demostró que no hubo diferencias significativas en las hemorragias graves, mientras que el tratamiento antitrombótico triple redujo de forma significativa tanto los eventos isquémicos como la muerte<sup>15</sup>. Nuestro grupo ha evaluado el riesgo de hemorragia grave y no grave en 33 pacientes con indicación de anticoagulación e implantación de *stent* durante el periodo de tiempo que tomaron triple tratamiento antitrombótico en comparación con el periodo en el que se mantuvieron con dicumarínicos más aspirina. El seguimiento incluye 53 pacientes/mes en tratamiento triple en comparación con 869 pacientes/mes en tratamiento doble. Se observó un exceso de hemorragias no graves durante el periodo en triple tratamiento, aunque las hemorragias graves fueron iguales en ambos periodos de tratamiento, y tampoco hubo diferencias respecto a los eventos embólicos<sup>16</sup>.

Sarafoff *et al.* estudiaron 515 pacientes con anticoagulación que recibieron un *stent* farmacológico. Durante el seguimiento 306 siguieron con anticoagulación por criterios clínicos y ecocardiográficos predefinidos, mientras que 209 continuaron sólo con doble antiagregación. El objetivo primario era el combinado de muerte, infarto, trombosis del *stent* o accidente cerebrovascular. Durante los dos años de seguimiento no hubo diferencias en la incidencia de eventos tromboticos ni hemorrágicos entre ambos grupos. Los autores señalan la importancia de identificar los pacientes que van a precisar tratamiento an-



ticoagulante para poder ofrecer la mayor eficacia con el menor riesgo<sup>17</sup>.

Así pues, en este momento las recomendaciones de las diferentes guías de práctica clínica para el tratamiento de pacientes con indicación de anticoagulación e implante de *stents* intracoronarios son dispares y reflejan cuándo fueron escritas y la falta de estudios prospectivos sobre este problema específico. La guía del American College of Cardiology/American Heart Association sobre infarto de miocardio con elevación del ST<sup>18</sup> recomienda para pacientes con *stent* y necesidad de anticoagulación mantener un INR 2,0-2,5, aspirina 75-81 mg/d y clopidogrel 75 mg/d, con nivel de evidencia 1C; esta recomendación figura con asterisco en la Tabla 1, y es claramente diferente a las recomendaciones de la ESC.

### Complicaciones hemorrágicas

Estudios recientes han revelado la importancia de las hemorragias graves en el pronóstico de los pacientes con síndrome coronario agudo, ya que pueden triplicar la incidencia de muerte y de nuevos eventos isquémicos, tanto miocárdicos como cerebrales. Los predictores clínicos de hemorragia grave son también factores de riesgo para nuevos eventos isquémicos y son: edad avanzada, sexo femenino, hipertensión, anemia e insuficiencia renal<sup>19</sup>. Por lo tanto, estas características clínicas deben tenerse en cuenta en el momento de orientar el tratamiento del paciente y antes de prescribir el tratamiento anti-trombótico.

### Conclusiones

La asociación de tratamiento anticoagulante con antiagregación está indicada en pacientes con elevado riesgo embólico asociado a cardiopatía isquémica. La revascularización coronaria percutánea con *stents* requiere tratamiento antiagregante doble durante un mes para los *stents* metálicos y 12 meses para los farmacoactivos. El tratamiento anti-trombótico triple está indicado en pacientes que precisan anticoagulación y han sido revascularizados con *stent* coronario; debido al riesgo hemorrágico de esta combinación es fundamental seleccionar el tipo de *stent* y excluir a pacientes con riesgo hemorrágico elevado.

### Bibliografía

- Andreotti F, Testa L, Biondi-Zoccai GGL, Crea F. Aspirin plus warfarin compared with aspirin alone after an acute coronary syndrome: an updated and comprehensive metaanalysis of 25.307 patients. *Eur H J* 2006; 27: 519-26.
- Wallentin L, Wilcox RG, Weaver WD, Emanuelsson H, Godwin A, Nyström P, et al; ESTEEM Investigators. Oral ximelagatran for secondary prophylaxis after myocardial infarction: the ESTEEM randomised controlled trial. *Lancet* 2003; 362: 789-97.
- Van de Werf F, Bax J, Betriu A, Blomström-Lundqvist C, Crea F, Falk V, et al. Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation. The Task Force on the Management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2008; 29: 2909-45.
- Turpie AG, Gent M, Laupacis A, Latour Y, Gunstensen J, Basile F, et al. A comparison of aspirin with placebo in patients treated with warfarin after heart valve replacement. *N Engl J Med* 1993; 329: 524-9.
- Vahanian A, Baumgartner H, Bax J, Butchart E, Dion R, Filippatos G, et al. Guidelines on the management of valvular heart disease. The Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology. *Eur H J* 2007; 28: 230-68.
- Silber S, Albertsson P, Avilés FF, Camici PG, Colombo A, Hamm C, et al. Guidelines for Percutaneous Coronary Interventions. A Task Force for Percutaneous Coronary Interventions of the European Society of Cardiology. *Eur H J* 2005; 26: 804-47.
- Orford JL, Fasseas P, Melby S, Burger K, Steinbuhl SR, Holmes DR, et al. Safety and efficacy of aspirin, clopidogrel, and warfarin after stent placement in patients with an indication for anticoagulation. *Am Heart J* 2004; 147: 463-7.
- Fuster V, Rydén LE, Cannom DS, Crijns HJ, Curtis AB, Ellenbogen KA, et al. ACC/AHA/ESC guidelines for the management of patients with atrial fibrillation: full text. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines. Developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *Europace* 2006; 8: 651-745.
- Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative metaanalysis of randomized trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction and stroke in high risk patients. *BMJ* 2002; 324: 71-86.
- Bassand JP, Hamm C, Ardissino D, Boersma E, Budaj A, Avilés FF, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of non-ST-elevation acute coronary syndromes. The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Non-ST-Elevation Acute Coronary Syndromes of the European Society of Cardiology. *Eur H J* 2007; 28: 1598-660.
- Ferreira-González I, Permanyer-Miralda G, Marrugat J, Heras M, Cuñat J, Civeira E, et al. MASCARA (Manejo del Síndrome Coronario Agudo. Registro Actualizado) study. General findings. *Rev Esp Cardiol* 2008; 61: 803-16.
- Schömig A, Neumann FJ, Kastrati A, Schühlen H, Blasini R, Hadamitzky M, et al. A randomized comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary-artery stents. *N Engl J Med* 1996; 25; 334: 1084-9.
- Douglas PS, Brennan JM, Anstrom KJ, Sedrakyan A, Eisenstein EL, Haque G, et al. Clinical effectiveness of coronary stents in elderly persons: results from 262,700 Medicare patients in the American College of Cardiology-National Cardiovascular Data Registry. *J Am Coll Cardiol* 2009; 53: 1629-41.
- Nguyen MC, Lim YL, Walton A, Lefkowitz J, Agnelli G, Godman SG, et al. Combining warfarin and antiplatelet therapy after coronary stenting in the Global Registry of Acute Coronary Events: is it safe and effective to use just one antiplatelet agent? *Eur Heart J* 2007; 28: 1717-22.
- Ruiz-Nodar JM, Marín F, Hurtado JA, Valencia J, Pinar E, Pineda J, et al. Anticoagulant and antiplatelet therapy use in 426 patients with atrial fibrillation undergoing percutaneous coronary intervention and stent implantation implications

- for bleeding risk and prognosis. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51: 818-25.
16. Guasch E, Sionis A, Reverter JC, Andrea R, Loma-Osorio P, Freixa X, et al. Safety issues of adjunctive clopidogrel in patients discharged after percutaneous coronary intervention with stent placement and requiring oral anticoagulation. *Int J Cardiol* 2009 Jan 26. [Epub ahead of print]
  17. Sarafoff N, Ndrepepa G, Mehilli J, Dörrler K, Schulz S, Iijima R, et al. Aspirin and clopidogrel with or without phenprocoumon after drug eluting coronary stent placement in patients on chronic oral anticoagulation. *J Intern Med.* 2008; 264: 472-80.
  18. Antman EM, Hand M, Armstrong PW, Bates ER, Green LA, Halasyamani LK, et al. 2007 Focused Update of the ACC/AHA 2004 Guidelines for the Management of Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction, Writing Group to Review New Evidence and Update the ACC/AHA 2004 Guidelines for Society Endorsed by the American Academy of Family Physicians: 2007 Writing Guidelines: Developed in Collaboration With the Canadian Cardiovascular College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction: A Report of the American. *Circulation* 2008; 117: 296-328.
  19. Subherwal S, Bach RG, Chen AY, Gage BF, Rao SV, Newby LK, et al. Baseline risk of major bleeding in non-ST-segment-elevation myocardial infarction: the CRUSADE (Can Rapid risk stratification of Unstable angina patients Suppress Adverse outcomes with Early implementation of the ACC/AHA Guidelines) Bleeding Score. *Circulation* 2009; 119: 1846-9.

# Nuevas tendencias diagnóstico-terapéuticas en hemofilia

COORDINADORES: R. PÉREZ-GARRIDO. *Sevilla*  
J.F. LUCÍA. *Zaragoza*

## Resumen del simposio

En las últimas décadas se ha experimentado un avance importante en el diagnóstico y en el tratamiento de la hemofilia. En este simposio se van a debatir e intentarán clarificar algunos avances sujetos a controversia.

La primera ponencia versa sobre el tratamiento del primer hemartros en el paciente hemofílico. En primer lugar, se revisan los recientes avances en los mecanismos fisiopatológicos de la artropatía hemofílica y la estrecha relación entre hemartrosis recurrente y el daño articular a largo plazo. Estudios experimentales han demostrado que la sangre intraarticular tiene, por un lado, un efecto directo sobre el cartílago, actuando a nivel de los proteoglicanos y provocando secundariamente la apoptosis del condrocito; y por otro, la hemosiderina va a provocar hipertrofia de la membrana sinovial y neovascularización que favorece el resangrado. A la luz de estos conocimientos, los resultados sugieren que la aspiración de la sangre articular en las primeras 48 horas del hemartros puede prevenir el daño articular, además de disminuir el dolor y mejorar el rango de movimiento. Con el tratamiento profiláctico se disminuye en gran medida el número de hemartros, pero no se eliminan totalmente, por lo que su tratamiento sigue siendo un reto para los centros de hemofilia. Para finalizar, el Dr. Aznar presenta un protocolo de tratamiento intensivo del primer hemartros desarrollado en su unidad.

El segundo ponente, el Dr. Querol valora la ecografía articular en la hemofilia y la utilidad de esta técnica en manos del hematólogo. A nivel internacional no existe consenso sobre la duración del tratamiento del hemartros, aunque con los estudios fisiopatológicos actuales deberíamos tratar hasta la recuperación total de la articulación. La ecografía es una técnica inocua que nos permite realizar un seguimiento frecuente del proceso y puede aportar información fiable para decidir la duración del tratamiento sustitutivo. Nos proporciona criterios objetivos, como son la medición del grosor de la sinovial y la progresiva reabsorción de la sangre intraarticular, que unidos a los datos clínicos nos permite ajustar la duración e intensidad del tratamiento.

En la tercera ponencia, la Dra. Altisent aborda la problemática perinatal en hemofilia. Existe consenso general sobre la atención del parto del hemofílico por un equipo multidisciplinar en el que se incluyen hematólogo, obstetra, anestesista y pediatra, en un centro con un laboratorio de urgencia capacitado para la dosificación de factores de la coagulación, un banco de sangre y concentrados de factor disponibles. Otras recomendaciones son más discutibles; así, en las portadoras con un feto potencialmente afecto, la mayoría de los centros recomienda parto normal por vía vaginal en el que deben evitarse procedimientos invasivos y maniobras instrumentales. Algunos centros recomiendan el parto mediante cesárea, siendo, de hecho, más frecuentes en las portadoras de hemofilia con feto varón (22-47% vs. 8%) que en la población normal, si bien no elimina el riesgo de hemorragia cerebral en el recién nacido. Tampoco existe consenso en cuanto a la utilización de tratamiento profiláctico en el recién nacido. La ecografía cerebral, realizada de forma rutinaria por algunos grupos, estaría indicada en el recién nacido prematuro, si el parto es traumático o ante la sospecha clínica que sugiera sangrado. En estos casos se debe administrar tratamiento profiláctico, utilizado en algunos centros de forma sistemática en las formas graves, lo cual ha generado controversia debido en parte a la teórica aparición de inhibidores cuando el factor se infunde en los primeros meses de vida.

En la última ponencia, la Dra. Sedano expone una valoración crítica de los modelos de profilaxis primaria. Se trata de una modalidad de tratamiento estandarizada en nuestro país, como nos revelan los datos del estudio epidemiológico realizado en el 2006, en el que el 72,5% de los hemofílicos graves en edad pediátrica

estaban en tratamiento con algún tipo de profilaxis. Es, igualmente, el tratamiento recomendado por la Federación Mundial de Hemofilia, y está avalado por abundantes estudios observacionales y más recientemente por un estudio aleatorizado. La profilaxis primaria debería iniciarse antes de los dos años de edad o previamente al inicio de alguna evidencia clínica de daño articular; sin embargo, el régimen óptimo no está claramente definido y existen algunas barreras para su implantación, como son la necesidad de un adecuado acceso venoso, el posible sobretratamiento en un 10-15% de estos pacientes con un fenotipo menos severo o incluso consideraciones económicas.

La importancia de empezar la profilaxis antes de que exista daño articular no admite duda, pero existe dificultad en establecer el momento de inicio y la pauta adecuada. Por otro lado, el incremento de evidencia del efecto protector sobre la incidencia de desarrollo de inhibidor puede ser un factor importante para su implantación, sobre todo en pacientes con genotipo grave, historia familiar de inhibidor, tratamiento intensivo por cirugía o episodio grave de sangrado. Pocos estudios se han documentado sobre la continuidad de la profilaxis en la edad adulta, quedando muchas preguntas por resolver. Debido en parte a su alto coste, parece razonable que los pacientes adopten un régimen más flexible, disminuyendo dosis o aumentando el intervalo de administración, en lugar de suspender la profilaxis y pasar a tratamiento a demanda. Para finalizar se revisa la indicación de profilaxis por agentes *bypass* en la hemofilia con inhibidor.

## TRATAMIENTO DEL PRIMER HEMARTROS EN EL PACIENTE HEMOFÍLICO

J.A. AZNAR

*Unidad de Hemostasia y Trombosis.  
Servicio de Hematología y Hemoterapia.  
Hospital Universitario La Fe. Valencia*

### Introducción

Los hemartros son las manifestaciones hemorrágicas más frecuentes y de mayor morbilidad que puede presentar el paciente hemofílico. Afectan más frecuentemente a las articulaciones de codos, rodilla y tobillos<sup>1</sup>. Su tratamiento consiste en la infusión de su factor deficitario aunque, en la actualidad, no existen criterios unificados sobre la dosis y la duración de estos tratamientos, que pueden variar, según diferentes países y centros, entre una dosis de 20-40 UI/kg y una duración de 1-3 días, cada 12-24 h. Estas diferencias pueden explicarse porque los criterios para establecer dichos tratamientos no se han basado en fundamentos etiopatogénicos, sino sintomáticos, como son la desaparición del dolor y la recuperación de la movilidad articular. Esta indefinición de criterios puede conllevar la utilización de tratamientos ineficaces que desencadenen una artropatía grave, que puede requerir intervenciones quirúrgicas ortopédicas o terminar en condiciones invalidantes, incluso en pacientes relativamente jóvenes<sup>2</sup>. En este sentido, hay que resaltar que el episodio agudo de un hemartros tarda en resolverse, aproximadamente, una semana, tiempo sensiblemente superior a la duración de la cobertura hemostática que proporcionan los tratamientos estándares anteriormente referidos<sup>3</sup>.

Por otra parte, en un estudio multicéntrico español realizado en el año 2000, pudimos observar que los tratamientos a demanda, con pautas similares a las anteriormente expuestas, eran incapaces de frenar la artropatía hemofílica, ya que la misma se constató en un alto porcentaje de los pacientes estudiados<sup>4</sup>. Estas consideraciones clínicas nos deben hacer reflexionar sobre la conveniencia de revisar las pautas de estos tratamientos convencionales que se han mostrado ineficaces para frenar el desarrollo de la artropatía hemofílica y, acorde con ello, considerar si sería necesario aumentar su eficacia mediante un incremento de la intensidad y la duración de estos tratamientos. Esta revisión conceptual se hace todavía más necesaria en el caso concreto del tratamiento del primer hemartros ocurrido en cada una de las seis articulaciones mayores del paciente hemofílico, debido a las graves consecuencias que se pueden derivar de la utilización de un tratamiento inadecuado en cada uno de estos primeros hemartros.

Aunque en los últimos años se ha avanzado mucho sobre el conocimiento de la patogénesis de la artropatía hemofílica, todavía quedan muchas incógnitas por resolver, sobre todo en lo referente a los cambios tempranos ocurridos en las articulaciones. Sabemos que un complejo proceso multifactorial interviene en el desarrollo de la artropatía hemofílica, en el que hay que destacar la alteración funcional y estructural del cartílago articular y la inflamación de la membrana sinovial.

En este trabajo revisaremos los recientes avances sobre la fisiología articular y de la etiopatogenia de la artropatía hemofílica y, a la luz de ellos, fundamentaremos nuevos modelos para el tratamiento del hemartros, basados, no sólo en criterios sintomáticos, sino también en criterios etiopatogénicos, confiando que un mejor conocimiento de la patogénesis de esta alteración pueda ayudar a desarrollar estrategias terapéuticas más efectivas.

### Fisiología

#### Membrana sinovial

La capsula articular cierra externamente la cavidad articular, y su parte interna esta formada por la membrana sinovial que cubre el interior de las estructuras intraarticulares, excepto el cartílago. La membrana sinovial produce y garantiza la calidad del líquido sinovial, un ultrafiltrado del plasma, del cual depende la nutrición y lubricación del cartílago articular. La membrana sinovial es la encargada de producir el líquido sinovial y limpiar la cavidad articular de restos celulares u otros residuos.

La membrana sinovial está compuesta por dos capas. La más externa, lindante con la cavidad articular, está formada por dos tipos de células: los macrófagos y los fibroblastos. La capa más interna está compuesta por grasa, cuerpos fibrosos y por múltiples vasos capilares y linfáticos. Estos capilares posibilitan la transferencia al interior de la cavidad articular de pequeñas moléculas, tales como: electrolitos, glucosa y aminoácidos, los cuales son necesarios para la nutrición del cartílago. La absorción y limpieza del líquido sinovial se lleva a cabo por los macrófagos, los capilares y los vasos linfáticos de la membrana sinovial<sup>5</sup>.

Destacamos la dualidad contrapuesta de los capilares, ya que por un lado son fundamentales para mantener la producción y limpieza del líquido sinovial, pero por otro son responsables de las hemorragias articulares. Sabemos que un hemartros produce una proliferación vascular en la sinovial que favorece la presentación de nuevas hemorragias que, si se repiten con frecuencia, terminarán generando una articulación diana, la cual se define como aquella articulación que, como consecuencia de haber presentado hemorragias



repetidas, presenta una hipertrofia sinovial que favorece la presentación de nuevas hemorragias.

### **Cartílago articular**

El cartílago y el líquido sinovial son fundamentales para que los movimientos articulares sean suaves y no traumáticos. El cartílago es avascular y aneural; por tanto, su nutrición y mantenimiento depende del líquido articular. Sólo tiene un tipo de células: los condrocitos, que se caracterizan por su incapacidad para proliferar en el individuo adulto<sup>6</sup>. La función de los condrocitos es la de producir y mantener la matriz que da consistencia al cartílago. Esta matriz está compuesta de una fase líquida (agua y electrolitos) y otra sólida (colágeno, proteoglicanos y otras proteínas). Los proteoglicanos, al estar altamente sulfatados, están cargados negativamente y, por tanto, atraen cationes que crean una presión osmótica alta en el interior del cartílago. Esta presión osmótica atrae agua al interior del cartílago, la cual es necesaria para mantener su elasticidad y resistencia. El cartílago actúa como una esponja; bajo presión, el agua es exprimida al exterior y cuando la carga desaparece es atraída de nuevo al interior del cartílago, de manera que el cartílago mantiene la elasticidad necesaria para amortiguar las cargas que sufre la articulación y para facilitar la suavidad de sus movimientos y proteger al hueso subcondral<sup>7</sup>.

---

## **Etiopatogenia**

### **Cambios en la sinovial**

Como ya hemos comentado anteriormente, la sinovial tiene, entre otras funciones, la capacidad de remover y/o fagocitar los residuos celulares y proteicos existentes en la cavidad articular. Esta función, en el caso del hemofílico, es fundamental, ya que de ella depende la remoción de la sangre articular. Cuando la cantidad de sangre interarticular es grande, esta capacidad fagocítica queda sobrepasada y se produce una hipertrofia e hiperplasia de los sinoviocitos y una hipervascularización de la sinovial que incrementa el riesgo de que se produzcan nuevas hemorragias y de desarrollar una sinovitis aguda. En el hemofílico, cuando esta función queda sobrepasada reiteradamente, la hemosiderina se va acumulando en la sinovial perpetuando una sinovitis crónica<sup>8,9</sup>. La sinovial hemosiderítica muestra una incrementada producción de citocinas proinflamatorias, como son las interleucinas (HL-1 e IL-6), además del factor alfa de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), ambos conocidos por sus propiedades destructoras de tejidos<sup>10</sup>.

Por otro lado, hay evidencia del papel jugado por el hierro en los cambios sufridos por la sinovial tras las

hemartrosis, ya que se ha demostrado que el hierro tiene un efecto proliferativo sobre los sinoviocitos<sup>11</sup>, hecho que se constata en análisis anatomopatológico, ya que el 75% de los hemofílicos con sinovitis presentan depósitos de hierro en la sinovial<sup>12</sup>. Además, el hierro incrementa la expresión de un pro-oncogén MYC (c-myc)<sup>13</sup> y de la proteína mdm2<sup>14</sup>, contribuyendo ambas al desarrollo de una hipertrofia y posterior hiperplasia del tejido sinovial. Así pues, vemos que el hierro provoca una proliferación celular y vascular de la sinovial. Esta doble proliferación es responsable del engrosamiento de la sinovial, que puede propiciar que se presente un nuevo hemartros ante mínimos traumatismos, facilitando la instauración del círculo vicioso “hemorragia-sinovitis-hemorragia” que perpetuará la artropatía hemofílica.

En un reciente estudio experimental en perros sanos, Jansen demuestra que tras los hemartros se produce una inflamación de la sinovial con aumento de la producción de mediadores destructores de tejidos tales como enzimas y citocinas que alteran, 24-48 horas después de la hemorragia, el *turnover* de la matriz del cartílago, con el subsiguiente daño del mismo<sup>15</sup>. Destacamos otro modelo experimental desarrollado por Valentino en ratones hemofílicos que ha aportado importantes avances sobre la génesis de la sinovitis<sup>16</sup>.

### **Cambios en el cartílago articular**

El concepto de que la sinovitis es el agente único fisiopatogénico responsable de la destrucción del cartílago, últimamente, ha quedado en entredicho, ya que se ha demostrado *in vitro* que la exposición del cartílago a la sangre conduce a un disturbio del *turnover* de la matriz del cartílago. El contacto del cartílago con la sangre diluida al 50% (concentración que se cree tiene la sangre intraarticular tras un hemartros) durante 4 días (tiempo que se especula puede ser el natural para la evacuación de la sangre de una articulación en humanos) conduce a una inflamación de la sinovial, a una inhibición de la síntesis de los proteoglicanos y a un incremento de la liberación de proteoglicanos desde la matriz del cartílago al interior de la cavidad articular<sup>17,18</sup>. Esta inhibición de la síntesis de proteoglicanos y el aumento de la liberación de proteoglicanos de la matriz del cartílago dura más de 10 días después de la inicial exposición de 4 días con sangre diluida al 50%<sup>19</sup>. Estudios recientes demuestran que incluso tiempos menores de exposición a diluciones menores, 2 días y sangre al 10-20%, respectivamente, ya producen lesiones similares en el cartílago articular<sup>20</sup>.

Estas lesiones se producen en articulaciones vírgenes, pero también se pueden incrementar en articulaciones ya dañadas, si estas sufren hemartros recurrentes, es decir, que un cartílago ya alterado es todavía

sensible a aumentar su deterioro<sup>21</sup>. Este hecho sugiere que, incluso en articulaciones con cartílago alterado, si queremos frenar o enlentecer el avance del desarrollo de la artropatía hemofílica, será necesario prevenir los hemartros con tratamientos profilácticos o bien tratarlos adecuadamente a demanda.

Las observaciones anteriormente descritas avalarían la conveniencia de practicar la artrocentesis en el paciente hemofílico lo antes posible, para minimizar el deterioro del cartílago por el contacto directo de la sangre. Además, la artrocentesis también está indicada cuando la presión de la sangre intraarticular es muy elevada, ya que la misma puede inducir la apoptosis de condrocitos y la inhibición de proteoglicanos<sup>22</sup>.

Complementando los experimentos *in vitro* anteriormente descritos, Roosendaal realizó un trabajo experimental *in vivo* inyectando sangre autóloga en la rodilla derecha de un perro no hemofílico, en los días 0 y 2, y comprobó que en el día 4 el contenido y síntesis de proteoglicano se reducían y la liberación de proteoglicano al espacio intraarticular aumentaba, comprobándose una alteración evidente del cartílago al compararlo con el de su rodilla izquierda sana. Al día 16, la síntesis de proteoglicano y la liberación del mismo estaban muy aumentadas, pero su efecto sobre el cartílago no era detectable, ya que su contenido de proteoglicanos era bajo a pesar de presentar una síntesis de proteoglicanos aumentada. El cambio de una inhibición a un aumento de la síntesis de proteoglicanos desde el día 4 al 16, mientras que el contenido de proteoglicano permanece bajo, sugiere que este incremento de la síntesis de proteoglicano no es efectiva para reparar el cartílago. En este trabajo, Roosendaal demuestra que el cartílago de los animales jóvenes era más susceptible que el de los animales adultos<sup>23</sup>.

En este experimento la sinovial mostraba signos de inflamación en los días 4 y 16, pero sus efectos destructivos sobre el cartílago se evidenciaron en el día 16. Como la alteración del cartílago ya era evidente desde el día 4 manteniéndose hasta el 16, esto sugiere que la acción directa de la sangre sobre el cartílago es la responsable de la alteración de éste más que la acción destructora de la liberación de sustancias por la membrana sinovial. En suma, estos hallazgos demuestran experimentalmente que un simple hemartros en una articulación sana provoca duraderos efectos adversos sobre la actividad del condrocito y en la integridad de la matriz del cartílago, y que el efecto directo de la sangre sobre el cartílago precede al indirecto provocado por la inflamación sinovial.

Este ensayo experimental también demostró que la combinación de un hemartros en una articulación sometida a carga provoca una mayor inflamación sinovial, más síntesis y liberación de proteoglicanos y más alteración del cartílago que cuando lo comparamos con su articulación homóloga no sometida a carga<sup>24</sup>.

Esto sugiere la necesidad de restringir la carga cuando se produce un hemartros en los pacientes hemofílicos.

De lo anteriormente descrito se deduce que el efecto directo de la sangre sobre el cartílago parece que es previo al efecto indirecto de la sinovial sobre éste. Sin embargo, es evidente que existe una recíproca influencia "sinovial-cartílago" en el deterioro de ambos. Así, el cartílago puede aumentar el deterioro sinovial al liberar productos de degradación que aumentan la sinovitis y, viceversa, la sinovial puede liberar sustancias proinflamatorias y necrotizantes que pueden acelerar el deterioro del cartílago e incluso del hueso subcondral<sup>25</sup>.

La destrucción del cartílago por la sangre puede ser debida a las acciones del hierro y de las células mononucleares provenientes de la sangre intraarticular<sup>25</sup>. Aunque la acción de citocinas IL-1 y TNF- $\alpha$  contribuyen a la inhibición transitoria de la síntesis de proteoglicanos, no parece que estas sustancias sean las responsables de efectos irreversibles sobre el cartílago articular<sup>18</sup>.

Los efectos prolongados o permanentes de la sangre sobre el cartílago provocan la apoptosis de los condrocitos<sup>26</sup>. Basados en distintos trabajos experimentales *in vitro*, se especula que la apoptosis del condrocito se debe a la acción conjunta intraarticular de los H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unidos al hierro<sup>18,27,28</sup>. Se especula que tras un hemartros, las citocinas proinflamatorias, producidas por la activación de monocitos y macrófagos, incrementan la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por el condrocito. Estos H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reaccionan con el hierro y generan radicales hidroxilos en la cercanía del condrocito produciendo su apoptosis.

Debido a que los condrocitos son las únicas células de cartílago y que difícilmente proliferan en edad adulta, la pérdida de estas células por apoptosis conduce a una alteración irreversible de la matriz del cartílago y a un grave deterioro articular<sup>27</sup>.

### **Cambios en el hueso subcondral**

Los hemartros de repetición provocan crecimientos anormales en las epífisis óseas, osteoporosis, quistes subcondrales y osteofitos. Si estos cambios son la consecuencia del deterioro del cartílago o le preceden está todavía por demostrar.

### **Diagnóstico**

Dado que en este mismo simposio hay un capítulo específico dedicado al diagnóstico ecográfico del hemartros en el paciente hemofílico, no creemos necesario desarrollar aquí este apartado. Únicamente reiteramos

la importancia de la ecografía en la monitorización del tratamiento del hemartros en hemofilia. Aunque la resonancia magnética es fundamental para evidenciar las alteraciones más precoces de partes blandas, sobre todo del cartílago, y también para visualizar los depósitos de hierro, su manejo queda sólo al alcance de los especialistas en imagen. Sin embargo, la ecografía se está incorporando últimamente a la praxis habitual del hematólogo y su manejo en su consulta de hemofilia le proporciona información básica y objetiva para el diagnóstico y la monitorización del tratamiento de estos pacientes. La ecografía nos proporciona criterios objetivos; entre ellos, los más útiles son la medición del grosor de la sinovial y el estado de la resolución de la sangre intraarticular e incluso, con eco-Doppler, la visualización de la vascularización responsable de los puntos sangrantes. La combinación de estos criterios con los clásicos criterios clínicos: cese del dolor y normalización de la función articular, nos permitirá ajustar a estos parámetros tanto la intensidad como la duración del tratamiento del hemartros.

## Tratamiento

De los aspectos desarrollados anteriormente sobre la etiopatogenia del hemartros destacamos la importancia de la acción directa de la sangre en la lesión del cartílago, debida a la apoptosis de los condrocitos y a la consiguiente alteración de la matriz del cartílago. Complementariamente, la inflamación de la sinovial intervendrá también en esta alteración del cartílago mediante el aumento de citocinas, la alteración de la síntesis de los proteoglicanos y la salida de los mismos desde la matriz del cartílago hasta el líquido sinovial; por tanto, creemos que, en base a lo anteriormente expuesto, parece fundamental evitar, lo máximo posible, el contacto de la sangre con el cartílago y la sinovial, sobre todo en el caso de un primer hemartros en una articulación “virgen”.

Por otra parte, hay que destacar la discordancia existente entre la prolongada duración de las alteraciones de la sinovial y del cartílago tras una hemorragia, según se evidencia en trabajos experimentales, y la corta cobertura hemostática que proporcionan los tratamientos convencionales del hemartros, que en algunos casos se limitan a una sola administración de su factor deficitario. En este sentido destacamos los siguientes trabajos experimentales

- Leticia afirma que el episodio agudo de un hemartros tarda en resolverse, aproximadamente, una semana<sup>3</sup>.
- Jansen demuestra en un estudio experimental en perros sanos que tras los hemartros se produce una inflamación de la sinovial que altera, 24-48 horas después de la hemorragia, el *turnover* de la

matriz del cartílago, con el subsiguiente daño del mismo<sup>15</sup>.

- Roosendaal y Hooiveld demuestran *in vitro* que el contacto del cartílago con la sangre conduce a una inflamación de la sinovial, a una inhibición de la síntesis de los proteoglicanos y a un incremento de la liberación de proteoglicanos desde la matriz del cartílago que dura más de 10 días después del inicial contacto con sangre<sup>17-19</sup>.
- Roosendaal demuestra en un trabajo experimental *in vivo* que inyectando sangre en la rodilla de un perro, en los días 0 y 2, se observa en el día 4 que la síntesis de proteoglicano se reducía, el contenido de proteoglicanos en la matriz disminuía, la liberación de proteoglicano al espacio intrarticular aumentaba y que el día 16 el contenido de proteoglicanos en el cartílago se mantenía bajo<sup>23</sup>.

En base a lo anteriormente expuesto, proponemos una estrategia terapéutica para evitar los hemartros en articulaciones vírgenes o con poca lesión articular que se deberá mantener mientras observemos ecográficamente presencia de sangre intraarticular y/o signos inflamatorios en la sinovial. En este sentido, presentamos tres propuestas terapéuticas de aplicación según sea la gravedad y la situación articular de los pacientes:

- a) Pacientes con profilaxis primaria con todas sus articulaciones vírgenes. Para evitar la aparición de hemartros en el paciente hemofílico grave se aplica la profilaxis primaria, que consiste en la administración de su factor deficitario, dos o tres veces a la semana, antes del primer año de la vida o después del primer hemartros<sup>29</sup>. Con ello tratamos de evitar la aparición de hemorragias desde la primera edad en pacientes graves.
- b) Pacientes sin profilaxis primaria con alguna articulación virgen. En aquellos pacientes hemofílicos que, por su menor gravedad, no estén sometidos a profilaxis primaria hay que ser muy cautelosos en el tratamiento del primer hemartros de cada una de sus articulaciones, y cuando se presentan la estrategia consistirá en prolongar el tratamiento sustitutivo hasta que la sinovial recupere su situación basal, es decir, aquella que presentaba antes del hemartros. Sabemos que en la etiopatogenia del hemartros la sangre almacenada en el interior de la cavidad articular provoca una inflamación de la sinovial con una proliferación de los vasos sanguíneos que facilita la aparición de nuevos hemartros, y es por ello que deberemos proteger al paciente del riesgo de resangrado manteniendo el tratamiento hasta la normalización de la sinovial, que se objetivará mediante la ecografía midiendo el grosor y características de la misma y asegurando la reabsorción de total de la sangre intraarticular. Para ello requerimos un ecógrafo en la consul-

ta de hemofilia que nos permita un seguimiento ecográfico cada 24 horas. Si evitamos resangrados reduciremos la acción directa de la sangre sobre la alteración del cartílago.

- c) Pacientes sin profilaxis primaria y hemartros en articulaciones ya alteradas. Hemos visto anteriormente que una alteración del cartílago articular puede aumentarse cuando posteriormente se reitera el contacto de la sangre con el cartílago. Por ello, ante hemartros en una articulación ligeramente dañada también deberemos prologar el tratamiento del mismo hasta la reabsorción de la sangre y la desaparición de la inflamación sinovial. Al contrario que en el caso anterior, en este caso será difícil saber cuándo debemos terminar el tratamiento, ya que posiblemente no conoceremos el estado pre-hemartros de la sinovial.

En todos los casos de hemartros, recomendamos adicionalmente a lo anteriormente expuesto:

- La administración precoz de concentrados de factor VIII o IX o de agentes de acción bypass en los hemofílicos con inhibidores.
- La artrocentesis precoz para evacuar de la sangre articular lo antes posible, sobre todo en casos de alta tensión intraarticular, ya que la misma puede producir apoptosis del condrocito.
- Aliviar el dolor inicial con agentes que no interfieran la función plaquetaria.
- Mantener reposo en las primeras horas, evitando la carga durante al menos las primeras 48 horas, ya que, como hemos señalado anteriormente, la combinación simultánea de sangre en contacto con el cartílago y carga en la articulación puede aumentar el grado de la lesión de la misma.
- Iniciar una rehabilitación específica para lograr la recuperación de la función articular.

Sobre la artrocentesis queremos señalar que en la experiencia de nuestra unidad nunca hemos tenido una complicación infecciosa derivada de esta práctica. Por ello pensamos que hay que seguir preconizando la evacuación de la sangre articular tan pronto como sea posible.

## Protocolo para el tratamiento intensivo del primer hemartros

### Justificación

Sobre la base de todo lo anteriormente expuesto, en nuestra Unidad de Hemostasia y Trombosis hemos desarrollando un protocolo de trabajo para el tratamiento de los hemartros agudos acaecidos en articulaciones vírgenes o mínimamente afectadas, con un historial de baja frecuencia hemorrágica, en pacientes hemofílicos con o sin inhibidores, basado en la pro-

longación del tratamiento sustitutivo de los hemartros hasta la completa resolución de la hemorragia y el restablecimiento articular. De esta forma pretendemos minimizar el riesgo de resangrado articular mientras persiste la sinovitis posthemartros y prevenir la aparición de articulaciones diana.

La intensidad y la duración del tratamiento se monitoriza con una combinación de criterios clínicos (cese del dolor y normalización de la función articular) y ecográficos (resolución de la sangre intraarticular y normalización de la sinovial). Inicialmente se trataría al paciente con una pauta estándar de tratamiento a demanda hasta el cese de la hemorragia y luego se continuaría con una pauta de tratamiento prolongado trisemanal (o diario en algunos casos de pacientes con inhibidor) hasta la restauración de la normalidad articular según los parámetros ecográficos anteriormente expuestos.

Este protocolo lo hacemos extensivo a los pacientes hemofílicos que desarrollan inhibidores, ya que la tendencia de los pacientes hemofílicos sin inhibidor para presentar un deterioro articular tras haber sido tratados con las terapias convencionales todavía se hace más evidente en los pacientes hemofílicos que desarrollan inhibidores frente al factor VIII o IX. Esto se evidencia en los trabajos de Morfini, que concluyen que los pacientes con inhibidor, aunque presentan una incidencia similar de hemartros y hematomas musculares que el grupo control –pacientes hemofílicos graves sin inhibidor–, presentan un significativo mayor deterioro articular, tanto en la evaluación clínica (Gilbert) como en la radiológica (Pettersson)<sup>30,31</sup>. Creemos que estos resultados obligan a un replanteamiento del tratamiento del hemartros agudo en los pacientes hemofílicos con inhibidores, ya que, posiblemente, debido al alto coste económico de los agentes bypass, las dosis y la duración de estos tratamientos con rFVIIa o el FEIBA han podido administrar en cantidades y duración insuficientes y menores que las utilizadas en los tratamientos con FVIII o IX en pacientes hemofílicos sin inhibidores.

### Protocolo

Aunque la dosis y duración pueden variar en función de las características de los hemartros, las pautas terapéuticas propuestas son las siguientes:

- Hemofílicos sin inhibidor. Se inicia el tratamiento con una dosis media de 30 U/kg/12-24 h (niños: 35 U/kg; adultos: 25 U/kg) hasta la desaparición del dolor, la recuperación de la movilidad y la comprobación ecográfica de la disminución del líquido intraarticular. Posteriormente se continúa con tratamiento trisemanal 25-35 U/Kg, adultos o niños, respectivamente, hasta la normalización ecográfica.



- Hemofílicos con inhibidor. Tratamiento inicial: 90 mcg/kg cada 2-3 horas (120 µg/kg en niños) hasta la desaparición del dolor, la recuperación de la movilidad y la disminución del líquido intraarticular, y después se continúa con 90 µg/kg o 120 µg/kg (niños) cada 24 horas hasta la normalización ecográfica.

Este estudio, en su primera fase, lo estamos desarrollando en nuestra unidad con el objetivo de averiguar cuál es la duración media del tratamiento requerida para la normalización de los hemartros, y según los resultados obtenidos plantearíamos una propuesta para un estudio multicéntrico a nivel nacional o internacional.

### Terapias de futuro

Hoy día se está trabajando en nuevas alternativas terapéuticas, tanto sobre nuevos concentrados de factor VIII o IX y agentes *bypass* que se pretende sean más eficaces como sobre fármacos que modulen la respuesta inflamatoria o que disminuyan o retrasen la lesión del cartílago. De estas últimas, todavía en fase experimental, destacamos las siguientes:

- La administración de citocina IL-10, que tiene un efecto antiinflamatorio sobre la sinovial y además beneficia el turnover de la matriz del cartílago<sup>32,33</sup>.
- La inyección de IT-10 durante la exposición del cartílago a la sangre que reduce los devastadores efectos de la sangre sobre el cartílago. La IL-10 reduce la producción por la sinovial de citocinas IL-1beta y TNF-alfa proinflamatorias<sup>34</sup>.
- También son interesantes los trabajos que investigan la correlación entre diversos marcadores biológicos en suero y orina y las alteraciones articulares vistas en radiología<sup>35</sup>.

### Resumen

La actualización bibliográfica sobre la etiopatogenia del primer hemartros que ocurre en cada una de las articulaciones del paciente hemofílico evidencia que la sangre intraarticular genera importantes cambios degenerativos en la membrana sinovial y el cartílago articular que persisten más de una semana. Esta evolución contrasta con la corta duración, de 1-3 días, de los tratamientos convencionales del hemartros en hemofilia. En base a lo anteriormente expuesto, resaltamos la conveniencia de monitorizar por ecografía el tratamiento del primer hemartros y prolongarlo hasta la normalización de estas alteraciones.

En nuestra unidad hemos desarrollado un protocolo para el tratamiento del primer hemartros, y en esta primera fase pretendemos conocer cuál es la duración

media del tratamiento requerida para conseguir la normalización ecográfica de la articulación, y según los resultados obtenidos plantearíamos una propuesta para un estudio multicéntrico a nivel nacional o internacional.

### Bibliografía

1. Aznar JA, Lucía F, Abad L, Jiménez-Yuste V, Perez Garrido R, Battle J, Balda I, Parra R, Cortina V. Haemophilia in Spain Haemophilia 2009; 1-11 (DOI: 10.1111/j.1365-2516.2009.02001.x).
2. Luck Jr JV, Silva M, Rodríguez-Merchan EC, Ghalambor N, Zahiri CA, Finn RS. Haemophilic arthropathy. The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons 2004; 12: 234-45.
3. Leticia G, Piccione F, Redola C, Zummo G. Ultrastructural appearance of human synovial membrana in the reabsorption phase of acute haemarthrosis. Ital J Orthop Traumatol 1980; 6: 275-7.
4. Aznar JA, Magallón M, Querol F, Gorina E, Tusell JM. The orthopaedic status of severe haemophiliacs in Spain. Haemophilia 2000; 6: 170-6.
5. Garnero, P. Noninvasive biochemical markers in osteoarthritis. Osteoarthritis (ed. By R.W. Moskowitz, R.D. Altman, M.C. Hochberg, J.A. Buckwalter & V.M. Goldberg). Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. 2008; 215-32.
6. Muir H. The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. Bioessays 1995; 17: 1039-1048.
7. Sandell L, Heinegard D & Hering T Cell Biology, biochemistry, and molecular biology of articular cartilage in osteoarthritis. Osteoarthritis (ed by R.W. Moskowitz, R.D. Altman, M.C. Hochberg, J. Buckwalter, V.M. Goldberg) Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, PA. 2008. pp. 73-106.
8. Stein H, Duthie RB. The pathogenesis of chronic haemophilic arthropathy. The Journal of Bone and Joint Surgery 1981; 63B: 601-9.
9. Dabbagh AJ, Trenam CW, Morris CJ, Blake DR. Iron in joint inflammation. Annals of the Rheumatic Diseases 1993; 52: 67-73.
10. Roosendaal G, Vianen ME, Wenting MJ, van Rinsum AC, van den Berg HM, Lafeber FP, Bijlsma JW. Iron deposits and catabolic properties of synovial tissue from patients with haemophilia. The Journal of Bone and Joint Surgery 1998; 80: 540-5.
11. Wen FQ, Jabbar AA, Chen YX, Kazarian T, Patel DA, Valentino LA. C-myc proto-oncogene expression in hemophilic synovitis: in vitro studies of the effects of iron and ceramide. Blood 2002; 100: 912-6.
12. Morris CJ, Blaque DR, Wainwright AC, Steven MM. Relationship between iron deposits and tissue damage in the synovium: an ultrastructural study. Ann Rheum Dis 1986; 45: 21-6.
13. Michael VV, Alias KE. Cell cycle implications in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Frontiers in Bioscience 2000; 5: D594-D601.
14. Hakobyan N, Kazarian T, Jabbar AA, Jabbar KJ, Valentino LA. Pathobiology of hemophilic synovitis I: overexpression of mdm2 oncogene. Blood 2004; 104: 2060-4.
15. Jansen NWD, Roosendaal G, Wenting MJG, Bijlsma JWJ, Theobald M, Hazewinkel HAW, Lafeber FPJG. Very rapid clearance after a joint bleed in the canine knee can not prevent adverse effects on cartilage and synovial tissue. Osteoarthritis & Cartilage (2008a). In press.



16. Valentino LA, Hakobyan N, Kazarian T, Jabbar KJ, Jabbar AA. Experimental haemophilic synovitis: rationale and development of a murine model of human factor VIII deficiency. *Haemophilia* 2004; 10: 280-7.
17. Roosendaal G, Vianen ME, van den Berg HM, Lafeber FP, Bijlsma JW. Cartilage damage as a result of hemarthrosis in a human in vitro model. *Journal of Rheumatology* 1997; 24: 1350-4.
18. Roosendaal G, Vianen ME, Marx JJ, van den Berg HM, Lafeber FP, Bijlsma JW (1996b). Blood-induced joint damage: a human in vitro study. *Arthritis and Rheumatism* 1996b; 42: 1025-32.
19. Hooiveld M, Roosendaal G, Vianen M, van den Berg HM, Bijlsma J, Lafeber F. Blood-induced joint damage: longterm effects in vitro and in vivo. *Journal of Rheumatology* 2003a; 30: 339-44.
20. Jansen NW, Roosendaal G, Bijlsma JW, DeGroot J, Lafeber FP. Exposure of human cartilage tissue to low concentrations of blood for a short period of time leads to prolonged cartilage damage: an in vitro study. *Arthritis and Rheumatism* 2007; 56: 199-207.
21. Roosendaal G, Lafeber FP. Pathogenesis of haemophilic arthropathy. *Haemophilia* 2006; 12 (Suppl 3): 117-21.
22. Jansen NW, Roosendaal G, Bijlsma JW, DeGroot J, Theobald M, Lafeber FP. Degenerated cartilage is as vulnerable to blood-induced damage as healthy cartilage is. *Annals of the Rheumatic Diseases* (2008b).doi: 10.1136/ard.2007.081182.
23. Roosendaal G, Tekoppele JM, Vianen ME, van den Berg HM, Lafeber FP, Bijlsma JW. Articular cartilage is more susceptible to blood induced damage at young than at old age. *Journal of Rheumatology* 2000; 27: 1740-4.
24. Hooiveld MJ, Roosendaal G, Jacobs KM, Vianen ME, van den Berg HM, Bijlsma JW, Lafeber FP. Initiation of degenerative joint damage by experimental bleeding combined with loading of the joint: a possible mechanism of hemophilic arthropathy. *Arthritis and Rheumatism* 2004; 50: 2024-31.
25. Roosendaal G, Tekoppele JM, Vianen ME, van den Berg HM, Lafeber FP, Bijlsma JW. Blood-induced joint damage: a canine in vivo study. *Arthritis and Rheumatism* 1999a; 42: 1033-9.
26. Hooiveld M, Roosendaal G, Wenting M, van den Berg HM, Bijlsma J, Lafeber F. Short-term exposure of cartilage to blood results in chondrocyte apoptosis. *American Journal of Pathology* 2003c; 162: 943-51.
27. Burkhardt H, Schwingel M, Menninger H, Macartney HW, Tschesche H. Oxygen radicals as effectors of cartilage destruction. Direct degradative effect on matrix components and indirect action via activation of latent collagenase from polymorphonuclear leukocytes. *Arthritis and Rheumatism* 1986; 29: 379-87.
28. Morris CJ, Earl JR, Trenam CW, Blake DR. Reactive oxygen species and iron – a dangerous partnership in inflammation. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 1995; 27: 109-22.
29. Manco-Johnson MJ, Absire T, Shapiro A, et al. Prophylaxis versus episodic treatment to prevent joint disease in boys with severe hemophilia. *N Engl J Med* 2007; 357: 535-44.
30. Morfini M, Haya S, Pollmann H, et al. Preliminary Observations from the European Study on Orthopedic Status (ESOS) in Hemophilia Patients with Inhibitors. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2006; 108: 1037.
31. Morfini M, Haya S, Tagariello G, et al. European study on orthopaedic status of haemophilia patients with inhibitors. *Haemophilia* 2007; 13 (5): 606-12.
32. Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annual Review of Immunology* 2004; 22: 929-79.
33. Van Roon JA, Van Roy JL, Gmelig-Meyling FH, Lafeber FP, Bijlsma JW. Prevention and reversal of cartilage degradation in rheumatoid arthritis by interleukin-10 and interleukin-4. *Arthritis and Rheumatism* 1996; 39: 829-35.
34. Jansen NWD, Roosendaal G, Hooiveld MJ, Bijlsma JW, van Roon JA, Theobald M, Lafeber FP. Interleukin-10 protects against blood-induced joint damage. *British Journal of Haematology* 2008c; 142: 951-63.
35. Jansen NWD, Roosendaal G, Lundin B, Heijnen L, Mauers-Bunschoten EP, Bijlsma JW, Theobald M, Lafeber FPJG. The combination of the biomarkers uCTX-II, sCOMP, and sCS846 reflects cartilage damage in haemophilic arthropathy. *Arthritis & Rheumatism* (2008e). In press.

## ECOGRAFÍA ARTICULAR EN HEMOFILIA: ¿UNA PRÁCTICA PARA HEMATÓLOGOS?

F. QUEROL<sup>1</sup>, F. APARISI<sup>2</sup>, J. BELTRÁN<sup>2</sup>, C. CIFRIÁN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Valencia. Unidad de Hemostasia y Trombosis. Hospital Universitario La Fe. Valencia

<sup>2</sup>Servicio de Radiodiagnóstico.

Hospital de Rehabilitación La Fe. Valencia

### Introducción

Las hemartrosis recurrentes y los hematomas que afectan al aparato locomotor constituyen el problema más importante en el tratamiento y profilaxis de la patología del paciente hemofílico. El objetivo de este trabajo es el conocimiento de las posibilidades de diagnóstico y control evolutivo de las lesiones musculoesqueléticas, mediante técnicas de imagen ecográfica.

El tratamiento básico de la hemofilia es la terapia sustitutiva de los factores de la coagulación. Las modalidades genéricas de tratamiento son dos: “profilaxis” y “a demanda”. En líneas generales, la “profilaxis” consiste en la administración de factor cada 48 horas en la hemofilia A y dos veces a la semana en la hemofilia B; la modalidad “a demanda” consiste en la administración de factor lo más tempranamente posible ante un problema hemorrágico. Ambos conceptos y sus variantes son suficientemente conocidas por el hematólogo, si bien, todavía en la actualidad, múltiples circunstancias implican desacuerdos en relación con las dosis, frecuencias de administración y también en el inicio y final de las diferentes modalidades.

En el paciente afecto de hemofilia grave, aquellos que presentan niveles plasmáticos de factor VIII/IX inferiores al 1%, la profilaxis ha conseguido el control casi total de las hemorragias espontáneas, aunque presumiblemente las mismas puedan aparecer en los niveles valle, es decir, relacionadas con esfuerzos o traumatismos inadvertidos que ocurren lejanos en el tiempo a la administración del factor (más de 24-36 horas). En los pacientes “a demanda” el riesgo es evidentemente mayor.

Respecto a la calidad de vida del hemofílico, los beneficios derivados de las posibilidades terapéuticas comportan que las actividades de la vida diaria sean prácticamente iguales a las de la población general y, por supuesto, los pacientes hemofílicos, con o sin factor, tienen los mismos riesgos de: accidentes traumáticos, lesiones musculoesqueléticas en actividades físicas y deportivas, sobreesfuerzos, etc. Producida la lesión, la hemorragia es prácticamente un hecho, y esta hemorragia, la causada por un traumatismo más o menos grave, incluso inadvertido, requiere dosis suplementarias de factor, es decir, no se cohibe con los niveles plasmáticos de factor que representa la profilaxis en el paciente hemofílico severo (sin profilaxis el problema es lógicamente más grave); tampoco cesa la hemorragia traumática con los niveles basales de factor del paciente con hemofilia moderada o incluso leve. En el paciente que presenta inhibidores el problema es todavía más importante y, en todos los pacientes, la función articular y muscular se altera y los procesos degenerativos, artropatía, se agravan.

La realidad es que, aun hoy, la artropatía hemofílica sigue siendo un problema y su germen, la hemartrosis, parece ser que es y seguirá siendo la principal causa de morbilidad en el paciente hemofílico<sup>1</sup>.

Clásicamente, el diagnóstico y control de las hemartrosis y los hematomas musculares se lleva a cabo mediante la evaluación clínica de la tumefacción, el dolor, la movilidad y la fuerza. El factor suele aplicarse cada 24 horas, hasta que cesan los síntomas; pero el cese de la sintomatología clínica no garantiza la normalización de la estructura articular y, con relativa frecuencia, el resangrado se produce al poco de reiniciar la actividad física, lo que da lugar a la típica “articulación diana”. Presumiblemente, un control más exhaustivo, es decir, la vigilancia ecográfica de la normalización de la estructura y el mantenimiento de la terapéutica sustitutiva hasta conseguir esa normalización, influiría positivamente sobre la artropatía hemofílica.

En los últimos años la ecografía musculoesquelética ha mostrado su excepcional utilidad y constituye una herramienta diagnóstica de primer orden en las lesiones de partes blandas: tendones, músculos y articulaciones<sup>2-4</sup>. Es utilizada sistemáticamente en los procesos reumatológicos y en las lesiones deportivas<sup>5</sup>, esto, claro está, refiriéndonos a problemas musculoesqueléticos. Su indicación como diagnóstico de imagen, en la especialidad de radiodiagnóstico, abarca prácticamente todos los campos de la medicina.

Diversas razones justifican el entusiasmo de las diferentes especialidades médicas por la técnica ecográfica, entre ellas:

1. La tecnología actual aporta aparatos de alto rendimiento que proporcionan imágenes comparables a la resonancia magnética.

2. Es un método inocuo (no irradia, requiere muy poco tiempo exploratorio) y es muy económico.
3. Es un método dinámico en tiempo real (posibilita estudiar las estructuras en movimiento) y permite la comparación con tejidos sanos.
4. Ofrece posibilidades terapéuticas (sirve de guía para las infiltraciones, punciones y biopsias).
5. Facilita parámetros objetivos (ecoestructura líquida o sólida, tamaños, vascularización, roturas tendinosas o musculares, calcificaciones, etc.).

Refiriéndonos a los problemas específicos de la hemofilia, la ecografía permite confirmar la presencia de un hemartros y su evolución, valorando su curación o resangrado. Ecográficamente puede apreciarse la sinovial inflamada en sus diferentes fases. También es posible visualizar y valorar el cartílago y su deterioro. Respecto a los hematomas, la imagen nos permite determinar el tamaño, localizar el músculo o músculos afectados y comprobar su función; posteriormente podemos valorar la evolución, su posible encapsulamiento y la vascularización, con el evidente riesgo de pseudotumor. En resumen, para el hematólogo, se trata de objetivar un problema grave y avalar las decisiones terapéuticas: las relacionadas con la continuidad o cese del tratamiento específico de factor y las pautas de fisioterapia relacionadas con la recuperación funcional.

En este trabajo se ofrece una descripción resumida de los fundamentos básicos de la ecografía y pretende mostrar la facilidad de obtención diagnóstica de las imágenes normales y su comparación con las patologías comunes en el paciente hemofílico: hemartros, sinovitis y hematomas.

---

## Generalidades sobre la ecografía

La obtención de imágenes mediante ecografía se basa en la utilización de un sonido de alta frecuencia emitido y posteriormente captado por una sonda o transductor (Figura 1). La onda sonora atraviesa los diferentes tejidos y en cada uno de ellos, dependiendo de sus características, se producen “ecos” que se transforman en señales eléctricas, que interpreta una computadora, dando lugar a imágenes que identifican la morfología de nuestro cuerpo.

Dependiendo de la frecuencia y características del transductor se consiguen diferentes profundidades y campos exploratorios. Las sondas lineales para el estudio de las estructuras musculoesqueléticas son generalmente multifrecuencia, 5-10 megahercios (MHz). La frecuencia permite que la profundidad explorada varíe entre 0,15 y 7 cm.

En los ecógrafos de clínica básica, las imágenes se obtienen en modo bidimensional, modo B, en escalas de grises que identifican las estructuras anatómicas.



Figura 1. Imagen de un ecógrafo detallando la sonda típica (lineal, 5-10 MHz) utilizada para el estudio musculoesquelético.

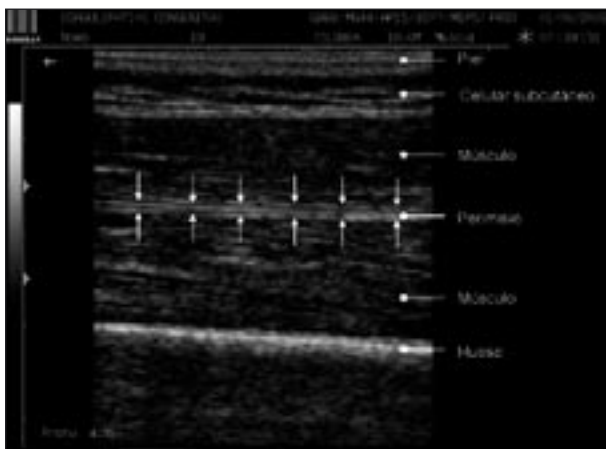


Figura 2. Sección longitudinal en la imagen ecográfica de un músculo normal.



Figura 3. Calcificación provocada por un hematoma en un paciente hemofílico. Se evidencia la proximidad a la línea cortical del hueso.

Los aparatos actuales son digitales y la imagen (valorada, medida y archivada) se transfiere con facilidad a la historia clínica, lo que nos permite el control evolutivo de una forma objetiva.

Los conceptos básicos para la interpretación de la imagen exigen un vocabulario mínimo. Las imágenes negras, **anecoicas**, se deben a la ausencia de ecos: traducen el paso del sonido por un medio líquido (en el cuerpo, la sangre es un buen ejemplo). Las imágenes blancas, **hiperecoicas**, implican la reflexión del sonido al chocar contra estructuras “duras”: el hueso (por su importante contenido en calcio). Cuando el haz de ultrasonidos atraviesa las estructuras anatómicas, en función de sus componentes (elementos celulares y agua), obtenemos imágenes más o menos brillantes, hiper- o hipoecoicas, y de formas concretas.

La piel se corresponde con una línea de pocos milímetros regular e hiperecoica; la grasa subcutánea tiene una estructura más irregular, gris hacia negro. Su espesor y estructura depende del sexo, obesidad y región explorada.

El músculo (Figura 2), en la imagen que se obtiene con los cortes longitudinales, tiene el aspecto denominado en “pluma de ave” y está delimitado por una línea hiperecoica, que se corresponde con el tejido conjuntivo (epimisio) que cubre el músculo. Las líneas blancas que se encuentran en el interior corresponden al perimisio, que engloba los haces musculares. En las sufusiones hemorrágicas, que con frecuencia afectan al paciente hemofílico, la imagen negra (hipoecoica o anecoica) correspondiente al derrame “separa” estos haces y en conjunto observamos una estructura “diferente” y, por supuesto, aumentada de tamaño.

El hueso se observa como una línea regular blanca hiperintensa que refleja totalmente los ecos. Nos sirve de referencia anatómica y, en relación con la hemofilia, es extremadamente importante comprobar la proximidad del hematoma a la línea cortical, por el riesgo de que los vasos neoformados, en el intento de reabsorción del hematoma, afecten al hueso (Figura 3) y puedan dar lugar a un pseudotumor hemofílico.

Arterias y venas (Figura 4) tienen la misma forma circular (en el corte transversal): una línea ecogénica (la de la circunferencia) rodea una imagen negra (sangre). La visualización de la arteria permite observar su latido y, además, pre-



sionando con la sonda, podemos comprobar cómo la vena se deprime con facilidad y la arteria necesita mayor presión para modificar su volumen. Resulta una imagen interesante porque permite comparar con un hematoma reciente.

En cuanto a los tendones, la otra estructura interesante como referencia para valorar las lesiones comunes del paciente hemofílico, se observan como cordones en cuyo interior se visualizan unas líneas paralelas. Los tendones tienen una propiedad ecográfica para reconocerlos, que se denomina anisotropía, y es que, para obtener una buena imagen, es necesario que el haz de ultrasonidos incida perpendicularmente sobre el eje del tendón. En hemofilia usamos los tendones cuadriceps y tibial anterior como referencia para el estudio del hemartros en rodilla y tobillo.

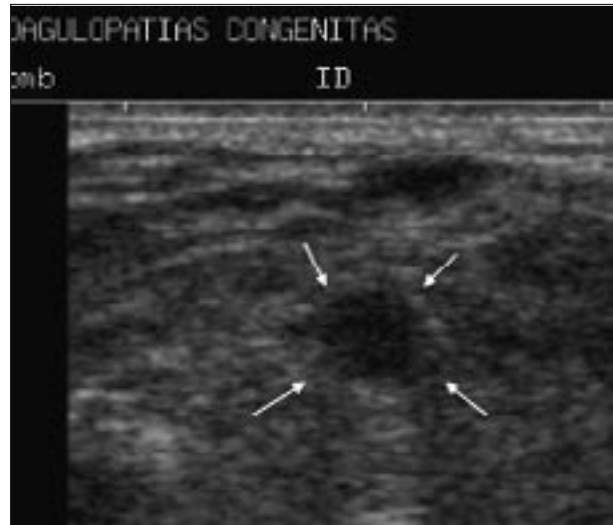


Figura 4. Imagen ecográfica identificando vasos sanguíneos.

### Lesiones comunes en el paciente hemofílico

Los hematomas superficiales preocupan a los padres de los niños hemofílicos, en ocasiones porque son extremadamente aparatosos (Figura 6), pero frecuentemente no precisan administración de factor, tan sólo cuidados físicos. La ecografía nos permite determinar el tamaño y las estructuras que compromete, valorando la evolución del posible resangrado y también el posible encapsulamiento, en cuyo caso sí que requeriría tratamientos especiales.

Los hematomas musculares requieren una atención especial. Primero es importante conocer el músculo o músculos afectados por el hematoma. Con ello aseguramos la inmovilización de la función que corresponda. La ecografía nos permite valorar su extensión y profundidad (Figura 7), aspecto este último suficientemente importante, primero por el riesgo que implica la cercanía al hueso (riesgo de pseudotumor); segundo, por el clásico tratamiento del frío local. El efecto terapéutico de las bolsas de hielo se consigue, como máximo, a una profundidad de un centímetro y medio; por tanto, si la profundidad es mayor, el frío no ofrece resultados útiles (excepto el efecto psicológico).

En el control evolutivo de un hematoma muscular, el apoyo ecográfico es muy importante para autorizar la movilidad o la carga. El dolor que puede referir un hemofílico, cuando es autorizado a mover después de haber es-

tado en reposo por culpa de un hematoma muscular, puede ser el resultado de un resangrado, cuya objetivación sólo es posible mediante la imagen.

El hemartros, sangre en el interior de una articulación, se visualiza como una imagen negra, anecoica,

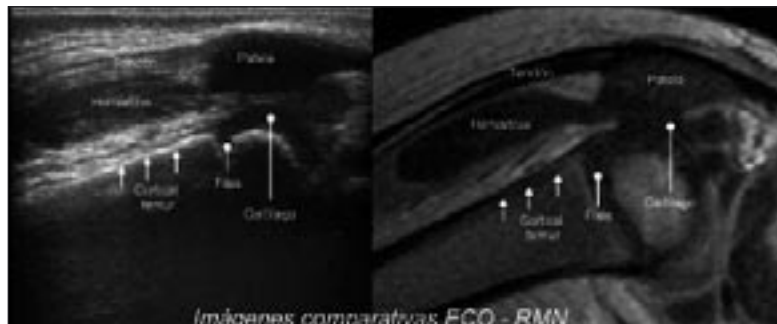


Figura 5. Imagen comparativa de ecografía y RMN en la que se observan diferentes estructuras de la rodilla de un niño hemofílico.

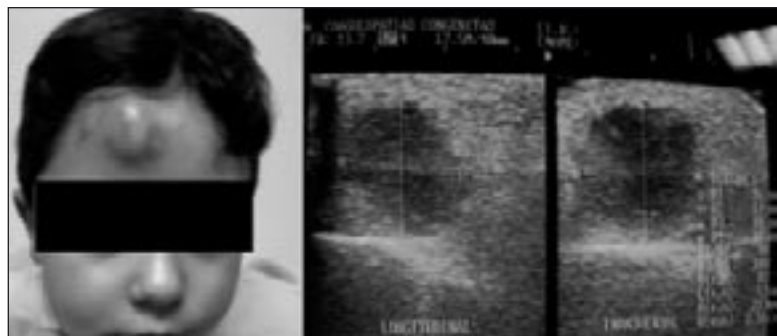


Figura 6. Hematoma superficial en paciente hemofílico.

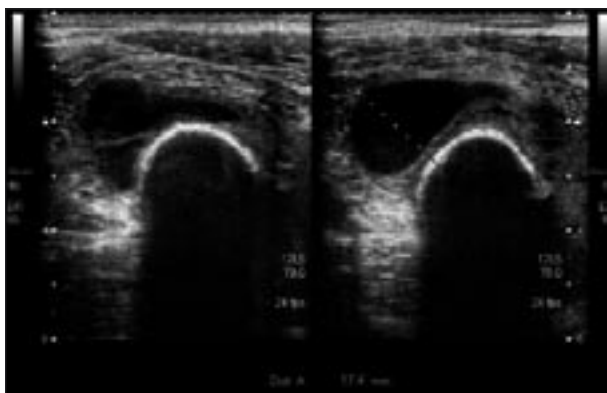


Figura 7. Sección transversal del muslo. Hematoma en el músculo crural. Obsérvese la profundidad del hematoma y la proximidad al fémur (línea hiperecogénica: blanca y brillante).

situada en el espacio articular, que desplaza en mayor o menor medida las estructuras externas. En el tobillo puede observarse un “abombamiento” que empuja al tendón del tibial anterior (Figura 8). En la rodilla se observa igualmente la “ocupación negra” intraarticular, en el fondo de saco cuadricepsital, y que también empuja el tendón (Figura 9).

La importancia de las decisiones terapéuticas respecto al hemartros<sup>6</sup> justifican sobradamente evaluar con ecografía la persistencia del derrame intraarticular.

### Sinovitis: gradación

La presencia de sangre articular, desde el primer episodio, representa la alteración del cartílago y de la membrana sinovial, estructuras ambas cuya lesión dará lugar a la artropatía hemofílica<sup>67</sup>.

La sinovitis crónica es la principal causa del hemartros de repetición. La hipertrofia sinovial, su posterior hiperplasia, origina un incremento de la vascularización en el plexo subsinovial con incremento del riesgo hemorrágico. Vasos neoformados que sangran con facilidad ante mínimos traumatismos, es decir, tan sólo

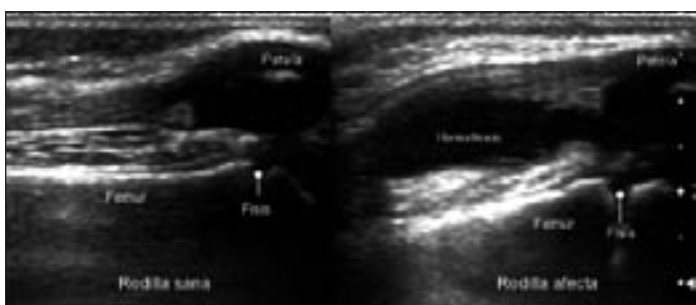


Figura 9. Imagen de hemartros de rodilla. Obsérvese cómo en la rodilla afecta la hemartrosis “abomba” la cavidad y desplaza el tendón.



Figura 8. Imagen de hemartros en tobillo. Las flechas señalan las referencias anatómicas.

el “esfuerzo” de una genuflexión, subir escaleras o incluso caminar por terrenos no llanos, puede desencadenar un nuevo hemartros.

La sinovitis tiene un tratamiento efectivo, la sinoviortesis, que ha mostrado su utilidad en la disminución de la frecuencia hemorrágica y, por ende, en la ralentización del proceso degenerativo. Vigilar la evolución de la sinovitis y, sobre todo, de la vascularización sinovial es extremadamente importante. Una sinovial hipervascularizada es garantía de resangrados, y su prevención un objetivo básico en hemofilia.

La imagen (Figura 10) muestra los grados de lesión sinovial. La presencia de, simplemente, el grado I permite al hematólogo adecuar una terapia sustitutiva acorde con el riesgo de sangrado.

### Ecografía y hemofilia

En 1976, Nowotny y colaboradores<sup>8</sup> publican en *Haemostasis* la que posiblemente sea la primera cita del uso de la ecografía, para el diagnóstico y control de hematomas en el paciente hemofílico; en su trabajo señalan el método como simple, rápido, indoloro y sin efectos adversos. Posteriormente, en 1977, McVerry<sup>9</sup> publica en *Lancet* el uso de la ecografía para el control y seguimiento de hematomas intramusculares en pacientes con coagulopatías. En 1986 Wilson<sup>10</sup>, del Nuffield Orthopaedic Centre, en Oxford, publica el trabajo “Diagnostic ultrasound in haemophilia”, en el que señala su experiencia y concluye la importancia de la ecografía en el diagnóstico y control rutinario de las hemorragias, en tejidos blandos en el paciente hemofílico.



Las publicaciones de las dos últimas décadas, en relación con el uso de la ecografía musculoesquelética en hemofilia, ya señalaban la importancia de la misma para el diagnóstico diferencial y la localización de los hematomas intramusculares<sup>11-18</sup>, y también en relación con el control de la membrana sinovial<sup>19,20</sup>.

En relación con la artropatía hemofílica se ha evidenciado la correlación clínica radiológica y ultrasonográfica<sup>(21)</sup>, señalando la importancia de la ecografía como excepcional herramienta<sup>19,20,22-24</sup>. Zukotynsky<sup>25</sup>, en 2007, describe admirablemente el uso protocolizado de la ecografía para el estudio de la artropatía hemofílica.

En España, Rodríguez Merchán<sup>26</sup>, en 1992, señala la importancia de la ecografía para diferenciar, en relación con la artropatía hemofílica, el derrame y la inflamación sinovial. Es a partir de ese momento, entre otros motivos por nuestra relación personal y profesional con el Dr. Rodríguez Merchán, que tomamos la iniciativa, a nivel nacional, del uso sistemático de la ecografía para el diagnóstico y control rutinario de los problemas hemorrágicos musculoesqueléticos del paciente hemofílico. En sucesivas ocasiones hemos señalado nuestra experiencia en el diagnóstico por la imagen, hemos dictado cursos de formación en ecografía básica para hematólogos<sup>27,28</sup> y puesto en marcha proyectos de investigación<sup>29</sup> para evidenciar los beneficios esta metodología.

## Conclusiones

Parece obvio señalar que estamos convencidos de la importancia de la imagen ecográfica en la clínica diaria, pero lo que parece incuestionable es:

- El derrame intraarticular puede ser confirmado mediante la ecografía.
- La ecografía permite valorar la evolución de un hemartros, además de por su ecoestructura, evaluando la disminución de su tamaño hasta obtener la imagen basal de normalidad.
- La sinovitis puede ser confirmada mediante ecografía.
- La gradación de la sinovitis mediante ecografía puede facilitar las decisiones terapéuticas encaminadas a la prevención de la artropatía hemofílica.
- La ecografía permite la identificación y localización intra- o extramuscular de los hematomas.
- La ecografía permite valorar la evolución de los hematomas, evaluando su ecoestructura y su tamaño.
- El uso rutinario de la ecografía puede mejorar el diagnóstico y tratamiento de la artropatía hemofílica.

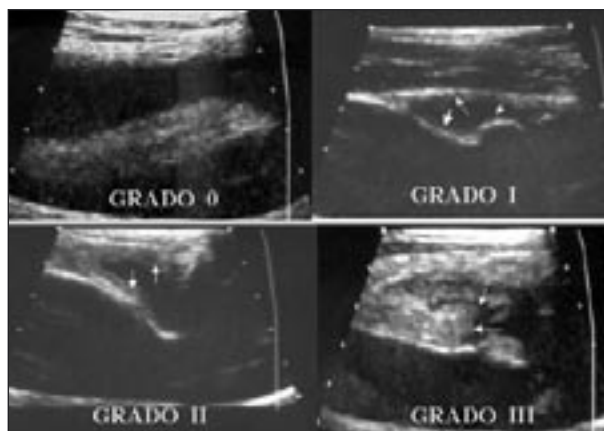


Figura 10. Gradación de la sinovitis acorde a la imagen ecográfica.

## Bibliografía

1. Raffini L, Manno C. Modern management of haemophilic arthropathy. *British Journal Haematology* 2007; 136: 777-87.
2. Lefebvre E, Pourcelot L. Ecografía musculotendinosa. Barcelona (España): Masson; 1991.
3. Lecoq B, Fournier L, Carteni M, Morin F, Marcelli C. Ecografía en reumatología. EMC (Elsevier SAS, París). Aparato locomotor; 2005. pp. 140-50.
4. Van Hoolsbeeck MT, Introcaso JH. Ecografía musculoesquelética. Madrid (España): Marbán; 2006.
5. Balias R, Sala X, Álvarez G, Jiménez F. Ecografía musculoesquelética. Barcelona (España): Paidotribo; 2007.
6. Roosendaal G, Cansen NW, Schutgens R, Lafeber FP. Haemophilic arthropathy: the importance of the earliest haemarthroses and consequences for treatment. *Haemophilia* 2008; 14 (6): 4-10.
7. Roosendaal G, Lafeber FP. Pathogenesis of haemophilic arthropathy. *Haemophilia* 2006; 12 (3): 117-21.
8. Nowotny C, Niessner H, Thale E, Lechner K. Sonography: a method for localization of hematomas in hemophiliacs. *Haemostasis* 1976; 5 (3): 129-35.
9. McVerry BA, Voke J, Vicary FR, Dormandy KM. Ultrasonography in the management of haemophilia. *Lancet* 1977; 1 (8017): 872-4.
10. Wilson DJ, McLardy-Smith PD, Woodham CH, MacLarnon JC. Diagnostic ultrasound in haemophilia. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 1987; 69-B (1): 103-7.
11. Kumari S, Fulco JD, Karayalcin G, Lipton R. Gray scale ultrasound: evaluation of iliopsoas hematomas in hemophiliacs. *American Roentgen Ray Society* 1979; 133: 103-6.
12. Heim M, Horooszwski H, Setigsohn U, Martinowitz U, Strauss S. Ilio-Poas Hematoma-its Detection and Treatment with Special Reference to Hemophilia. *Arch Orthop Traumat Surg* 1982; 99: 195-7.
13. Shirkhoda A, Mauro MA, Staab EV, Blat PM. Soft-tissue hemorrhage in hemophiliac patients. *Radiology* 1983; 147: 811-4.
14. Aspelin P, Pettersson H, Ssigurjonsson S, Nilsson IM. Ultrasonographic examinations of muscle hematomas in hemophiliacs. *Acta Radiol Diagn* 1984; 25 (6): 513-6.
15. Taddeo U, Sighinolfi L, Serino ML, Vita G, Zucchi F. Ultrasonics in the diagnosis of deep hematomas in hemophilia [Abstract]. *Radiol Med* 1986; 72 (10): 738-42.
16. Graif M, Martinowitz U, Strauss S, Heim M, Itzsch Y. Sonographic localization of hematomas in hemophilic patients

- with positive iliopsoas sign. *AJR Am J Roentgenol* 1987; 148 (1): 121-3.
17. MacDonald PB, Loch RC, Lindsay D, Levi C. Haemophilic arthropathy of the shoulder. *J Bone Joint Surg* 1990; 72B: 470-1.
  18. Hermann G, Gilbert MS, Abdelwahab IF. Hemophilia: evaluation of musculoskeletal involvement with CT, sonography and MR imaging. *AJR Am J Roentgenol* 1992; 158 (1): 119-23.
  19. Bagnolesi P, Romagnoli C, Perri G, Trippi D, Marini C. Echography of the knee in the haemophilic [Abstract]. *Radiol Med* 1988; 76 (5): 405-8.
  20. Bagnolesi P, Campassi C, Cilotti A, Lencioni R, Napoli V, Bartolozzi C. Hemophilic arthropathy: echography and radiology [Abstract]. *Radiol Med* 1993; 85 (1-2): 28-33.
  21. Klukowska A, Czyrny Z, Laguna P, Brzewski M, Serafin-Krol MA, Rokicka-Milewska R. Correlation between clinical, radiological and ultrasonographical image of knee joints in children with haemophilia. *Haemophilia* 2001; 7: 286-92.
  22. Antunes SV, Negrão JR, Lupinacci FL, Kubota E, Fernandes ARC. Sonography for assessment of knee arthropathy in Brazilian haemophilic patients. *Haemophilia* 2008; 14: 145-6.
  23. Acharya SS, Schloss R, Dyke JP, Mintz DN, Christos P, Dimichelle DM, Adler RS. Power Doppler sonography in the diagnosis of hemophilic synovitis – a promising tool. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*; 6: 2055-61.
  24. Acharya SS. Hemophilic joint disease – current perspective and potential future strategies [Abstract]. *Transfus Apher Sci* 2008; 38 (1): 495-5.
  25. Zukotynski K, Jarrin J, Babyn PS, Carcao M, Pazmino J, Stain AM, Doria S. Sonography for assessment of haemophilic arthropathy in children: a systematic protocol. *Haemophilia* 2007; 13 (3): 293-304.
  26. Merchán EC, De Orbe A, Gago J. Ultrasound in the diagnosis of the early stages of hemophilic arthropathy of the knee. *Acta Orthop Belg* 1992; 58 (2): 122-5.
  27. Querol F, Aparisi F, Aznar JA. Actas de conferencias del I Curso ecografía para hematólogos. 2007 Dic 10-11; Valencia: Departamento de Fisioterapia Universidad de Valencia; 2007.
  28. Querol F, Aparisi F. Actas de conferencias del Curso de ecografía y ultrasonidos terapéuticos. Principios básicos y aplicaciones prácticas. 2009 Ene 13-14; Valencia: Departamento de Fisioterapia Universidad de Valencia; 2009.
  29. Querol F, Cortina V, Cid AR, Haya S, Aznar JA. Clinical and echographical control protocol of haemarthrosis in haemophilia patients with inhibitors: evaluation of the efficacy of recombinant factor VIIa in the evolution process (EFFISEVEN protocol). *Haemophilia* 2008; 14 (6): 36-44.

## EL PARTO EN NIÑOS CON HEMOFILIA: ¿TRATAR O NO TRATAR?

C. ALTISENT

*Unitat d'Hemofília.*

*Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona*

### Introducción

Las hemofilias A y B son coagulopatías congénitas ligadas al cromosoma X. Los genes que codifican las proteínas plasmáticas deficitarias, los factores VIII y IX de la coagulación, se localizan en el brazo largo del

cromosoma X, en las zonas Xq28 y Xq27, respectivamente. La hemofilia tiene una distribución generalizada, sin distinción de razas. Su incidencia es de 1 por cada 5.000 varones para la hemofilia A y de 1 por cada 35.000 para la hemofilia B. En el 80-85% de los casos se trata de hemofilia A y el 15-20% restante de hemofilia B. Según los niveles de FVIII o FIX, se clasifica en grave (<1%), moderada (1-5%) y leve (>5%); las manifestaciones clínicas se correlacionan con los niveles de factor. En un tercio de los casos no existen antecedentes familiares y se consideran casos esporádicos. En la hemofilia grave, la proporción de casos familiares y esporádicos es equiparable; no obstante, en la actualidad, el consejo genético basado en el estudio molecular contribuye a disminuir los casos familiares y está modificando tal proporción.

El tratamiento de la hemofilia consiste en la administración intravenosa del factor deficitario. Existen dos modalidades terapéuticas: según demanda y profilaxis. En los últimos años el tratamiento profiláctico se ha recomendado como la mejor opción terapéutica para la prevención de la artropatía hemofílica y de las hemorragias graves, como la cerebral. Suele iniciarse en edades tempranas (a los 2 años) porque la mitad de los niños suelen presentar la primera hemorragia articular antes de esta edad. Los productos recombinantes disponibles desde el inicio de los años 90 han demostrado una gran eficacia y seguridad; sin embargo, en la actualidad, la principal complicación del tratamiento sustitutivo es la aparición de un inhibidor, hecho que ocurre en un 25-30% de los pacientes con hemofilia grave que reciben tratamiento sustitutivo.

Los factores que predisponen a la aparición de un inhibidor están en relación con las características del paciente, como la etnia, gravedad de la hemofilia, antecedentes familiares de inhibidor, tipo de mutación del gen, genotipo HLA y polimorfismos en las regiones del promotor de la interleucina 10 y factor de necrosis tumoral alfa; no obstante, también se han descrito factores ambientales o relacionados con el tratamiento, como la edad de la primera exposición al fármaco, tratamiento intensivo, tratamiento profiláctico o según demanda y tipo de factor administrado –plasmático o recombinante<sup>1</sup>. El estudio CANAL (Concerted Action on Neutralising Antibodies in Severe Haemophilia A) es un estudio multicéntrico y retrospectivo que analizó los potenciales determinantes del desarrollo de inhibidor en 319 pacientes. Evidenció que existía una correlación entre la edad al inicio del tratamiento y la aparición del inhibidor: en el 41% de los pacientes que lo iniciaban antes del primer mes frente a sólo un 18% de los que lo inician a partir de los 18 meses; no obstante, esta asociación desaparecía al ajustarlo según la intensidad del tratamiento y otras variables. Las conclusiones de este estudio fueron que se puede disminuir el riesgo de su aparición evitando intervenciones

quirúrgicas electivas al inicio del tratamiento e indicando la profilaxis de forma temprana<sup>2</sup>. Una publicación posterior en la que se analizó la misma cohorte de pacientes propuso unos índices de riesgo de desarrollo de inhibidor; éstos son: antecedentes familiares de inhibidor (2 puntos), tipo de mutación (2 puntos) y tratamiento intensivo de 5 días en la primera exposición al fármaco (3 puntos). Basados en este cálculo, la incidencia de inhibidor fue del 6% en pacientes sin factores de riesgo, 23% en los que puntuaban 2 y 57% en los que alcanzaban 3 o más puntos<sup>3</sup>.

### Diagnóstico prenatal

En la hemofilia, el diagnóstico prenatal permite dar recomendaciones para el momento del parto y el tratamiento del neonato con hemofilia. En caso de que no se haya realizado tal diagnóstico prenatal en las mujeres portadoras de un feto varón, las recomendaciones deben ser las mismas que en el caso de un feto afectado y confirmar o descartar el diagnóstico lo antes posible mediante la determinación del factor VIII o IX en la sangre de cordón umbilical. La complicación más grave del neonato con hemofilia en el parto es la hemorragia cerebral. Según la evidencia disponible, la vía vaginal sigue siendo la recomendada para el parto, siempre y cuando no existan indicaciones ginecológicas de cesárea<sup>4</sup>, ya que se han descrito hemorragias cerebrales en niños con hemofilia nacidos tanto mediante parto vaginal como cesárea<sup>5</sup>. Están contraindicadas las punciones en cuero cabelludo para la determinación del pH o colocación de electrodos craneales, así como la utilización de extractores tipo fórceps y *vacuum*.

En la población general, la incidencia clínica de hemorragias cerebrales es muy baja y se ha contabilizado en primíparas en 1 de cada 860 y 664 partos con extracción mediante fórceps y *vacuum*, respectivamente, así como en 1 de cada 907 cesáreas indicadas en el momento del parto, 1 de cada 2.750 cesáreas programadas y 1 de cada 1.900 partos espontáneos por vía vaginal<sup>6</sup>. Esta baja incidencia clínica contrasta con el estudio ecográfico publicado por Heibel<sup>7</sup>, quien realizó un control con ecografía craneal a los tres días del parto a 1.000 neonatos consecutivos sin signos de sufrimiento perinatal y halló 35 hemorragias intracraneales y 34 posibles secuelas de hemorragia. No se reporta el seguimiento clínico de estos neonatos. La ecografía craneal es útil para el cribado de hemorragia craneal, pero no es útil para el diagnóstico del hematoma subdural o subaracnoideo, en cuyos casos está indicada la tomografía computarizada o la resonancia magnética. No existe consenso en cuanto a la recomendación de practicar un estudio de imagen en neonatos con hemofilia. En un estudio realizado en 45 hospitales del Reino Unido, un 41% practicaba estudio eco-

gráfico craneal del neonato, un 38% lo practicaba si existían condiciones especiales durante el parto (prolongado o mediante fórceps) y un 21% lo indicaba si existían signos clínicos sugestivos de hemorragia<sup>8</sup>. Los síntomas de la hemorragia cerebral pueden ser graves, con signos neurológicos manifiestos, aunque en ocasiones son vagos y retardan el diagnóstico de la hemorragia.

### Hemorragia cerebral

Alrededor del 15-33% de los neonatos con hemofilia presenta complicaciones hemorrágicas y la incidencia de hemorragia intracraneal es del 3,58-12%, con una mortalidad del 0,6-21,9%. Los estudios más recientes sitúan el porcentaje de hemorragia cerebral en el 3,5-4% en los países con unas condiciones de tratamiento óptimas, cifra considerada aún elevada con respecto a la población normal, estimada en 0,03% en partos de bajo riesgo (cesárea electiva) y en 0,1% en los de alto riesgo (parto con extractor *vacuum*)<sup>9,10</sup>. La causa más frecuente es el traumatismo en el momento del parto. En una revisión de 66 artículos publicados entre los años 1949 y 1999, Kulkarni describió las complicaciones neonatales de 349 niños<sup>11</sup>; la hemorragia más frecuente se localizaba en el cráneo: intracraneal o extracraneal en el 27 y 14% de los casos, respectivamente. La hemorragia después de la circuncisión se presentó en un 30% y remarcó que esta complicación se reportaba preferentemente en artículos publicados entre los años 1949 y 1966. La hemorragia después de punción venosa se observó en un 16%, y la umbilical en un 6%. Con una frecuencia inferior al 3% fueron la hemorragia en un órgano gastrointestinal y también la articular.

En otra revisión bibliográfica entre los años 1964 y 1996, Kulkarni y Lushe<sup>12</sup> recopilaron 109 hemorragias intra- y extracraneales; identificaron 33 publicaciones que describían 109 episodios: 65% intracraneales, 35% extracraneales y 5% ambos tipos de hemorragia. Los síntomas clínicos fueron: anemia, hipotensión, shock y letargia. Sin embargo, sólo los pacientes con hemorragia intracraneal presentaron déficits neurológicos (15%) y secuelas neurológicas tardías (38%). El tipo de hemofilia se reportaba en 40 neonatos: 35 con hemofilia A y, a su vez, 22 fueron graves, 10 moderadas y tres leves; así como en 5 con hemofilia B, de las cuales una fue grave, dos moderadas y una leve; y en un caso no fue reportado el tipo. Esta revisión confirma que esta complicación se puede presentar en todos los tipos de gravedad de la hemofilia.

Ljung reportó todas las complicaciones neonatales de todos los niños nacidos en Suecia durante el periodo 1970-1999<sup>4</sup>. Así, aunó 117 casos, de los que 12 sufrieron un cefalohematoma subgaleal y cuatro

una hemorragia intracraneal; éstas ocurrieron en pacientes con hemofilia esporádica, y uno de ellos era prematuro.

La prematuridad es un factor de riesgo para la hemorragia intracraneal y la presenta un 7,1% de los neonatos con peso inferior a 1,500 g. Kraft<sup>13</sup> describió las incidencias acaecidas en tres niños hemofílicos prematuros: dos gemelos con hemofilia A moderada (FVIII del 2%) y uno con hemofilia B leve (FIX del 6%) sometido a tratamiento profiláctico para la prevención de la hemorragia cerebral. Uno de los dos gemelos falleció por sepsis y hemorragia cerebral. Con el tratamiento intensivo instaurado no desarrollaron inhibidor. Con su experiencia, estos autores recomiendan el tratamiento profiláctico en prematuros. No obstante, en la literatura existen pocos datos farmacocinéticos en prematuros y neonatos a término. En un estudio realizado en un prematuro con hemofilia moderada, la recuperación fue del 86% y la vida media fue de 6,43 horas<sup>14</sup>.

Con el fin de disminuir el riesgo de hemorragia cerebral durante el parto vaginal, Gilchrist *et al.*<sup>15</sup> administraron tratamiento intrauterino a las 37 semanas de gestación y previo al parto. Después de la administración de 86 UI/kg de FVIIIr, con una teórica recuperación del 160%, el residual de sangre de cordón a las 7 horas fue sólo del 38%. Los autores consideran que estos niveles bajos podría ser secundarios a un excesivo consumo durante la separación de la placenta en el momento del parto o debido a que en el momento de la infusión el factor se distribuyera por la circulación placentaria. El caso de este niño, que tenía una inversión del intrón 22, desarrolló un inhibidor de alto título al año de edad y a los 12 días de exposición. La incidencia de hemofilia en casos de muerte intrauterina y en neonatos debida a hemorragia cerebral es desconocida; en caso de niños prematuros debida a hemorragia intraventricular no se realiza estudio para descartar una coagulopatía.

Los hematomas subgaleales son infrecuentes y, en general, se asocian a la utilización del extractor *vacuum*. Debido a que el hematoma se localiza en una zona de extenso tejido plano, la pérdida hemática puede ser importante y causar shock hipovolémico, compresión cerebral y precisar un desbridamiento quirúrgico<sup>16</sup>. Kilani y Wetmore<sup>17</sup> estimaron una mortalidad del 11,8% en 34 neonatos con hematoma subgaleal; el 91,2% había tenido un parto ayudado con *vacuum* o fórceps y con elevada frecuencia se asociaba a hemorragia intracraneal. En una revisión bibliográfica, Plauché<sup>18</sup> la estimó en un 22,8%, después de analizar 123 casos, de los cuales un 64% de los partos fue ayudado con instrumentos, aunque también se presentó en partos vaginales espontáneos y con cesárea.

La presencia de un cefalohematoma importante o un hematoma subgaleal en ausencia de maniobras traumáticas debe orientar hacia la presencia de una posible

coagulopatía<sup>19</sup>. El reconocimiento temprano del hematoma subgaleal y la diferenciación del cefalohematoma, junto con un tratamiento sustitutivo adecuado, es lo idóneo para mejorar el pronóstico de esta grave hemorragia extracraneal.

Recientemente se han publicado las consecuencias a largo plazo de la hemorragia intracraneal en un centro de hemofilia en Londres<sup>20</sup>. De 102 niños con hemofilia leve, moderada o grave, nacidos entre 1994 y 2002, 11 de los 63 con hemofilia grave (17,5%) sufrieron una hemorragia intracraneal; 7 de estos 11 estaban en el periodo neonatal, y 3 de estos 7 fallecieron en el curso de las dos semanas después del parto. Al comparar 6 de estos niños con un promedio de edad de 5,5 años con 11 niños con hemofilia de 7,8 años de edad como promedio y sin antecedentes de hemorragia intracraneal, se identificó un retraso importante en lo que respecta a las actividades motora y psicológica.

---

### Prevención de la hemorragia cerebral

Las consecuencias de la hemorragia intracraneal han planteado la necesidad de administrar dosis bajas de factor a todos los neonatos con diagnóstico prenatal de hemofilia. Buchanan<sup>21</sup> revisó su experiencia personal en los últimos tres años a partir de siete neonatos con hemofilia grave o moderada; dos de ellos padecieron una hemorragia intracraneal masiva y un tercero un hematoma subgaleal con descenso de la hemoglobina hasta 4,5 g/dL; otro necesitó una intervención quirúrgica urgente a las 30 horas debido a una malrotación y vólvulo. Una de las hemorragias intracraneales la presentó un niño con antecedentes familiares y parto mediante cesárea, a los cuatro días de vida. Ninguno de los niños había recibido tratamiento profiláctico. El autor considera la imposibilidad de realizar un estudio clínico aleatorizado, por lo que, aunque sean recomendaciones con escaso nivel de evidencia, él aconseja administrar una dosis de factor recombinante VIII o IX a todos los niños con sospecha o confirmación de hemofilia en las primeras 24 horas de vida. En un niño de aproximadamente 3 kg de peso, el autor considera que la dosis que contiene menor cantidad de FVIII o FIX (250-300 UI) podría representar un incremento del 150-200% para el FVIII o del 60-80% para el FIX, con lo cual se adquiere un buen nivel hemostático durante las 24 horas y aceptable durante 72 horas. No hay datos en la literatura que confirmen esta recuperación y vida media<sup>14</sup>.

Kulkarni<sup>22</sup> reportó los resultados de un cuestionario remitido por el Medical and Scientific Advisory Council de la National Hemophilia Foundation remitido a obstetras, hematólogos y neonatólogos colaboradores de centros de tratamiento de hemofilia para conocer las prácticas sobre el parto de portadoras y el trata-



miento del neonato para la prevención de la hemorragia intracraneal. De los 29 neonatólogos y 28 pediatras hematólogos que respondieron al cuestionario, el 89% de los hematólogos estaba a favor de una profilaxis temprana en los recién nacidos con hemofilia, pero el 60% no aceptaba el tratamiento inmediato después del parto para compensar el traumatismo inherente al mismo.

Las recomendaciones aceptadas hasta la actualidad son: a) practicar un parto vaginal siempre que no exista indicación obstétrica para una cesárea; b) obtener sangre de cordón para la determinación de factores; c) determinar el tiempo de protrombina y el tiempo de tromboplastina parcial activada y factores de la coagulación a todos los recién nacidos con hemorragia intracraneal que no presenten antecedentes familiares de hemofilia, con el fin de detectar casos esporádicos; d) administrar vitamina K por vía oral, aumentando la dosis o continuándola durante un periodo más prolongado para prevenir la hemorragia del recién nacido debida a deficiencia de esta vitamina; y e) en los niños con hemofilia y hemorragia intracraneal, iniciar el tratamiento profiláctico lo antes posible para evitar recidivas<sup>11,23</sup>.

No existen datos en la literatura que permitan valorar las ventajas e inconvenientes del tratamiento profiláctico en el neonato con hemofilia, con excepción del niño prematuro, aunque Ljung<sup>9</sup> considera que debe practicarse el mismo control que en el neonato nacido a término, pero realizando ecografías seriadas. La duda de que el tratamiento temprano pueda incrementar el riesgo de desarrollo de inhibidor ha condicionado una conducta más expectante en situaciones que pueden ser de alto riesgo.

## Recomendaciones

Con los datos disponibles hasta la actualidad, tratar o no tratar al neonato sigue siendo una pregunta sin respuesta. No obstante, se pueden plantear las opciones en dos supuestos posibles:

### **Paciente con diagnóstico prenatal de hemofilia**

Deben seguirse las recomendaciones para evitar las maniobras traumáticas y consensuar con el ginecólogo y pediatra neonatólogo las condiciones específicas de cada portadora (primípara, nulípara, complicaciones en anteriores partos...) con el fin de indicar un parto vaginal o por cesárea. Debe considerarse la posibilidad de que la hemorragia cerebral puede no presentarse inmediatamente después del parto y recomendar siempre el estudio ecográfico craneal por la incidencia de anomalías en pacientes sin coagulopatía. Según estu-

dios recientes, el riesgo de aparición de inhibidor inducido por el tratamiento sustitutivo estaría en relación con la intensidad del mismo y la indicación clínica. La utilización en neonatos de una dosis única no elevada (<50 UI/kg) quizás no represente un mayor riesgo de aparición de inhibidor y tiene su indicación ante la sospecha clínica de hemorragia grave.

### **Paciente con hemofilia esporádica**

En este caso, la primera manifestación clínica puede ser grave, por lo que es fundamental confirmar el diagnóstico lo más temprano posible. Si el tratamiento debe ser intensivo (hemorragia cerebral), al finalizar el mismo hay que valorar el inicio precoz de la profilaxis para prevenir el desarrollo de inhibidor.

## Conclusión

Dada la baja incidencia de esta coagulopatía es difícil realizar estudios aleatorizados que permitan unas recomendaciones con alto grado de evidencia. Las guías clínicas y el análisis de datos de estudios retrospectivos, así como la inclusión de pacientes en estudios abiertos y prospectivos es el camino para resolver las dudas que plantea el tratamiento del neonato hemofílico.

## Bibliografía

1. Astermark J, Lacroix-Desmazes S, Reding MT. Inhibitor development. *Haemophilia* 2008; 14 (supl 3): S36-S42.
2. Gouw SC, van der Bom JG, van den Berg, for the CANAL Study group. Treatment-related risk factors of inhibitor development in previously untreated patients with hemophilia A: the CANAL cohort study. *Blood* 2007; 109: 4648-54.
3. Ter Avest PC, Fischer K, Mancuso ME, Santagostino E, Yueste VJ, vanden Berg HM et al. Risk stratification for inhibitor development at first treatment for severe hemophilia A: a tool for clinical practice. *J Thromb Haemost* 2008; 6 (12): 2048-54.
4. Ljung R, Lindgren AC, Petrini P, Tengborn L. Normal vaginal delivery is to be recommended for haemophilia carrier gravidae. *Acta Paediatr* 1994; 83 (6): 609-11.
5. Michaud JL, Rivard GE, Chessex P. Intracranial hemorrhage in a newborn with hemophilia following elective cesarean section. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1991; 13 (4): 473-5.
6. Towner D, Castro MA, Eby-Wilkens E, Gilbert WM. Effect of mode of delivery in nulliparous women on neonatal intracranial injury. *N Engl J Med* 1999; 341 (23): 1709-14.
7. Heibel M, Heber R, Bechinger D, Kornhuber HH. Early diagnosis of perinatal cerebral lesions in apparently normal full-term newborns by ultrasound of the brain. *Neuroradiology* 1993; 35 (2): 85-91.
8. Chalmers EA, Williams MD, Richards M, Brown SA, Liesner R, Thomas A et al. Management of neonates with inherited bleeding disorders – a survey of current UK practice. *Haemophilia* 2005; 11: 186-7.
9. Ljung RCR. Intracranial haemorrhage in haemophilia A and B. *Br J Haematol*. 2007; 140: 378-384.



10. Ljung R, Chambost H, Stain AM, DiMichele D. Haemophilia in the first years of life. *Haemophilia* 2008; 14 (supl 3): S188-S195.
11. Kulkarni R, Lusher J. Perinatal management of newborns with haemophilia. *Br J Haematol* 2001; 112: 264-74.
12. Kulkarni R, Lusher JM. Intracranial and extracranial hemorrhages in newborns with hemophilia: a review of the literature. *J Pediatr Hematol Oncol* 1999; 21 (4): 289-95.
13. Kraft KE, Verlaak R, van Heijst AF, Nováková I, Brons PP. Management of haemophilia in three premature infants. *Haemophilia* 2008; 14 (2): 378-80.
14. Gale RF, Hird MF, Colvin BT. Management of a premature infant with moderate haemophilia A using recombinant factor VIII. *Haemophilia* 1998; 4: 850-3.
15. Gilchrist GS, Wilke JL, Muehlenbein LR et al. Intrauterine correction of factor VIII deficiency. *Haemophilia* 2001; 7: 497-9.
16. Amar AP, Aryan HE, Meltzer HS, Levy ML. Neonatal subgaleal hematoma causing brain compression: report of two cases and review of the literature. *Neurosurgery* 2003; 52 (6): 1470-4.
17. Kilani RA, Wetmore J. Neonatal subgaleal hematoma: presentation and outcome-radiological findings and factors associated with mortality. *Am J Perinatol* 2006; 23 (1): 41-8.
18. Plauché WC. Subgaleal hematoma. A complication of instrumental delivery. *JAMA* 1980; 244 (14): 1597-8.
19. Chia CC, Huang SC. Neonatal coagulopathy presents as unusual and severe subgaleal hematomas after vacuum delivery. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2008; 47 (4): 435-7.
20. Bladen M, Khair K, Liesner R, et al. Long-term consequences of intracranial haemorrhage in children with haemophilia. *Haemophilia* 2009; 15: 184-92.
21. Buchanan GR. Factor concentrate prophylaxis for neonates with hemophilia. Twelfth annual American Society of Pediatric Hematology/Oncology meeting: something different this year (guest commentaries). *J Pediatric Hematol Oncol* 1999; 21 (4): 254-5.
22. Kulkarni R, Lusher JM, Henry RC, Kallen DJ. Current practices regarding newborn intracranial haemorrhage and obstetrical care and mode of delivery of pregnant haemophilia carriers: a survey of obstetricians, neonatologists and haematologists in the United States, on behalf of the National Hemophilia Foundation's Medical and Scientific Advisory Council. *Haemophilia* 1999; 5: 410-5.
23. Street AM, Ljung R, Lavery SA. Management of carriers and babies with haemophilia. *Haemophilia* 2008; 14 (supl 3): S181-S187.

## VALORACIÓN CRÍTICA DE LOS MODELOS DE PROFILAXIS PRIMARIA

C. SEDANO

*Servicio de Hematología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander*

### Resumen

En los pacientes hemofílicos, la artropatía ocasionada por repetidas hemorragias articulares es la causa más importante de morbilidad, y su prevención, dada la irreversibilidad del proceso, es uno de los objetivos primordiales a conseguir.

Está demostrado, tanto por estudios observacionales como prospectivos, que la mejor forma de conservar la integridad articular es evitando que se produzcan las hemorragias; y para conseguirlo, la profilaxis primaria iniciada antes de que exista ningún daño en la articulación es el tratamiento de elección.

Sin embargo, hay toda una serie de circunstancias individuales, como son el fenotipo clínico, los accesos venosos disponibles, el soporte familiar y social y la relación coste-beneficio que, sobre todo en los primeros momentos de la implantación, pueden condicionar este régimen terapéutico. Y se han buscado otras pautas más individualizadas y asumibles por cada paciente y su medio, que puedan ser igualmente eficaces.

### Introducción

El tratamiento profiláctico tuvo sus orígenes en Suecia en 1958, tras la observación de que los pacientes con hemofilia moderada y, por tanto, con niveles de factor VIII por encima del 1%, raramente desarrollaban una artropatía crónica<sup>1</sup>. Intentando reproducir una situación similar en los pacientes con hemofilia grave, se administró a un pequeño número de pacientes con hemorragias de repetición, concentrados de factor VIII de forma continuada para elevar sus niveles plasmáticos por encima del 1% y determinar si de esta manera se frenaban las hemorragias y la progresión de la artropatía. Sus buenos resultados fueron la base para luego aplicarlo de forma más extensa, y en 1972 se comenzó a utilizar también en la hemofilia B.

En 1976 se publicaron los primeros resultados de la experiencia sueca; se mostró su efectividad y se observó que, para evitar el daño articular, debía iniciarse a una edad muy temprana<sup>2</sup>. Esta opción terapéutica se extendió a otros países europeos, que implantaron modelos más individualizados, atendiendo antes al patrón hemorrágico del paciente y al acceso venoso disponible que al nivel alcanzado del factor VIII plasmático, y observaron que con dosis menores también se obtenían resultados satisfactorios<sup>3</sup>.

En 1982 se diagnosticó el primer caso de sida en un paciente hemofílico, y durante esa década, debido a los desgraciados acontecimientos surgidos como consecuencia de las transmisiones víricas provocadas por los hemoderivados administrados, se frenó de forma importante la aplicación de la profilaxis.

Pero desde que a comienzos de los años noventa se aprobaron los primeros concentrados de factores recombinantes, y los procedimientos de purificación de los derivados plasmáticos consiguieron aportar un alto grado de seguridad, se retomó con ímpetu la aplicación de la profilaxis.

En 1992 se comunicaron los primeros resultados de la experiencia sueca tras 25 años de seguimiento. Ad-

ministrando dosis de 20-40 UI/kg de concentrado de factor VIII, tres veces a la semana en el caso de hemofilia A, o 30-40 UI/kg de concentrado de factor IX, dos veces a la semana en la hemofilia B, e iniciándolo antes de los 2 años de edad, los pacientes presentaban menos de un hemartros al año y su evaluación ortopédico-radiológica a los 10 años de la implantación fue normal en un alto porcentaje de ellos<sup>4,5</sup>.

Otros estudios europeos también mostraron la necesidad de comenzar la profilaxis antes de que se produzca el daño articular, para evitar que éste sea irreversible<sup>6</sup>.

Aledort, en 1994, publicó un estudio longitudinal, de 6 años de seguimiento, donde confirmó el beneficio de la profilaxis y observó que está más relacionado con su mantenimiento ininterrumpido que con la dosis administrada. También resaltó que, si ya existe daño articular antes de iniciar la profilaxis, ésta puede retrasar o estabilizar la progresión de la artropatía, pero no revertirla<sup>7</sup>.

### Estado actual de su aplicación

Desde 1994 es el tratamiento recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), Federación Mundial de Hemofilia (WHF), Fundación Nacional de Hemofilia (MASAC), entre otros, para los pacientes con hemofilia A y B grave<sup>8-10</sup>.

De gran importancia ha sido el primer estudio prospectivo, aleatorizado y multicéntrico, tras 49 meses de seguimiento, publicado en 2007 (the US Joint Outcome Study: JOS), que comparó los beneficios, sobre todo articulares, de la profilaxis *versus* tratamiento a demanda. Mostró que el 93% de los hemofílicos que utilizaban profilaxis mantenían las articulaciones conservadas y un descenso significativo de cualquier tipo de hemorragia, frente al 55% de los que seguían el tratamiento a demanda<sup>11</sup>.

El estudio ESPRIT, prospectivo y que también compara la profilaxis *versus* demanda, ha publicado recientemente los primeros resultados de 10 años de seguimiento, y también encuentran una significativa reducción de la clínica hemorrágica y del daño articular en los pacientes que están con profilaxis<sup>12</sup>.

La profilaxis primaria se ha definido, según diferentes autores, en función de la edad de inicio o de la aparición del primer hemartros.

El grupo PEDNET considera que la profilaxis es primaria si ésta se inicia antes de los 2 años. Si se inicia después de los 2 años o después de 2 o más hemorragias articulares, ya se considera profilaxis secundaria A<sup>13</sup>.

Otros autores definen la profilaxis primaria como el tratamiento continuado (más de 46 semanas/año) y a largo plazo, que puede estar determinado por la edad,

si se inicia antes de los 2 años y antes de cualquier evidencia clínica de hemorragia, o por la primera hemorragia, independientemente de la edad, si se inicia antes de que exista daño articular, para lo que no debe haber habido más de un hemartros<sup>14,15</sup>.

A la hora de decidir la aplicación de la profilaxis primaria, hay tres factores fundamentales a considerar: el momento del inicio (en función de la edad o del número de hemartros previos), la dosis y la frecuencia de administración.

Está demostrado que la mayor eficacia se consigue cuando la profilaxis se inicia en el primer año de vida, antes de que se haya producido ninguna hemorragia articular, y cuando se aplican los regímenes que utilizan las dosis más altas, con mayor frecuencia de administración y se mantiene de forma ininterrumpida, según el protocolo sueco; y respecto a este modelo se comparan los demás.

Distintos estudios han mostrado que la edad media del primer sangrado articular es de 1,9 años<sup>16</sup>. Pero ya en 1980, Pettersson puso en evidencia que algunos pacientes presentan alteraciones articulares radiológicas al iniciar la profilaxis a pesar de que no haya existido constancia clínica de hemorragias articulares previas, sospechando que puede deberse a hemorragias subclínicas que pasan desapercibidas pero que deterioran la articulación<sup>17</sup>. Por ello hay autores que son partidarios de iniciarla en el primer año de vida, sin esperar que acontezca la primera hemorragia articular<sup>18</sup>.

Pero el patrón hemorrágico de los pacientes hemofílicos no sólo está determinado por el nivel plasmático del factor deficiente. Existen otros condicionantes que pueden modificarlo, y su conocimiento puede determinar el mejor momento de inicio y el mejor régimen de la profilaxis.

También se ha puesto de manifiesto que entre el 10 y el 15% de los pacientes diagnosticados de hemofilia severa, cuando utilizan tratamiento a demanda, presentan menos manifestaciones hemorrágicas y mejor conservación articular y radiológica que el resto.

Hasta ahora no se conocen con claridad las causas que dan lugar a este diferente comportamiento, aunque parece que el origen de esta heterogeneidad fenotípica puede ser multifactorial. Se ha relacionado con la coexistencia de factores genéticos protrombóticos (factor V Leiden, FII20210A, MTHFR y los déficits de PC, PS y AT); o con el tipo de mutación en el gen del FVIII o IX, como por ejemplo la inversión en el intrón 22, que se asocia con el fenotipo hemorrágico más severo, mientras que las mutaciones missense suelen tener fenotipos moderados. Y también se ha observado que las variaciones farmacocinéticas de los pacientes pueden estar en relación con la variabilidad fenotípica<sup>19</sup>.

Con los conocimientos actuales, el factor que más puede orientar el posible fenotipo es la edad en la que

ocurre la primera hemorragia articular espontánea, así como la frecuencia y la gravedad de la misma<sup>20</sup>. Si se inicia la profilaxis antes de que ésta ocurra, el fenotipo puede enmascararse; por ello, otros autores recomiendan comenzar tras la aparición de la primera hemorragia articular, individualizando cada caso y eligiendo el régimen que mejor se adapte al patrón hemorrágico y al acceso venoso del paciente<sup>21</sup>.

En cuanto a las dosis a utilizar, existen distintas opciones. Una de ellas son los regímenes clásicos implantados en Suecia de 30-40 UI/kg dos veces por semana en la hemofilia B y 20-40 UI/kg tres veces a la semana en la hemofilia A, que se considera “el modelo comparativo”. El estudio JOS utilizó 25 U/kg cada dos días, basándose en estudios farmacocinéticos y en su experiencia clínica. Estudios holandeses han objetivado que con la administración de dosis intermedias de 15-25 U/kg una o dos veces a la semana, adaptado al patrón hemorrágico del paciente, se obtienen resultados equiparables a los conseguidos con dosis más altas<sup>22</sup>.

Aledort advirtió que no era el mantenimiento de los niveles de factor VIII plasmático por encima del 1% y, por tanto, la dosis y frecuencia en la pauta, un factor determinante para conseguir buenos resultados, sino su administración de forma continuada. En 1999, Astermark también puso de manifiesto que, aunque el inicio de la profilaxis debe ser precoz, la dosis y la frecuencia de administración pueden individualizarse y adaptarse a las características de cada paciente<sup>23</sup>.

La frecuencia de administración, sobre todo en los primeros tres años, está muy influida por la disponibilidad del acceso venoso. Éste es uno de los condicionantes que más puede modificar el régimen en los primeros años de vida. Si se aplica la profilaxis primaria clásica con infusiones cada 2 o 3 días, el acceso venoso periférico en muchos casos es insuficiente y hay que recurrir al catéter venoso central, o la creación de una fístula arteriovenosa. Pero los riesgos que conllevan estas alternativas, como son las infecciones, el mal funcionamiento del dispositivo o las trombosis nos llevan a buscar regímenes terapéuticos más flexibles, que permitan la utilización de las vías periféricas como primera opción.

En Canadá, el 53% de los niños entre 0 y 2 años están en profilaxis y lo inician antes de los 2 años utilizando un régimen escalonado, en la mayoría de los casos con una frecuencia de una vez a la semana, la cual va aumentando en función del patrón hemorrágico individual hasta conseguir dosis de 25 UI/kg tres veces a la semana, generalmente a partir de los 3 años. Tras 5 años de seguimiento observaron una media de 0,9 hemorragias articulares al año con un mínimo daño articular<sup>24</sup>.

Esta opción terapéutica de profilaxis primaria iniciada precozmente, pero individualizada en función del fenotipo hemorrágico del paciente y la disponibilidad

del acceso venoso, es seguida actualmente por muchos centros de hemofilia.

Su beneficio se extiende también a las hemorragias no articulares, que pueden ser graves como la hemorragia cerebral, que precisan dosis altas e intensivas de concentrado del factor deficiente. Estas dosis en los primeros momentos de la vida se relacionan con la aparición de inhibidores, por lo que la profilaxis primaria puede tener también un efecto protector ante el riesgo de su aparición<sup>25</sup>.

A la hora de valorar la eficacia de la profilaxis, es importante disponer de métodos objetivos de interpretación de los resultados. En la actualidad, la resonancia magnética es la técnica de imagen que mejor revela los primeros signos de deterioro articular, incluso en ausencia de evidencia clínica de hemartros. Pero la necesidad de recurrir a la anestesia hace difícil su utilización en los primeros años de vida.

La elección del tratamiento profiláctico también está condicionado por la repercusión económica. Distintos trabajos han valorado y confirmado que el coste de la profilaxis primaria es claramente superior al del tratamiento a demanda; pero cuando su implantación es de manera escalonada, éste disminuye y el coste indirecto derivado de la morbilidad es mucho menor<sup>26</sup>.

Un peligro que se está poniendo de manifiesto en los pacientes a los que se aplica la profilaxis primaria es su interrupción. El buen cumplimiento es muy elevado en la primera década, pero a partir de la adolescencia se inician importantes cambios físicos y psíquicos en los pacientes que favorecen los abandonos temporales. Hay estudios que constatan que casi dos tercios de los jóvenes incumplen el régimen de la profilaxis al llegar a la veintena. El peligro de los daños articulares, que con tanto esfuerzo se habían evitado, reaparece. Por tanto, se debe intentar mantener por lo menos hasta alcanzar la edad adulta, cuando ya el estilo de vida se hace más sedentario y la articulación es menos vulnerable, comparada con la del niño en periodo de crecimiento. Faltan estudios que definan claramente como se debe proseguir la profilaxis primaria después de la adolescencia, pero parece razonable individualizar el tratamiento en función de las manifestaciones hemorrágicas y el régimen de vida<sup>27</sup>.

### Profilaxis primaria en pacientes con inhibidor

Los buenos resultados obtenidos cuando se aplica la profilaxis primaria en los pacientes sin inhibidor evitando la artropatía son también un objetivo a conseguir en los que presentan inhibidor. Hasta hace pocos años, los productos disponibles, los agentes *bypass* (concentrados del complejo protrombínico activado [CCPa] y factor VII activado recombinante [rFVIIa]) se

han utilizado en el tratamiento a demanda. Posiblemente pensando en la corta vida media que tienen, y la necesidad, por tanto, de administraciones muy frecuentes, no se planteaba con ellos instaurar una profilaxis para evitar la artropatía.

En los últimos años, distintas publicaciones están mostrando que también se puede aportar un beneficio a estos pacientes y comienzan a aplicarse como profilaxis secundaria en aquellos pacientes con artropatía desarrollada<sup>28</sup>, y también como profilaxis primaria en niños a los que se acaba de diagnosticar un inhibidor y están pendientes de iniciar (o durante) el tratamiento de inmunotolerancia. Mantener las articulaciones indemnes hasta conseguir la erradicación del inhibidor y comenzar la profilaxis convencional debe ser también un objetivo a conseguir<sup>29,30</sup>.

### Consideraciones finales

Hoy en día, está demostrado que, ante un episodio hemorrágico, el tratamiento administrado a demanda de forma adecuada en dosis y tiempo de duración no evita, en un elevado porcentaje de pacientes, el desarrollo de la artropatía. Incluso una buena profilaxis no es capaz de revertirla, si ésta ya existía previamente. Sólo la profilaxis muy temprana, que impida que se produzcan hemorragias en articulaciones indemnes, es eficaz, evitando su desarrollo, por lo que actualmente la profilaxis primaria es el tratamiento de elección en los pacientes diagnosticados de hemofilia grave.

Los factores más determinantes para obtener los mejores resultados clínicos y radiológicos al aplicar la profilaxis primaria son, el momento del inicio (que puede estar determinado por la edad, antes de los 2 años y de la aparición de cualquier hemorragia articular o en función de la aparición de hemartros, independientemente de la edad) y su aplicación de forma continuada. Los rasgos fenotípicos observados pueden orientar sobre la elección del momento de inicio.

Otros condicionantes, como el acceso venoso periférico y el soporte familiar y social, deben valorarse también para aplicar un régimen profiláctico individualizado y asumible.

Se recomienda la utilización del acceso venoso periférico frente al catéter venoso central como primera opción, debido al riesgo de complicaciones, fundamentalmente las infecciones y trombosis de este último.

Los regímenes que aplican dosis escalonadas, sobre todo en los tres primeros años de vida y permiten utilizar los accesos venosos periféricos, pueden conseguir resultados similares a pautas más intensivas.

Todos los estudios orientados a valorar la calidad de vida de los niños a los que se les implanta la profilaxis primaria han mostrado buenos resultados.

El beneficio de la profilaxis primaria se extiende también a la prevención de otras hemorragias graves. Y también pueden tener un efecto preventivo ante la aparición de inhibidores.

Se debe insistir en la necesidad de la continuar la profilaxis en la adolescencia, ya que su abandono puede borrar todo beneficio obtenido en la infancia.

### Bibliografía

- Ahlberg A. Haemophilia in Sweden. VII. Incidence, treatment and prophylaxis of arthropathy and other musculoskeletal manifestations of haemophilia A and B. *Acta Orthop Scand* 1965; 77 (Suppl.): 3-132.
- Nilsson IM, Hedner U, Ahlberg A. Haemophilia prophylaxis in Sweden. *Acta Paediatr Scand* 1976; 65: 129-35.
- Van Creveld S. Prophylaxis of joint hemorrhages in haemophilia. *Acta Haematol* 1971; 45: 120-7.
- Nilsson IM, Berntorp E, Lofqvist T, Pettersson H. Twenty-five years experience of prophylactic treatment in severe haemophilia A and B. *J Intern Med* 1992; 232: 25-32.
- Löfqvist T, Nilsson IM, Berntorp E, et al. Haemophilia prophylaxis in young patients-a long term follow-up. *J Intern Med* 1997; 241: 395-400.
- Brackman HH, Eickhoff HJ, Oldenburg, et al. Long-term therapy and on-demand treatment of children and adolescents with severe hemophilia A: 12 years of experience. *Haemostasis* 1992; 22: 251-8.
- Aledort LM, Haschemeyer RH, Pettersson H; The Orthopaedic Outcome Study Group. A longitudinal study of orthopaedic outcomes for severe factor VIII deficient haemophiliacs. *J Int Med* 1994; 236: 391-9.
- Bertorp E, Boulyjenkov V, Brettler D, et al. Modern treatment of haemophilia. *Bull World Health Organ* 1995; 73: 691-701.
- World Federation of Hemophilia WFH. Guidelines for the Management of Hemophilia, 2005. Available at: [http://www.wfh.org/2/docs/Publications/Diagnosis\\_and\\_Treatment/Gudelines\\_Mng\\_Hemophilia.pdf](http://www.wfh.org/2/docs/Publications/Diagnosis_and_Treatment/Gudelines_Mng_Hemophilia.pdf).
- Nacional Hemophilia Foundation. MASAC Recommendations Concerning Prophylaxis (Regular Administration of Clotting Factor Concentrate to Prevent Bleeding). Document nº 179. 2007.
- Manco-Johnson MJ, Abshire TC, Shapiro AD, et al. Prophylaxis versus episodic treatment to prevent joint disease in boys with severe hemophilia. *N Engl J Med* 2007; 357 (6): 535-44.
- Gringeri A, Lundin B, von Mackensen S, et al. A 10-yr, randomized clinical trial on prophylaxis vs. on demand treatment in children with haemophilia A: the E.S.P.R.I.T. study. *Haemophilia* 2008; 14 (Suppl 2): 99 (Abstract).
- Donadle-Claeyssens S. European Paediatric Network for Haemophilia Management. Current co-ordinated activities of the PETNET (European Paediatric Network for Haemophilia Management) 2006; 12 (2): 124-7.
- Berntorp E, Astermark J, Bjorkman, et al. Consensus perspectives on prophylactic therapy for haemophilia: summary statement. *Haemophilia* 2003; 9: 1-4.
- Ota S, Mclimont M, Carcao M, et al. Definitions for haemophilia prophylaxis and its outcomes: the Canadian Consensus Study. *Haemophilia* 2007; 13 (1): 12-20.
- Pollman H, Richter H, Ringkamp H, Jurgens H. When are children diagnosed as having severe haemophilia and when do they start to bleed? A 10-year single-centre PUP study. *Eur J Pediatr* 1999; 158 (Suppl. 3): S166-70.
- Pettersson H, Alberg A, Nilsson IM. A radiologic classification of hemophilia arthropathy. *Clin Orthopedics* 1980; 149: 153-9.



18. Kreuz W, Escuriola-Ettinghausen C, Funk M, Schmidt H, Kornhuber B. When should prophylactic treatment in patients with haemophilia A and B start? The German experience. *Haemophilia* 1998; 4: 413-7.
19. Jayandharan, Giridhara Rao, Srivastava, et al. The phenotypic heterogeneity of severe hemophilia. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 2008; 34 (1): 128-41.
20. Van Den Berg HM, Groot PHG, Fischer K. Phenotypic heterogeneity in severe hemophilia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2007; 5 (Suppl. 1): 151-6.
21. Fischer K, Valentino L, Ljung R, Blanchette V. Prophylaxis for severe haemophilia: clinical challenges in the absence as well as in the presence of inhibitors. *Haemophilia* 2008; 14 (Suppl. 3): 196-201.
22. Fischer K, Astermark J, Van der Bom JG, et al. Prophylactic treatment for severe haemophilia: comparison of an intermediate-dose to a high dose regimen. *Haemophilia* 2002; 8: 753-60.
23. Astermark J, Petrini P, Tengborn L, Schulman S, Ljung R, Berntorp E. Primary prophylaxis in severe haemophilia should be started at an early age but can be individualized. *Br J Haematol.* 1999; 105: 1109-13.
24. Hilliard P, McLimont M, Mulder K, et al. Musculoskeletal status of the Canadian Hemophilia Prophylaxis Study cohort after 10 years. *Haemophilia* 2008; 14 (2): 412.
25. Mancuso ME, Graca L, Auerswald G, Santagostino E. Haemophilia care in children-benefits of early prophylaxis for inhibitor prevention. *Haemophilia* 2009; 15 (Suppl. 1): 8-14.
26. Nicholson A, Berger K, Bohn R, Carcao M, Fischer K, Gringeri A, Hoots K, et al. Recommendations for reporting economic evaluations of haemophilia prophylaxis: a nominal groups consensus statement on behalf of the Economics Expert Working Group of The International Prophylaxis Study Group. *Haemophilia* 2008; 14: 127-32.
27. Van Dijk K, Fischer K, van der Bom JG, et al. Can long-term prophylaxis for severe haemophilia be stopped in adulthood? Results from Denmark and the Netherlands. *Br J Haematol* 2005; 130: 107-12.
28. Valentino LA. The benefits of prophylactic treatment with APCC in patients with haemophilia and high-titre inhibitors: a retrospective case series. *Haemophilia* 2009; 1-10.
29. Rodríguez-Merchan EC, Hedner U, Heijnen L, Jiménez-Yuste V, Lee CA, Morfini M, et al. Prevention of haemophilic arthropathy during childhood. May common orthopaedic management be extrapolated from patients without inhibitors to patients with inhibitors? *Haemophilia* 2008; 14 (Suppl. 6): 68-81.
30. López Fernández ME, Andon Saavedra C, Amor Otero MA, Batlle J. "Primary" prophylactic treatment with recombinant activated factor VII (rFVIIa) during immune tolerance in a haemophilic child (abstract). Abstract no. P-M-161, XXIst ISTH Congress. Geneva, July 6-11, 2007.



## Síndrome mielodisplásico

COORDINADORES: J. BARGAY. *Palma de Mallorca*  
B. NOMDEDÉU. *Barcelona*

### Resumen del simposio

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) son un grupo heterogéneo de enfermedades clonales de la célula madre hematopoyética que se caracterizan por la aparición de citopenias progresivas con una médula ósea normal o hiper celular, alteraciones madurativas en una o más líneas celulares de la sangre y un riesgo elevado de transformación leucémica. Su diagnóstico frecuentemente no es fácil y requiere de la integración de datos clínicos, analíticos, morfológicos, citogenéticos y moleculares a fin de ofrecer a los enfermos una orientación pronóstica y terapéutica ajustada a cada caso. En su nomenclatura se utilizan las clasificaciones del grupo franco-americano-británico (FAB)<sup>1</sup> y de la Organización Mundial de la Salud (OMS)<sup>2</sup>. La clasificación FAB se basa en la consideración de alteraciones citomorfológicas tales como el porcentaje de blastos y de sideroblastos en anillo en médula ósea, la observación de bastones de Auer y el grado de monocitosis en la sangre periférica. La clasificación OMS combina datos citomorfológicos como el grado de displasia y el porcentaje de blastos con otros de tipo citogenético y molecular. El manejo clínico de los SMD debe establecerse según un sistema pronóstico validado en series independientes. En este sentido, los índices pronósticos más utilizados en la actualidad son el IPSS<sup>3</sup> y el WPSS<sup>4</sup>, que utilizan como variable pronóstica en común el análisis citogenético de la médula ósea.

Lo anteriormente expuesto nos permite ver que la aplicación rutinaria del estudio citogenético en los SMD es fundamental, ya que aporta información que permite desde el diagnóstico de entidades a aportaciones clínicas, pronósticas y terapéuticas. Este tema de tanta relevancia lo expone el Dr. Francesc Solé, miembro del Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica (GCECGH)<sup>5</sup> que junto con el grupo cooperativo germano-austriaco<sup>6</sup> ha aportado recientemente nueva información sobre el significado pronóstico de las alteraciones citogenéticas en los SMD, en aras de mejorar las limitaciones del IPSS y WPSS en este campo.

El progresivo conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos y de los factores pronósticos de los SMD ha permitido ir desarrollando tratamientos ajustados al riesgo. Hasta hace muy poco tiempo el tratamiento de la mayoría de los SMD de bajo riesgo se reducía al soporte transfusional. En los últimos años han surgido nuevos tratamientos que generan mayores expectativas para estos pacientes. El Dr. Guillermo Sanz, coordinador del Registro Español de los Síndromes Mielodisplásicos (RESMD), nos presenta una revisión minuciosa del tema con las recomendaciones vigentes para el manejo terapéutico de los pacientes con SMD de bajo riesgo y de las nuevas normas europeas, actualmente en preparación, aportando un algoritmo útil para la toma de decisiones en estos pacientes.

A pesar de la reciente disponibilidad de nuevos fármacos capaces de modificar la historia natural de los SMD, el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH) es considerado como la única modalidad con capacidad curativa, aunque es aplicable sólo a una minoría de pacientes. En un intento de ofrecer el alo-TPH a un mayor número de pacientes, durante los últimos años se han desarrollado esquemas de acondicionamiento de intensidad reducida que permiten ampliar el espectro de los pacientes trasplantables a edades más avanzadas y/o pacientes con un cierto grado de comorbilidades. Pionero en este campo, entre otros, ha sido el grupo español (GETH)<sup>7,8</sup>. El Dr. Rodrigo Martino nos expone en este simposio un análisis del estado actual del trasplante con acondicionamiento convencional y de intensidad reducida en los SMD.

Finalmente, el Dr. Guillermo García Manero nos aporta una documentada actualización sobre la importancia de las alteraciones epigenéticas y de la angiogénesis en la patogénesis de los SMD, revisando el uso de los agentes hipometilantes y antiangiogénicos en los SMD. Sus amplios conocimientos sobre el tema nos permitirán tener una visión actualizada sobre el papel de estos agentes en estos pacientes, utilizados aisladamente o en combinaciones.

El propósito de este simposio es ofrecer una actualización en el manejo de los pacientes con SMD. Los coordinadores estamos seguros de que la calidad de los ponentes elegidos satisfará ampliamente nuestras expectativas.

---

### **Bibliografía**

1. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. French-American-British Cooperative Group. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1982; 51: 189-99.
2. Vardiman JW, Yhiel J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009; 114: 937-51.
3. Greenberg P, Cox C, LeBeau MN, et al. International scoring system for evaluation prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997; 89: 2079-88.
4. Malcovati L, Germing U, Kuendeg A, et al. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemia evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3503-10.
5. Sole 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: 1168-78.
6. Haase D, Germing U, Schanz J, Pfeilstocker M, Nosslinger T, Hildebrandt B, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* 2007; 110: 4385-95.
7. Martino R, Iacobelli S, Brand R, et al. Retrospective comparison of reduced-intensity conditioning and conventional high-dose conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using HLA-identical sibling donors in myelodysplastic syndromes. *Blood* 2006; 108: 836-46.
8. Martino R, Valcarcel D, Brunet S, et al. Comparable non-relapse mortality and survival after HLA-identical sibling blood SCT with reduced or conventional-intensity conditioning for high-risk MDS and AML in first remission. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41: 33-8.

## DIGNÓSTICO CITOGÉNÉTICO DE LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS

F. SOLÉ

*Laboratori de Citogenètica Molecular. Servei de Patologia. Escola de Citologia Hematològica Soledad Woessner-IMAS. Hospital del Mar. Barcelona*

### Antecedentes

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) comprenden un conjunto de insuficiencias medulares crónicas relativamente frecuentes en la práctica diaria. En general se manifiestan en personas mayores de 50 años de edad, suelen expresarse en forma de mono, bi o pancitopenia con alteraciones morfológicas y dishemopoyéticas que en un porcentaje variable (20-30%) evolucionan a una leucemia aguda (LA). Los SMD se clasifican en cinco subtipos morfológicos propuestos por el grupo cooperativo FAB<sup>1</sup>: anemia refractaria simple (AR), anemia refractaria con sideroblastos en anillo (ARS), anemia refractaria con exceso de blastos (AREB), anemia refractaria con exceso de blastos en transformación (AREB-t) y leucemia mielomonocítica crónica (LMMC). Los criterios empleados en esta clasificación se basan en el porcentaje de blastos en médula ósea y sangre periférica, el número absoluto de monocitos circulantes, la presencia de bastones de Auer y la proporción de sideroblastos en anillo, todo ello junto a rasgos morfológicos dishemopoyéticos de grado variable. Recientemente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha propuesto una nueva clasificación, en la que establece las siguientes entidades: anemia refractaria con y sin sideroblastos en anillo, citopenia refractaria con mielodisplasia multilínea, anemia refractaria con exceso de blastos y el síndrome 5q<sup>-2</sup>.

Respecto a los hallazgos citogenéticos, la frecuencia de detección de alteraciones cromosómicas en los SMD varía entre un 30 y un 50% según las series presentadas<sup>3-6</sup>. Las alteraciones cromosómicas descritas en SMD se detallan en la Tabla 1. Cabe destacar que las más frecuentes se manifiestan en los cromosomas 5 y 7, en forma de monosomía o delección, y en el cromosoma 8 en forma de trisomía 8. Otras alteraciones implican a 1q, 3q21-26, 11q, 12p y 17p.

En la serie del Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica (GCECGH)<sup>6</sup>, de 640 pacientes estudiados, 327 (51%) tenían un cariotipo anormal clonal. Al considerar los diferentes subtipos de SMD, el presente estudio confirma que la prevalencia de alteraciones es mayor en las variedades con exceso de blastos, AREB y AREB-t (61% y 70%, respectivamen-

te) que en los demás subtipos (43% en la AR, 33% en la ARSA y 42% en la LMMC). No se registró una relación entre un cambio cromosómico y un subtipo de SMD, aunque se pueden vislumbrar algunas asociaciones como la delección 5q<sup>-</sup> en pacientes con AREB; la implicación del cromosoma 7 en forma de monosomía o delección 7q<sup>-</sup> en pacientes con AREB y AREB-t; y la trisomía 8, delección 12p<sup>-</sup> y la detección de cariotipos complejos en pacientes con AREB.

Seguidamente se describen las características morfológicas y clínicas de las alteraciones citogenéticas más frecuentes en los pacientes con SMD.

### Implicación de 3q21-3q26

La implicación de las bandas 3q21 o 3q26 en los SMD se observa en aproximadamente el 2% de los pacientes. Las alteraciones más frecuentes son: inv(3)(q21q26)/EVI1, t(3;5)(q25;q34)/EVI1-MLF1, t(3;3)(q21;q26)/MDS1-EVI1. En la mayoría de los pacientes se observa un exceso de blastos, y un porcentaje importante (30-50%) son pacientes con antecedentes de tratamiento previo. En los pacientes con dicha anomalía, es de destacar una marcada dismegacariopoyesis, y en el 50% de los casos se observa un recuento normal de plaquetas, y en el 30% un recuento elevado. La respuesta al tratamiento es baja, con una corta supervivencia<sup>5</sup>.

A nivel molecular, es de destacar la localización del gen EVI1 en la banda 3q26.

Tabla 1. Alteraciones más frecuentes en los pacientes con SMD de novo

#### Alteraciones

##### Alteraciones más frecuentes:

5q<sup>-</sup>  
7q<sup>-</sup> ó -7  
+8  
i(17)(q10)  
del(20)(q11q13)  
-Y

##### Otras alteraciones:

t(1;3)(p36;q21)  
t(1;7)(p11;p11)  
1q<sup>+</sup>  
t(2;11)(p11;q23)  
inv(3)(q21q26), t(3;3)(q21;q26)  
del(9)(q13q22)  
+11  
12p<sup>-</sup>  
+13  
13q<sup>-</sup>  
-18/18q<sup>-</sup>  
-20  
+21

## Delección 5q- como única anomalía

La alteración citogenética **5q-** es remarcable por estar relacionada con una entidad clínica muy concreta, que se caracteriza por incidir en pacientes con anemia refractaria (AR), generalmente mujeres con una edad media de 65 años, con una larga supervivencia. A nivel citológico cursa con una hipolobulación megacariocítica, número normal o elevado de plaquetas, anemia macrocítica e hipoplasia de la serie roja en médula ósea<sup>7</sup>. En estos pacientes la evolución a leucemia aguda es poco frecuente.

Respecto a la serie del GCECGH, la delección 5q- como única anomalía la hemos observado en 8 AR, 1 AR, 10 AREB y 3 AREB-t, y en combinación con otras alteraciones cromosómicas, en 1 ARSA, 3 AREB, y 1 LMMC<sup>6</sup>. Los pacientes con la delección 5q- como única anomalía presentan las características propias del llamado síndrome 5q-<sup>7</sup>; se trata de mujeres de edad avanzada, con anemia macrocítica, trombocitosis, megacariocitos hipolobulados y curso clínico favorable. Nuestra experiencia confirmaría el carácter de buen pronóstico de esta anomalía cromosómica incluso en pacientes con AREB, entidad asociada, en general, a un curso clínico poco favorable<sup>8</sup>.

Otras alteraciones distintas a la delección 5q y que implican al cromosoma 5 son la t(5;12) implicando el gen TEL, la t(5;7) implicando el gen HIP1 y la t(3;5) implicando el gen MLF<sup>9</sup>.

Recientemente, un nuevo medicamento, la lenalidomida, ha demostrado una gran eficacia en los pacientes con SMD y delección 5q, no sólo como única anomalía, sino también asociado a otras alteraciones citogenéticas. Por ello, en aquellos pacientes con SMD y en los que por citogenética convencional no se observe la delección 5q, puede estar indicada la realización de la FISH con la sonda de 5q para descartar la delección 5q.

## Monosomía 7 o delección 7q

Otra alteración muy frecuente en los SMD, la **monosomía 7 o delección 7q**, tanto en niños como en adultos, se caracteriza por presentar durante la fase inicial una médula ósea hipoproliferativa y citopenias refractarias, con quimiotaxis defectiva de los neutrófilos, infecciones recurrentes y transformación progresiva hacia un síndrome mieloproliferativo que evoluciona terminalmente a LANL<sup>10</sup>. Dicha alteración es muy frecuente en pacientes con SMD o LANL secundarios a agentes alquilantes.

## Trisomía 8

Al igual que en la mayoría de las publicaciones<sup>3-6,10</sup>, la trisomía 8 ha sido la alteración cromosómica numéri-

Tabla 2. Propuesta de actualizar el IPSS en relación con el valor pronóstico de las alteraciones citogenéticas

<b>Buen pronóstico (&gt; 50 meses)</b>
5q-, 5q- +1, 11q-, 12p-, 20q-, +21, -Y
<b>Intermedio 1 (50-30 meses)</b>
2 alt., +1/+1q inv(3q), t(3q), t(7q), +8, +19, -21
<b>Intermedio 2 (30-15 meses)</b>
Cariotipo con 3 alteraciones citogenéticas, -7/7q-
<b>Mal pronóstico (&lt; 15 meses)</b>
Cariotipo con > 3 alteraciones citogenéticas

ca más observada en nuestra experiencia<sup>6</sup>. Dicha alteración se puede observar como única anomalía o asociada a otras alteraciones.

La trisomía 8 es más frecuente en mujeres que en hombres (11% vs. 5%), más frecuente en SMD *de novo* que secundarios, y afecta a pacientes de edad avanzada.

En ocasiones, la detección de la trisomía 8 puede resultar difícil por problemas inherentes a la morfología de este cromosoma y por la calidad no siempre favorable de las mitosis obtenidas. En estas circunstancias, la técnica de FISH es de gran utilidad para confirmar la sospecha de trisomía 8 en los casos difícilmente valorables por citogenética convencional.

## Delección 12p

Otra alteración muy observada ha sido la delección 12p-. Dicha alteración es frecuente en pacientes con SMD y LA secundarias, y la hemos detectado preferentemente en pacientes con AREB, y asociada a otras alteraciones citogenéticas<sup>11</sup>. En nuestra serie<sup>6</sup> la delección del cromosoma 12, a pesar observarse en pacientes con AREB, se ha asociado a un buen pronóstico. Es de destacar que a nivel del brazo corto del cromosoma 12 está mapado el oncogén c-K-ras-2, TEL (ETV6) y KiP1.

## Isocromosoma 17q

En nuestra serie del GCECGH es de interés señalar el hallazgo del isocromosoma i(17q) como única alteración citogenética en 12 pacientes<sup>6</sup>. En 3 pacientes de los que se disponía de datos clínicos se observó que se ajustaban al perfil clínico-biológico descrito en la literatura: varones de edad avanzada, con hepato o esplenomegalia, médula ósea hiperclular, acompañada de basofilia, de eosinofilia y de megacariocitos dismórficos, y con una mala respuesta clínica (la mayoría evolucionan a LA y tienen una supervivencia muy corta)<sup>6,12</sup>.

Recientemente, se propone como **síndrome de 17p** a un grupo de SMD caracterizados por una disgranulopoyesis, que combina a pseudo-Pelger-Huet y la presencia de la deleción de 17p. En estos casos, es frecuente que esta deleción se presente en forma de isocromosoma 17q, y que a nivel molecular se observe la mutación de P53<sup>9</sup>.

### Valor pronóstico del estudio citogenético

En la serie del GCECGH<sup>6</sup>, se ha observado que la detección de un cariotipo anómalo se relaciona con una mayor incidencia de evolución a LA. Por el contrario, la detección de un cariotipo normal se asocia a baja incidencia de evolución a LA y larga supervivencia. Similares resultados han sido observados por Gyger *et al.*<sup>13</sup>, que señalan, al igual que Coiffier *et al.*<sup>14</sup>, la importancia de la proporción del número de blastos, dato corroborado posteriormente por Sanz *et al.*<sup>8</sup>. Estos autores, junto al número de blastos en médula ósea, destacan la edad del paciente, el recuento de plaquetas, el recuento de leucocitos y los niveles de hemoglobina como parámetros con influencia significativa en el pronóstico de los SMD.

Mufty y Galton<sup>15</sup> insisten en la importancia del cariotipo como factor pronóstico, señalando la necesidad de practicar el cariotipo en el momento del diagnóstico y durante el curso evolutivo de la enfermedad. En su estudio hallan que, junto al número de blastos, la detección de cariotipos complejos en el momento del diagnóstico y de cambios en el cariotipo durante el curso de la enfermedad tienen un valor pronóstico desfavorable. Los trabajos iniciales de Yunis *et al.*<sup>16</sup> destacan que, independientemente del subtipo morfológico (variedades con exceso de blastos), la detección de un cariotipo complejo se relaciona con un mal pronóstico. Esta opinión fue confirmada por Toyama *et al.*<sup>4</sup> en una serie de 401 SMD, en la que demuestran que la presencia de un cariotipo complejo va ligada a un mal pronóstico, implicando cortas supervivencias

y elevada frecuencia de evolución a LA en cualquier subtipo de SMD. Morel *et al.*<sup>3</sup>, sobre 408 SMD, refieren similares resultados, y en función del porcentaje de blastos en médula ósea y del cariotipo deducen que existen tres tipos de pacientes según el riesgo de evolución a LA: a) bajo riesgo de evolución a LA en pacientes con ausencia de cariotipo complejo y menos de un 10% de blastos; b) riesgo intermedio en pacientes con cariotipo complejo o con más de un 10% de blastos, y c) alto riesgo de evolución en pacientes con cariotipo complejo y más de un 10% de blastos.

Basándonos en nuestra experiencia<sup>6</sup> y en la referida en la literatura<sup>3-5,17</sup> se deduce la importancia del cariotipo como factor pronóstico en los SMD permitiendo establecer tres grupos de alteraciones citogenéticas con distinto valor pronóstico (bueno, intermedio y malo). El grupo internacional de estudio de los SMD ha propuesto un *score*, el IPSS, en el que destaca el valor pronóstico del estudio citogenético<sup>17</sup>. El IPSS separa tres grupos de pronóstico respecto al cariotipo: buen pronóstico: cariotipo normal, pérdida del cromosoma Y y deleción 5q- y deleción 20q- como única anomalía; mal pronóstico: cariotipo complejo (más de tres alteraciones citogenéticas) y -7/7q-; y pronóstico intermedio: el resto de alteraciones citogenéticas.

Recientemente, Solé *et al.*<sup>18</sup> y Haase *et al.*<sup>19</sup> sobre unas series de 948 y 2.124 pacientes han establecido nuevos *scores* teniendo en cuenta las alteraciones citogenéticas menos frecuentes. Así, destacan el buen pronóstico de la deleción del(11q), del(12p) y el mal pronóstico de los cariotipos con más de 3 alteraciones citogenéticas. En la Tabla 3 se señala una propuesta pendiente de validar en la que se intenta mejorar una de las limitaciones del IPSS o WPSS, que es la de incluir en la categoría de pronóstico intermedio muchas alteraciones que pueden ser de buen o mal pronóstico.

En la Tabla 4 se indican las normas a tener en cuenta para contar el número de alteraciones citogenéticas en un paciente con SMD. Es importante seguir esta normativa, ya que es la base para considerar un paciente con cariotipo con 3 o más alteraciones; dicho cariotipo está incluido actualmente en la categoría de mal pronóstico en el IPSS o WPSS. Para ello, es recomendable que el citogenetista en su informe indique en un comentario el número de alteraciones citogenéticas y su valor pronóstico según el IPSS o WPSS.

Tabla 3. Normativa del recuento de alteraciones citogenéticas para la determinación del índice pronóstico

- Se cuenta cada una de las alteraciones citogenéticas escritas entre comas
- Si existen clones no relacionados, se suman las alteraciones presentes en cada clon
- Si existe evolución clonal, se suman las alteraciones distintas presentes en los distintos clones
- Las siguientes anomalías se cuentan como una alteración:
  - Pérdida del cromosoma Y
  - Cariotipo tetraploide
  - Cromosoma marcador
  - Cromosoma en anillo®
  - Doble diminutos (dmms) o regiones de tinción homogénea (HSR)

### Aplicación de la FISH en el estudio de los SMD

Las principales ventajas de la aplicación de la FISH en los SMD son dos: no requiere tener células en división y permite la detección de alteraciones crípticas difíciles de detectar por citogenética convencional<sup>20,21</sup>. En un estudio reciente presentado en el ASH del año anterior, Baunoch *et al.*<sup>22</sup> valoraron por FISH con las son-



Tabla 4. Protocolo de estudio citogenético de los SMD

<p><b>Obligatorio</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>· Estudio citogenético convencional (<i>gold standard</i>)</li> <li>· En los casos con ausencia de divisiones o menos de 10 metafases analizadas aplicar:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- FISH con las sondas 5q, 7q, centromérica del 8 y 20q o considerar aplicar CGH/SNP <i>array</i></li> </ul> </li> <li>· Aplicar FISH para el seguimiento de la enfermedad mínima residual</li> <li>· Aplicar FISH con sonda 5q- en casos en que no se detecte 5q- que cumplan los siguientes requisitos:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Sospecha de síndrome 5q-</li> <li>- Ausencia de mitosis</li> <li>- Cariotipo alterado con implicación del cromosoma 5 pero sin evidencia de 5q- (por ejemplo, monosomía 5)</li> <li>- Cariotipo complejo</li> </ul> </li> </ul>
<p><b>Opcional</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>· Cariotipo complejo: aplicar M-FISH o SKY</li> </ul>
<p><b>Recomendable</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>· Conservación de muestras biológicas en el banco de tumores o de tejidos</li> </ul>

das de 5q, 7q, centromérica del cromosoma 8 y 20q, 25 pacientes con SMD que presentaban un cariotipo normal. Entre los 25 casos, en 3 (12%) detectaron alteraciones citogenéticas.

El Comité de Citogenética del Grupo Nacional de SMD ha propuesto unas guías con las indicaciones de cuándo se debería aplicar la FISH. Se considerará obligado en aquellos casos con menos de 10 metafases valorables o con ausencia de divisiones o en los casos para realizar el seguimiento de la enfermedad mínima residual. Se consideraría recomendable cuando la citogenética sea normal en 20 metafases analizadas o en aquellos casos susceptibles de recibir un tratamiento en función del resultado citogenético.

Por otro lado, en aquellos casos en los que se detecta un cariotipo complejo, la aplicación de técnicas de FISH multicolor, tales como M-FISH o SKY, permite detectar mayor número de alteraciones citogenéticas (Tabla 4). Si se aplican técnicas de hibridación genómica comparada (HGC o CGH), se pueden detectar ganancias y pérdidas de material genético en casos con cariotipo complejo o con cromosomas marcadores. Sin embargo, la aplicación rutinaria de estas técnicas es limitada, dado su elevado coste económico y complejidad. Recientes estudios sobre con CGH *array* (o SNP *arrays*) han demostrado que el 87% de los pacientes con SMD presentan alteraciones citogenéticas o que el 60% de los pacientes con cariotipo normal presentan ganancias o pérdidas de material genético<sup>23</sup>.

## Arrays en SMD

### CGH/SNP arrays

Si bien los *arrays* de expresión son una herramienta de investigación, la CGH *array* o SNP *arrays* formarán pronto parte de las técnicas que deberán in-

cluir los laboratorios de citogenética para utilizarlas en el diagnóstico de las neoplasias hematológicas. Las principales ventajas de estas metodologías son que no requieren células en división, permiten detectar ganancias y pérdidas de material genético (éstas son las principales alteraciones en los pacientes con SMD), permiten detectar cambios genéticos con una mayor resolución (0,5 Mb frente a las 10 Mb de la citogenética convencional) y además la técnica de SNP *arrays* permite detectar UPD, cambios genéticos que pueden aportar mucha información sobre la etiología de los SMD. Sin embargo, también tienen ciertas limitaciones, entre las que hay que destacar: si la proporción de células tumorales es inferior al 30%, no se detectarán alteraciones genéticas del clon patológico, no detectan translocaciones equilibradas (poco frecuentes en los SMD, 1% y muy frecuentes en otras patologías como las leucemias agudas o linfomas), y coste económico algo más elevado.

Los estudios preliminares utilizando dicha metodología avalan su utilidad. En el año 2007, Gondek *et al.*<sup>23</sup> presentaron un estudio sobre pacientes con SMD en los que comparaban los hallazgos citogenéticos detectados por citogenética convencional (cariotipo) frente a SNP *arrays*. Observaron que mediante SNP *arrays* el 80% de los pacientes presentaban alteraciones citogenéticas frente al 50% de la citogenética convencional, y además en el 68% de los pacientes con citogenética normal, con SNP *arrays* se detectaban alteraciones citogenéticas. De 5 pacientes que no presentaron mitosis por citogenética, 4 (80%) presentaron alteraciones citogenéticas por *arrays*. Además, en el 33% de los pacientes se observaron LOH o UPD.

Similares resultados fueron encontrados más recientemente por Starczynowsky *et al.* (2008)<sup>24</sup> mediante CGH *array* aplicado en 44 pacientes con SMD de IPSS de bajo riesgo. Observaron alteraciones por citogenética en el 36% frente al 82% con los *arrays*. Destaca-

ron ganancias cromosómicas en 11q24-qter, 17q11.2 y 17q12, y pérdidas en 2p33.1, 5q31.1-q13.2 y 10q21.3.

Con todo, aún es pronto para considerar el valor pronóstico de los resultados detectados por *arrays*. Hasta el momento se integra en resultado detectado por citogenética convencional en el IPSS o WPSS, y se requerirán estudios más amplios para considerar el valor pronóstico de los cambios genéticos detectados mediante esta nueva metodología.

Estos resultados y su relativo coste económico hacen plantear la necesidad de aplicar la CGH/SNP *array* en aquellos casos que no sean informativos (ausencia de metafases o cariotipo normal) mediante citogenética convencional.

### Arrays de expresión

En la última edición del Congreso Americano de Hematología (ASH) se han presentado los primeros estudios de SMD con la tecnología de los *arrays* de expresión<sup>25</sup>. En un grupo de 25 pacientes con SMD, aplican la metodología de los *arrays* de Affimetrix en dos grupos de pacientes, de alto riesgo según el IPSS y de bajo riesgo según el IPSS. Para purificar las células neoplásicas, separan las células CD34 positivas. Mediante esta técnica, demuestran que son 11 genes los que permiten separar ambos grupos de pacientes.

Otro estudio, con una serie de 28 pacientes, 7 personas sanas, 7 AR, 7 AREB-t y 7 leucemias agudas secundarias, y con la misma metodología, observa que 7 genes permiten separar las distintas entidades. Entre estos genes destaca la baja expresión de CDK1A, TTP, MAD, catepsina H, U-PAR, EXIL, MCL-1, y la elevada expresión de FLT3. Lo más interesante es destacar la baja expresión de genes relacionados con la apoptosis.

### Conclusiones

La aplicación rutinaria del estudio citogenético de los SMD es importante, ya que aporta información complementaria a la de la citología y permite el establecimiento de entidades citológico-citogenéticas. De todos estos resultados que incluyen series amplias de pacientes con estudio citogenético y seguimiento clínico, se deduce que la realización del cariotipo es imprescindible en el estudio de los SMD por las implicaciones clínicas y terapéuticas que de él se derivan.

Por otro lado, el seguir conociendo nuevas alteraciones citogenéticas permitirá establecer nuevas entidades citológicas con unas características clínicas bien definidas. La aplicación de la tecnología de los *arrays* permitirá conocer los mecanismo moleculares implicados en los SMD, y así establecer conductas terapéuticas más específicas.

### Bibliografía

- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C. The French-American-British Co-operative Group: Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1985; 51: 189-99.
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Konrad Muller-Hermelink H, Vardiman J, et al. World health organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the clinical advisory committee-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3835-49.
- Morel P, Hebban M, Lai JL, Duhamel A, Preudhomme C, Wattel E, et al. Cytogenetic analysis has strong independent prognostic value in de novo myelodysplastic syndromes and can be incorporated in a new scoring system: a report on 408 cases. *Leukemia* 1993; 7: 1315-23.
- Toyama K, Ohyashiki K, Yoshida Y, Abe T, Asano S, Hirai H, et al. Clinical implications of chromosomal abnormalities in 401 patients with myelodysplastic syndromes: a multicentric study in Japan. *Leukemia* 1993; 7: 499-508.
- Fenaux P, Morel P, Luc Lai J. Cytogenetics of myelodysplastic syndromes. *Sem Hematol* 1996; 33: 127-38.
- Solé F, Espinet B, Sanz GF, Cervera J, Calasanz MJ, Luño E, et al. Incidence, characterization and prognostic significance of chromosomal abnormalities in 640 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 2000; 108: 346-56.
- Van Den Berghe H, Vermaelen K, Mecucci C, Barbieri D, Tricot G. The 5q- anomaly. *Cancer Genet Cytogenet* 1985; 17: 189-255.
- Sanz GF, Sanz MA, Vallespí T, Cañizo 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.
- Fenaux P. Chromosome and molecular abnormalities in myelodysplastic syndromes. *Int J Hematol* 2001; 73: 429-37.
- Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia 1982: correlation of morphology and karyotype. *Cancer Genet Cytogenet* 1984; 11: 249-360.
- Streubel B, Sauerland C, Heil G, Freund M, Bartels H, Lengfelder E, et al. Correlation of cytogenetic, molecular cytogenetic, and clinical findings in 59 patients with ANLL or MDS and abnormalities of the short arm of chromosome 12. *Br J Haematol* 1998; 100: 521-33.
- Becher R, Carbonell F, Bartram CR. Isochromosome 17q in Ph<sup>-</sup>-negative leukemia: a clinical, cytogenetic, and molecular study. *Blood* 1990; 75: 1679-83.
- Gyger M, Infante-Rivard C, D'Angelo G, Forest L, Lussier P. Prognostic value of clonal chromosomal abnormalities in patients with primary myelodysplastic syndrome. *Am J Hematol* 1988; 28: 13-20.
- Coiffier B, Adeleine P, Viala JJ, Bryon PA, Fiere D, Gentilhomme O, Vuvan H. Dysmyelopoietic syndromes. A search of prognostic factors in 193 patients. *Cancer* 1983; 52: 83-90.
- Muffy GJ, Galton DAG. Myelodysplastic syndromes: natural history and features of prognostic importance. *Clin Haematol* 1986; 15: 953.
- Yunis JJ, Lobell ML, Arnesen MA, Oken MM, Mayer MG, Rydell RE, Brunning RD. Refined chromosome study helps define prognostic subgroups in most patients with primary myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia. *Br J Haematol* 1988; 68: 189-94.
- Greenberg P, Cox C, Le Beau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997; 89: 2079-88.
- 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.
19. Haase D, Germing U, Schanz J, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Hildebrandt B, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* 2007; 110 (13): 4385-95.
  20. Rigolin GM, Bigoni R, Milani R, Cavazzini F, Roberti MG, Bardi A, et al. Clinical importance of interphase cytogenetics detecting occult chromosome lesions in myelodysplastic syndromes with normal karyotype. *Leukemia* 2001; 15: 1841-7.
  21. Cuneo A, Bigoni R, Cavazzini F, Bardi A, Roberti MG, Agostini P, et al. Incidence and significance of cryptic chromosome aberrations detected by fluorescence in situ hybridization in acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Leukemia* 2002; 16: 1745-51.
  22. Baunoch DA, Hibbard MK, Baker E, Moore M, Sanford J, deLagarde D, et al. False negative cases of myelodysplastic syndrome using flow cytometry and conventional cytogenetics-Rationale for Reflex FISH screening. *American Society of Hematology. Blood* 2002; 100 (11): 793a.
  23. Gondek LP, Tiu R, O'Keefe CL, Sekeres MA, Theil KS, Maciejewski JP. Chromosomal lesions and uniparental disomy detected by SNP arrays in MDS, MDS/MPD, and MDS-derived AML. *Blood* 2008; 111 (3): 1534-42.
  24. Starczynowski DT, Vercauteren S, Telenius A, Sung S, Tohyama K, Brooks-Wilson A, et al. High-resolution whole genome tiling path array CGH analysis of CD34+ cells from patients with low-risk myelodysplastic syndromes reveals cryptic copy number alterations and predicts overall and leukemia-free survival. *Blood* 2008; 112 (8): 3412-24.
  25. Hofmann WK, de Vos E, Komor M, Hoelzer D, Wachsmann W, Koefler HP. Prediction of disease risk in patients with myelodysplastic syndrome using gene expression profiling of hematopoietic stem cells. *American Society of Hematology. Blood* 2002; 100 (11): 166a.

## ALGORITMO DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LOS SMD DE BAJO RIESGO. RECOMENDACIONES EUROPEAS

G.F. SANZ

*Servicio de Hematología.*

*Hospital Universitario La Fe. Valencia*

### Introducción

A pesar de los notables progresos en el conocimiento de la patogénesis y defectos moleculares que subyacen en el desarrollo de las neoplasias mieloides, los avances en el tratamiento de los síndromes mielodisplásicos (SMD) no han sido tan evidentes. Así, a pesar de la reciente disponibilidad de nuevos fármacos capaces de modificar la historia natural de los SMD y de los progresos en el área del trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH), el tratamiento continúa siendo insatisfactorio para la mayoría de los pacientes.

El objetivo fundamental de esta revisión es presentar, a la luz de las recomendaciones vigentes<sup>1-3</sup> y de

las europeas actualmente en preparación<sup>4</sup>, el estado actual del manejo terapéutico de los pacientes con SMD de bajo riesgo, alterado de forma sustancial en años recientes.

### Consideraciones generales y definición de SMD de bajo riesgo

El principio general que debe guiar el tratamiento del paciente con SMD es adaptarlo al riesgo individual, edad, estado general, existencia de comorbilidad y enfermedades asociadas, preferencias del paciente y a las características del proceso que predicen la probabilidad de respuesta a un determinado tratamiento. Independientemente del grupo de riesgo al que pertenezca, el paciente deberá recibir el mejor cuidado de soporte posible. Otra máxima a tener siempre en cuenta es que el tratamiento de los SMD debe ser considerado investigacional, por lo que los pacientes deben ser incluidos en protocolos controlados o ensayos clínicos siempre que sea posible.

El riesgo individual debe establecerse según un sistema pronóstico de prestigio reconocido que haya demostrado su fiabilidad en series independientes. En este sentido, los índices pronósticos a emplear son el IPSS<sup>5</sup> o WPSS<sup>6</sup>. El índice pronóstico internacional (IPSS), que emplea la proporción medular de blastos, número de citopenias y el análisis citogenético convencional, ha sido en la última década el índice de referencia universal para evaluar el pronóstico y decidir la actitud terapéutica a seguir en el paciente individual con SMD<sup>5</sup>. El IPSS segrega los pacientes en 4 grupos de riesgo (bajo, intermedio-1, intermedio-2 y alto) tanto para supervivencia como para riesgo de evolución a LMA. Recientemente se ha propuesto el empleo de un nuevo índice pronóstico denominado con el acrónimo WPSS (*WHO-based prognostic scoring system*), que permite definir 5 grupos de riesgo (muy bajo, bajo, intermedio, alto y muy alto) basándose en la clasificación morfológica de la OMS de 2001, los mismos grupos de riesgo citogenético del IPSS y el desarrollo de dependencia transfusional de concentrado de hematíes (Tabla 1)<sup>6</sup>. Ambos índices, IPSS y WPSS, han demostrado su valor en series independientes y son aplicables tanto al diagnóstico como durante la evolución de la enfermedad. Aunque probablemente el WPSS, al incluir la dependencia transfusional, sea superior al IPSS, el punto débil común de ambos índices radica en el uso de una clasificación de riesgo citogenético obsoleta. Por ello, los grupos de riesgo citogenético del IPSS y WPSS deben matizarse a la luz de los datos del Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica<sup>7</sup> y del Grupo Cooperativo Germano-Austriaco de SMD<sup>8</sup>.

Tabla 1. Índices pronósticos en SMD

Índice Pronóstico Internacional (IPSS) <sup>1</sup>						Grupo de riesgo	Puntuación
Puntos	0	0,5	1	1,5	2		
Blastos MO	< 5%	5-10%		11-20%	21-30%	Bajo	0
Cariotipo <sup>2</sup>	Bueno	Intermedio	Malo			Intermedio-1	0,5-1
Citopenias <sup>3</sup>	0 o 1	2 o 3				Intermedio-2	1,5-2
						Alto	2,5-3,5
Índice Pronóstico WPSS <sup>4</sup>						Grupo de riesgo	Puntuación
Puntos	0	1	2	3			
Subtipo OMS	AR ARSA	CRDM CRDM-SA	AREB-1	AREB-2		Muy bajo	0
Cariotipo <sup>2</sup>	Bueno	Intermedio	Malo			Bajo	1
Dependencia transfusional <sup>5</sup>	No	Sí				Intermedio	2
						Alto	3-4
						Muy alto	5-6

<sup>1</sup> Greenberg P, et al. Blood 1997; 89: 2079. <sup>2</sup> Bueno → normal, del(5q) aislada, del(20q) aislada, -Y aislada; Intermedio → +8, dos anomalías; Pobre → anomalías muy complejas (> 2), anomalías del cromosoma 7. <sup>3</sup> Citopenias → hemoglobina < 10 g/dL, plaquetas < 100 × 10<sup>9</sup>/L, neutrófilos < 1,8 × 10<sup>9</sup>/L. <sup>4</sup> Malcovati L, et al. J Clin Oncol 2007; 25: 3503.

<sup>5</sup> Dependencia transfusional → haber recibido al menos una transfusión de concentrado de hemáties cada 8 semanas en un periodo de 4 meses

Para planificar el tratamiento en la práctica clínica diaria únicamente se consideran dos grupos de pacientes: bajo riesgo (IPSS de riesgo bajo e intermedio-1 o WPSS de riesgo muy bajo, bajo o intermedio) y alto riesgo (IPSS de riesgo intermedio-2 y alto o WPSS de riesgo alto o muy alto). Esta definición simplificada de grupos de riesgo será la empleada de ahora en adelante. En casos particulares, pueden tenerse en cuenta otros factores de importancia pronóstica indiscutible, como presencia de displasia multilineal<sup>9</sup> o mielofibrosis<sup>10</sup>, nivel sérico de LDH<sup>11</sup> y dependencia transfusional<sup>6,9</sup>.

### Modalidades de tratamiento para SMD de bajo riesgo. Medidas generales: cuidados de soporte, agentes eritropoyéticos y tratamiento quelante de la sobrecarga de hierro

#### Cuidados de soporte

Ofrecer el mejor tratamiento de soporte continúa siendo esencial. La decisión de transfundir concentrados de hemáties debe ser individualizada, no basada en la cifra de hemoglobina, y su objetivo, conseguir que la sintomatología anémica interfiera lo menos posible la actividad física del paciente y evitar el daño isquémico orgánico. En este sentido, las guías europeas en preparación recomiendan transfundir siempre que la hemoglobina sea inferior a 8 g/dL y cuando esté entre 8 y 9 g/dL y existan síntomas de anemia<sup>4</sup>. Los requerimientos transfusionales pueden variar ampliamente en presencia de otros problemas médicos, aloanticuerpos eritrocitarios, esplenomegalia y hemorragia intestinal oculta intercurrente. La transfusión de con-

centrado de plaquetas debe seguir los mismos criterios empleados en pacientes con leucemia aguda. En los pacientes candidatos a TPH se recomienda emplear hemoderivados irradiados.

El manejo de la infección debe ser similar al adoptado en pacientes con neutropenia, y tener presente que algunos enfermos pueden desarrollar infecciones graves con cifras normales de neutrófilos, debido a la presencia de alteraciones funcionales de los neutrófilos. El uso de factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF) puede ser útil en infecciones graves con neutropenia y no aumenta el riesgo de LMA.

#### Agentes eritropoyéticos

El empleo de agentes eritropoyéticos, como eritropoyetina (EPO) alfa o beta o darbepoyetina, puede ser beneficioso en pacientes de bajo riesgo. La tasa de respuesta a agentes eritropoyéticos es muy variable (10-60%)<sup>12-22</sup>. Los pacientes con mayor probabilidad de responder son aquéllos con un nivel endógeno de EPO inferior a 200-500 U/L, bajos requerimientos transfusionales (inferiores a 2 unidades de concentrado de hemáties al mes), IPSS de riesgo bajo o intermedio-1 y displasia eritroide aislada<sup>15,17,18,21</sup>. En pacientes con elevado requerimiento transfusional y nivel de EPO superior a 500 U/L, la tasa de respuesta es inferior al 10%, mientras que puede alcanzar el 60-70% en casos de bajo riesgo con menores requerimientos transfusionales y nivel de EPO inferior a 200 U/L<sup>15,16,18,21</sup>. El empleo de dosis de EPO o de darbepoyetina iguales o superiores a 60.000-80.000/semana o 300 µg/semana, respectivamente, ofrece mejores resultados que el uso de do-



sis inferiores<sup>23</sup>. El uso de esquemas de administración semanal ofrece resultados similares a la diaria, con claras ventajas prácticas<sup>3,4</sup>. La práctica habitual es retirar la EPO a las 8-12 semanas si no se observa un aumento de las cifras de hemoglobina y reticulocitos<sup>3,4</sup>. La adición de G-CSF a bajas dosis (1-2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  1-3 veces por semana) podría ser beneficiosa en algunos pacientes que no responden a EPO sola, especialmente en pacientes con ARSA<sup>4</sup>. La duración mediana de la respuesta a agentes eritropoyéticos es de 1 a 2 años<sup>12,16</sup> y su uso solo o en combinación con G-CSF no aumenta el riesgo de transformación leucémica y podría aumentar la supervivencia<sup>24,25</sup>. Dado el temor a la aparición de eventos tromboembólicos, se recomienda mantener la mínima dosis eficaz de EPO o darbepoyetina, interrumpirlos temporalmente cuando la cifra de hemoglobina es superior a 12 g/dL y reiniciarlos a una dosis inferior cuando la hemoglobina desciende por debajo de 11 g/dL<sup>26</sup>. La pérdida de respuesta a agentes eritropoyéticos puede ser debida a una deficiencia real o funcional de hierro. En estos casos el empleo de suplementos de hierro podría ser eficaz.

### **Tratamiento quelante de la sobrecarga de hierro**

El tratamiento transfusional crónico condiciona una sobrecarga de hierro con sus correspondientes secuelas cardíacas, hepáticas y endocrinas. Es probable que la avanzada edad, presencia frecuente de enfermedades asociadas y peor tolerancia cardíaca a la anemia crónica de los pacientes con SMD aumente su susceptibilidad a los efectos tóxicos de la sobrecarga de hierro. Los pacientes con SMD que requieren transfusiones de concentrados de hematíes presentan peor supervivencia independientemente de otras características pronósticas<sup>6,9</sup>. Del mismo modo, la sobrecarga de hierro, definida como un nivel sérico de ferritina superior a 1.000 ng/mL, parece influir negativamente en la supervivencia de los pacientes con SMD<sup>9,27,28</sup>, especialmente en los subtipos morfológicos de mejor pronóstico<sup>9,28</sup> y dos series recientes han mostrado mayor supervivencia en pacientes que recibieron quelación de hierro<sup>29,30</sup>. En el pasado la sobrecarga de hierro de los pacientes con SMD no se ha manejado apropiadamente, debido a la incomodidad de la vía de administración de deferoxamina y a los efectos hematológicos adversos de deferiprona. La reciente aprobación del quelante del hierro oral deferasirox podría cambiar este panorama. Los estudios disponibles en pacientes con SMD sugieren que deferasirox, a la dosis de 20-30 mg/kg, es capaz de producir un balance negativo de hierro con una tolerancia adecuada en la mayoría de los casos. Sin embargo, su elevado precio y potenciales efectos adversos, como elevación de la cifra de creatinina y diarrea, en ausencia de datos claros de

prolongación de supervivencia o reducción significativa de las complicaciones derivadas de la sobrecarga de hierro, pueden limitar su uso. Actualmente se considera que los pacientes que más se podrían beneficiar de un programa de quelación adecuado serían los de riesgo bajo (IPSS bajo o intermedio-1) con requerimientos transfusionales, ferritina mayor a 1.000-2.000 ng/mL u otra evidencia de sobrecarga de hierro significativa y sin comorbilidad que reduzca significativamente su calidad o esperanza de vida<sup>3,4</sup>. El tratamiento quelante también podría considerarse en los candidatos a TPH alogénico<sup>4</sup>, dada la mayor mortalidad relacionada con el proceder y peor supervivencia que presentan los pacientes con sobrecarga de hierro al trasplante<sup>32,33</sup>, pero no hay ninguna evidencia de la seguridad y eficacia de deferasirox en esta indicación.

### **Lenalidomida y otros inmunomoduladores**

La lenalidomida es un fármaco perteneciente a una nueva familia de compuestos inmunomoduladores derivados de la talidomida denominados genéricamente IMiD<sup>®</sup>. Entre las propiedades biológicas responsables de su actividad en SMD se encuentran la supresión de la producción de citocinas inflamatorias por los monocitos, el aumento de la activación de células T y NK, la inhibición de la angiogénesis, la estimulación de la eritropoyesis y un efecto citotóxico directo<sup>34</sup>. La lenalidomida es más potente, especialmente como inmunomodulador, y presenta un perfil de seguridad más favorable que la talidomida, destacando la prácticamente nula toxicidad neurológica<sup>34,35</sup>.

### **Lenalidomida en pacientes con delección 5q**

Por razones aún desconocidas, la lenalidomida presenta una eficacia especialmente notable en pacientes con SMD que presentan delección 5q<sup>36-39</sup>. En la serie más amplia disponible con 148 pacientes con SMD de bajo riesgo (IPSS bajo o intermedio-1), dependientes de transfusión (al menos 2 concentrados de hematíes en 8 semanas) que presentaban delección 5q (aislada en 110, asociada a otra anomalía en 25 y como parte de un cariotipo complejo en 12) tratados con lenalidomida a la dosis de 10 mg/día (102 pacientes) o 10 mg/día durante 21 días cada 28 días (46 pacientes), la tasa de independencia transfusional, mantenida en la mitad de los casos a las 74 semanas, fue del 67%, y la mediana de aumento de la cifra de hemoglobina respecto a la basal fue de 5,4 g/L<sup>37</sup>. La mayoría de las respuestas se produjeron rápidamente, entre las semanas 4 y 12, aunque en algún caso tardó hasta 11 meses. Llamativamente, el 73% de los pacientes presentó una remisión citogenética, que fue completa



en el 45%. La mielosupresión fue casi constante, con neutropenia y trombopenia de grado 3-4 en el 55% y 44% respectivamente, y 3 pacientes fallecieron por infección durante la fase de neutropenia<sup>37</sup>. En general, la neutropenia y la trombopenia tendieron a resolverse a las 8 semanas de tratamiento, en paralelo con la aparición de la respuesta eritroide. Otros efectos adversos, que aparecen en más del 10% de los pacientes, fueron diarrea, calambres musculares, prurito, eritema y temblor, pero raramente alcanzaron el grado 3-4. El 80% de los pacientes requirió reducción de dosis, principalmente a consecuencia de la toxicidad hematológica. De hecho, la mayoría de los 51 pacientes que permanecían libres de transfusiones estaban recibiendo 5 mg al día (41%) o 5 mg a días alternos (31%), lo que podría indicar que la respuesta puede mantenerse en muchos casos con pequeñas dosis de lenalidomida. Como resultado de este estudio, lenalidomida fue aprobada por la Food and Drug Administration (FDA) norteamericana en diciembre de 2005 para pacientes con SMD de bajo riesgo dependientes de transfusión que presentan delección 5q, pero la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) ha solicitado estudios adicionales que actualmente están en marcha. Los pacientes con trombopenia antes del tratamiento tienen menor tasa de respuesta, probablemente por requerir con mayor frecuencia una reducción de la dosis<sup>37,38</sup>. Asimismo, la probabilidad de respuesta eritroide y citogenética es mayor en los pacientes que desarrollan neutropenia y trombopenia<sup>38</sup>. En la actualidad desconocemos la dosis óptima y la duración del tratamiento con lenalidomida. La intensidad de la dosis en las primeras semanas de tratamiento parece importante. En cualquier caso, debe prestarse especial cuidado al desarrollo de toxicidad hematológica, con recuentos semanales de células sanguíneas las primeras 8-12 semanas de tratamiento y cuando lo indique la situación clínica. El uso de G-CSF parece evitar la reducción o suspensión de la dosis de lenalidomida en muchos casos, por lo que se ha recomendado emplearlo cuando el recuento de neutrófilos se acerca o es inferior a  $1 \times 10^9/L$ <sup>40</sup>. La trombocitopenia importante sólo puede manejarse con reducción o suspensión transitoria de dosis. Esta última opción es imprescindible si la cifra de plaquetas es inferior a  $25 \times 10^9/L$ <sup>40</sup>. Aunque se desconoce si la lenalidomida aumenta el riesgo de complicaciones tromboembólicas en SMD, como ocurre en pacientes con mieloma múltiple, es muy aconsejable prestar especial atención a la aparición de estos eventos, y algunos recomiendan emplear heparinas de bajo peso molecular en pacientes con antecedentes de trombosis o con factores de riesgo<sup>40</sup>. Asimismo, los pacientes con respuesta eritroide excesiva y cifras de hemoglobina superiores a 14 g/dL podrían beneficiarse de flebotomías y del empleo de anticoagulación o antiagregación<sup>40</sup>.

### ***Lenalidomida en pacientes sin delección 5q***

La tasa de respuesta eritroide en pacientes de bajo riesgo (IPSS bajo o intermedio-1) con dependencia transfusional cuando no hay delección 5q es menor pero sustancial. En la única serie disponible, 56 de 214 pacientes de estas características (26%) tratados con lenalidomida consiguieron independencia transfusional que se mantuvo una mediana de 10 meses, el aumento medio de la hemoglobina fue de 3,2 g/dL y la reducción de las necesidades transfusionales fue superior al 50% en 37 pacientes adicionales (17%), lo que supuso una tasa de respuesta eritroide del 43%<sup>39</sup>. La independencia transfusional fue más frecuente en pacientes con intensidad transfusional inferior a 4 unidades de concentrado de hematíes en 8 semanas, cifra de plaquetas superior a  $150 \times 10^9/L$ , LDH normal y menor duración del SMD. La toxicidad principal fue hematológica, con 30% y 25% de neutropenia y trombopenia de grado 3-4 respectivamente. La mayor toxicidad hematológica en pacientes con delección 5q sugiere que en ese grupo el fármaco actuaría, al menos en parte, por supresión clonal.

### ***Talidomida***

Una pequeña proporción de pacientes con SMD de bajo riesgo presentan respuesta eritroide con talidomida a dosis de 100-400 mg al día (150-200 mg al día en la mayoría de los pacientes)<sup>41</sup>, pero la menor toxicidad y mayor eficacia de lenalidomida han hecho que el empleo de talidomida sea excepcional.

---

### ***Globulina antitimocítica***

El uso de globulina antitimocítica (ATG) se ha basado en la existencia de alteraciones inmunológicas en los SMD, como presencia de células T oligoclonales y autorreactivas y reducción de células NK, y en la respuesta al fármaco en algunos pacientes con SMD hipocelulares<sup>42</sup>. Cerca de una tercera parte de los pacientes que han recibido ATG responden, en muchos casos con independencia transfusional prolongada<sup>43-48</sup>. La respuesta es mayor en pacientes de edad inferior a 60 años, con IPSS de riesgo bajo o intermedio-1, sin exceso de blastos, con médula ósea hipocelular, con trombocitopenia, sin alteraciones citogenéticas y que presentan el alelo HLA-DR15<sup>49</sup>. En alguna serie la incidencia de infecciones graves ha sido elevada, por lo que esta modalidad debería emplearse exclusivamente en centros con experiencia en ATG<sup>50</sup>. La experiencia disponible con ciclosporina es inferior<sup>51,52</sup>.

## Agentes hipometilantes

En las últimas dos décadas se ha constatado la importancia de la epigenética en diferentes neoplasias<sup>53</sup>. La inactivación de la transcripción de genes supresores de tumor por metilación de su región promotora parece desempeñar un importante papel en la patogénesis de los SMD<sup>54</sup>. Los agentes hipometilantes azacitidina (5-azacitidina) y decitabina (5-aza-2'-deoxicitidina) son análogos del nucleósido pirimidina que inhiben la ADN metiltransferasa a dosis inferiores a las que producen citotoxicidad y que podrían revertir el estado de silencio transcripcional de genes supresores de tumores o inductores de diferenciación y restaurar el funcionamiento normal de las células progenitoras hematopoyéticas<sup>54</sup>.

### Azacitidina

Los resultados de dos ensayos clínicos aleatorizados de azacitidina frente a cuidados de soporte<sup>55-57</sup> o cuidados convencionales<sup>58</sup> confirman que azacitidina debe ser considerada como el tratamiento de primera línea en SMD de alto riesgo y han permitido la rápida aprobación del fármaco en Estados Unidos (aprobado en pacientes con cualquier subtipo FAB de SMD; los pacientes con AR o ARSA deben presentar neutropenia, trombocitopenia o requerir transfusiones) y Europa (autorizado en SMD de alto riesgo, leucemia mielomonocítica crónica [LMMC] no mieloproliferativa y LMA con 20-30% blastos medulares). Aunque la experiencia publicada en SMD de bajo riesgo es limitada, los resultados preliminares de un estudio de tres esquemas de administración de azacitidina que obvian el problema logístico de su administración durante el fin de semana (azacitidina 75 mg/m<sup>2</sup>/día × 5 días seguido de 2 días de descanso y de 75 mg/m<sup>2</sup>/día × 2 días cada 28 días, azacitidina 50 mg/m<sup>2</sup>/día × 5 días seguido de 2 días de descanso y de 50 mg/m<sup>2</sup>/día × 5 días cada 28 días y de azacitidina 75 mg/m<sup>2</sup>/día × 5 días cada 28 días) son esperanzadores<sup>59</sup>. En ese estudio, la eficacia de los 3 esquemas fue similar, en términos de tasa de respuesta y de independencia transfusional, al esquema de administración clásico y, además, el esquema de 75 mg/m<sup>2</sup>/día × 5 días cada 28 días presentó una toxicidad inferior<sup>59</sup>. Llamativamente, en este estudio, en el que el 63% de los pacientes eran SMD de bajo riesgo, más de la mitad de los pacientes alcanzaron independencia transfusional. Estos datos requieren confirmación pero son de enorme valor. Asimismo, la vía endovenosa parece ofrecer resultados comparables a la vía subcutánea<sup>60</sup>. Azacitidina también está siendo ensayada en pacientes en remisión completa tras quimioterapia intensiva de tipo LMA y antes del TPH alogénico.

### Decitabina

Como resultado de un estudio aleatorizado comparando decitabina a la dosis de 15 mg/m<sup>2</sup> en infusión endovenosa de 3 horas cada 8 horas durante 3 días (dosis total: 135 mg/m<sup>2</sup>) cada 6 semanas y cuidados de soporte<sup>61</sup>, la FDA aprobó decitabina para pacientes con SMD *de novo* y secundarios, tratados previamente o no, con cualquier subtipo FAB y un IPSS de riesgo intermedio-1, intermedio-2 o alto. En diferentes subanálisis, el tiempo a LMA o muerte de los pacientes con IPSS de riesgo intermedio-2 o alto riesgo, sin tratamientos previos y con SMD *de novo*, fue significativamente mayor en el grupo tratado con decitabina, pero no hubo ninguna ventaja clara de decitabina en los pacientes de riesgo intermedio-1<sup>61</sup>. Otro ensayo aleatorizado de decitabina frente a tratamiento de soporte en pacientes de alto riesgo y edad avanzada realizado en Europa no ha podido confirmar la teórica ventaja en supervivencia de decitabina<sup>62</sup>, por lo que no se espera que la EMEA apruebe el fármaco en SMD. Se dispone de información de otros esquemas de administración de decitabina que permiten su administración sin ingreso hospitalario<sup>63,64</sup>. Un estudio aleatorizado comparó 3 esquemas alternativos de administración en 115 pacientes con SMD de alto riesgo o LMMC: 20 mg/m<sup>2</sup>/día por vía endovenosa durante 5 días, 20 mg/m<sup>2</sup>/día por vía subcutánea durante 5 días, y 10 mg/m<sup>2</sup>/día por vía endovenosa durante 10 días<sup>63</sup>. El esquema endovenoso de 5 días, de mayor intensidad de dosis, fue considerado el óptimo, con una tasa de respuesta completa del 39%. La duración mediana de la respuesta fue de 20 meses, la mediana de supervivencia de 22 meses, y la mortalidad del tratamiento fue del 3% a las 6 semanas y del 7% a los 3 meses. Los pacientes con LMMC, sin alteraciones de los cromosomas 5 y 7 y sin tratamientos previos presentaron mejores resultados<sup>64</sup>. Los resultados de este grupo de 115 pacientes tratados con esquemas alternativos de decitabina han sido comparados recientemente con los obtenidos en un grupo histórico de 115 pacientes de características similares tratado con quimioterapia intensiva de tipo LMA<sup>65</sup>. El grupo que recibió decitabina mostró mayor supervivencia que el que recibió quimioterapia intensiva (mediana de supervivencia: 22 *versus* 12 meses). En resumen, no disponemos de datos suficientes para recomendar el uso de decitabina en SMD de bajo riesgo, con la posible salvedad de su empleo en LMMC.

### Quimioterapia intensiva y trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos

No disponemos de datos del empleo de quimioterapia intensiva de tipo LMA en SMD de bajo riesgo. Debido a los riesgos inherentes y pobres resultados a

largo plazo, la quimioterapia de tipo LMA solamente se suele emplear en pacientes de alto riesgo, en los que la tasa de remisión completa (RC) es del 50-60%, la incidencia de muerte precoz del 20-25%, la frecuencia de enfermedad refractaria del 20-25%, el riesgo de recaída muy elevado (70-80%), la duración de la remisión (mediana: 8 meses) y de la supervivencia global (mediana: 12 meses) cortas, y la proporción de pacientes que sobreviven sin enfermedad, escaso (10-20%)<sup>66-71</sup>. Las características con mayor peso pronóstico son la edad, el estado general y la comorbilidad y citogenética<sup>68,70</sup>. La probabilidad de supervivencia libre de enfermedad (SLE) es mínima en pacientes de más de 75 años, con comorbilidades o que presentan anomalías citogenéticas incluidas en el grupo citogenético desfavorable del IPSS (cariotipo complejo y anomalías del cromosoma 7). Los pacientes que reciben quimioterapia intensiva permanecen ingresados más del 50% de su tiempo, lo que implica una calidad de vida pobre. El posible beneficio del TPH autólogo en los pacientes que alcanzan RC con quimioterapia es incierto<sup>4,68,72-75</sup>.

### Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos

El TPH alogénico es la única modalidad con capacidad curativa demostrada en SMD. En la serie más amplia disponible de TPH alogénico de hermano HLA-idéntico, la experiencia del International Bone Marrow Transplantation group (IBMTR) en 452 pacientes, la SLE, riesgo de recaída y MRT a los 3 años fue del 40%, 23% y 37%, respectivamente<sup>76</sup>. Es probable que los resultados de esta modalidad de TPH, como reflejan distintas encuestas recientes del EBMT e IBMTR, hayan mejorado en la última década gracias a una reducción de la mortalidad del proceder. Los factores que más influyen en los resultados del TPH alogénico de hermano HLA-idéntico son la edad, el estadio de la enfermedad (subtipo FAB o proporción de blastos al trasplante), el grupo de riesgo citogenético del IPSS, la existencia de comorbilidades y, posiblemente, el tiempo desde el diagnóstico al trasplante<sup>76-81</sup>. La edad, presencia de comorbilidad y mayor tiempo al trasplante aumentan la MRT. En un estudio retrospectivo del EBMT, la MRT de los pacientes de edad inferior a 20 años, entre 20 y 40, y superior a 40 años fue del 30%, 43% y 50%, respectivamente<sup>79</sup>. La proporción medular de blastos y la puntuación según el IPSS muestran una relación directa con el riesgo de recaída e inversa con la SLE. En pacientes sin exceso de blastos, la SLE puede llegar al 60% a los 3 años, mientras que es inferior al 20% en los que presentan una proporción superior al 20%<sup>76-81</sup>. La tasa de recaída puede sobrepasar el 80% cuando el paciente

presenta alteraciones citogenéticas de alto riesgo del IPSS, y es inferior al 20% en los pacientes con alteraciones cromosómicas de buen pronóstico o cariotipo normal<sup>80,81</sup>. Varias preguntas respecto al TPH alogénico de hermano HLA-idéntico continúan sin tener respuesta clara. El régimen ideal de acondicionamiento no está establecido, y el uso de quimioterapia tipo LMA antes del trasplante para reducir masa tumoral es controvertido. La fuente de progenitores hematopoyéticos a emplear preferiblemente, sangre periférica o médula ósea, no está del todo clara. El prendimiento es más rápido y la incidencia de enfermedad injerto contra huésped (EICH) mayor con sangre periférica. Es posible que en pacientes con alto riesgo de recaída esta última fuente sea preferible por ofrecer un mayor efecto antileucémico. Finalmente, el momento de proceder al trasplante en el paciente individual es discutible. El IBMTR, empleando un modelo de análisis de decisión tipo Markov y las bases de datos del IPSS y del propio IBMTR, concluyó que la mayor ganancia de vida se lograba demorando el trasplante hasta la progresión en los pacientes con IPSS de riesgo bajo o intermedio-1 y trasplantando de entrada en los casos con IPSS de riesgo intermedio-2 o alto<sup>82</sup>. Los resultados de este trabajo han influido de forma notable en las recomendaciones de los expertos<sup>1-4</sup> y en los criterios de selección de pacientes para programas de trasplante. Sin embargo, estos datos pueden no ser aplicables en casos particulares. Así, la demora no parece aconsejable para un paciente de riesgo intermedio-1 con anemia que requiere transfusiones, presenta displasia multilineal y tiene un cariotipo desfavorable o exceso de blastos<sup>4</sup>, o para un paciente de bajo riesgo con neutropenia o trombocitopenia grave o acusada fibrosis medular.

El TPH alogénico de hermano HLA-idéntico con acondicionamiento convencional solamente es aplicable en una minoría (menos del 10%) de los pacientes debido al límite genético (donante disponible en el 30-35%), de edad (55-60 años) y de estado general (adecuado con ausencia de comorbilidad) que precisa para tener unas garantías mínimas de éxito. El empleo de donantes no emparentados (DNE), tanto de médula ósea y sangre periférica como de sangre de cordón umbilical, y de regímenes de acondicionamiento de menor intensidad, permite ampliar el beneficio del TPH alogénico a un mayor número de pacientes. La probabilidad de SLE del TPH de DNE varía del 28% al 59% la tasa de recaída, 14% al 35%, es aceptable y la MRT, superior al 50%, es muy elevada, constituyendo el principal problema a resolver<sup>83-86</sup>. Un estudio de Seattle ha mostrado resultados prometedores con busulfán oral ajustado a niveles plasmáticos y ciclofosfamida, pero estos datos requieren confirmación<sup>83</sup>. Las características con influencia pronóstica en esta modalidad de TPH son muy similares a las del

TPH de hermano HLA-idéntico. Los pacientes sin exceso de blastos, con IPSS de riesgo bajo o intermedio-1, con citogenética IPSS favorable, SMD *de novo*, así como los que desarrollan EICH aguda tienen menor riesgo de recaída<sup>83-86</sup>. La mayor edad de receptor y donante, mayor tiempo desde el diagnóstico al trasplante, disparidad HLA, desarrollo de EICH agudo y seropositividad para citomegalovirus (CMV) aumenta la MRT<sup>83-86</sup>. Finalmente, la ausencia de exceso de blastos, menor puntuación IPSS, menor edad, menor tiempo desde el diagnóstico al trasplante, seronegatividad para CMV y no desarrollar EICH aguda grave resultan en una mayor probabilidad de SLE<sup>83-86</sup>. Los resultados de esta modalidad de TPH han mejorado en los últimos años. La experiencia con trasplante de sangre de cordón umbilical (TSCU) es aún limitada pero podría ser similar a la de TPH de DNE adulto<sup>87-88</sup>. Por su mayor tolerancia inmunológica y rápida disponibilidad, esta modalidad debe considerarse en los pacientes que precisan trasplante urgente o carecen de un DNE adulto HLA-compatible. El TPH alogénico con acondicionamiento de intensidad reducida (AIR) es especialmente atractivo en los SMD, ya que la menor MRT que condiciona permite realizarlo en un gran número de pacientes que por su edad o comorbilidad no serían candidatos a un TPH con acondicionamiento mieloablativo convencional. El EBMT ha comparado recientemente los resultados del TPH alogénico de hermano HLA-idéntico en 215 pacientes con SMD y edad mediana de 56 años que recibieron AIR con los obtenidos en 621 pacientes con una edad mediana de 45 años que recibieron acondicionamiento convencional<sup>89</sup>. El grupo que recibió AIR presentó de forma significativa mayor incidencia de recaída (45% *versus* 27%), menor MRT (22% *versus* 32%) y similar SLE (33% *versus* 41%) a los 3 años que el tratado con acondicionamiento mieloablativo estándar. Estos resultados, que fueron similares considerando distintos grupos de edad, y el estado de la enfermedad al trasplante evidencian que el empleo de AIR es una alternativa válida para pacientes con SMD y edad avanzada o comorbilidad.

## Nuevos agentes

Los progresos en el reconocimiento de nuevos mecanismos biológicos y genéticos implicados en la patogénesis de los SMD está abriendo el camino a la búsqueda de nuevos fármacos. Sin embargo, todos estos nuevos agentes (inhibidores de la acetilación de histonas, inhibidores de farnesil transferasa, clofarabina, cloretazina, erlotinib) están siendo ensayados en pacientes de alto riesgo y no se dispone de datos de su potencial eficacia en SMD de bajo riesgo. Los nuevos agentes estimulantes de la trombopoyesis, como ro-

miplostina y eltrombopag, podrían desempeñar un papel en SMD de bajo riesgo con trombocitopenia grave, pero su eficacia y seguridad son todavía inciertas.

## Estrategia de tratamiento

El objetivo básico del tratamiento en los SMD de bajo riesgo debe ser reducir las citopenias y mejorar la calidad de vida del paciente. Es posible que esta estrategia en algunos casos redunde en una prolongación de la supervivencia. En algunas ocasiones particulares puede considerarse el empleo de la única modalidad curativa, el TPH alogénico. En la Figura 1 se ofrece el posible algoritmo de tratamiento de los pacientes con SMD de bajo riesgo.

Los pacientes asintomáticos sin citopenias significativas, sin exceso de blastos y sin alteraciones citogenéticas desfavorables pueden beneficiarse de un seguimiento estrecho sin recibir ningún tratamiento específico<sup>4</sup>. Los restantes requieren un manejo activo.

El tratamiento de los pacientes con anemia sintomática (generalmente con hemoglobina inferior a 10 g/dL) debe estratificarse de acuerdo con la presencia de delección 5q, cifra endógena de EPO e intensidad transfusional. Los pacientes con delección 5q y requerimientos transfusionales son candidatos a recibir lenalidomida, a ser posible en el contexto de un ensayo clínico<sup>4</sup>. En estos casos se debe extremar la vigilancia de los recuentos sanguíneos de neutrófilos y plaquetas y modificar la dosis del fármaco y asociar G-CSF si se aprecia una toxicidad hematológica significativa. Los pacientes sin delección 5q, con nivel endógeno de EPO inferior a 500 U/L y requerimientos transfusionales moderados (menos de 2 concentrados de hematíes al mes) deben recibir EPO o darbepoyetina durante 8 semanas y si no hay respuesta se debe asociar G-CSF<sup>4</sup>. El uso combinado de entrada de EPO y G-CSF puede ser especialmente beneficioso en los pacientes con anemia refractaria con sideroblastos en anillo. Los pacientes que no responden a agentes eritropoyéticos o pierden esta respuesta pueden ser considerados para tratamiento con lenalidomida o azacitidina o ser incluidos en ensayos clínicos. El tratamiento a considerar en los pacientes transfusión-dependientes con una cifra de EPO endógena superior a 500 U/L o con una cifra de EPO inferior y con intensos requerimientos transfusionales (más de 2 concentrados de hematíes al mes) no está bien establecido. Este grupo de pacientes podría beneficiarse de lenalidomida como primera opción, dada la comodidad de su formulación oral respecto a los agentes hipometilantes y su menor toxicidad en comparación con ATG. Una posible excepción sería el subgrupo de pacientes sin comorbilidad significativa y con elevada pro-



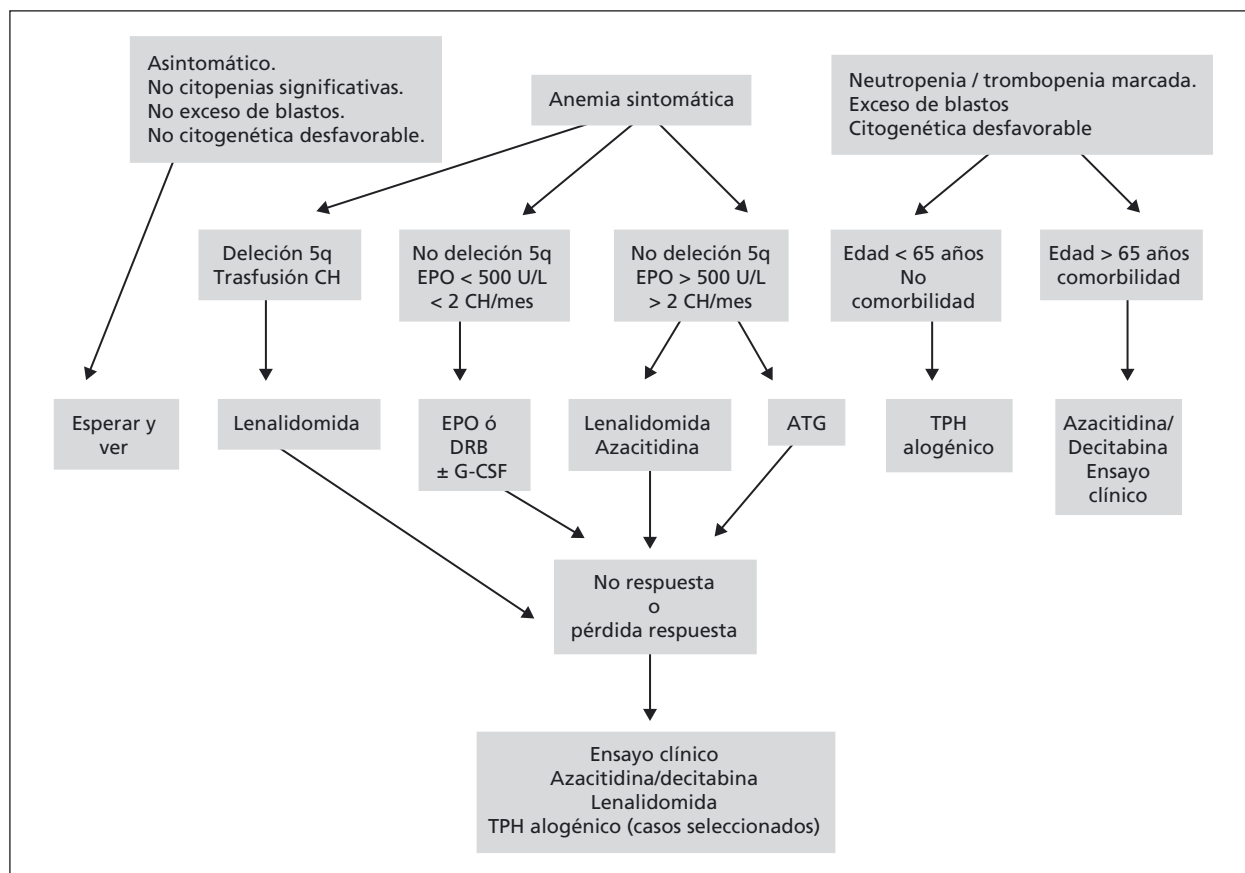


Figura 1. Algoritmo de tratamiento para pacientes con SMD de bajo riesgo (IPSS de riesgo bajo o intermedio-1: puntuación: 0-1, o WPSS de riesgo muy bajo, bajo o intermedio: puntuación: 0-2). CH: concentrado de hemáties; EPO: eritropoyetina; DRB: darbepoyetina; G-CSF: factor estimulante de colonias granulocíticas; ATG: globulina antitumoral; TPH: trasplante de progenitores hematopoyéticos.

babilidad de respuesta a ATG. Este agente podría ser especialmente útil en los pacientes de edad inferior a 65 años, sin exceso de blastos ni anomalías cromosómicas, con dependencia transfusional inferior a 2 años y con una médula hipocelular<sup>4</sup>. Los pacientes de bajo riesgo con anemia significativa que no responden o pierden la respuesta a las modalidades terapéuticas anteriores deberían ser incluidos en ensayos clínicos, podrían ser considerados para tratamiento con agentes hipometilantes o, en casos seleccionados (pacientes jóvenes, con buen estado general y sin comorbilidad), para TPH alogénico.

Los pacientes con IPSS intermedio-1 o WPSS intermedio que presentasen exceso de blastos o citogenética desfavorable deberían ser considerados para TPH alogénico<sup>4</sup>. Esta misma estrategia podría considerarse en pacientes con neutropenia, trombocitopenia o mielofibrosis marcada.

Los pacientes con LMMC que presentan reordenamiento y activación del gen con actividad tirosinasa PDGFRB como consecuencia de traslocaciones en 5q31-33, la más común la t(5;12), merecen una consideración especial. Estos pacientes presen-

tan normalización de los recuentos sanguíneos y remisión citogenética prolongada tras tratamiento con imatinib.

El quelante del hierro deferasirox debería emplearse en todos los pacientes de bajo riesgo con requerimientos transfusionales y evidencia de sobrecarga de hierro en los candidatos a TPH alogénico<sup>4</sup>. En todos los casos los enfermos deben ser seguidos estrechamente para detectar con prontitud la progresión de la enfermedad a estadio de alto riesgo.

## Resumen

La aparición de nuevos fármacos capaces de modificar el curso natural de los SMD ha modificado de forma sustancial el manejo terapéutico que tradicionalmente recibían los pacientes con SMD. Sin embargo, la información disponible no permite establecer con certeza el papel que pueden llegar a desempeñar las nuevas modalidades de tratamiento. Es más, la dosis ideal, esquema de administración y duración de los nuevos tratamientos así como las ventajas potencia-



les de su uso combinado son desconocidas. Esta revisión, basada en los datos aparecidos recientemente y en las guías de tratamiento de consenso publicadas o en preparación, ha tratado de ofrecer la visión actual de las diversas opciones terapéuticas existentes y del lugar que ocupan en el manejo de los pacientes con SMD. Finalmente, no debemos olvidar que el tratamiento para la mayoría de los pacientes continúa siendo insatisfactorio, por lo que siempre que sea posible deben ser incluidos en ensayos clínicos y protocolos terapéuticos investigacionales cuidadosamente diseñados.

## Bibliografía

- 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; UK MDS Guidelines Group. Guidelines for the diagnosis and therapy of adult myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 2003; 120: 187-200.
- National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Myelodysplastic syndromes. NCCN clinical practice guidelines in Oncology. V.2.2008. [www.nccn.org](http://www.nccn.org) (accessed December 1, 2007).
- Evidence- and consensus-based guidelines for the therapy of adult primary myelodysplastic syndromes. A statement from the European LeukemiaNet (manuscript in preparation).
- Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenau 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.
- Sole 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: 1168-78.
- Haase D, Germing U, Schanz J, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Hildebrandt B, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* 2007; 110: 4385-95.
- 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.
- Della Porta MG, Malcovati L, Boveri E, Travaglino E, Pietra D, Pascutto C, et al. Clinical relevance of bone marrow fibrosis and CD34-positive cell clusters in primary myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 2009; 27: 754-62.
- Germing U, Hildebrandt B, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Valent P, Fonatsch C, et al. Refinement of the international prognostic scoring system (IPSS) by including LDH as an additional prognostic variable to improve risk assessment in patients with primary myelodysplastic syndromes (MDS). *Leukemia* 2005; 19: 2223-31.
- Hellstrom-Lindberg E. Efficacy of erythropoietin in the myelodysplastic syndromes: a meta-analysis of 205 patients from 17 studies. *Br J Haematol* 1995; 89: 67-71.
- Stein RS, Abels RI, Krantz SB. Pharmacologic doses of recombinant human erythropoietin in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Blood* 1991; 78: 1658-63.
- Italian Cooperative Study Group for rHuEpo in Myelodysplastic Syndromes. A randomized double-blind placebo-controlled study with subcutaneous recombinant human erythropoietin in patients with low-risk myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1998; 103: 1070-4.
- Hellstrom-Lindberg E, Negrin R, Stein R, 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, Ahlgren T, et al. Treatment of anemia in myelodysplastic syndromes with granulocyte colony-stimulating factor plus erythropoietin: results from a randomized phase II study and long-term follow-up of 71 patients. *Blood* 1998; 92: 68-75.
- Terpos E, Mougiou A, Kouraklis A, et al. Prolonged administration of erythropoietin increases erythroid response rate in myelodysplastic syndromes: a phase II trial in 281 patients. *Br J Haematol* 2002; 118: 174-80.
- Hellstrom-Lindberg E, Gulbrandsen N, Linberg G, et al. A validated decision model for treating the anaemia of myelodysplastic syndromes with erythropoietin + granulocyte colony-stimulating factor: significant effects on quality of life. *Br J Haematol* 2003; 120: 1037-46.
- Casadevall N, Durieux P, Dubois S, et al. Health, economic, and quality-of-life effects of erythropoietin and granulocyte colony-stimulating factor for the treatment of myelodysplastic syndromes: a randomized, controlled trial. *Blood* 2004; 104: 321-7.
- Balleari E, Rossi E, Clavio M, et al. Erythropoietin plus granulocyte colony-stimulating factor is better than erythropoietin alone to treat anemia in low-risk of myelodysplastic syndromes: results from a randomized single-centre study. *Ann Hematol* 2006; 85: 174-80.
- Howe RB, Porwit-MacDonald A, Wanat R, Tehranchi R, Hellström-Lindberg E. The WHO classification of MDS does make a difference. *Blood* 2004; 103: 3265-70.
- Jädersten M, Montgomery SM, Dybedal I, Porwit-MacDonald A, Hellström-Lindberg E. Long-term outcome of treatment of anemia in MDS with erythropoietin and G-CSF. *Blood* 2005; 106: 803-11.
- Moyo V, Lefebvre P, Duh MS, Yektashenas B, Mundle S. Erythropoiesis-stimulating agents in the treatment of anemia in myelodysplastic syndromes: a meta-analysis. *Ann Hematol* 2008; 87: 527-36.
- Jädersten M, Malcovati L, Dybedal I, Della Porta MG, Invernizzi R, Montgomery SM, et al. Erythropoietin and granulocyte-colony stimulating factor treatment associated with improved survival in myelodysplastic syndrome. *J Clin Oncol* 2008; 26: 3607-13.
- Park S, Grabar S, Kelaidi C, Beyne-Rauzy O, Picard F, Bardet V, et al. Predictive factors of response and survival in myelodysplastic syndrome treated with erythropoietin and G-CSF: the GFM experience. *Blood* 2008; 111: 574-82.
- Rizzo JD, Somerfield MR, Hagerty KL, Seidenfeld J, Bohlius J, Bennett CL, et al. Use of epoetin and darbepoetin in patients with cancer: 2007 American Society of Hematology/American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *Blood* 2008; 111: 25-41.
- Takatoku M, Uchiyama T, Okamoto S, et al. Retrospective nationwide survey of Japanese patients with transfusion-dependent MDS and aplastic anemia highlights the negative impact of iron overload on morbidity/mortality. *Eur J Haematol* 2007; 78: 487-94.
- Garcia-Manero G, Shan J, Faderl S, Cortes J, Ravandi F, Borthakur G, et al. A prognostic score for patients with lower risk myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 2008; 22: 538-43.

29. Rose C, Brechignac S, Vassilief 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 (suppl 1): 249 (abstract).
30. Leitch HA, Wong DHC, Leger CS, et al. Improved leukemia-free and overall survival in patients with myelodysplastic syndrome receiving iron chelation therapy: a subgroup analysis. *Blood* 2007; 110 (suppl 1): 1469 (abstract).
31. 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 deferasirox (ICL670): a 1-yr prospective study. *Eur J Haematol* 2008; 80: 168-76.
32. Altés A, Remacha AF, Sureda A, et al. Iron overload might increase transplant-related mortality in haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002; 29: 987-9.
33. Armand P, Kim HT, Cutler CS, et al. Prognostic impact of elevated pretransplantation serum ferritin in patients undergoing myeloablative stem cell transplantation. *Blood* 2007; 109: 4586-8.
34. Ortega J, List A. Immunomodulatory drugs in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Curr Opin Oncol* 2007; 19: 656-9.
35. List AF. Lenalidomide--the phoenix rises. *N Engl J Med* 2007; 357: 2183-6.
36. List A, Kurtin S, Roe DJ, Buresh A, et al. Efficacy of lenalidomide in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* 2005; 352: 549-57.
37. 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.
38. Sekeres MA, Maciejewski JP, Giagounidis A, et al. Lenalidomide-induced cytopenias: relationship to hematologic improvement in patients with myelodysplastic syndromes (MDS). *Blood* 2007; 110: 821 (abstract).
39. Raza A, Reeves JA, Feldman EJ, et al. Phase II study of lenalidomide in transfusion-dependent, low- and intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes with karyotypes other than deletion 5q. *Blood* 2008; 111: 86-93.
40. Giagounidis A, Fenaux P, Mufti GJ, Muus P, Platzbecker W, Sanz G, et al. Practical recommendations on the use of lenalidomide in the management of myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol* 2008; 87: 345-52.
41. Raza A, Meyer P, Dutt D, et al. Thalidomide produces transfusion independence in long-standing refractory anemias of patients with myelodysplastic syndromes. *Blood* 2001; 98: 958-65.
42. Kondo Y, Molldrem JJ. Immune-induced cytopenia: bone marrow failure syndrome. *Curr Hematol Rep* 2004; 3: 178-83.
43. Molldrem JJ, Caples M, Mavroudis D, Plante M, Young NS, Barrett AJ. Antithymocyte globulin for patients with myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 1997; 99: 699-705.
44. Sauntharajah Y, Nakamura R, Nam JM, et al. HLA-DR15 (DR2) is overrepresented in myelodysplastic syndrome and aplastic anemia and predicts a response to immunosuppression in myelodysplastic syndrome. *Blood* 2002; 100: 1570-4.
45. Stadler M, Germing U, Kliche KO, et al. A prospective, randomized, phase II study of horse antithymocyte globulin vs rabbit antithymocyte globulin as immune-modulating therapy in patients with low-risk myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2004; 18: 460-5.
46. Sloand EM, Mainwaring L, Fuhrer M, et al. Preferential suppression of trisomy 8 compared with normal hematopoietic cell growth by autologous lymphocytes in patients with trisomy 8 myelodysplastic syndrome. *Blood* 2005; 106: 841-51.
47. Broliden PA, Dahl IM, Hast R, et al. Antithymocyte globulin and cyclosporine A as combination therapy for low-risk non-sideroblastic myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2006; 91: 667-70.
48. Lim ZY, Killick S, Germing U, et al. Low IPSS score and bone marrow hypocellularity in MDS patients predict hematological responses to antithymocyte globulin. *Leukemia* 2007; 21: 1436-41.
49. Ganser A, Passweg J, Stadler M, Dobbelsstein C, Weissinger EM. Immunosuppressive treatment strategies in low-risk MDS. *Cancer Treat Rev* 2007; 33 (suppl 1): S11-4.
50. Steensma DP, Dispenzieri A, Moore SB, Schroeder G, Tefleri A. Antithymocyte globulin has limited efficacy and substantial toxicity in unselected anemic patients with myelodysplastic syndrome. *Blood* 2003; 101: 2156-8.
51. Jonášova A, Neuwirtová R, Cermák J, et al. Cyclosporin A therapy in hypoplastic MDS patients and certain refractory anemias without hypoplastic bone marrow. *Br J Haematol* 1998; 100: 304-9.
52. Shimamoto T, Tohyama K, Okamoto T, et al. Cyclosporin A therapy for patients with myelodysplastic syndrome: multicenter pilot studies in Japan. *Leuk Res* 2003; 27: 783-8.
53. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007; 128: 683-92.
54. Issa JP. DNA methylation as a therapeutic target in cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 1634-7.
55. 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.
56. Kornblith AB, Herndon JE 2nd, Silverman LR, Demakos EP, Odchimar-Reissig R, Holland JF, et al. Impact of azacitidine on the quality of life of patients with myelodysplastic syndrome treated in a randomized phase III trial: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 2002; 20: 2441-52.
57. Silverman LR, McKenzie DR, Peterson BL, et al. Further analysis of trials with azacitidine in patients with myelodysplastic syndrome: studies 8421, 8921, and 9221 by the Cancer and Leukemia Group B. *J Clin Oncol* 2006; 24: 3895-903.
58. Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, et al, for the International Vidaza High-Risk MDS Survival Study Group. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomized, open-label, phase III study. *Lancet Oncol* 2009; 10: 223-32.
59. Lyons RM, Cosgriff TM, Modi SS, Gersh RH, Hainsworth JD, Cohn AL, et al. Hematologic response to three alternative dosing schedules of azacitidine in patients with myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1850-6.
60. Walgren R, Dao C, Kreisel F, et al. A phase II study of intravenous azacitidine alone in patients with myelodysplastic syndromes NCT00384956. *Blood* 2007; 110: 1451 (abstract).
61. Kantarjian H, Issa JP, Rosenfeld CS, et al. Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study. *Cancer* 2006; 106: 1794-803.
62. Wijermans P, Suciu S, Baila L, Platzbecker U, Giagounidis A, Selleslag D, et al. Low dose decitabine versus best supportive care in elderly patients with intermediate or high risk MDS not eligible for intensive chemotherapy: final results of the randomized phase III study (06011) of the EORTC Leukemia and German MDS Study Groups. *Blood* 2008; 112: 226 (abstract).
63. Kantarjian H, Oki Y, Garcia-Manero G, 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.
64. Kantarjian HM, O'Brien S, Shan J, et al. Update of the decitabine experience in higher risk myelodysplastic syndrome and analysis of prognostic factors associated with outcome. *Cancer* 2007; 109: 265-73.

65. Kantarjian HM, O'Brien S, Huang X, et al. Survival advantage with decitabine versus intensive chemotherapy in patients with higher risk myelodysplastic syndrome: comparison with historical experience. *Cancer* 2007; 109: 1133-7.
66. Estey E. Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes in older patients. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1908-15.
67. Beran M, Shen Y, Kantarjian H, et al. High-dose chemotherapy in high-risk myelodysplastic syndrome: covariate-adjusted comparison of five regimens. *Cancer* 2001; 92: 1999-2015.
68. Sanz GE, Mena-Duran AV, Ribera JM, et al. Autologous stem cell transplantation after FLAG-IDA chemotherapy for high-risk myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myeloid leukemias secondary to MDS (sAML) does not improve outcome: a PETHEMA experience in 103 patients. *Blood* 2005; 106 (suppl 1): 793 (abstract).
69. Estey EH, Thall PF, Cortes JE, 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 blasts in transformation, or refractory anemia with excess blasts. *Blood* 2001;98:3575-3583.
70. Kantarjian H, Beran M, Cortes J, et al. Long-term follow-up results of the combination of topotecan and cytarabine and other intensive chemotherapy regimens in myelodysplastic syndrome. *Cancer* 2006; 106: 1099-109.
71. Estey EH, Thall PF, Giles FJ, et al. Gemtuzumab ozogamicin with or without interleukin 11 in patients 65 years of age or older with untreated acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome: comparison with idarubicin plus continuous-infusion, high-dose cytosine arabinoside. *Blood* 2002; 99: 4343-9.
72. de Witte T, Suciú S, Verhoef G, et al. Intensive chemotherapy followed by allogeneic or autologous stem cell transplantation for patients with myelodysplastic syndromes (MDSs) and acute myeloid leukemia following MDS. *Blood* 2001; 98: 2326-31.
73. Al-Ali HK, Brand R, van Biezen A, et al. A retrospective comparison of autologous and unrelated donor hematopoietic cell transplantation in myelodysplastic syndrome and secondary acute myeloid leukemia: a report on behalf of the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Leukemia* 2007; 21: 1945-51.
74. de Witte T, Suciú S, Brand R, Muus P, Kröger N. Autologous stem cell transplantation in myelodysplastic syndromes. *Semin Hematol* 2007; 44: 274-7.
75. Ducastelle S, Adès L, Gardin C, et al. Long-term follow-up of autologous stem cell transplantation after intensive chemotherapy in patients with myelodysplastic syndrome or secondary acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2006; 91: 373-6.
76. Sierra J, Pérez WS, Rozman C, et al. Bone marrow transplantation from HLA-identical siblings as treatment for myelodysplasia. *Blood* 2002; 100: 1997-2004.
77. Appelbaum FR, Barrall J, Storb R, et al. Bone marrow transplantation for patients with myelodysplasia. Pretreatment variables and outcome. *Ann Intern Med* 1990; 112: 590-7.
78. Anderson JE, Appelbaum FR, Schoch G, et al. Allogeneic marrow transplantation for refractory anemia: a comparison of two preparative regimens and analysis of prognostic factors. *Blood* 1996; 87: 51-8.
79. de Witte T, Hermans J, Vossen J, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for patients with myelo-dysplastic syndromes and secondary acute myeloid leukaemias: a report on behalf of the Chronic Leukaemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Br J Haematol* 2000; 110: 620-30.
80. Nevill TJ, Fung HC, Shepherd JD, et al. Cytogenetic abnormalities in primary myelodysplastic syndrome are highly predictive of outcome after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1998; 92: 1910-7.
81. Sutton L, Chastang C, Ribaud P, et al. Factors influencing outcome in de novo myelodysplastic syndromes treated by allogeneic bone marrow transplantation: a long-term study of 71 patients Societe Francaise de Greffe de Moelle. *Blood* 1996; 88: 358-65.
82. Cutler CS, Lee SJ, Greenberg P, 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; 104: 579-85.
83. Deeg HJ, Storer B, Slattery JT, et al. Conditioning with targeted busulfan and cyclophosphamide for hemopoietic stem cell transplantation from related and unrelated donors in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood* 2002; 100: 1201-7.
84. Anderson JE, Anasetti C, Appelbaum FR, et al. Unrelated donor marrow transplantation for myelodysplasia (MDS) and MDS-related acute myeloid leukemia. *Br J Haematol* 1996; 93: 59-67.
85. Arnold R, de Witte T, van Biezen A, et al. Unrelated bone marrow transplantation in patients with myelodysplastic syndromes and secondary acute myeloid leukemia: an EBMT survey. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21: 1213-16.
86. Castro-Malaspina H, Harris RE, Gajewski J, et al. Unrelated donor marrow transplantation for myelodysplastic syndromes: outcome analysis in 510 transplants facilitated by the National Marrow Donor Program. *Blood* 2002; 99: 1943-51.
87. Ooi J, Iseki T, Takahashi S, et al. Unrelated cord blood transplantation for adult patients with advanced myelodysplastic syndrome. *Blood* 2003; 101: 4711-13.
88. Sanz GE, Rocha V, Asano S, et al. Outcomes after umbilical-cord blood transplantation from unrelated donors (UCBT) in patients with myelodysplastic syndromes (MDS). An Eurocord study. *Leuk Res* 2005; 29 (suppl. 1): S20 (abstract).
89. Martino R, Iacobelli S, Brand R, et al. Retrospective comparison of reduced-intensity conditioning and conventional high-dose conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using HLA-identical sibling donors in myelodysplastic syndromes. *Blood* 2006; 108: 836-46.

## TRASPLANTE CON ACONDICIONAMIENTO CONVENCIONAL Y DE INTENSIDAD REDUCIDA EN SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS Y LEUCEMIA AGUDA MIELOBLÁSTICA

D. VALCÁRCEL, R. MARTINO

*Unidad de Hematología Clínica. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Universidad Autónoma de Barcelona*

### Introducción

En los últimos 10 años los llamados acondicionamientos de intensidad reducida (AloTIR) se han asentado como los más frecuentes para la preparación de trasplantes alogénicos de progenitores hematopoyéticos (AloTPH) en la mayoría de enfermedades oncohematológicas, incluyendo los síndromes mielodis-



plásicos (SMD) y las leucemias agudas mieloblásticas (LAM), tanto *de novo* como secundarias a un SMD o tratamiento citotóxico previo (LAM-st). En la presente ponencia se abordará la definición conceptual de los AloTIR y los AloTPH con acondicionamientos convencionales (AloCONV), así como los resultados de éstos en SMD y LAM.

### Actividad de TPH allogénico para SMD/LAM-st

El número de AloTPH realizados en centros adscritos al EBMT para SMD y LAM-st ha aumentado progresivamente entre 1997 y 2007. Así pues, en 1997 se realizaron 370 AloTPH para estas indicaciones, mientras que en 2007 el número fue de 1.030, de los cuales 580 fueron AloTIR y 600 a partir de un donante no emparentado (datos del registro EBMT, Anja Van Biesen, comunicación personal). El número de pacientes > 50 años que recibieron un AloTPH también ha ido aumentando, siendo de tan sólo 75 en 1997 pero de 620 en 2007.

### Variables que influyen en el resultado de una AloTPH por SMD/LAM

Antes de proseguir con el análisis del papel que puede jugar la intensidad del acondicionamiento en los resultados de un AloTPH para SMD y LAM, es conveniente repasar el gran número de variables que tienen un peso relevante en el curso de un paciente que recibe un AloTPH y potencialmente en el resultado final del procedimiento. En la Tabla 1 se resumen las variables más relevantes, a juicio de los autores de esta breve revisión. Con ello, sólo queremos remarcar que el “tipo de acondicionamiento” es tan sólo una de muchas variables con relevancia pronóstica, lo cual explica por qué es tan difícil definir el impacto independiente del acondicionamiento en los resultados finales de una serie de pacientes con SMD y LAM sometidos a un AloTPH.

### Acondicionamiento para AloTPH. Concepto y definición. Tipos de acondicionamiento en SMD/LAM

El tratamiento de acondicionamiento se ha definido como los fármacos o la radioterapia que se administra en las 2 semanas previas a la infusión de progenitores hematopoyéticos cuya principal finalidad es permitir el injerto hematopoyético e inmunitario del donante y, al mismo tiempo y con una relevancia variable, reducir la “carga tumoral”. Históricamente, los primeros acondicionamientos desarrollados para

AloTPH se establecieron de manera empírica, siendo, en orden cronológico, primero la ciclofosfamida asociada a irradiación corporal total (ICT > 9 Gy dosis total) (ICT), seguida de la ciclofosfamida asociada al busulfán oral (BuCy y BuCy2)<sup>1</sup>. Éstos constituyen aún hoy los tipos más frecuentes de AloCONV, si bien el busulfán oral sin ajuste farmacocinético ha sido reemplazado por la formulación i.v. y/o por el ajuste de dosis con farmacocinética<sup>2</sup>.

A finales de la última década del siglo XX, por varios motivos se desarrollaron acondicionamientos con dosis más bajas de agentes citotóxicos directos y/o ICT, de cara a estudiar la posibilidad de establecer un injerto linfohematopoyético estable con menos toxicidad directa por el acondicionamiento y estudiar el desarrollo de alorreactividad antitumoral clínicamente relevante o beneficiosa. En conjunto, estos acondicionamientos se han denominado AloTIR, si bien la intensidad de dosis de quimio-radioterapia ha variado mucho, creando cierta confusión por la gran cantidad de combinaciones de fármacos y dosis, e incluso la nomenclatura de este conjunto de acondicionamientos (AloTIR, no ablativos, submieloablativos, no mieloablativos). En la Tabla 2 se resumen los AloCONV y AloTIR más frecuentes en series de pacientes con SMD y/o LAM.

### Depleción T *ex vivo*. Depleción T *in vivo*. Farmacoprofilaxis de la EICH. Interrelaciones con el acondicionamiento

La depleción de linfocitos T (DLT) se emplea fundamentalmente para reducir la incidencia y gravedad de la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) aguda y crónica. La DLT y el método que se emplee para conseguirla tienen un papel importante en el curso inmediato y en la morbilidad precoz tras un AloTPH, por lo que sería deseable que se describiese con detalle el método de DLT empleado al describir un acondicionamiento. A grandes rasgos, existen dos tipos de DLT. Por un lado, la depleción T *ex vivo*, que se emplea fundamentalmente en el AloCONV y se hace por selección negativa de linfocitos T o por selección positiva de células CD34+. Por otro lado, la depleción T *in vivo* mediante anticuerpos antilinfocíticos, sobre todo la globulina antilinfocítica o antitímocítica (ATG) y el anti-CD52 o alemtuzumab, que se emplean tanto en el AloTIR como en el AloCONV.

Por otra parte, la profilaxis farmacológica de la EICH, que se inicia durante el acondicionamiento, por lo que también puede considerarse como parte integral del mismo, si bien se continúa durante los meses postrasplante. La ciclosporina A, un inhibidor de calcineurina, es el fármaco más usado, aunque el uso de tacrolimus es cada vez mayor, especialmente en trasplante de donante no emparentado. En aque-

**Tabla 1. Variables del paciente, del donante y del procedimiento que pueden tener un impacto en el resultado final del trasplante en pacientes con LAM y SMD: el tipo de acondicionamiento es sólo una más entre otras variables importantes**

· Fase de la enfermedad: La cantidad de enfermedad (generalmente medida como blastos en sangre periférica y/o en médula ósea) en el momento del trasplante y la respuestas y recaídas a los tratamientos previos
· Comorbilidades: La presencia de comorbilidades, su severidad y el impacto de éstas en los resultados del trasplante han sido foco de estudios sólo en los últimos años
· Fuente de progenitores: La médula ósea y la sangre periférica han sido durante décadas las únicas fuentes de progenitores de células madre hematopoyéticas. Sin embargo, en los últimos años el cordón umbilical está siendo cada vez más usado
· Histocompatibilidad: Los estudios de compatibilidad HLA a nivel antigénico y alélico son los determinantes principales de los resultados en el trasplante alogénico, especialmente en los trasplantes de donante no emparentado. Además, el impacto de otros antígenos menores de histocompatibilidad y variables genéticas diferentes a HLA está siendo objeto de estudio
· Serologías virales: El estado serológico frente a citomegalovirus tanto del paciente como del donante tiene un gran impacto en el resultado del trasplante. El estudio de otros virus puede ser también de gran importancia y está siendo objeto de estudio en la actualidad (p. ej.: adenovirus, Epstein-Barr, etc.)
· Impacto del sexo del donante según el sexo del paciente: El uso de donante mujer en pacientes hombre se ha visto asociado a una mayor incidencia de enfermedad injerto contra huésped y mayor mortalidad asociada al trasplante
· Estrategias para prevenir y tratar la EICH: El tipo de profilaxis de EICH es un factor de máxima importancia. En general, el uso de ATG o alemtuzumab para una depleción <i>in vivo</i> se asocia a una reducción de la EICH aguda y crónica, y como consecuencia una menor mortalidad asociada al trasplante; sin embargo, la depleción T se asocia también a una menor intensidad del efecto injerto contra leucemia y, por lo tanto, se aumenta el riesgo de recidiva de la enfermedad de base. Por consiguiente, el impacto precoz y tardío de estas estrategias en el ámbito de la LAM y SMD es de gran interés y objeto de un intenso esfuerzo investigador
· Acondicionamiento: Desde la introducción de la ciclofosfamida y la irradiación corporal total a finales de los años setenta del siglo pasado, se han investigado diferentes pautas de acondicionamiento, pero ninguna de ellas se ha mostrado superior a las demás en términos de supervivencia global. El fraccionamiento de la irradiación corporal total ha reducido los efectos secundarios, pero se ha incrementado la dosis para obtener los mismos efectos inmunosupresores. El uso de la combinación de busulfán y ciclofosfamida ha mostrado resultados similares a ciclofosfamida e ICT en LAM; sin embargo, en LAL la combinación con ICT parece ofrecer mejores resultados. El tratamiento con busulfán puede ser optimizado tanto con el uso de formulaciones endovenosas, que evitan los problemas de absorción del fármaco, como con el uso de estudios farmacocinéticos que permiten modificar la dosis de acuerdo con los niveles obtenidos en plasma (variables tanto por la absorción del fármaco como por las diferencias en su metabolismo como consecuencia de interacciones farmacológicas o diferentes perfiles farmacogenómicos). El uso de regímenes de acondicionamiento hiperintensos se asocia a menor probabilidad de recidiva, pero el incremento paralelo en la mortalidad asociada al trasplante hace que los resultados finales en términos de supervivencia sean similares. El uso de acondicionamientos de intensidad reducida se asocia a mayor probabilidad de recidiva; sin embargo, la reducción de la mortalidad asociada al trasplante ha permitido ofrecer una opción curativa mediante el efecto injerto contra leucemia a un grupo de pacientes que, de otra forma, no serían candidatos a trasplante alogénico. Los resultados a largo plazo todavía no se conocen

llos casos en que no se usa ningún tipo de DLT, se suele asociar un segundo fármaco, que clásicamente ha sido el metotrexato, si bien en los últimos 5 años, con la intención de reducir la toxicidad asociada, se están estudiando el micofenolato mofetil o el sirolimus como sustitutos.

### Principales tipos de AloTIR. AloTIR con mínima intensidad vs. AloTIR de intensidad intermedia

Si bien se pueden encontrar más de 60 tipos de AloTIR publicados para SMD y LAM<sup>3-8</sup>, a grandes rasgos se pueden subclasificar en dos tipos según la teórica intensidad o toxicidad extrahematológica directa de la quimioterapia y/o ICT que la componen. Un primer grupo sería el de los AloTIR de “intensidad intermedia”, cuyos ejemplos más habituales son la fludarabina (120-180 mg/m<sup>2</sup>) combinada con dosis intermedias de busulfán (8-10 mg/kg) o melfalán (70-140 mg/kg). Un segundo grupo se denomina AloTIR de “intensi-

dad mínima”, siendo el más extendido el esquema tradicional de fludarabina asociada con ICT a 2 Gy<sup>9</sup>.

### AloTIR con alemtuzumab o ATG

La inclusión de ATG o alemtuzumab en el AloTIR es muy habitual, y ambos (sobre todo el alemtuzumab) reducen la EICH, si bien a costa de aumentar el fallo de implante y el riesgo de progresión de la enfermedad de base. Asimismo, ambos aumentan el riesgo de desarrollar infección por CMV y otras infecciones linfocito T-dependientes en ausencia de EICH<sup>10-12</sup>. Nuestro grupo analizó datos cooperativos españoles-franceses-británicos para valorar el impacto potencial a corto plazo de incluir ATG o alemtuzumab en un AloTIR basado en fludarabina y busulfán para SMD y LAM<sup>10,13</sup>. En la Tabla 3 se resumen los resultados no publicados de dicha comparación, que concluyó que las 3 estrategias conducían a una supervivencia similar a los 2 años, aunque los motivos de muerte diferían en cada grupo.



**Tabla 2. Regímenes de acondicionamiento y esquemas de profilaxis de EICH más frecuentes en los trasplantes alogénicos convencionales y de intensidad reducida**

<p>· <b>Acondicionamiento estándar mieloablativo:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Basado en ICT (&gt; 8 Gy) + ciclofosfamida (120 mg/kg) (CyICT)</li> <li>- Sólo quimioterapia             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Busulfán-Ciclofosfamida (BuCy)</li> <li>- Otras combinaciones de 2 agentes alquilantes</li> </ul> </li> <li>- AloCONV hiperintensivos: BuCy o CyICT + otro citostático (Ara-C, VP-16, tiotepa)</li> </ul>
<p>· <b>Acondicionamientos de intensidad reducida:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Fludarabina + un agente alquilante o dosis intermedias de ICT             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Fludarabina + busulfán</li> <li>- Fludarabina + melfalán</li> <li>- Fludarabina + treosulfán</li> <li>- Fludarabina + otros alquilantes</li> <li>- Fludarabina + ICT (3-8 Gy)</li> </ul> </li> <li>- Fludarabina + dosis bajas de ICT (0,2 Gy): AloTIR mínimamente intensivo</li> <li>- Fludarabina + otros agentes (distintos al uso de un agente alquilante simple; p. ej.: tiotepa, Ara-C, etc.)</li> </ul>
<p>· <b>Depleción in vivo:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Alemtuzumab</li> <li>- ATG</li> <li>- No ATG ni alemtuzumab, o no especificado</li> </ul>
<p>· <b>Profilaxis de EICH, excepto depleción T:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Sin depleción T <i>in vitro</i>:             <ul style="list-style-type: none"> <li>- CsA + MTX</li> <li>- CsA sola</li> <li>- CsA + otras (no MTX; p. ej.: micofenolato mofetil, sirolimus, etc.)</li> </ul> </li> <li>- Depleción T <i>in vitro</i> + CsA (± MTX)</li> </ul>

ATG: globulina antitimocítica; CsA: ciclosporina; EICH: enfermedad injerto contra huésped; ICT: irradiación corporal total; MTX: metotrexato

### Principales tipos de AloTPH de intensidad convencional (AloCONV). Acondicionamientos hiperintensivos

Los AloCONV también pueden subclasificarse en 2 grandes categorías. Por un lado, CyICT y BuCy

pueden considerarse los principales tipos de AloCONV, si bien existen muchas otras posibilidades, al cambiar la ciclofosfamida por melfalán, tiotepa u otro fármaco. Por otro lado, los AloCONV “hiperintensivos” serían aquellos en los que se añade otro fármaco a dosis altas a los anteriores, fundamentalmente Ara-C, melfalán, tiotepa, treosulfán o etopósido, lo cual conlleva un aumento de la toxicidad precoz del acondicionamiento. En general, se considera que los AloCONV hiperintensivos no ofrecen ventajas en la supervivencia de pacientes con SMD y LAM, ya que la pequeña reducción de la recaída postrasplante queda anulada por el aumento de la mortalidad relacionada con el procedimiento<sup>14</sup>.

A continuación se describirán brevemente los resultados comparativos de los AloTPH en SMD y LAM según la intensidad del acondicionamiento. Dado que los resultados de un AloTPH dependen en gran medida de variables ajenas al tipo de acondicionamiento empleado, se describirán por separado los resultados comparativos en AloTPH de hermano HLA idéntico para pacientes con SMD o LAM en fase precoz (SMD de bajo riesgo no tratado o SMD de alto riesgo y LAM en remisión completa) y en fases avanzadas.

### AloTPH en SMD en fase precoz. Comparación AloTIR vs. AloCONV

En un estudio prospectivo realizado en nuestra institución comparamos los resultados de realizar un AloTIR con FluBu en comparación con un AloCONV con CyICT según la edad del paciente (edad > y ≤ 50 años, respectivamente) en 87 pacientes consecutivos con LAM o SMD en fase precoz. La supervivencia a los 3 años fue igual en ambos grupos (alrededor del 50%), tanto en los pacientes que llegaron a trasplantarse como en todos los candidatos analizados por intención de tratamiento. Este resultado sugiere que en la práctica clínica cotidiana el AloTIR puede reducir

**Tabla 3. Resultados del trasplante a los 24 meses en comparaciones retrospectivas, comparando 3 esquemas de acondicionamiento de intensidad reducida con o sin alemtuzumab o globulina antitimocítica en pacientes con neoplasias mieloides**

	FBm	FBC	FBA
MRT	18%	11%	21%
Recidiva	26%	39%	35%
Supervivencia global	60%	58%	60%
Supervivencia libre de enfermedad	56%	50%	44%

FBm: fludarabina-busulfán (FB)-metotrexato; FBC: FB y Campath® (alemtuzumab). FBA: FB y globulina antitimocítica; MRT: mortalidad asociada al tratamiento  
 FBm vs. FBC en ref. 13  
 FBm vs. FBA en ref. 10

**Tabla 4. Resultados del trasplante a los 48 meses en 3 estudios retrospectivos del EBMT comparando acondicionamientos convencionales mieloablativos y acondicionamientos de intensidad reducida en pacientes que recibieron un trasplante alogénico de un hermano HLA idéntico, por una LAM o un SMD de alto riesgo (> 10% de blastos)**

*SMD de bajo riesgo (anemia refractaria simple) con AtoTPH emparentado (n = 244) o de DNE (n = 130)<sup>1</sup>*

	<b>AloTIR</b>	<b>AloCONV</b>		
· MRT	34%	39%		
· Recaída	37%	11% (P = 0,02 multiV.)		
· Sup. Global	43%	53%		
· Sup. Libre Enf.	29%	51%		

*SMD fase precoz (n = 277)<sup>2</sup> LAM fase precoz (n = 416)<sup>3</sup>*

	<b>RIC</b>	<b>SMC</b>	<b>RIC</b>	<b>SMC</b>
· MRT	18%	25%	22%	30%
· Recaída	32%	27%	33%	16%
· Sup. Global	55%	56%	53%	56%
· Sup. Libre Enf.	50%	48%	44%	54%

*Fase avanzada SMD (n = 235)<sup>2</sup> Fase avanzada LAM (n = 202)<sup>3</sup>*

	<b>RIC</b>	<b>SMC</b>	<b>RIC</b>	<b>SMC</b>
· MRT	25%	34%	14%	34%
· Recaída	55%	37%	64%	45%
· Sup. Global	34%	35%	27%	23%
· Sup. Libre Enf.	20%	29%	23%	21%

*MRT: mortalidad asociada al tratamiento. Sup.: Supervivencia. Enf.: Enfermedad.*

<sup>2</sup> Datos de Aoudjhane et al. Leukemia 2005<sup>16</sup> (Del ALWP del EBMT)

<sup>3</sup> Datos de Martino et al. Blood 2006<sup>17</sup> (Del EBMT MDS Subcommittee del CLWP)

<sup>1</sup> Datos de De Witte et al. Br J Haematol<sup>18</sup>.

la elevada MRT observada con AloCONV en pacientes de más de 50 años de edad<sup>15</sup>.

Varios estudios retrospectivos del EBMT permiten estimar el impacto del acondicionamiento en LAM y SMD en fase precoz. En la Tabla 4 se resumen los resultados de estos estudios<sup>16-18</sup>. Los dos estudios más amplios sugieren que la supervivencia a los 4 años tras un AloTIR y un AloCONV ronda el 50%, si bien con menor MRT y mayor recaída tras un AloTIR. En un tercer estudio focalizado en anemia refractaria simple (en un 65% de casos con IPSS intermedio-1 o intermedio-2), la SLE a los 4 años fue menor con AloTIR, al no estar compensada la mayor incidencia de recaída con menor MRT. Este estudio nos recuerda que todavía queda mucho terreno para la mejoría con cualquier tipo de acondicionamiento.

### **AloTPH en fase avanzada. Comparación AloTIR vs. AloCONV**

La necesidad de hallar estrategias alternativas a la intensidad del acondicionamiento para mejorar los resultados del AloTPH queda reflejada con mayor cla-

ridad con los resultados de los pacientes con SMD de alto riesgo y LAM en fase avanzada (más allá de la primera remisión). Los resultados a los 4 años obtenidos se resumen en la Tabla 4, donde se observa que la supervivencia global (SG) de estos pacientes ronda el 30% con AloTIR y AloCONV, y la SLE es de alrededor del 23% con ambos.

### **Otras variables relacionadas con la intensidad del acondicionamiento. Comorbilidades y edad**

Los estudios de registro están sujetos a numerosos sesgos que deben ser tenidos en cuenta a la hora de su interpretación. En concreto, el tipo de acondicionamiento está fuertemente relacionado en los registros con muchas otras variables relevantes, tales como la edad y, sin duda, las comorbilidades y el estado funcional de los pacientes. Lamentablemente, en los registros no es posible analizar el impacto de las comorbilidades. En nuestro centro hemos analizado las variables que influyen en la MRT y la supervivencia a los 2 años tras un AloTIR en un grupo de 195 pa-

cientes consecutivos. En el análisis multivariante, un índice de comorbilidad del trasplante hemopoyético (HCT-CI) alto<sup>19</sup> (índice > 2) se asoció con una mayor MRT y menor supervivencia. Por ello, una correcta valoración de las comorbilidades debe formar parte de los futuros estudios sobre Alo-TIR y AloCONV.

En un amplio estudio retrospectivo de AloTPH en SMD y LAM coordinado por el equipo de Seattle, se identificó el importante papel pronóstico independiente del HCT-CI y la fase de la enfermedad. Así pues, la MRT a los 2 años era < 10% en fases precoces y pacientes con un HCT-CI bajo, mientras que era del 40% en fases avanzadas en combinación con un HCT-CI alto, siendo del 18-30% con una sola de estas variables adversas<sup>20</sup>.

La edad avanzada es asimismo una variable de gran relevancia en los resultados del AloTPH. Un estudio reciente del EBMT ha analizado los resultados del AloTPH en 1.333 pacientes con SMD o LAM-st y una edad > 50 años, de los cuales el 62% recibieron un AloTIR<sup>21</sup>. En el análisis multivariante, la intensidad del acondicionamiento no influyó en la SG ni en la SLE a los 5 años, pero redujo la MRT (25% vs. 40%), junto con la fase avanzada, los donantes alternativos y la citogenética de mal pronóstico. Asimismo, la recaída era mayor con AloTIR (40% vs. 30%, respectivamente), en fases avanzadas y con citogenética de mal pronóstico.

---

**Concepto clave: la definición idónea de un tipo de acondicionamiento debe incluir fármacos citotóxicos/tipo y dosis de ICT/profilaxis de la EICH/depleción T o alemtuzumab-ATG: plataforma de acondicionamiento**

La gran variedad de acondicionamientos descritos en la literatura hace imposible establecer diferencias clínicamente relevantes entre distintos tipos. Además, la estrategia de profilaxis de la EICH, sobre todo respecto a la DLT, forma parte de la "estrategia de acondicionamiento" empleada. Por ello, sería aconsejable incorporar todas las medidas que se emplean en las 2 semanas previas a la infusión de progenitores en un concepto más amplio, que podríamos denominar *plataforma de acondicionamiento*. Sería aconsejable describir con detalle la plataforma de acondicionamiento en cada procedimiento de AloTPH, sin recurrir a términos generales como AloTIR o AloCONV. Ejemplos de plataformas de acondicionamiento serían: fludarabina (150 mg/m<sup>2</sup>) con busulfán (8 mg/kg v.o.), alemtuzumab (100 mg) y ciclosporina, o fludarabina (150 mg/m<sup>2</sup>) con busulfán (10 mg/kg v.o.), ciclosporina y metotrexato; o fludarabina (90 mg/m<sup>2</sup>) con ICT (200 cGy), ciclo-

porina y MMF, si bien existen más de 60 bien descritas en LAM y SMD.

---

### **Posibles cambios en el AloTPH en SMD/ LAM: plataforma de acondicionamiento ± plataforma de progenitores hematopoyéticos ± plataforma de intervención post-AloTPH**

Sin embargo, avanzar en el terreno del AloTPH para SMD y LAM no vendrá dado por pequeños cambios en las plataformas de acondicionamiento actualmente empleadas. Y es evidente que se requieren mejoras, tanto para reducir la MRT como para reducir la recaída y mejorar la calidad de vida de los supervivientes. Para lograr dichas mejorías, deberíamos centrarnos en las fases posteriores al acondicionamiento:

1. Las diversas fuentes de progenitores y sus manipulaciones conllevan una variedad cada vez más amplia y heterogénea de productos celulares. Por ello, quizás debamos pronto referirnos al producto final infundido como *plataforma de progenitores hematopoyéticos o productos celulares*.

2. Las intervenciones terapéuticas postrasplante para reducir la recidiva o mejorar inmunidades específicas mediante fármacos no citotóxicos, anticuerpos monoclonales con especificidad antitumoral o linfocitos T específicos conducirán a la posibilidad de reducir la MRT y la recidiva más allá del acondicionamiento o de la inhibición o inducción de EICH/aloinmunidad inespecífica, mediante *plataformas de intervención post-AloTPH*.

---

### **Bibliografía**

1. Deeg HJ. Transplantation conditioning regimens: can we say it better? *Biol Blood Marrow Transplant* 2009; 15: 653-5.
2. Ciurea SO, Andersson BS. Busulfan in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009; 15: 523-36.
3. Niederwieser D, Lange T, Cross M, et al. Reduced intensity conditioning (RIC) haematopoietic cell transplants in elderly patients with AML. *Best Pract Res Clin Haematol* 2006; 19: 825-38.
4. Blaise D, Vey N, Faucher C, Mohty M. Current status of reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2007; 92: 533-41.
5. Lazarus HM, Rowe JM. Reduced-intensity conditioning for acute myeloid leukemia: is this strategy correct. *Leukemia* 2006; 20: 1673-82.
6. Storb R. Can reduced-intensity allogeneic transplantation cure older adults with AML? *Best Pract Res Clin Haematol* 2007; 20: 85-90.
7. Scott BL, Sandmaier BM. Outcomes with myeloid malignancies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006; 381-9.
8. Barrett AJ, Savani BN. Stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning regimens: a review of ten years experience with new transplant concepts and new therapeutic agents. *Leukemia* 2006; 20: 1661-72.

9. Scott BL, Sandmaier BM, Storer B, et al. Myeloablative vs nonmyeloablative allogeneic transplantation for patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukemia with multilineage dysplasia: a retrospective analysis. *Leukemia* 2006; 20: 128-35.
10. Mohty M, Martino R, Faucher C, et al. Fludarabine and Busulfan-Based Reduced Intensity Conditioning (RIC) Allogeneic HLA-Identical Transplantation (allo-SCT) with or without Anti-Thymocyte Globulin (ATG): Comparison between Two Prospective Studies in Patients with Myeloid Malignancies [abstract]. *Blood* 2004; 104.
11. Hegenbart U, Niederwieser D, Sandmaier BM, 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: 444-53.
12. Tauro S, Craddock C, Peggs K, 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: 9387-93.
13. Martino R, Ho A, Sierra J, et al. Reduced-intensity conditioning allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with or without alemtuzumab in acute myelogenous leukaemia and myelodysplastic syndromes: comparison between two prospective studies using fludarabine and oral busulfan [abstract]. *BMT* 2004; 33: O120.
14. Kindwall-Keller T, Isola LM. The evolution of hematopoietic SCT in myelodysplastic syndrome. *Bone Marrow Transplant* 2009; 43: 597-609.
15. Martino R, Valcarcel D, Brunet S, et al. Comparable non-relapse mortality and survival after HLA-identical sibling blood SCT with reduced or conventional-intensity conditioning for high-risk MDS and AML in first remission. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41: 33-8.
16. Aoudjhane M, Labopin M, Gorin NC, et al. 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: 2304-12.
17. Martino R, Iacobelli S, Brand R, et al. Retrospective comparison of reduced-intensity conditioning and conventional high-dose conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using HLA-identical sibling donors in myelodysplastic syndromes. *Blood* 2006; 108: 836-46.
18. De Witte T, Brand R, Van Biezen A, et al. Allogeneic stem cell transplantation for patients with refractory anaemia with matched related and unrelated donors: delay of the transplant is associated with inferior survival. *Br J Haematol* 2009 (en prensa).
19. Sorror ML, Maris MB, Storb R, et al. Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT. *Blood* 2005; 106: 2912-9.
20. Sorror ML, Sandmaier BM, Storer BE, Maris MB, Baron F, Maloney DG. Comorbidity and disease status based risk stratification of outcomes among patients with acute myeloid leukemia or myelodysplasia receiving allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol* 2007; 20: 4246-54.
21. Lim ZY, Brand R, Martino R, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for patients with MDS and secondary AML above the age of 50 years. *J Clin Oncol* 2009 (en prensa).

## Linfoma folicular

COORDINADORES: J. GAYOSO. *Madrid*  
E. CONDE. *Santander*

### Resumen del simposio

El linfoma folicular constituye uno de los linfomas más frecuentes. Su curso clínico se caracteriza por un comportamiento indolente, con una historia de sucesivas remisiones y recaídas después de cada línea de tratamiento. En los últimos 10 años hemos asistido al desarrollo de la inmunoterapia con anticuerpos monoclonales, la radioinmunoterapia y los trasplantes submieloablativos (“minialos”), que han logrado prolongar la supervivencia media de los pacientes de forma significativa respecto a épocas anteriores. En este simposio contaremos con la presencia de destacados especialistas nacionales e internacionales que nos van a ilustrar sobre el estado del arte en el linfoma folicular.

En primer lugar, el profesor Randy Gascoine, hemopatólogo de la British Columbia Cancer Agency, nos adentrará en el conocimiento del microambiente en el linfoma folicular, en cómo éste puede justificar, al menos en parte, la heterogeneidad clínica y la respuesta de los pacientes a los distintos tratamientos, y en la importancia pronóstica de diferentes poblaciones celulares acompañantes del clon tumoral linfoide B tanto por su papel en el origen y mantenimiento del tumor como en su transformación y progresión histológica. Posteriormente, el doctor Armando López-Guillermo revisará las opciones terapéuticas de primera línea en el linfoma folicular y el papel de los tratamientos post-remisión, desde el mantenimiento con rituximab hasta la intensificación con trasplante autólogo pasando por los tratamientos de consolidación con radioinmunoterapia. La doctora M.<sup>a</sup> José Terol presentará una revisión de los tratamientos de rescate, las diferentes posibilidades en función de las características del paciente y su enfermedad, y la necesidad de integrar dichos tratamientos en una estrategia global de tratamiento desde el diagnóstico, dada la hasta ahora invariable historia de recidivas sucesivas. Finalmente, la doctora Silvia Montoto, desde el Instituto del Cáncer del Reino Unido, tratará de definir el papel y momento óptimo del trasplante autólogo en dicha estrategia global y, más aún, nos planteará la difícil cuestión de dónde situar el trasplante alogénico, básicamente en forma de “minialo”, para explotar el efecto injerto contra linfoma como única plataforma que realmente ha mostrado posibilidades de curación para los pacientes con linfoma folicular.

Esperamos, como coordinadores de este simposio, que sea atractivo, genere una productiva discusión y sirva para acercar los conocimientos más actualizados sobre el tema a nuestra asociación en su L Congreso.



## THE ROLE OF THE MICROENVIRONMENT IN FOLLICULAR LYMPHOMA. MEETING OF THE SPANISH HEMATOLOGY SOCIETY, NOVEMBER 2009

R.D. GASCOYNE

*Hematopathologist and Clinical Professor,  
British Columbia Cancer Agency & the BC Cancer  
Research Centre, Vancouver, Canada*

### Introduction

Follicular lymphoma (FL) represents the second most common subtype (22%) of non-Hodgkin's lymphoma (NHL) behind diffuse large B cell lymphoma (DLBCL). In North America, FL represents the most common histological subtype, accounting for 32% of all NHLs and the majority of indolent B cell lymphomas. The 2008 World Health Organization (WHO) recognizes a number of histological grades and variants, the latter including primary cutaneous follicle centre cell lymphoma, pediatric FL, primary duodenal FL and early lesions of uncertain clinical significance such as *in situ* FL. FL is imminently treatable, but most patients present with advanced-stage disease and cannot be cured by conventional therapy. The median age at presentation is 63 years. FL is characterized by marked clinical heterogeneity, with median survivals in the range of 8-10 years, but with a wide range of outcomes. Some patients will survive in excess of 25 years, while 15-20% will die of transformed/aggressive FL within the first 3 years following diagnosis. Understanding the clinical and biological correlates that underlie this diverse spectrum of outcomes is the subject of much investigation. The frequency of transformation is variably reported and generally portends a poor prognosis. Several recent single institution studies suggest that transformation occurs at a steady-state of approximately 3% per year and may possibly plateau at 15-17 years, suggesting that only half of the patients are at-risk<sup>1,2</sup>.

The treatment of FL is markedly heterogeneous, spanning the complete spectrum from no treatment (watch & wait) to allogeneic bone marrow transplantation. There is no clear consensus as to the choice of initial therapy for symptomatic patients, although R-CHOP has emerged as a preferred option in many countries. The current PRIMA trial will hopefully provide some insight regarding the optimal treatment regimen for symptomatic FL patients.

Several recent randomized clinical trials have confirmed a survival benefit for patients with FL treated with chemotherapy regimens to which the monoclo-

nal anti-CD20 antibody, rituximab, has been added<sup>3,4</sup>. For the first time in several decades, newer therapies may be changing the clinical course of FL leading to improvements in overall survival<sup>5-7</sup>. Moreover, maintenance rituximab has also been shown to improve progression-free survival<sup>8,9</sup>.

### Pathogenesis

Two major themes have evolved to explain the pathogenesis of FL including; 1) a primary genetic model based on accumulating genomic alterations and clonal selection of neoplastic B cells and; 2) an immunological model based on the composition and function of the microenvironment in which the non-neoplastic cells exert a dominant effect on the behavior of the tumor cells<sup>10</sup>. It is likely that both affect the overall biology of FL and variably impact prognosis in individual patients. A key event in disease initiation is the t(14;18)(q32;q21) that results in constitutive activation of *BCL2*, allowing FL B cells to escape the normal default program of most germinal centre B cells; programmed cell death. Most FL cells acquire additional genetic alterations that presumably contribute to a growth and survival advantage. Virtually all FL patients show additional karyotypic abnormalities at the time of diagnosis. Moreover, a number of these contribute to outcome, a finding consistent with providing a growth advantage to the tumor cells. Lastly, specific genetic aberrations contribute to transformation (e.g. *p53* mutation, *p16* loss). The genetic model would favour that the accumulation of genetic alterations in the tumor cells dictates autonomous growth characteristics, risk of transformation and controls the composition of the microenvironment of the lymph node.

An alternative immunological model suggests that the composition and function of the various cells in the lymph node microenvironment provide important crosstalk with the neoplastic B cells. The neoplastic follicle, like the reactive follicle, is rich in a number of immune-related cells such as T cells, macrophages and follicular dendritic cells (FDC). These cells are important during the early growth of FL and likely provide a nurturing environment for the tumor cells. Recent gene expression data and immunohistochemistry studies implicate these cells in the prognosis of FL and similarly appear to have a role in histological transformation. These findings are discussed in more detail in the sections on the microenvironment.

The shape of the overall survival curve in FL highlights the marked clinical heterogeneity characteristic of this lymphoma. It is unlikely that a simple genetic or immunological model alone can be developed to easily explain the pathogenesis of FL. A more

likely scenario is that FL is a balance between genetic and microenvironmental factors that may differentially influence the growth of the tumor cells and the clinical course of the patient. For example, those patients who transform early and pursue an aggressive clinical course may be more “genetically driven”, as their tumors may be less influenced by the non-neoplastic cells in the microenvironment and are more affected by acquired genetic alterations that confer enhanced growth potential and transformation risk. In any given patient the contribution of each may vary and maybe additionally influenced by therapy. In summary, the diverse clinical spectrum of FL patients likely reflects a dynamic interaction between somewhat competing influences; functional intrinsic genomic alterations that provide the tumor cells with a growth advantage and immunological factors within the tumor microenvironment that either favour the neoplastic cells and/or drive transformation or alternatively, actively suppress growth of the FL B cells in favour of the host.

---

### Host genetics

Novel strategies to examine the microenvironment and constitutional genetics have begun to explore the role of the host in FL biology and outcome prediction. Single nucleotide polymorphisms, SNPs, are single base-pair changes in the germline DNA that occur in healthy individuals. They represent but one form of genetic variation amongst individuals. A SNP for the *FcyRIIIa* gene has been shown to predict survival in FL patients following therapy with single-agent rituximab, an anti-CD20 monoclonal antibody<sup>11</sup>. The implication is that immune effector cells such as macrophages and possibly natural killer cells that mediate their effects through antibody-dependent cellular cytotoxicity and complement-mediated cell lysis, differentially bind the Fc portion of rituximab, dependent on the particular variant of FcR coded for in the host genome. The affinity of binding therefore, appears to impact the efficacy of rituximab as a single therapeutic agent. It remains unclear whether FcR polymorphisms will hold their prognostic significance in FL patients treated in the era of immunochemotherapy<sup>12</sup>.

Cerhan and colleagues recently examined the role of additional immune response SNPs in FL and found that four genes, *IL8*, *IL2*, *IL12B* and *IL1RN*, together with clinical and demographic factors, could be used to construct an outcome predictor that identified three risk groups with 5-year overall survival estimates of 96% (low-risk), 72% (intermediate-risk) and 58%<sup>13</sup>. These patients were variably treated and importantly, were treated prior to the introduction of

rituximab into routine clinical practice. These tantalizing new data require validation in additional patient cohorts of FL treated in the current era of immunochemotherapy.

---

### The microenvironment

The follicular growth pattern, the morphological similarity to normal centrocytes and centroblasts, the immunophenotype and the molecular features of somatic mutation of *IGH* genes together with intra-clonal sequence diversity establishes FL as a tumor of germinal center B cells. Evidence supports that the neoplastic B cells require the follicular microenvironment for their clonal expansion and survival. The microenvironment in FL includes a number of non-neoplastic cells such as fibroblasts, fibroblastic reticular cells, endothelial cells, dendritic cells (antigen presenting cells), T cells, benign B cells and macrophages. It is likely that clonal expansion and CSR require signals from these cells and involve co-stimulatory molecules including CD40, CD40L, CD28, ICOS and IL4. FL cell lines do not exist, primarily because FL B cells fail to grow *in vitro* without recapitulating their microenvironment in the form of feeder layers, cytokines or the addition of non-neoplastic cells that mimic their germinal center niche. These observations together with recent gene expression data and studies using tissue microarrays (TMA) suggest a prominent role for the microenvironment contributing to both clinical outcome and risk of transformation. However, there are a number of conflicting findings that may in part be explained by variable clinical findings and different treatments.

---

### Gene expression profiling

Genome-wide transcription profiling has been successfully applied to samples of FL, providing important insight into the biology of the disease as well molecular predictors of survival. One of the original studies of expression profiling of FL analyzed flow-sorted purified neoplastic B cells and determined a list of differentially expressed genes in comparison to normal germinal center B cells. Genes that were either up or down-regulated were discovered with the former showing a good correlation with copy number gains as determined by cytogenetic analyses. As a result of the approach of using purified neoplastic B cells, gene signatures derived from non-neoplastic cells in the tumor biopsies were not analyzed. A number of additional studies have now been published using whole frozen FL biopsy sam-

ples with somewhat differing results. The latter may be the result of using different microarray platforms, variable methodology and bioinformatics tools for analysis, variable tumor content, in addition to differences in patient selection. Dave *et al.* studied 191 frozen FL biopsy samples in an attempt to determine molecular predictors of overall survival<sup>14</sup>. Ten gene expression signatures predictive of outcome were found, five associated with favourable survival and five associated with inferior survival. However, two dominant signatures accounted for the most discriminate outcomes and appeared to be derived from non-neoplastic cells in the tumor microenvironment. One called immune response-1 (IR-1) was associated with favourable survival and contained many T cell genes and a few monocyte-derived genes. The other called immune response-2 (IR-2) was associated with inferior survival and was mostly a monocyte/macrophage and FDC gene signature. Combining these two signatures into a molecular predictor score allowed the recognition of very disparate survivals for patients with newly diagnosed FL. Glas *et al.*, using a non-commercial microarray platform, studied a highly selected cohort of FL patients grouped according to outcome and biopsy-proven histological transformation<sup>15</sup>. These authors defined an 81-gene model capable of predicting immediate clinical behavior following biopsy, either diagnostic or at relapse, but were unable to determine any expression profiles associated with long-term survival or transformation risk. In a follow-up study of patients with early or late transformation, these same authors were unable to determine a consistent expression profile associated with early (< 3 years from diagnosis) transformation, but did find that biopsies with increased intra-follicular CD4<sup>+</sup> T cells determined using immunohistochemistry were more likely to transform early (see section on transformation). The single consistent conclusion from these studies is that non-neoplastic cells in the microenvironment of FL are major contributors to the biology, transformation risk and clinical outcome of FL. It will be important to repeat these analyses for patients treated with rituximab containing regimens and develop new molecular predictors.

### The role of the microenvironment in FL survival

The precise role of the non-neoplastic cells in the tumor microenvironment in FL is as yet incompletely defined, but several cell types have been implicated as contributors to outcome in patients with FL. Studies from the late 1980s suggested that increased CD4<sup>+</sup> T cells were associated with spontaneous remissions in FL<sup>16</sup>. More recently, both the absolute number

and architectural distribution of CD4<sup>+</sup> T cells have been studied, with somewhat conflicting results<sup>15,17-19</sup>. One study found that increased CD4<sup>+</sup> T cells were linked with favorable clinical behavior, while other studies could not confirm a prognostic role for these cells<sup>17,19, 20</sup>. In contrast, increased intra-follicular CD4<sup>+</sup> T cells were recently associated with an increased risk of early transformation, a finding somewhat at odds with the numerical data<sup>21</sup>. Enumeration of CD4<sup>+</sup> T cells using flow cytometry did not show any prognostic impact in FL<sup>18,22</sup>. The role of CD8<sup>+</sup> T cells is similarly confounded by conflicting data in FL. Some studies have suggested an association with improved outcome, while others suggest the opposite finding<sup>20,22-24</sup>. The gene expression profiling data discussed earlier in this chapter did implicate CD8<sup>+</sup> T cells (IR-1) as predictors of improved overall survival<sup>14,25</sup>. Clearly additional studies will be required to resolve the precise contribution of these non-neoplastic cells to survival in FL. Regulatory T cells (Treg) are a subset of cells expressing CD4, CD25 and a nuclear transcription factor FOXP3. These cells play a role in regulating effector T cell populations and their presence has been associated with inferior survival in epithelial malignancies as a result of creating an immunosuppressive microenvironment that allows tumor cells to escape the host immune response. In FL, the role and prognostic relevance of these cells is controversial, as some studies suggest an association with favorable outcome while other studies suggest the opposite<sup>20,26</sup>. It may well be that the role of different T cell populations in the microenvironment of FL is context-dependent; affected significantly by the clinical features of the patients and the treatments given. Further studies are clearly required.

More recently, the impact of PD-1<sup>+</sup> lymphocytes has been evaluated in FL. PD-1 (Program Cell Death 1) is a member of the CD28 receptor family and has an important function in inhibitory pathways, attenuating T cell responses. Carreras *et al.* recently showed that patients with FL having ≤ 5% PD-1<sup>+</sup> cells in their diagnostic biopsies had inferior overall survival (OS) and this was independent of the FLIPI<sup>27</sup>. Interestingly, data from Vancouver suggests the opposite finding; with a high content of PD-1<sup>+</sup> T cells and a follicular pattern both correlating with inferior OS in a uniformly treated population of advanced-stage FL patients<sup>28</sup>. Increased CD68<sup>+</sup> macrophages have been associated with inferior survival in some, but not all studies<sup>19,21,29</sup>. Similarly, the role of FDCs expressing CD21 is unclear. Some studies have suggested that an immature FDC immunophenotype correlates with early progression, while other studies could not confirm these findings<sup>30</sup>.

In a study of microvessel density in FL, Koster and colleagues found that increased vascularity was cor-

related with improved OS in patients treated uniformly with chemotherapy<sup>31</sup>. The opposite finding was reported by Farinha *et al.*<sup>32</sup>.

Lastly, the impact of mast cells in FL was studied in FL patients treated with R-CHOP<sup>33</sup>. A high content of mast cells was associated with inferior OS.

---

### The role of the microenvironment in FL transformation

Factors that predict transformation risk also implicate the microenvironment, including the number of activated CD4<sup>+</sup> T cells within the follicles, the dissolution of the FDC meshworks as well as their maturity and/or functional status<sup>21</sup>. Concomitant with histological transformation, the FL B cells appear to gain autonomous growth characteristics and no longer require the growth-supporting niche offered by the follicular microenvironment. Thus, the resultant DLBCL loses its follicular growth pattern and is associated with dissolution of the FDC meshworks and loss of much of the accompanying T cells<sup>34</sup>. Therefore, a primary immunological theory of pathogenesis would suggest that many of the genetic alterations in the tumor B cells are “noise”, and that the microenvironment controls the growth potential of the FL cells and determines the risk of histological transformation. Recently, disruption of the FDC meshwork has been implicated as a predictor of early histological transformation in FL<sup>21,34</sup>. Cases with increased numbers of FOXP3<sup>+</sup> T cells appear to be at risk for histologic transformation. Similarly, patients with ≤ 5% PD-1<sup>+</sup> T cells also showed a higher risk of transformation<sup>27</sup>. Data presented at ASH 2008 from Vancouver found the opposite finding<sup>28</sup>. Moreover, increased MVD was also associated with an increased risk of transformation.

---

### The impact of therapy

Treatment in FL is a largely under appreciated prognostic factor in FL. Importantly, all previous prognostic factors must be revisited when new therapies are introduced. Rituximab containing regimens have now shown an increase in overall survival in FL and maintenance therapy is significantly associated with improvements in PFS. Recent data suggests that specific chemotherapy, radiotherapy and biological treatments may be differentially visited upon the tumor cells *vs.* the cells in the microenvironment, helping to explain the incongruent findings of the role of non-neoplastic cells in the tumor microenvironment in FL<sup>35,36</sup>.

Canioni and colleagues reported that the negative impact of increased macrophages was abrogated by the addition of rituximab to chemotherapy<sup>37</sup>. Similarly, Taskinen *et al.* showed that high macrophage content was associated with improved OS in FL patients treated with R-CHOP<sup>38</sup>. Interestingly, these data make some sense given the contribution of benign macrophages to the activity of anti-CD20 therapy in animal models of NHL<sup>39</sup>. In aggregate, all of these studies suggest that many therapies used to treat FL may have a differential impact upon the tumor cells in contrast to the immune cells variably present in diagnostic biopsies of FL.

---

### References

1. Montoto S, Davies AJ, Matthews J, Calaminici M, Norton AJ, Amess J, et al. Risk and clinical implications of transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma. *Journal of clinical oncology*. 2007 Jun 10;25(17):2426-33.
2. Al-Tourah AJ, Gill KK, Chhanabhai M, Hoskins PJ, Klasa RJ, Savage KJ, et al. Population-Based Analysis of Incidence and Outcome of Transformed Non-Hodgkin's Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2008 October 6, 2008;JCO.2008.16.0283.
3. Marcus R, Imrie K, Belch A, Cunningham D, Flores E, Catalano J, et al. CVP chemotherapy plus rituximab compared with CVP as first-line treatment for advanced follicular lymphoma. *Blood*. 2005 Feb 15;105(4):1417-23.
4. Hiddemann W, Kneba M, Dreyling M, Schmitz N, Lengfelder E, Schmits R, et al. Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood*. 2005 Dec 1;106(12):3725-32.
5. Fisher RI, LeBlanc M, Press OW, Maloney DG, Unger JM, Miller TP. New treatment options have changed the survival of patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2005 Nov 20;23(33):8447-52.
6. Liu Q, Fayad L, Cabanillas F, Hagemester FB, Ayers GD, Hess M, et al. Improvement of overall and failure-free survival in stage IV follicular lymphoma: 25 years of treatment experience at The University of Texas M.D. Anderson Cancer Center. *J Clin Oncol*. 2006 Apr 1;24(10):1582-9.
7. Swenson WT, Wooldridge JE, Lynch CF, Forman-Hoffman VL, Chrischilles E, Link BK. Improved survival of follicular lymphoma patients in the United States. *J Clin Oncol*. 2005 Aug 1;23(22):5019-26.
8. van Oers MH, Klasa R, Marcus RE, Wolf M, Kimby E, Gascoyne RD, et al. Rituximab maintenance improves clinical outcome of relapsed/resistant follicular non-Hodgkin lymphoma in patients both with and without rituximab during induction: results of a prospective randomized phase 3 intergroup trial. *Blood*. 2006 Nov 15; 108 (10): 3295-301.
9. Hochster H, Weller E, Gascoyne RD, Habermann TM, Gordon LI, Ryan T, et al. Maintenance Rituximab After Cyclophosphamide, Vincristine, and Prednisone Prolongs Progression-Free Survival in Advanced Indolent Lymphoma: Results of the Randomized Phase III ECOG1496 Study. *J Clin Oncol*. 2009 April 1, 2009;27(10):1607-14.



10. de Jong D. Molecular pathogenesis of follicular lymphoma: a cross talk of genetic and immunologic factors. *J Clin Oncol*. 2005 Sep 10;23(26):6358-63.
11. Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood*. 2002 Feb 1;99(3):754-8.
12. Carlotti E, Palumbo GA, Oldani E, Tibullo D, Salmoi-raghi S, Rossi A, et al. FcγRIIIA and FcγRIIA polymorphisms do not predict clinical outcome of follicular non-Hodgkin's lymphoma patients treated with sequential CHOP and rituximab. *Haematologica*. 2007 Aug;92(8):1127-30.
13. Cerhan JR, Wang S, Maurer MJ, Ansell SM, Geyer SM, Cozen W, et al. Prognostic significance of host immune gene polymorphisms in follicular lymphoma survival. *Blood*. 2007 Jun 15;109(12):5439-46.
14. Dave SS, Wright G, Tan B, Rosenwald A, Gascoyne RD, Chan WC, et al. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med*. 2004 Nov 18;351(21):2159-69.
15. Glas AM, Kersten MJ, Delahaye LJ, Witteveen AT, Kibbelaar RE, Velds A, et al. Gene expression profiling in follicular lymphoma to assess clinical aggressiveness and to guide the choice of treatment. *Blood*. 2005 Jan 1;105(1):301-7.
16. Strickler JG, Copenhaver CM, Rojas VA, Horning SJ, Warnke RA. Comparison of "host cell infiltrates" in patients with follicular lymphoma with and without spontaneous regression. *American journal of clinical pathology*. 1988 Sep;90(3):257-61.
17. Lee AM, Clear AJ, Calaminici M, Davies AJ, Jordan S, Mac-Dougall F, et al. Number of CD4+ Cells and Location of Fork-head Box Protein P3-Positive Cells in Diagnostic Follicular Lymphoma Tissue Microarrays Correlates With Outcome. *J Clin Oncol*. 2006 November 1, 2006;24(31):5052-9.
18. Ai WYZ, Czerwinski DK, Horning S, Allen J, Tibshirani R, Levy R. Tumor-infiltrating T cells are not predictive of clinical outcome in follicular lymphoma. *Blood*. [Abstract]. 2006 November 16, 2006;108(11):824a.
19. Farinha P, Masoudi H, Skinnider BF, Shumansky K, Spinelli JJ, Gill K, et al. Analysis of multiple biomarkers shows that lymphoma-associated macrophage (LAM) content is an independent predictor of survival in follicular lymphoma (FL). *Blood*. 2005 Jun 2;106(6):2169-74.
20. Carreras J, Lopez-Guillermo A, Fox BC, Colomo L, Martinez A, Roncador G, et al. High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood*. 2006 Nov 1;108(9):2957-64.
21. Glas AM, Knoops L, Delahaye L, Kersten MJ, Kibbelaar RE, Wessels LA, et al. Gene-expression and immunohistochemical study of specific T-cell subsets and accessory cell types in the transformation and prognosis of follicular lymphoma. *Journal of clinical oncology*. 2007 Feb 1;25(4):390-8.
22. Farinha P, Han J, Al-Tourah A, Connors JM, Banerjee D, Gascoyne RD. The tumor microenvironment measured by flow cytometry predicts overall survival and transformation risk in follicular lymphoma. *Blood*. [Abstract]. 2006 November 16, 2006;108(11):2406a.
23. Alvaro T, Lejeune M, Salvado M-T, Lopez C, Jaen J, Bosch R, et al. Immunohistochemical Patterns of Reactive Microenvironment Are Associated With Clinicobiologic Behavior in Follicular Lymphoma Patients. *J Clin Oncol*. 2006 December 1, 2006;24(34):5350-7.
24. Wahlin BE, Sander B, Christensson B, Kimby E. CD8+ T-Cell Content in Diagnostic Lymph Nodes Measured by Flow Cytometry Is a Predictor of Survival in Follicular Lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2007 January 15, 2007;13(2):388-97.
25. Dave S. Gene expression profiling and outcome prediction in non-hodgkin lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006 Jan;12(1 Suppl 1):50-2.
26. Farinha P, Campo E, Banham A, Masoudi H, Skinnider B, Connors JM, et al. The architectural pattern of FOXP3+ T cells is an independent predictor of survival in patients with follicular lymphoma (FL). *Mod Pathol*. [Abstract]. 2006;19:1043a.
27. Carreras J, Lopez-Guillermo A, Roncador G, Villamor N, Colomo L, Martinez A, et al. High Numbers of Tumor-Infiltrating Programmed Cell Death 1-Positive Regulatory Lymphocytes Are Associated With Improved Overall Survival in Follicular Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2009 March 20, 2009;27(9):1470-6.
28. Farinha P, Roncador G, Al-Tourah A, Connors JM, Gascoyne RD. Combined FOXP3+ and PD1+ T Cell Density and Architectural Patterns Predict Overall Survival and Risk of Transformation in Uniformly Treated Patients with Follicular Lymphoma. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2008 November 16, 2008;112(11):2815-.
29. Canioni D, Salles G, Mounier N, Brousse N, Keuppens M, Morchauer F, et al. The poor prognosis value of high intratumoral macrophage count in follicular lymphoma patients requires selection of appropriate cut-off and can be circumvented by rituximab therapy. *Blood*. [Abstract]. 2006 November 16, 2006;108(11):822a.
30. Chang KC, Huang X, Medeiros LJ, Jones D. Germinal centre-like versus undifferentiated stromal immunophenotypes in follicular lymphoma. *J Pathol*. 2003 Nov;201(3):404-12.
31. Koster A, van Krieken JH, Mackenzie MA, Schraders M, Borm GF, van der Laak JA, et al. Increased vascularization predicts favorable outcome in follicular lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2005 Jan 1;11(1):154-61.
32. Farinha P, Gascoyne RD, Kyle A, Minchinton A, Connors JM, Karsan A. Vascularization Predicts Overall Survival (OS) & Risk of Transformation (RT) in Uniformly Treated Patients with Follicular Lymphoma (FL). *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2007 November 16, 2007;110(11):184-.
33. Taskinen M, Karjalainen-Lindsberg M-L, Leppa S. Prognostic influence of tumor-infiltrating mast cells in patients with follicular lymphoma treated with rituximab and CHOP. *Blood*. 2008 May 1, 2008;111(9):4664-7.
34. Shiozawa E, Yamochi-Onizuka T, Yamochi T, Yamamoto Y, Naitoh H, Kawakami K, et al. Disappearance of CD21-positive follicular dendritic cells preceding the transformation of follicular lymphoma: immunohistological study of the transformation using CD21, p53, Ki-67, and P-glycoprotein. *Pathol Res Pract*. 2003;199(5):293-302.
35. de Jong D, Koster A, Hagenbeek A, Raemaekers J, Veldhuizen D, Heisterkamp S, et al. Impact of the tumor microenvironment on prognosis in follicular lymphoma is dependent on specific treatment protocols. *Haematologica*. 2009 January 1, 2009;94(1):70-7.
36. Lejeune M, Alvaro T. Clinicobiological, prognostic and therapeutic implications of the tumor microenvironment in follicular lymphoma. *Haematologica*. 2009 January 1, 2009;94(1):16-21.
37. Canioni D, Salles G, Mounier N, Brousse N, Keuppens M, Morchauer F, et al. High Numbers of Tumor-Associated Macrophages Have an Adverse Prognostic Value That Can Be Circumvented by Rituximab in Patients With Follicular Lymphoma Enrolled Onto the GELA-GOELAMS FL-2000 Trial. *J Clin Oncol*. 2008 January 20, 2008;26(3):440-6.
38. Taskinen M, Karjalainen-Lindsberg ML, Nyman H, Eerola LM, Leppa S. A high tumor-associated macrophage content predicts favorable outcome in follicular lymphoma patients treated with rituximab and cyclophosphamide-doxorubicin-vincristine-prednisone. *Clinical cancer research*. 2007 Oct 1;13(19):5784-9.
39. Minard-Colin V, Xiu Y, Poe JC, Horikawa M, Magro CM, Hamaguchi Y, et al. Lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice is mediated by macrophage FcγRI, FcγRIII, and FcγRIV. *Blood*. 2008 August 15, 2008;112(4):1205-13.



## TRATAMIENTO DE PRIMERA LÍNEA Y MANTENIMIENTO EN EL LINFOMA FOLICULAR

A. LÓPEZ-GUILLERMO,  
G. GUTIÉRREZ-GARCÍA

Servicio de Hematología. Hospital Clínic. Barcelona

### Introducción

Los pacientes con linfoma folicular (LF) tienen una supervivencia relativamente prolongada que podría superar los 15 años de mediana en las series más recientes. Sin embargo, aunque con los tratamientos actuales se pueden alcanzar tasas elevadas de respuesta completa (RC), la mayoría de los pacientes sigue recayendo y muchos de ellos acaban falleciendo por el linfoma. Así pues, la historia “natural” del LF sigue siendo una sucesión de respuestas y posteriores recaídas, si bien la duración de las respuestas se ha prolongado mucho en los últimos años gracias a los nuevos tratamientos<sup>1,2</sup>.

Como es bien conocido, no existe un único tratamiento que pueda considerarse de elección en el LF, sino diferentes terapias no excluyentes entre sí y que pueden resultar útiles dependiendo de las características del enfermo, la extensión del linfoma y la fase de la enfermedad. La lista clásica de opciones terapéuticas en primera línea incluye las siguientes:

1. **Abstención terapéutica.** Los pacientes con LF en estadio avanzado y sin factores de riesgo pueden permanecer sin tratamiento hasta que se producen signos de progresión clínica o histológica. Alrededor de la mitad de los pacientes permanece estable, sin requerir tratamiento, durante más de 3 años, y un 10%, durante más de 5 años. La supervivencia de los pacientes no tratados inicialmente no difiere de la de aquéllos con similares características tratados desde el diagnóstico<sup>3</sup>. En este contexto, el uso de rituximab como monoterapia

se está evaluando en estudios prospectivos frente a la abstención.

2. **Radioterapia.** Considerada de elección para formas localizadas, tiene un papel menor para los restantes casos. En particular, la radioterapia complementaria no parece aportar nada a la supervivencia de los pacientes.

3. **Quimioterapia.** Con fármacos alquilantes (p. ej., clorambucilo o ciclofosfamida) utilizados como monoterapia y con poliquimioterapias más o menos complejas (COP, CHOP, ATT, etc.) se alcanzan tasas crecientes de RC (hasta 50-80%), si bien la supervivencia global no se modifica sustancialmente<sup>1,2</sup>.

4. **Análogos de las purinas.** De entre estos fármacos, la experiencia con fludarabina es, con mucho, la más amplia. Se ha mostrado eficaz tanto en el tratamiento inicial como en la recaída de los LF. Su combinación con otras quimioterapias permite alcanzar mayores tasas de respuesta<sup>6</sup>.

En las últimas décadas se han utilizado tratamientos distintos que han mejorado las respuestas y la supervivencia. En los próximos apartados se detallan los más importantes.

### Tratamientos actuales de primera línea

#### Inmunoterapia e immunoquimioterapia

El uso de anticuerpos monoclonales frente a antígenos específicos de las células tumorales es una aproximación terapéutica muy atractiva, con un mecanismo de acción completamente diferente de la quimioterapia. En el LF la monoterapia con rituximab (anticuerpo monoclonal anti-CD20) permite alcanzar tasas elevadas de respuesta, sobre todo en pacientes sin criterios de riesgo, si bien la tasa de RC no supera el 25%<sup>4,5,7</sup>. Rituximab puede combinarse con la quimioterapia convencional, lo que se ha denominado immunoquimioterapia, de manera que au-

Tabla 1. Tasa de respuesta completa, supervivencia libre de progresión y supervivencia global en cuatro estudios prospectivos aleatorizados con diferentes poliquimioterapias con y sin rituximab

Referencia	Régimen terapéutico	N	CR (%)	SLP (%)	SG (%)
Marcus, Blood 2005 <sup>8</sup>	COP	159	10	21	77
	COP + R	162	41*	40*	83*#
Hiddemann, Blood 2005 <sup>9</sup>	CHOP	205	17	62	90
	CHOP + R	223	20	84*	95*##
Herold, JCO 2007 <sup>10</sup>	MCIP	177	25	40	74
	MCIP + R	181	50*	71*	87*#
Salles, Blood 2008 <sup>11</sup>	CHVP + IF	183	59	37	79
	CHVP + IF + R	175	75*	53*	84###

C: ciclofosfamida; Cl: clorambucilo; H: adriamicina; IF: interferón; O: vincristina; P: prednisona; R: rituximab; RC: respuesta completa; SG: supervivencia global; SLP: supervivencia libre de progresión; M: mitoxantrona; VP: etopósido; \* p < 0,05; # a 4 años; ## a 2 años; ### a 5 años

**Tabla 2. Algunas de las diferentes pautas de mantenimiento con rituximab en el linfoma folicular**

Referencia	Pauta de rituximab	Duración del mantenimiento
Hainsworth, J Clin Oncol 2005 <sup>14</sup> Hochster, J Clin Oncol 2009 <sup>18</sup>	375 mg/m <sup>2</sup> /semana × 4 semanas - 1 ciclo cada 6 meses	2 años (4 ciclos)
Forstpointner, Blood 2006 <sup>16</sup>	375 mg/m <sup>2</sup> /semana × 4 semanas - 1 ciclo cada 6 meses	1 año (2 ciclos: a 3 y 9 meses)
Ghielmini, Blood 2004 <sup>13</sup>	375 mg/m <sup>2</sup> /semana - 1 dosis cada 2 meses	8 meses (4 dosis)
Van Oers, Blood 2006 <sup>17</sup>	375 mg/m <sup>2</sup> /semana - 1 dosis cada 3 meses	2 años
Estudio PRIMA	375 mg/m <sup>2</sup> /semana - 1 dosis cada 2 meses	2 años

**Tabla 3. Supervivencia libre de progresión y supervivencia global según se realice o no tratamiento de mantenimiento con rituximab tras el tratamiento de rescate en pacientes con linfoma folicular en recaída o progresión**

Referencia	Régimen de rescate	N	SLP (%)		SG (%)	
			Observación	Mantenimiento con rituximab	Observación	Mantenimiento con rituximab
Forstpointner, Blood 2006 <sup>16</sup>	R-FCM	81	45	70*	nd	nd*
Van Oers, Blood 2006 <sup>17</sup>	CHOP/R-CHOP	324	28	62*	76	85*

SG: supervivencia global; SLP: supervivencia libre de progresión; \*  $p < 0,05$

menta muy notablemente tanto la tasa de RC como la duración de las mismas. En la Tabla 1 se detallan los principales aspectos de los cuatro estudios prospectivos y aleatorizados que han demostrado con el mayor nivel de evidencia que la inmunoterapia es mejor que la quimioterapia convencional tanto respecto a la tasa de RC como a la supervivencia libre de enfermedad e incluso respecto a la supervivencia global<sup>8-11</sup>. Así pues, en el momento actual la inmunoterapia debe considerarse el tratamiento de elección para los pacientes con LF que requieran terapia. Cuál ha de ser la quimioterapia asociada a rituximab es todavía objeto de debate.

### Radioinmunoterapia

Se han utilizado anticuerpos monoclonales anti-CD20 unidos a productos radiactivos (p. ej., <sup>90</sup>Y-ibritumomab-tiuxetan o <sup>131</sup>I-tositumomab), lo que aumentaría su eficacia antitumoral. Esta variante terapéutica se suele denominar radioinmunoterapia. La experiencia es amplia en pacientes recaídos, en los que se ha demostrado eficacia, pero debe considerarse todavía experimental en primera línea de tratamiento.

### Otras bioterapias

Interferón alfa. Desde que se demostró su efecto antitumoral, este fármaco viene siendo utilizado en el tratamiento del LF, tanto en la fase inicial, en combinación con la quimioterapia convencional, como en la de mantenimiento. Prolonga la duración de la res-

puesta, pero no es seguro que alargue la supervivencia de los pacientes<sup>12</sup>.

### Tratamientos tras la terapia de inducción

Una vez obtenida una respuesta con inmunoterapia, sea ésta cual sea, son posibles varias conductas terapéuticas: 1) observación, esto es, no aplicar más tratamiento; sigue siendo la actitud más convencional; 2) tratamiento de mantenimiento durante unos meses/años; 3) "consolidación" de la respuesta mediante un tratamiento corto; y 4) tratamiento de intensificación, mediante un trasplante autólogo de progenitores hemopoyéticos.

### Tratamiento de mantenimiento

El mantenimiento de la respuesta alcanzada con el tratamiento de inducción es una opción clásica en el LF. En este sentido, ya se ha indicado el papel del interferón. Más recientemente, se han publicado evidencias de que rituximab es un fármaco eficaz y poco tóxico para este fin. Así, se han sugerido diferentes pautas de mantenimiento, algunas de las cuales se indican en la Tabla 2<sup>13-15</sup>. No parece que ninguna de tales pautas pueda ser considerada superior a las demás.

En el contexto de pacientes en recaída o progresión se ha demostrado la eficacia del mantenimiento con rituximab tras un régimen de rescate en dos estudios prospectivos y aleatorizados<sup>16,17</sup>. Con estos resultados, resumidos en la Tabla 3, se ha establecido la indicación formal del mantenimiento en pacientes en recaída

da. De manera interesante, el mantenimiento es eficaz tanto si los pacientes habían recibido rituximab en el tratamiento de rescate como si no. De todos modos, hay que hacer notar que, aunque se ha demostrado que el mantenimiento es mejor que la simple observación, no existen datos comparativos con otras opciones tras la respuesta al rescate, como son la consolidación o la intensificación mediante un trasplante autólogo de progenitores hemopoyéticos.

Tras el tratamiento de primera línea, la primera evidencia de la ventaja del mantenimiento con rituximab frente a la observación se acaba de publicar<sup>18</sup>. El tratamiento inicial en esta serie era R-COP. Se hallan pendientes los resultados del estudio PRIMA, en el que se analizará la utilidad del mantenimiento tras la respuesta a alguna de las inmunoterapias de primera línea más utilizadas (R-COP, R-CHOP, R-MCP y R-FCM).

### Tratamiento de consolidación

Recientemente se ha demostrado el papel de <sup>90</sup>Y-ibritumomab-tiuxetan como tratamiento de consolidación de la respuesta al tratamiento de primera línea. En efecto, en el estudio FIT, los pacientes en RC o respuesta parcial que recibieron una dosis de <sup>90</sup>Y-ibritumomab-tiuxetan tuvieron una duración de la respuesta superior a la de los no consolidados<sup>19</sup>. No queda claro cuál ha de ser el papel de la radioinmunoterapia en los pacientes que han recibido inmunoterapia en primera línea.

### Tratamiento de intensificación

Con el trasplante autólogo de progenitores hemopoyéticos se consigue una elevada tasa de respuestas, aunque la mayoría de los pacientes acaba por recaer. Existen tres estudios en pacientes jóvenes de alto riesgo que fueron aleatorizados a recibir o no tratamiento de intensificación con un trasplante autólogo. Los resultados fueron contradictorios. Por otro lado, los enfermos no habían recibido rituximab en ningún momento, de manera que los resultados no parecen valorables en la época del rituximab. Recientemente, se ha iniciado un nuevo estudio (ensayo Ri-CHOP) en el que tras un tratamiento de inducción con R-CHOP los pacientes en respuesta son aleatorizados a ser intensificados o no mediante un trasplante autólogo, además de hacer tratamiento de mantenimiento con rituximab en ambas ramas.

### Estrategias terapéuticas en primera línea

Tras la enumeración de tantas posibilidades terapéuticas que, a la postre, no curan al paciente con LF en es-

tadio avanzado, se evidencia la dificultad para decidir cuál es la estrategia terapéutica más adecuada en cada caso. En general, en los pacientes mayores sin factores de mal pronóstico se prefiere una actitud conservadora: abstención terapéutica hasta que progrese la enfermedad y, en ese momento, algún tipo de inmunoterapia no agresiva. La monoterapia con rituximab puede ser una excelente opción terapéutica en estos enfermos. En pacientes jóvenes, en especial si tienen factores pronósticos adversos, está justificado administrar tratamiento más intensivo. La asociación de rituximab y poli-quimioterapia es la mejor opción terapéutica, ya que se ha demostrado que la adición de rituximab a las quimioterapias más habituales (p. ej., COP o CHOP) aumenta la tasa de respuestas, su duración y la supervivencia de los pacientes. Por el contrario, no está claro cuál de estas quimioterapias es mejor en estos casos. Aunque su utilidad es objeto de controversia, el mantenimiento con IFN podría ser útil en pacientes jóvenes y con alta masa tumoral en el momento del diagnóstico. El papel del rituximab como mantenimiento en primera línea se está evaluando actualmente en ensayos clínicos. Por último, el papel del TPH no está definido y debe reservarse asimismo para ensayos clínicos controlados.

### Bibliografía

1. Hiddemann W, Buske C, Dreyling M, et al. Current management of follicular lymphomas. *Br J Haematol* 2006; 136: 191-202.
2. Tan D, Horning SJ. Follicular lymphoma: clinical features and treatment. *Hematol Oncol Clin North Am* 2008; 22: 863-82.
3. Ardeshtna KM, Smith P, Norton A, et al. Long-term effect of a watch and wait policy versus immediate systemic treatment for asymptomatic advanced-stage non-Hodgkin lymphoma: a randomised controlled trial. *Lancet* 2003; 362:516-22.
4. Colombat P, Salles G, Brousse N, et al. Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) as single first-line therapy for patients with follicular lymphoma with a low tumor burden: Clinical and molecular evaluation. *Blood* 2001; 97: 101-6.
5. Colombat P, Brousse N, Morschhauser F, et al. Single treatment with rituximab monotherapy for low-tumor burden follicular lymphoma (FL): survival analyses with extended follow-up of 7 years. *Blood* 2006; 108: 147a.
6. Montoto S, Moreno C, Domingo-Domenech E, et al. High clinical and molecular response rates with fludarabine, cyclophosphamide and mitoxantrone in previously untreated patients with advanced stage follicular lymphoma. *Haematologica* 2008; 93: 207-14.
7. McLaughlin P, Grillo-Lopez A, Link BK, et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol* 1998; 16:2825-33
8. Marcus R, Imrie K, Belch A, et al. CVP chemotherapy plus rituximab compared with CVP as first-line treatment for advanced follicular lymphoma. *Blood* 2005; 105: 1417-23.
9. Hiddemann W, Kneba M, Dreyling M, et al. Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage

- follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: Results of a prospective randomized study of the German low-grade lymphoma study group. *Blood* 2005; 106: 3725-32.
10. Herold M, Pasold R, Srock S, et al. Results of a prospective randomized open label phase-III study comparing rituximab plus mitoxantrone, chlorambucil, prednisolone chemotherapy (R-MCP) versus MCP alone in untreated advanced indolent non-Hodgkin's lymphoma and mantle-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2007;15:1986-92.
  11. Salles G, Mounier N, de Guibert S, et al. Rituximab combined with chemotherapy and interferon in follicular lymphoma patients: results of the GELA-GOELAMS FL2000 study. *Blood* 2008; 112: 4824-31.
  12. Rohatiner AZ, Gregory WM, Peterson B, et al. Meta-analysis to evaluate the role of interferon in follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2215-23.
  13. Ghielmini M, Schmitz SF, Cogliatti SB, et al. Prolonged treatment with rituximab in patients with follicular lymphoma significantly increases event-free survival and response duration compared with the standard weekly x 4 schedule. *Blood* 2004; 103: 4416-23.
  14. Hainsworth JD, Litchy S, Burris HA, et al. Rituximab as first-line and maintenance therapy for patients with indolent non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2002; 20: 4261-7.
  15. Vidal L, Gafter-Gvili A, Leibovici L, et al. Rituximab maintenance for the treatment of patients with follicular lymphoma: systematic review and meta-analysis of randomized trials. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101: 248-55.
  16. Forstpointner R, Unterhalt M, Dreyling M, et al. Maintenance therapy with rituximab leads to a significant prolongation of response duration after salvage therapy with a combination of rituximab, fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone (R-FCM) in patients with recurring and refractory follicular and mantle cell lymphomas: Results of a prospective randomized study of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *Blood* 2006; 108: 4003-8.
  17. van Oers MH, Klasa R, Marcus RE, et al. Rituximab maintenance improves clinical outcome of relapsed/resistant follicular non-Hodgkin lymphoma in patients both with and without rituximab during induction: results of a prospective randomized phase 3 intergroup trial. *Blood* 2006; 108: 3295-301.
  18. Hochster H, Weller E, Gascoyne R, et al. Maintenance rituximab after cyclophosphamide, vincristine, and prednisone prolongs progression-free survival in advanced indolent lymphoma: results of the randomized phase III ECOG1496 study. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1607-14.
  19. Morschhauser F, Radford J, Van Hoof A, et al. Phase III trial of consolidation therapy with yttrium-90-ibritumomab tiuxetan compared with no additional therapy after first remission in advanced follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 2008; 26: 5156-64.

## TRATAMIENTO DE RESCATE EN EL LINFOMA FOLICULAR

M.<sup>ª</sup>J. TEROL CASTERÁ,  
A.I. TERUEL CASASÚS

*Servicio de Hematología y Oncología Médica.  
Hospital Clínico Universitario. Valencia*

El tratamiento del linfoma folicular (LF) es especialmente complejo por diversas razones: su larga his-

toria natural, la ausencia de factores predictivos eficaces que nos permitan adaptar adecuadamente la terapéutica y la amplia variedad de opciones terapéuticas existentes. Aunque diversos estudios han puesto de manifiesto que estos pacientes presentan una mayor expectativa de vida respecto a décadas anteriores<sup>1</sup>, ninguna opción terapéutica ha conseguido modificar la historia natural de la enfermedad, que sigue siendo incurable, con su tendencia a la recaída continua y con una probabilidad acumulativa de transformación a largo plazo. Debido a la variabilidad de los tratamientos empleados en primera línea, las características de los pacientes son también muy heterogéneas en la recaída. Así, la edad, el tipo de tratamiento inicial administrado, la duración de la primera respuesta, las características de la enfermedad en la recaída, la comorbilidad y la estrategia terapéutica futura (posibilidad de trasplante) deben tenerse en cuenta en el tratamiento individualizado de estos pacientes.

Finalmente, aunque existe una dilatada experiencia en la utilización de diversos fármacos en situación de recaída, dicho cuerpo de evidencia se establece a partir de series de pacientes tratados con esquemas convencionales. En la actualidad la mayoría de estos pacientes, especialmente en los últimos 8-10 años, reciben tratamiento quimioinmunoterápico con rituximab en primera línea<sup>2</sup>. Por ello se hace necesario un mayor conocimiento, tanto de las características clínicas del linfoma folicular refractario o en recaída a rituximab como de la eficacia de nuevos fármacos tras dichos esquemas. A continuación pasaremos a revisar las principales estrategias empleadas en estos pacientes, con especial hincapié en los nuevos fármacos empleados en la era postrituximab.

---

### Watch and wait

La opción de esperar y ver en los pacientes en recaída puede ser una opción perfectamente válida en la recaída, ya que algunos pacientes pueden permanecer asintomáticos durante largos periodos de tiempo en el momento de la recaída. Por ello, el tratamiento debe plantearse en el momento en que la enfermedad produce sintomatología.

---

### Quimioterapia convencional

Numerosos esquemas de quimioterapia han sido empleados en estos pacientes, dependiendo del tipo de quimioterapia recibida en la primera línea. Así, los análogos de las purinas, y en especial la fludarabina tanto en monoterapia como en combina-



ción, representa una de las opciones terapéuticas más eficaces en los pacientes previamente tratados con alquilantes. La tasa de respuestas globales (RG) oscila entre un 70 y un 100%, con una supervivencia libre de enfermedad (SLE) del 50-60%<sup>3</sup>. No obstante, la fludarabina es un agente muy inmunosupresor, por lo cual se hace necesaria la profilaxis infecciosa frente a infecciones oportunistas. Por otro lado, su toxicidad sobre las células madre hematopoyéticas dificulta la movilización de progenitores y, por tanto, la eventual realización de un trasplante, dato a tener en cuenta en la estrategia de tratamiento.

## Anticuerpos monoclonales

Desde la introducción del rituximab a finales de los años noventa, diversos anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos de superficie de la célula B han sido introducidos en el tratamiento del folicular en recaída.

### Rituximab

El estudio pivotal que permitió la aprobación de rituximab por la FDA en 1998 demostró en 166 pacientes con linfoma indolente que el rituximab en monoterapia a dosis de 375 mg/m<sup>2</sup>/semana permitía obtener un 60% de RG en el grupo de linfomas foliculares con un 6% de remisiones completas (RC), con una mediana de duración de la respuesta de un año<sup>4</sup>. La adición de rituximab a la quimioterapia aumenta la tasa de respuestas y la SLE respecto a la quimioterapia convencional o la inmunoterapia sola, en pacientes con LF en recaída. Así, el Grupo Alemán de linfomas de bajo grado realizó un estudio prospectivo, multicéntrico y aleatorizado, en un grupo de 147 pacientes con linfoma indolente (LF y manto) en el cual se comparaba la administración de rituximab en combinación con FCM frente a dicha quimioterapia sola. La tasa de RG y RC fue significativamente superior en el grupo de R-FCM frente a FCM (94% y 40% frente a 70% y 23%, respectivamente)<sup>5</sup>. La supervivencia libre de progresión (SLP) a los 3 años no se alcanzó en el grupo R-FCM frente a 21 meses para los tratados con FCM. Asimismo, se apreció una tendencia a una mayor supervivencia en los pacientes tratados con R-FCM frente a FCM (a 2 años, 90% frente a 70%; p = 0,09). Obviamente la mayoría de los pacientes introducidos en estos ensayos no habían recibido rituximab previo, por lo cual esta eficacia no puede ser extrapolada a los pacientes que ya han recibido dicho monoclonal en primera línea.

## Radioinmunoterapia

Dada la elevada sensibilidad del linfoma a la radiación, otra de las aproximaciones desarrolladas ha sido la asociación de un anticuerpo anti-CD20 con un isótopo radiactivo, con la intención de dirigir selectivamente la radiación a la célula tumoral. Existen dos radiofármacos disponibles: el Y-90-ibritumomab y el I<sup>131</sup> tositumomab.

### Y<sup>90</sup> ibritumomab

Primer radiofármaco aprobado por la FDA. El primer ensayo en fase III que permitió el registro del fármaco analizó una serie de 143 pacientes con linfoma indolente refractarios y vírgenes de rituximab. 73 pacientes recibieron Y<sup>90</sup> ibritumomab y 70 pacientes recibieron rituximab. La tasa de RG fue significativamente superior en los pacientes que recibieron el radiofármaco frente a los que recibieron rituximab (80% frente a 56%; p = 0,002), con una mayor tasa de RC (30% vs. 16%; p = 0,04)<sup>6</sup>. La mediana de duración de la respuesta fue de 14,1 meses y 12 meses, respectivamente, con una mediana de 23 meses en los pacientes que respondieron. Dicho radiofármaco también ha sido ensayado en pacientes refractarios a rituximab en un ensayo de fase II en 54 pacientes con linfoma folicular refractario a rituximab<sup>7</sup>. Todos los pacientes estaban previamente muy tratados, y un 75% tenía masas de más de 5 cm de diámetro. La tasa de RG fue del 74%, con un 15% de RC y un 59% de parciales. La mediana de duración de la respuesta fue de 6,8 meses para la globalidad de la serie y de 8 meses para los respondedores.

### I<sup>131</sup> tositumomab

Este radiofármaco también ha sido probado en 40 pacientes refractarios a rituximab, con una tasa de RG del 65% y un 38% de RC<sup>8</sup>. Este tratamiento no está disponible en Europa.

## Anticuerpos anti-CD22

El antígeno CD22 interviene en la adhesión celular de la célula B y en la activación de la misma, y se encuentra presente en el 60-80% de los linfomas no hodgkinianos. Es un receptor que se internaliza en la célula tras la unión a su ligando, lo cual le convierte en una diana atractiva para combinar con inmunotoxinas o radiofármacos.



### **Epratuzumab**

Anticuerpo monoclonal frente a CD22 que se internaliza tras su unión. En el ensayo de fase I/II en linfomas indolentes con un 45% de pacientes refractarios a rituximab, obtuvo una tasa de RG en el 18% de los pacientes, con un 6% de RC. Los pacientes con linfoma folicular de dicho ensayo presentaron un 43% de RG a dosis del 360 mg/m<sup>2</sup><sup>9</sup>. En un segundo estudio europeo en el que se incluyeron 34 pacientes con linfoma folicular, se administró epratuzumab (360 mg/m<sup>2</sup>) en combinación con rituximab (375 mg/m<sup>2</sup>) durante 4 semanas. La tasa de RG fue del 64%, con un 24% de RC<sup>10</sup>.

### **CMC-544**

Es un inmunoconjugado de anti-CD22 asociado a calicheamicina, un antibiótico con actividad antitumoral capaz de inducir lesión en el DNA que conduce a la apoptosis y muerte celular. Un estudio de fase I/II muestra actividad importante del monoclonal en el subgrupo de linfomas foliculares.

### **Y<sup>90</sup>-hLL2**

Asociación de un anticuerpo anti-CD22 a Y<sup>90</sup> empleado en 16 pacientes con linfoma indolente, con un 75% de RG y un 24% de RC<sup>11</sup>. La principal toxicidad fue la hematológica, pero no se requirió transfusión de productos sanguíneos ni factor de crecimiento.

### **Ofatumomab**

Es un anticuerpo monoclonal contra un epítipo del CD20 distinto del que reconoce el rituximab, con mayor afinidad por el mismo, y que posee una mayor capacidad de fijación del complemento. En un ensayo de fase I/II presentado por Hagenbeek, 40 pacientes refractarios a rituximab recibieron dosis ascendentes de ofatumomab de 300 a 1.000 mg/semana durante 4 semanas. La tasa de RG fue del 67%, con un 56% de respuesta en los previamente tratados con rituximab, sin evidencia de toxicidad limitante de dosis<sup>12</sup>. Nuevos ensayos en fase III están en desarrollo en este tipo de linfoma.

### **Galiximab**

Anticuerpo monoclonal IgG1 dirigido contra el antígeno CD80 de la superficie linfocitaria. Tras la unión al mismo, induce apoptosis, inhibe la proliferación

y activa la citotoxicidad dependiente de anticuerpo. En el estudio de fase I/II comunicado por Czuczman *et al.*, el galiximab fue administrado en dosis crecientes de 125 mg/m<sup>2</sup> a 500 mg/m<sup>2</sup> en una serie de 37 pacientes con linfoma folicular refractario o en recaída sin evidencia de toxicidad limitante de dosis<sup>13</sup>. La tolerancia del mismo fue muy buena, con la mayoría de toxicidades de grado 1,2. La tasa de RG fue del 11%, con un 5% de RC. En un estudio de fase II reciente, galiximab fue administrado en asociación a rituximab a una serie de 73 pacientes<sup>14</sup>. La tasa de RG fue del 64%, con un 31% de RC/RCi y un 33% de RP. La mediana de SLP fue de 12,2 meses.

## **Nuevos agentes**

### **Bendamustina**

Inicialmente desarrollada en la Alemania oriental, bendamustina es un agente con similitud a los alquilantes y a los análogos de purina que presenta una marcada actividad en diversos subtipos de linfomas. La bendamustina en monoterapia es un agente eficaz en el tratamiento de los linfomas foliculares refractarios a rituximab. Así, Friedberg *et al.*<sup>15</sup>, en un ensayo en fase II realizado en 76 pacientes con linfoma indolente refractario o en recaída (45 foliculares), administró bendamustina a 120 mg/m<sup>2</sup>/días 1,2 cada 21 días. La tasa de RG en la serie global fue del 77%, con un 34% de RC/RCi y un 43% de RP. En el subgrupo de 45 pacientes con linfoma folicular, la tasa de RG se elevó a un 82%, con una tasa de RC del 38%. La mediana de duración de la respuesta fue de 6,7 meses para la serie global (9 para los foliculares). La principal toxicidad fue la neutropenia (54%) y la trombopenia (25%). En el ensayo de fase II de Robinson *et al.*<sup>16</sup>, 67 pacientes con linfoma indolente refractarios a rituximab fueron tratados con bendamustina a 90 mg/m<sup>2</sup>/días 2,3 en asociación a rituximab (375 mg/m<sup>2</sup>/día 1) cada 28 días hasta un total de 6 ciclos. La tasa de RG fue del 92% con una tasa de RC del 41%, RCi 14% y RP 38%. La mediana de duración de la respuesta fue de 21 meses, y la mediana de tiempo a la progresión, de 23 meses. En la Tabla 1 se resumen las principales experiencias de bendamustina en linfoma indolente en recaída.

### **Lenalidomida**

La lenalidomida es un análogo de la talidomida de marcada actividad en mieloma y con un mecanismo de acción inmunomoduladora de marcado interés en los síndromes linfoproliferativos indolentes. Un ensayo de fase II realizado en linfoma indolente ha de-

Tabla 1. Eficacia de la bendamustina en el linfoma indolente en recaída

Estudio	N	Régimen	RG (%)	RC (%)	SLP (meses)	SG (meses)
Heide	58	120 mg/m <sup>2</sup> d 1,2 cada 21 días	73	11	16 (3-55)	36 (3-67)
Friedberg <sup>15</sup>	76	120 mg/m <sup>2</sup> d 1,2 cada 21 días	77	34	9 (8-12)	–
Kahl <sup>19</sup>	100	120 mg/m <sup>2</sup> d 1,2 cada 21 días	84	32	9 (8-12)	–
Rummel	63	90 mg/m <sup>2</sup> d 1,2 + rituximab 375 mg/m <sup>2</sup> d 1 cada 28 días	90	60	24 (5-44)	SG-4. <sup>a</sup> 56%
Robinson <sup>16</sup>	66	90 mg/m <sup>2</sup> d 1,2 + rituximab 375 mg/m <sup>2</sup> d 1 cada 28 días	92	55	NA	–
Weide	57	90 mg/m <sup>2</sup> d 1,2 + cada 28 días + Mtn 10 mg/m <sup>2</sup> d 1 + rituximab 375 mg/m <sup>2</sup> d 1 cada 28 días	89	35	19	33

mostrado actividad en los linfomas foliculares, con un 25% de RG en un conjunto de 12 pacientes<sup>14</sup>.

### Bortezomib

Los inhibidores del proteosoma constituyen un grupo de fármacos de marcada eficacia en el mieloma linfoma del manto. Estudios *in vitro* muestran sensibilidad de las líneas celulares a la acción de los mismos. En un ensayo de fase II la administración semanal o bisemanal de bortezomib en combinación con rituximab permitió obtener un 57% de RG, con la toxicidad neurológica como principal efecto adverso<sup>17</sup>. En la actualidad su uso se está explorando en un estudio en fase III de bortezomib/rituximab frente a rituximab como agente único.

### Intensificación y trasplante de progenitores hematopoyéticos

Aunque el trasplante autólogo es capaz de obtener un intervalo libre de progresión superior al de las terapias convencionales, la ausencia de una ventaja clara en términos de supervivencia y la probabilidad continua de recaída han restado interés a su aplicación sistemática en el linfoma folicular en recaída. No obstante, la experiencia de Rohatiner *et al.*, con una mediana de seguimiento de 12 años, muestra que un 48% de los pacientes permanecen libres de enfermedad y que, por lo tanto, este procedimiento puede ser potencialmente curativo al menos en un subgrupo de pacientes<sup>18</sup>. Por otro lado, experiencias recientes muestran que el trasplante alogénico tanto con acondicionamiento mieloablativo como de intensidad re-

ducida parece asociarse a una eventual curación del mismo a largo plazo.

### Conclusiones

La amplia variedad de opciones terapéuticas en el LF en recaída junto a la marcada heterogeneidad clínica de los pacientes obligan a una aproximación individualizada de la estrategia terapéutica a aplicar en cada caso. Así, ante un paciente con LF en recaída, se deberá considerar la edad del paciente, la comorbilidad, el tipo de tratamiento aplicado en primera línea, la duración de la respuesta a la primera línea y las características de la enfermedad en la recaída. Entre los agentes con actividad demostrada en pacientes refractarios a rituximab se encuentran: la bendamustina, en especial en asociación a rituximab, la radioinmunoterapia, los nuevos anticuerpos monoclonales y las técnicas de intensificación y trasplante de progenitores hematopoyéticos. En ausencia de una estrategia curativa demostrada, se apuntará una aproximación global del paciente en base a lo previamente expuesto.

### Bibliografía

- Swenson WT, Wooldridge JE, Lynch CF, Forman-Hoffman VL, Chrischilles E, Link BK. Improved survival of follicular lymphoma patients in the United States. *J Clin Oncol.* 2005;23:5019-5026.
- Seyfarth B, Josting A, Dreyling M, Schmitz N. Relapse in common lymphoma subtypes: salvage treatment options for follicular lymphoma, diffuse large cell lymphoma and Hodgkin disease. *Br J Haematol.* 2006;133:3-18.
- Klasa RJ, Meyer RM, Shustik C, et al. Randomized phase III study of fludarabine phosphate versus cyclophosphamide, vincristine, and prednisone in patients with recurrent low-

grade non-Hodgkin's lymphoma previously treated with an alkylating agent or alkylator-containing regimen. *J Clin Oncol.* 2002;20:4649-4654.

4. McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK, et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol.* 1998;16:2825-2833.
5. Forstpointner R, Dreyling M, Repp R, et al. The addition of rituximab to a combination of fludarabine, cyclophosphamide, mitoxantrone (FCM) significantly increases the response rate and prolongs survival as compared with FCM alone in patients with relapsed and refractory follicular and mantle cell lymphomas: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood.* 2004;104:3064-3071.
6. Witzig TE, Gordon LI, Cabanillas F, et al. Randomized controlled trial of yttrium-90-labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy versus rituximab immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* 2002;20:2453-2463.
7. Witzig TE, Flinn IW, Gordon LI, et al. Treatment with ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy in patients with rituximab-refractory follicular non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* 2002;20:3262-3269.
8. Kaminski MS, Zelenetz AD, Press OW, et al. Pivotal study of iodine I 131 tositumomab for chemotherapy-refractory low-grade or transformed low-grade B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Oncol.* 2001;19:3918-3928.
9. Leonard JP, Coleman M, Ketas JC, et al. Phase I/II trial of epratuzumab (humanized anti-CD22 antibody) in indolent non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* 2003;21:3051-3059.
10. Strauss SJ, Morschhauser F, Rech J, et al. Multicenter phase II trial of immunotherapy with the humanized anti-CD22 antibody, epratuzumab, in combination with rituximab, in refractory or recurrent non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* 2006;24:3880-3886.
11. Linden O, Hindorf C, Cavallin-Stahl E, et al. Dose-fractionated radioimmunotherapy in non-Hodgkin's lymphoma using DOTA-conjugated, 90Y-radiolabeled, humanized anti-CD22 monoclonal antibody, epratuzumab. *Clin Cancer Res.* 2005;11:5215-5222.
12. Hagenbeek A, Gadeberg O, Johnson P, et al. First clinical use of ofatumumab, a novel fully human anti-CD20 monoclonal antibody in relapsed or refractory follicular lymphoma: results of a phase 1/2 trial. *Blood.* 2008;111:5486-5495.
13. Czuczman MS, Thall A, Witzig TE, et al. Phase I/II study of galiximab, an anti-CD80 antibody, for relapsed or refractory follicular lymphoma. *J Clin Oncol.* 2005;23:4390-4398.
14. Friedberg JW. Treatment of follicular non-Hodgkin's lymphoma: the old and the new. *Semin Hematol.* 2008;45:S2-6.
15. Friedberg JW, Cohen P, Chen L, et al. Bendamustine in patients with rituximab-refractory indolent and transformed non-Hodgkin's lymphoma: results from a phase II multicenter, single-agent study. *J Clin Oncol.* 2008;26:204-210.
16. Robinson KS, Williams ME, van der Jagt RH, et al. Phase II multicenter study of bendamustine plus rituximab in patients with relapsed indolent B-cell and mantle cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* 2008;26:4473-4479.
17. De Vos S DS, McLaughlin P, Daleh MN, Belt R, Flowers C, et al. Phase 2 study of bortezomib weekly or twice weekly plus rituximab in patients with follicular (FL) or marginal zone (MZL) lymphoma: final results. *Blood.* 2006;108:457s.
18. Rohatiner AZ, Nadler L, Davies AJ, et al. Myeloablative therapy with autologous bone marrow transplantation for follicular lymphoma at the time of second or subsequent remission: long-term follow-up. *J Clin Oncol.* 2007;25:2554-2559.
19. Kahl B, Bartlett NL, Leonard JP, et al. Bendamustine is safe and effective in patients with rituximab-refractory, indolent B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Blood.* 2007;110:406a.

## TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMOPOYÉTICOS EN EL LINFOMA FOLICULAR

S. MONTOTO

*Senior Lecturer/ Honorary Consultant.*

*Centre for Medical Oncology.*

*Institute of Cancer and the CR-UK Clinical Centre.*

*Barts and The London Queen Mary's School of Medicine and Dentistry. London, UK*

### Introducción

La historia natural y el curso clínico del linfoma folicular (LF) son característicos de los llamados "linfomas indolentes", con un patrón típico de respuestas repetidas al tratamiento seguidas de recaídas sucesivas<sup>1</sup> y una supervivencia global relativamente prolongada. Es por ello por lo que el trasplante de progenitores hemopoyéticos (TPH) se considera, en ocasiones, una opción demasiado agresiva para una enfermedad "indolente". Sin embargo, cabe recordar que, pese a que recientemente se ha descrito una mejoría en el pronóstico del LF<sup>2</sup>, éste se sigue considerando una enfermedad incurable, y la mayoría de los pacientes fallece por causas relacionadas con el linfoma. Ello apoyaría el uso de un tratamiento "agresivo" como el TPH en determinadas circunstancias. La dificultad, sin embargo, estriba en definir el lugar adecuado del TPH, tanto autólogo como alogénico, en el algoritmo terapéutico del manejo del LF. La aparición de los anticuerpos monoclonales y de la radioinmunoterapia ha contribuido a complicar más, si cabe, el panorama.

### Trasplante autólogo de progenitores hemopoyéticos

Desde los estudios pioneros en el *dana farber cancer institute* a finales de los años 80 con ciclofosfamida a altas dosis e irradiación corporal total (ICT) como consolidación del tratamiento de rescate en pacientes con linfoma en recaída, varios estudios<sup>3-5</sup> han mostrado la superioridad de dicho procedimiento sobre la quimioterapia convencional en cuanto a las posibilidades de obtener una respuesta prolongada en pacientes con LF. Sin embargo, el trasplante autólogo de progenitores hemopoyéticos (TAPH) presenta dos problemas fundamentales por los que frecuentemente se considera un procedimiento con escasas posibilidades de curación y excesivamente tóxico para una enfermedad con una supervivencia prolongada. El primero es el riesgo de recaída debido a la reinfusión de células

Tabla 1. Estudios aleatorizados comparando TAPH con quimioterapia convencional en primera línea

	SLP/SLE			SG		
	Quimioterapia	TPH	p	Quimioterapia	TPH	p
Lenz <i>et al.</i> , 2004*	36%	62%	< 0,0001	NE	NE	—
Deconinck <i>et al.</i> , 2005*	48%	60%	0,05	84%	78%	NS
Sebban <i>et al.</i> , 2006#	28%	38%	NS	71%	76%	NS

NE: no evaluable; NS: no significativo; SG: supervivencia global; SLE: supervivencia libre de evento; SLP: supervivencia libre de progresión; TAPH: trasplante autólogo de progenitores hemopoyéticos; \* a los 5 años; # a los 7 años.

linfomas con los progenitores hemopoyéticos. El segundo, la morbimortalidad asociada, tanto inicial como tardía. En cuanto al riesgo de recaída, dos estudios recientes<sup>6,7</sup> con un seguimiento muy prolongado sugieren la existencia de una meseta en las curvas de supervivencia libre de progresión (SLP), implicando, cuando menos, la posibilidad de alcanzar una SLP muy prolongada (¿curación?) en un porcentaje de pacientes con LF. Por lo que hace referencia a su morbimortalidad, si bien la toxicidad precoz es, en la actualidad, probablemente despreciable, la toxicidad tardía, especialmente por lo que hace referencia al riesgo de desarrollar síndromes mielodisplásicos/leucemias agudas mieloblásticas (SMD/LAM) secundarias<sup>8</sup> sigue siendo objeto de preocupación. En este sentido, se ha descrito un riesgo de SMD/LAM significativamente superior en pacientes que habían recibido ICT como parte del acondicionamiento en comparación con los tratados únicamente con quimioterapia<sup>6</sup>, lo que sugiere que dicho riesgo se podría obviar evitando el uso de ICT. En definitiva, mientras que el TAPH se considera, en general, una opción válida a tener en cuenta, el momento más oportuno de llevarlo a cabo sigue siendo el principal objeto de controversia. La reciente aparición en escena del mantenimiento/consolidación con rituximab<sup>9</sup> o radioinmunoterapia<sup>10</sup> ha añadido más interrogantes en cuanto al papel del TAPH en el tratamiento del LF, sin que por el momento se disponga de datos objetivos que comparen las dos estrategias en un estudio aleatorizado.

Pese a la historia natural de características “indolentes” del LF, varios estudios aleatorizados han comparado el TAPH en primera línea con quimioterapia convencional (Tabla 1)<sup>11-13</sup>. Así, los estudios de los grupos German Low-Grade Lymphoma Study Group (GLSG) y Groupe Ouest-Est des Leucémies et Autres Maladies du Sang (GOELAMS) mostraron una superioridad del TAPH sobre la quimioterapia convencional en cuanto a la SLP, sin que se observaran diferencias en la supervivencia global (SG), mientras que el estudio francés del Groupe d’Etude des Lymphomes de l’Adulte (GELA) no mostró diferen-

cias en la SLP o en la SG. Cabe destacar que en estos tres estudios el tratamiento de acondicionamiento incluyó ICT, y que en los estudios del GOELAMS y del GLSG<sup>14</sup> se observó una mayor incidencia de segundas neoplasias en los pacientes tratados con TAPH. Un estudio reciente ha comparado CHOP-rituximab con un programa de quimioterapia intensiva incluyendo rituximab y rescate con progenitores hemopoyéticos autólogos, demostrando una mejoría significativa de la SLP en los pacientes que recibieron el tratamiento intensivo, sin diferencias en la SG, que los autores atribuyeron al hecho de que gran parte de los pacientes que recaen tras CHOP-rituximab son rescatados con TAPH<sup>15</sup>. De los estudios mencionados se concluye que el TAPH en primera línea no aporta una mejoría significativa en el pronóstico de los pacientes con LF, por lo que, en general, esta estrategia se relega a estudios experimentales.

Así, el principal papel del TAPH radica en la consolidación de la respuesta tras el tratamiento de rescate en pacientes con LF en recaída. El acortamiento de la SG en pacientes que reciben el TAPH más allá de la primera recaída<sup>7</sup> apoya el uso de esta modalidad terapéutica en fases relativamente iniciales de la enfermedad. Sin embargo, cabe mencionar que dichas conclusiones provienen de estudios en los que se utilizaba ICT, por lo que la disminución de la SG en pacientes tratados en segunda y siguientes recaídas podría estar relacionada con un mayor riesgo de SMD/LAM en pacientes que han recibido más líneas de tratamiento. Por otra parte, la posibilidad de prolongar la SLP con mantenimiento con rituximab hace del TAPH en primera recaída una opción, para muchos, menos atractiva. Aún así, es posible que existan pacientes en los que el TAPH en primera recaída supondría una ventaja por su elevado riesgo de progresión. En este sentido, una duración corta de la primera respuesta<sup>16</sup> o un FLIPI (*Follicular Lymphoma International Prognostic Index*) de alto riesgo en la recaída<sup>17</sup> son factores de mal pronóstico que permiten la selección de pacientes de alto riesgo candidatos a recibir un tratamiento intensivo en primera recaída.



## Trasplante alogénico de progenitores hemopoyéticos

Los mismos argumentos en contra del TAPH son aplicables al alotrasplante con mucho más motivo: la alta morbilidad del trasplante alogénico convencional hacen de esta modalidad terapéutica una opción poco atrayente en una enfermedad con una SG relativamente prolongada, incluso reconociendo que probablemente se trate de la única opción potencialmente curativa. Así, el trasplante alogénico de progenitores hemopoyéticos en pacientes con LF resulta en un bajo riesgo de recaída a costa de una mortalidad relacionada con el trasplante (MRT) de alrededor del 40-50%<sup>18</sup>. La comparación del TAPH con el trasplante alogénico convencional demuestra que la disminución del riesgo de recaída en este último se ve contrarrestada por una mortalidad considerable, de manera que no se observan diferencias en la SG o en la SLP<sup>19</sup>.

El advenimiento de los “mini-alotrasplantes” o alotrasplantes con **acondicionamientos de intensidad reducida** ha contribuido a transformar el manejo de los pacientes con LF, extendiendo el uso del alotrasplante a pacientes mayores o que han recibido múltiples líneas de tratamiento. La posibilidad de reducir la toxicidad con un acondicionamiento no mieloablativo e inducir una enfermedad del injerto contra el linfoma es una opción, cuando menos, teóricamente, altamente atractiva en una enfermedad como el LF de curso “indolente”, que no precisa un acondicionamiento intensivo para mantenerla bajo control hasta que el efecto injerto contra el linfoma se produce. Así, la obtención de respuestas tras la infusión de linfocitos del donante o tras la reducción de la inmunosupresión confirma la existencia de dicho efecto, en mayor medida de lo que se observa en otros linfomas “agresivos”<sup>20-22</sup>. El problema radica, una vez más, en la morbilidad del procedimiento, puesto que, aun con un acondicionamiento menos intensivo, la MRT oscila entre el 11% y el 40% en diferentes series<sup>20-22</sup>, con una incidencia acumulada de enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) crónica extensa del 36-47%<sup>21, 22</sup>. Así pues, el reto consiste en desligar el efecto injerto contra el linfoma del efecto injerto contra el huésped. En este contexto, de nuevo, el punto crítico, una vez se ha de-

cidido considerar esta opción de tratamiento, es la decisión del momento más oportuno para llevar a cabo este procedimiento: su alta toxicidad hace que, en general, se reserve para pacientes que se hallan en fases avanzadas de la enfermedad, cuando el pronóstico asociado al linfoma es pobre. Ello hace que frecuentemente se lleve a cabo en pacientes que han recaído tras un TAPH. Sin embargo, hay que tener en cuenta que, en algunas series, la mortalidad del mini-alotrasplante es significativamente superior en pacientes que han recibido un TAPH previo<sup>21</sup>. Asimismo, los trasplantes de donantes no-HLA idénticos o no emparentados se acompañan de una mayor toxicidad<sup>21</sup>. Todo ello debe tenerse en cuenta, obviamente, junto a otros factores de consideración obligada, tales como la edad, la comorbilidad y preferencias del paciente, a la hora de decidir si el mini-alotrasplante es una opción adecuada en un paciente determinado y cuál es el momento más oportuno para realizarlo. La comparación del pronóstico de los pacientes tratados con un TAPH frente a aquellos que han recibido un mini-alotrasplante se ve dificultada por el hecho de que, como se ha comentado, este último se efectúa con frecuencia como rescate en pacientes que han recaído tras un TAPH. Así, la cuestión de un posible beneficio del mini-alotrasplante frente al TAPH en cuanto a las posibilidades de curación sigue abierta. Por desgracia, las posibilidades de un estudio aleatorizado que compare las dos estrategias en una situación equivalente son limitadas.

## Conclusiones

El papel del TPH en el manejo terapéutico del LF se ha visto revolucionado recientemente por el advenimiento de dos opciones terapéuticas de signo opuesto: el mantenimiento con rituximab (o radioinmunoterapia) y el uso de acondicionamientos de intensidad reducida en los trasplantes alogénicos. Tradicionalmente, el papel del TPH en la estrategia terapéutica del LF se veía limitado al uso de terapia a altas dosis con rescate autólogo de progenitores hemopoyéticos como consolidación del tratamiento de rescate en pacientes en recaída y, prácticamente, el único objeto de controversia se reducía al momento más adecuado para llevar

Tabla 2. Indicaciones del TPH en diferentes episodios de la enfermedad

	Primera línea	Primera recaída	Siguiente/s recaída/s
Auto-TPH	No (excepto en estudios experimentales)	Sí · ¿Siempre? · ¿Si DR corta, mal Px?	Sí · ¿Mejor alo?
Alo-TPH (mini)	No (¡ni en estudios experimentales!)	En principio, no (¿excepto en pacientes muy jóvenes?)	Sí

DR: duración de la respuesta; Px: pronóstico; TPH: trasplante de progenitores hemopoyéticos.



a cabo dicho procedimiento. En la actualidad, por el contrario, la posibilidad del tratamiento de mantenimiento con rituximab hace del TAPH una opción menos atractiva, al menos en fases relativamente iniciales de la enfermedad. Por otra parte, los acondicionamientos de intensidad reducida han ampliado el espectro de pacientes en los que se puede llevar a cabo un TPH alogénico. Ello ha dado lugar a la existencia de dos estrategias (TAPH y mini-alotrasplante) con unas indicaciones que se complementan (p. ej., mini-alotrasplante como tratamiento de la recaída post-TAPH) pero que, al mismo tiempo, se solapan en ocasiones, sin que se disponga de estudios objetivos que permitan seleccionar la población que se puede beneficiar más de una u otra estrategia.

En definitiva, las cuestiones críticas en el momento actual son, en primer lugar, cuál es el papel del TAPH en la era rituximab o, en otras palabras, si el TAPH ofrece alguna ventaja sobre el rituximab de mantenimiento y, en segundo lugar, si existe algún grupo de pacientes con LF en los que se deba optar por un mini-alotrasplante frente a un TAPH. Por desgracia, por el momento no hay perspectivas de que obtengamos las respuestas a dichas preguntas en un futuro próximo, de manera que, a día de hoy, únicamente se pueden esbozar unas recomendaciones generales en cuanto a las indicaciones de cada estrategia (Tabla 2) y enfocar nuestros esfuerzos a diseñar los estudios adecuados que nos permitan responder las preguntas arriba mencionadas.

## Bibliografía

- Johnson PW, Rohatiner AZ, Whelan JS, Price CG, Love S, Lim J, et al. Patterns of survival in patients with recurrent follicular lymphoma: a 20-year study from a single center. *J Clin Oncol.* 1995;13(1):140-7.
- Swenson WT, Wooldridge JE, Lynch CF, Forman-Hoffman VL, Chrischilles E, Link BK. Improved survival of follicular lymphoma patients in the United States. *J Clin Oncol.* 2005 Aug 1;23(22):5019-26.
- Rohatiner AZ, Johnson PW, Price CG, Arnott SJ, Amess JA, Norton AJ, et al. Myeloablative therapy with autologous bone marrow transplantation as consolidation therapy for recurrent follicular lymphoma. *J Clin Oncol.* 1994 Jun;12(6):1177-84.
- Brice P, Simon D, Bouabdallah R, Belanger C, Haioun C, Thieblemont C, et al. High-dose therapy with autologous stem-cell transplantation (ASCT) after first progression prolonged survival of follicular lymphoma patients included in the prospective GELF 86 protocol. *Ann Oncol.* 2000 Dec;11(12):1585-90.
- Schouten HC, Qian W, Kvaloy S, Porcellini A, Hagberg H, Johnson HE, et al. High-dose therapy improves progression-free survival and survival in relapsed follicular non-Hodgkin's lymphoma: results from the randomized European CUP trial. *J Clin Oncol.* 2003 Nov 1;21(21):3918-27.
- Montoto S, Canals C, Rohatiner AZ, Taghipour G, Sureda A, Schmitz N, et al. Long-term follow-up of high-dose treatment with autologous haematopoietic progenitor cell support in 693 patients with follicular lymphoma: an EBMT registry study. *Leukemia.* 2007 Nov;21(11):2324-31.
- Rohatiner AZ, Nadler L, Davies AJ, Apostolidis J, Neuberg D, Matthews J, et al. Myeloablative therapy with autologous bone marrow transplantation for follicular lymphoma at the time of second or subsequent remission: long-term follow-up. *J Clin Oncol.* 2007 Jun 20;25(18):2554-9.
- Micallef IN, Lillington DM, Apostolidis J, Amess JA, Neat M, Matthews J, et al. Therapy-related myelodysplasia and secondary acute myelogenous leukemia after high-dose therapy with autologous hematopoietic progenitor-cell support for lymphoid malignancies. *J Clin Oncol.* 2000 Mar;18(5):947-55.
- van Oers MH, Klasa R, Marcus RE, Wolf M, Kimby E, Gascoyne RD, et al. Rituximab maintenance improves clinical outcome of relapsed/resistant follicular non-Hodgkin lymphoma in patients both with and without rituximab during induction: results of a prospective randomized phase 3 intergroup trial. *Blood.* 2006 Nov 15;108(10):3295-301.
- Morschhauser F, Radford J, Van Hoof A, Vitolo U, Soubeyran P, Tilly H, et al. Phase III trial of consolidation therapy with yttrium-90-ibritumomab tiuxetan compared with no additional therapy after first remission in advanced follicular lymphoma. *J Clin Oncol.* 2008 Nov 10;26(32):5156-64.
- Lenz G, Dreyling M, Schiegnitz E, Forstpointner R, Wandt H, Freund M, et al. Myeloablative radiochemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in first remission prolongs progression-free survival in follicular lymphoma: results of a prospective, randomized trial of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood.* 2004 Nov 1;104(9):2667-74.
- Deconinck E, Foussard C, Milpied N, Bertrand P, Michenet P, Cornillet-LeFebvre P, et al. High-dose therapy followed by autologous purged stem-cell transplantation and doxorubicin-based chemotherapy in patients with advanced follicular lymphoma: a randomized multicenter study by GOELAMS. *Blood.* 2005 May 15;105(10):3817-23.
- Sebban C, Mounier N, Brousse N, Belanger C, Brice P, Haioun C, et al. Standard chemotherapy with interferon compared with CHOP followed by high-dose therapy with autologous stem cell transplantation in untreated patients with advanced follicular lymphoma: the GELF-94 randomized study from the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). *Blood.* 2006 Oct 15;108(8):2540-4.
- Lenz G, Dreyling M, Schiegnitz E, Haferlach T, Hasford J, Unterhalt M, et al. Moderate increase of secondary hematologic malignancies after myeloablative radiochemotherapy and autologous stem-cell transplantation in patients with indolent lymphoma: results of a prospective randomized trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol.* 2004 Dec 15;22(24):4926-33.
- Ladetto M, De Marco F, Benedetti F, Vitolo U, Patti C, Rambaldi A, et al. Prospective, multicenter randomized GITMO/III trial comparing intensive (R-HDS) versus conventional (CHOP-R) chemoimmunotherapy in high-risk follicular lymphoma at diagnosis: the superior disease control of R-HDS does not translate into an overall survival advantage. *Blood.* 2008 Apr 15;111(8):4004-13.
- Montoto S, Lopez-Guillermo A, Ferrer A, Camos M, Alvarez-Larran A, Bosch F, et al. Survival after progression in patients with follicular lymphoma: analysis of prognostic factors. *Ann Oncol.* 2002 Apr;13(4):523-30.
- Montoto S, Lopez-Guillermo A, Altes A, Perea G, Ferrer A, Camos M, et al. Predictive value of Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI) in patients with follicular lymphoma at first progression. *Ann Oncol.* 2004 Oct;15(10):1484-9.

18. van Besien K, Sobocinski KA, Rowlings PA, Murphy SC, Armitage JO, Bishop MR, et al. Allogeneic bone marrow transplantation for low-grade lymphoma. *Blood*. 1998 Sep 1;92(5):1832-6.
19. van Besien K, Loberiza FR, Jr., Bajorunaite R, Armitage JO, Bashey A, Burns LJ, et al. Comparison of autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for follicular lymphoma. *Blood*. 2003 Nov 15;102(10):3521-9.
20. Morris E, Thomson K, Craddock C, Mahendra P, Milligan D, Cook G, et al. Outcomes after alemtuzumab-containing reduced-intensity allogeneic transplantation regimen for relapsed and refractory non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2004 Dec 15;104(13):3865-71.
21. Rezvani AR, Storer B, Maris M, Sorror ML, Agura E, Maziarz RT, et al. Nonmyeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation in relapsed, refractory, and transformed indolent non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2008 Jan 10;26(2):211-7.
22. Khouri IF, McLaughlin P, Saliba RM, Hosing C, Korbling M, Lee MS, et al. Eight-year experience with allogeneic stem cell transplantation for relapsed follicular lymphoma after nonmyeloablative conditioning with fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab. *Blood*. 2008 Jun 15;111(12):5530-6.

## **Progenitores hemopoyéticos**

COORDINADORES: A. URBANO ISPIZUA. *Sevilla*  
J. DE LA RUBIA. *Valencia*

## TRASPLANTE ALOGÉNICO: ¿MÉDULA ÓSEA O SANGRE PERIFÉRICA?

J. DE LA RUBIA

*Servicio de Hematología. Hospital Universitario La Fe.  
Valencia*

### Introducción

Desde los primeros casos descritos a principios de la década de los ochenta, la administración de factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF) para la movilización de células progenitoras desde la médula a la sangre periférica se ha convertido en una técnica cada vez más utilizada como alternativa a la obtención clásica de progenitores hematopoyéticos (PH) directamente desde la médula ósea. Como en el caso del trasplante autólogo, los primeros trabajos en el campo del trasplante alogénico utilizando progenitores obtenidos de sangre periférica (alo-TSP) demostraron las ventajas de un rápida recuperación hematopoyética a corto plazo, con una notable reducción de la duración de la neutropenia y trombocitopenia cuando se compararon con el trasplante de médula ósea (alo-TMO). La confirmación posterior de estos datos y la mayor facilidad de obtención de un número suficiente de progenitores para el trasplante han consolidado el alo-TSP como una opción cada vez más usada en las unidades de trasplante, suponiendo en la actualidad el 75% de todos los trasplantes alogénicos realizados en Europa<sup>1</sup>. Sin embargo, la aparición de diferentes estudios comunicando una mayor incidencia de complicaciones asociadas al alo-TSP, especialmente las derivadas de la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) parecen haber ensombrecido las ventajas iniciales y han reavivado la discusión sobre la verdadera aportación del alo-TSP en el campo del trasplante alogénico.

En este trabajo resumiremos las características de obtención de ambos tipos de PH y su composición. Asimismo, comentaremos los principales estudios que han comparado la eficacia clínica de ambas modalidades de alotrasplante.

### Obtención de progenitores

Como ya se ha mencionado, la administración de G-CSF al donante es el procedimiento más empleado para la movilización de progenitores a la sangre, y la aspiración de médula ósea mediante la realización de múltiples punciones en ambas crestas ilíacas con anestesia general o epidural es la técnica habitual de obtención de PH de médula ósea. Ambas técnicas pueden

considerarse seguras; sin embargo, esta realidad no debe dejar de lado la posibilidad de aparición de complicaciones graves que deben situar en su justo término unos procesos no exentos totalmente de riesgos.

### Complicaciones de la obtención de progenitores hematopoyéticos

Una cuidadosa selección y evaluación del donante son requisitos necesarios para garantizar la seguridad del procedimiento y han hecho que, en conjunto, la obtención de progenitores se asocie a pocas complicaciones, siendo la mayoría leves, transitorias y sin implicaciones a largo plazo. En cuanto a las complicaciones graves, éstas son similares en ambos tipos de donación y oscilan entre 1,44 y 3 casos por cada 10.000 donaciones. Las asociadas a la extracción de médula se deben, sobre todo, a problemas derivados de la anestesia, infecciones y hemorragias. En un trabajo que incluyó 1.270 donaciones hubo 6 (0,5%) complicaciones graves<sup>2</sup>. En Estados Unidos, el National Marrow Donor Program ha registrado las complicaciones graves observadas tras la donación de médula en donantes no emparentados. En las primeras 439 extracciones, hubo un efecto adverso grave (apnea) y 3 pacientes (0,6%) requirieron transfusión alogénica. La mediana de días hasta la recuperación tras la donación fue de 16 días, pero el 10% de los donantes aún presentaban algún problema relacionado con la extracción al mes de la donación<sup>3</sup>. Al contrario, y al no requerir hospitalización ni procedimientos de anestesia, la donación de PH de sangre resulta más confortable para los donantes que, además, se incorporan antes que los de médula ósea a sus actividades diarias tras la donación<sup>4,5</sup>. En estos casos, los dolores óseos durante la administración del G-CSF son la principal complicación observada<sup>6</sup>. Sin embargo, y como en la donación de médula, también se han descrito casos esporádicos de complicaciones graves, especialmente cardiovasculares, debidas quizá a la conocida acción procoagulante del G-CSF. Asimismo, es una complicación característica (pero infrecuente) de la administración de G-CSF el aumento de tamaño del bazo y la posibilidad de rotura esplénica, por lo que se recomienda reposo relativo durante las semanas siguiente a la donación para minimizar el riesgo de aparición de este problema<sup>7</sup>.

En conjunto, y hasta el año 2005, se habían comunicado 9 fallecimientos de donantes de PH (6 de médula ósea y 3 de sangre periférica)<sup>8</sup>. Sin embargo, un estudio reciente del EBMT que incluyó más de 50.000 donaciones registró otros 5 fallecimientos, uno tras donar médula y los 4 restantes entre donantes de PH de sangre, todos de origen cardiovascular<sup>9</sup>.

Por último, se ha suscitado la discusión acerca del mayor riesgo de desarrollo de neoplasias hematológicas

**Tabla 1. Complicaciones más frecuentes asociadas a la obtención de progenitores hematopoyéticos**

Complicación	Médula ósea (%)	Sangre periférica (%)
Astenia	80	6
Dolor en punto de extracción	77	90*
Náuseas	51	5
Cefalea	36	33
Fiebre	22	6
Dolor de garganta	60	–
Sudoración	–	2,2
Hemorragias	9	–
Insomnio	–	1,3
Relacionada con vía central		<0,5
Método de donación preferido	20	60 <sup>i</sup>

\*Dolores óseos generalizados; <sup>i</sup>Indistinto (20%).

cas que pudieran presentar los donantes de sangre periférica derivado del potencial efecto leucemógeno del G-CSF. Sin embargo, debe destacarse con los datos actualmente disponibles que este temor es más teórico que real<sup>6</sup>. Además, no debe olvidarse tampoco el riesgo que, en general, presentan los familiares directos de un paciente con leucemia de desarrollar otra leucemia cuando se comparan con la población general e independientemente del tipo de PH que donen. Así, el estudio retrospectivo del EBMT ya mencionado<sup>8</sup> detectó la aparición de neoplasias hematológicas tanto en donantes de médula como de sangre, lo que subraya la necesidad de situar esta potencial complicación en el contexto adecuado. Por último, sólo el seguimiento prolongado de un número suficiente de donantes permitirá responder con seguridad a esta cuestión. La Tabla 1 muestra las principales complicaciones asociadas a ambos tipos de donación de PH.

En resumen, y aunque no exento de riesgos (algunos graves), el proceso de donación de PH debe considerarse razonablemente seguro y sin diferencias significativas entre ambos tipos de procedimientos. Por ello –y quizá con alguna excepción muy concreta–, a la hora de decidir qué tipo de alo-TPH se va a efectuar deben valorarse más las ventajas y complicaciones que cada tipo de trasplante suponga en el receptor, que el riesgo que la obtención de PH pueda suponer para el donante.

## Características y composición del injerto

Por las características del proceso de obtención de PH de SP que incluye la administración de G-CSF, es evidente que la cifra de progenitores presentes en el inóculo (medidos como células CD34+) es muy superior a la obtenida tras la extracción de médula ósea que se efectúa en condiciones basales, es decir, sin el uso previo de G-CSF. Sin embargo, la diferencia más acentuada desde el punto de vista del impacto clínico entre los PH de sangre y médula radica en las células accesorias presentes en el injerto. Así, el número de linfocitos B, T y células NK es 5-10 veces superior en un injerto de SP que de médula. Esto explica también la mayor facilidad en el injerto postrasplante; pero, probablemente, también las diferencias en la mayor incidencia de EICH y en la más rápida reconstitución inmune observada tras el alo-TSP<sup>10,11</sup>. La Tabla 2 muestra de manera resumida las principales diferencias en la composición entre los dos tipos de alo-TPH.

## Resultados clínicos del trasplante según el tipo de progenitor empleado

### Recuperación hematopoyética

Una característica común en los trabajos que han comparado el alo-TSP con el alo-TMO es la mayor rapidez en la recuperación hematopoyética observada tras el primero, con tiempos significativamente más cortos en la duración de la neutropenia y trombocitopenia postrasplante. Así, en un metaanálisis reciente de nueve ensayos aleatorizados que incluyó más de 1.000 pacientes, la mediana de recuperación de neutrófilos y plaquetas fue de 14 días en los receptores de alo-TSP frente a 21 y 22 días en los sometidos a alo-TMO ( $p < 0,00001$  en ambos casos)<sup>12</sup>. El impacto clínico de esta ventaja, sin embargo, parece menor. Así, un estudio no aleatorizado del EBMT no detectó diferencias en la mortalidad relacionada con el trasplante ni en la supervivencia global (SG) en función del tipo de PH empleado<sup>12</sup>, resultados posteriormente comprobados por otros grupos (Tabla 3). Por otro lado, en relación con el número de células progenitoras en el inóculo, hay que destacar que si bien en el alo-TMO diferentes trabajos han demostrado una menor mor-

**Tabla 2. Esquema de las principales diferencias en la obtención y composición de ambos tipos de fuentes de células progenitoras para el trasplante**

Fuente de progenitores	Procedimiento de obtención	Volumen (L)	Células CD34+ ( $\times 10^6$ /kg)	Linfocitos T ( $\times 10^6$ /kg)	Linfocitos B ( $\times 10^6$ /kg)	Células NK ( $\times 10^6$ /kg)
Médula ósea	Anestesia general	1-1,2	1-2	24	15	77
Sangre periférica	Administración de G-CSF	0,2-0,3	4-8	280-290	93	6



Tabla 3. Resultados clínicos de estudios comparativos de alo-TSP y alo-TMO en pacientes con neoplasias hematológicas

Autor/año	Núm. pacientes	Diagnóstico	Tipo de estudio	Resultados	Comentarios
Morton/2001	57	Neoplasias hematológicas	Unicéntrico	Alo-TMO: ↓ EICHc (p < 0,02)	Alo-TMO con G-CSF
Vigorito/1998	56	Neoplasias hematológicas	Multicéntrico. Aleatorizado	Alo-TMO: ↓ EICHc	
Couban/2002	228	LMC, LMA, SMD	Multicéntrico. Aleatorizado	Alo-TSP: ↓ MRT Alo-TSP: ↑ SG (p = 0,04)	
EBMT/2002	350	LMA, LLA, LMC, SMD	Multicéntrico. Aleatorizado	Alo-TMO: ↓ EICHa (p = 0,01) Alo-TMO: ↓ EICHc (p = 0,006)	
Mahmoud/1999	30	Neoplasias Hematológicas	Unicéntrico	Alo-TSP: ↓ EICHa (p = 0,01)	
Blaise/2000	101	LMA, LLA, LMC	Multicéntrico. Aleatorizado	Alo-TMO: ↓ EICHc	
Cornelissen/2003	120	Neoplasias hematológicas	Multicéntrico. Aleatorizado	Alo-TMO: ↑ SG (p = 0,04)	Deplecionado de LT
Heldal/2000	61	Neoplasias hematológicas	Multicéntrico. Aleatorizado	No diferencias	
Powles/2000	39	Neoplasias hematológicas	Aleatorizado	Alo-TSP: ↓ RR (p = 0,01)	
Bensinger/2001	176	Neoplasias hematológicas	Multicéntrico. Aleatorizado	Alo-TSP: ↓ RR (p = 0,04) Alo-TSP: ↑ SLE (p = 0,03)	
Guardiola/2002	234	SMD	Multicéntrico. Retrospectivo	Alo-TSP: ↑ SLE (p < 0,01)	
Champlin/2000	824	LMA, LLA, LMC	Multicéntrico. Retrospectivo	Alo-TSP: ↑ EICHc (p = 0,02) Alo-TSP: ↓ MRT y ↑ SLE (p < 0,001); ↓ Duración hospitalización	Datos al año. Ventajas de alo-TSP en enfermedad avanzada
Gallardo/2009	820	Neoplasias hematológicas	Multicéntrico. Casos y controles	Alo-TSP: ↑ EICHa (p = 0,02) y ↑ EICHc extensa (p < 0,001)	
Ringden/2002	4.575	LMA, LLA	Multicéntrico. Retrospectivo	Alo-TSP: ↑ EICHc (p < 0,05)	Manipuladas y no manipuladas
Friederichs/2009	350	LMA, LLA, MC	Multicéntrico	Alo-TSP: ↑ EICHc (p < 0,05) y ↑ tratamiento inmunosupresor; ↓ recaídas tardías (p = 0,06)	

Alo-TSP: alotrasplante de sangre periférica; Alo-TMO: alotrasplante de médula ósea; LMA: leucemia mieloblástica aguda; LLA: leucemia linfoblástica aguda; LMC: leucemia mieloide crónica; SMD: síndromes mielodisplásicos; EICHa: enfermedad injerto contra huésped aguda; EICHc, enfermedad injerto contra huésped crónica; SG: supervivencia global; SLE: supervivencia libre de enfermedad; MRT: mortalidad relacionada con el trasplante.

talidad y mayor supervivencia en los receptores de inóculos más altos tanto de donante familiar como no emparentado<sup>13-16</sup>, éste no parece ser el caso en los receptores de alo-TSP. Al contrario, varios grupos han sugerido que la presencia de un alto número de células CD34+ (> 8 × 10<sup>6</sup>/kg) en el injerto no sólo no mejora los resultados clínicos sino que, incluso, podía tener un efecto negativo en la supervivencia al asociarse a una más elevada incidencia de EICH crónica<sup>16</sup>. Este hallazgo podría explicarse porque los injertos con números más altos de células CD34+ también tendrían

un número más elevado de células accesorias responsables de la aparición de esta complicación, lo que, a su vez, exigiría la necesidad de un tratamiento inmunosupresor más prolongado<sup>17</sup>.

### ECIH aguda

El temor inicial de una mayor incidencia de EICH aguda tras el alo-TSP derivado de la infusión del elevado número de linfocitos T no se ha visto reflejado en

la mayoría de los trabajos. En otro metaanálisis de 15 estudios publicado en 2001 se observó una discreta mayor incidencia de EICH aguda cuando se consideró globalmente (RR: 1,16) pero sin diferencias en las formas más graves (grado III-IV)<sup>18</sup>, resultados confirmados posteriormente por otros autores en series más numerosas<sup>12,19-21</sup>. Sin embargo, en otro metaanálisis publicado recientemente sí se observó una mayor incidencia de las formas más graves (grados III-IV) de EICH aguda entre los receptores de alo-TSP ( $p = 0,03$ ), resultados ratificados en un estudio de casos y controles realizado recientemente por el Grupo Español de Trasplante Hematopoyético (GETH)<sup>22</sup>, aunque estas diferencias no tuvieron impacto en la supervivencia<sup>12</sup>. Por último, desde el punto de vista clínico, la EICH observada presentaba similares características a las descritas en los receptores de alo-TMO<sup>17</sup>.

### **EICH crónica**

A pesar de todo lo mencionado hasta ahora, han sido los datos comunicados sobre la incidencia de EICH crónica entre receptores de alo-TSP lo que ha puesto sobre la mesa las dudas acerca de la verdadera aportación que la sangre periférica realizada en el campo del alo-TPH. En este sentido hay que subrayar que prácticamente todos los estudios que comparan ambos tipos de trasplantes coinciden en demostrar una incidencia más elevada de EICH crónica entre los receptores de alo-TSP, tanto globalmente como en su forma extensa<sup>12,18,21,22</sup>. La causa de la mayor incidencia de EICH crónica en el alo-TSP no es, sin embargo, bien conocida y se ha atribuido tanto a la cifra más alta de células CD34+ infundidas como a la presencia de un mayor número de células accesorias (linfocitos T, células NK, dendríticas) con un papel muy importante en procesos claves en el postraplante<sup>23</sup>. Deben, pues, discutirse detalladamente entre el especialista y el paciente los riesgos derivados de la EICH crónica frente a las posibles ventajas de una menor tasa de recaídas asociada a esta complicación. En este sentido, jugará un papel importante en el futuro inmediato la realización de estudios de calidad de vida que nos permitan conocer mejor el impacto real que esta mayor incidencia de EICH tiene en la vida de los pacientes, datos que, lamentablemente están mencionados sólo de forma marginal en unos pocos estudios.

### **Supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global**

Inicialmente, cuando se comparó el alo-TSP con el alo-TMO, se observó una mejor SG y supervivencia libre de progresión (SLE) en los receptores de alo-TSP

con enfermedad en fases avanzadas, especialmente leucemia mieloblástica aguda y leucemia mieloide crónica, mientras que en pacientes de riesgo estándar esta diferencia no se detectaba<sup>12,18,20</sup>. Este dato de alguna manera “equilibraría” la mayor mortalidad tardía que podría derivarse de la mayor frecuencia de EICH crónica observada tras el alo-TSP. Resultados similares se han descrito en pacientes con SMD donde la realización de alo-TSP se asoció a una menor mortalidad y una mayor SLE excepto en los pacientes con citogenética de mal pronóstico<sup>19</sup>. Sin embargo, estudios más recientes no han confirmado estos datos iniciales. Así, el trabajo de casos y controles del GETH que ya hemos mencionado no observó diferencias en la SLE, SG ni en la probabilidad de recaída en función del tipo de TPH independientemente del estadio de enfermedad al trasplante<sup>22</sup>. En este mismo sentido van los resultados de diferentes análisis del EBMT que tampoco ha demostrado diferencias significativas en SG ni en la supervivencia libre de leucemia ni en función del diagnóstico ni del estado de la enfermedad al trasplante<sup>22,24</sup>. Además, la realización de alo-TSP no parece añadir ventajas especiales en aquellas enfermedades hematológicas no malignas donde no es necesario el papel inmunoterapéutico de la EICH. Así, los resultados preliminares parecen indicar una peor evolución en pacientes jóvenes con aplasia medular sometidos a alo-TSP cuando se compara con alo-TMO, debido a una mayor mortalidad precoz entre los primeros por la mayor incidencia de EICH crónica<sup>25</sup>.

Por último, cabe comentar que se ha explorado la realización de alo-TMO tras la administración de G-CSF al donante. Aunque la experiencia es limitada, los datos disponibles sugieren que esta modalidad de TPH presenta las ventajas de ambos tipos de trasplante sin sus problemas asociados, es decir, la más rápida recuperación hematopoyética postraplante del alo-TSP con una incidencia de EICH crónica similar, o incluso menor, que la observada tras el alo-TMO<sup>26</sup>.

### **Calidad de vida**

Como ya hemos comentado, este aspecto del TPH inicialmente menos estudiado está adquiriendo gran relevancia en los últimos años, en los que un número cada vez mayor de pacientes son largos supervivientes. En esta área, los diferentes trabajos apuntan a un mayor deterioro en los diferentes parámetros de calidad de vida entre los receptores de alo-TSP debido a la mayor incidencia de EICH crónica ya comentada y a la, lógicamente, necesidad de una mayor duración del tratamiento inmunosupresor en estos enfermos, lo que es causa de diferentes problemas a largo plazo<sup>17,21,22</sup>.

## Conclusión

La realización de un alo-TPH con progenitores de sangre periférica se acompaña de una rápida recuperación hematopoyética y una menor incidencia de complicaciones peritrasplante. Esto ha permitido ampliar la realización de trasplantes a un mayor número de pacientes y ha contribuido a desarrollar nuevas modalidades terapéuticas como los trasplantes con acondicionamientos de intensidad reducida. A pesar de estas ventajas, la decisión sobre qué fuente de PH es la más adecuada para la realización de un trasplante alogénico es más compleja. Como ya hemos comentado, la rapidez de la recuperación hematopoyética tras el alo-TSP se contrapone a la mayor incidencia de EICH, sobre todo crónica, por lo que este procedimiento no parece aportar ventajas significativas en términos de SG o SLE frente al aTMO, especialmente en pacientes con enfermedades de riesgo estándar. Podría beneficiarse de este proceder el subgrupo de enfermos en los que, por trasplantarse en fases más avanzadas de enfermedad, pueda tener papel terapéutico el efecto de injerto contra tumor que acompaña la EICH crónica aunque no existen todavía datos concluyentes que confirmen este extremo. Por último, y con la información actualmente disponible, no está indicada la realización de alo-TSP en pacientes con enfermedades hematológicas no malignas.

## 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: 1069-85.
2. Buckner CD, Clift RA, Sanders JE, Stewart P, Bensinger WI, Doney KC, et al. Marrow harvesting from normal donors. *Blood* 1984; 64: 630-4.
3. Stroncek, DE, Holland, PV, Bartch, G, Bixby T, Simmons RG, Antin JH, et al. Experiences of the first 493 unrelated marrow donors in the National Marrow Donor Program. *Blood* 1993; 81: 1940-6.
4. Favre G, Beksac M, Bacigalupo A, Ruutu T, Nagler A, Gluckman E, et al. Differences between graft product and donor side effects following bone marrow or stem cell donation. *Bone Marrow Transplant* 2003; 32: 873-80.
5. Rowley SD, Donaldson G, Lilleby K, Bensingter W, Appelbaum F. Experience of donors enrolled in a randomized study of allogeneic bone marrow or peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 2001; 97: 2541-8.
6. De la Rubia J, de Arriba F, Arbona C, Pascual MJ, Zamora C, Insunza A, et al. Follow-up of healthy donors receiving G-CSF for peripheral blood progenitor cell mobilization and collection. Results of the Spanish Donor Registry. *Haematologica* 2008; 93: 735-40.
7. Tigue CC, McKoy JM, Evens AM, Trifilio SM, Tallman MS, Bennett CL. Granulocyte-colony stimulating factor administration to healthy individuals and persons with chronic neutropenia or cancer: an overview of safety considerations from the Research on Adverse Drug Events and Reports project. *Bone Marrow Transplant* 2007; 40: 185-92.
8. Horowitz M, Confer LD. Evaluation of hematopoietic stem cell donors. *Hematology* 2005: 469-75.
9. Halter J, Kodera Y, Urbano Ispizua A, Greinix HT, Schmitz N, Favre G, et al. Severe events in donors after allogeneic hematopoietic stem cell donation. *Haematologica* 2009; 94: 94-101.
10. Körbling M, Anderlini P. Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: does the source of hematopoietic stem cells matter? *Blood* 2001; 98: 2900-8.
11. Tala RN, Urbano-Ispizua A, Martino R, Batlle M, Fernández-Avilés F, Herrera C, et al. G-CSF increases the number of peripheral blood dendritic cells CD16+ and modifies the expression of the costimulatory molecule CD86+. *Bone Marrow Transplant* 2006; 37: 873-9.
12. Stem Cell Trialists' Collaborative Group. Allogeneic Peripheral blood stem-cell compared with bone marrow transplantation in the management of hematologic malignancies: an individual patient data meta-analysis of nine randomized trials. *J Clin Oncol* 2005; 23: 5074-87.
13. Gorin NC, Labopin M, Rocha V, Arcese W, Beksac M, Gluckman E, et al. Marrow versus peripheral blood for genotypically identical allogeneic stem cell transplantation in acute myelocytic leukemia: influence of dose and stem cell source shows better outcome with rich marrow. *Blood* 2003; 102: 3043-51.
14. Dominletto A, Lamparelli T, Raiola AM, Van Lint MT, Gualandi F, Berisso G, et al. Transplantation-related mortality and long-term graft function are significantly influenced by cell dose in patients undergoing allogeneic marrow transplantation. *Blood* 2002; 100: 3930-4.
15. Sierra J, Storer B, Hansen JA, Björke JW, Martin PJ, Petersdorf EW, et al. Transplantation of marrow cells from unrelated donors for treatment of high-risk acute leukemia: the effect of leukemic burden, donor HLA-matching, and marrow cell dose. *Blood* 1997; 89: 4226-35.
16. Schmitz N, Beksack M, Hasenclever D, Bacigalupo A, Ruutu T, Nagler A, et al. Transplantation of mobilized peripheral blood cells to HLA-identical siblings with standard-risk leukemia. *Blood* 2002; 100: 761-7.
17. Flowers M, Parker P, Johnston L, Matos A, Storer B, Bensinger W, et al. Comparison of chronic graft-versus-host disease after transplantation of peripheral blood stem cells versus bone marrow in allogeneic recipients: long-term follow-up of a randomized trial. *Blood* 2002; 100: 415-9.
18. Cutler C, Giri S, Jeyapalan S, Paniagua D, Viswanathan A, Antin JH. Acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic peripheral-blood stem-cell and bone marrow transplantation: a meta-analysis. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3685-91.
19. Guardiola P, Runde V, Bacigalupo A, Ruutu T, Locatelli F, Bogaerts M, et al. Retrospective comparison of bone marrow and granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells for allogeneic stem cell transplantation using HLA identical sibling donors in myelodysplastic syndromes. *Blood* 2002; 99: 4370-8.
20. Champlin R, Schmitz N, Horowitz M, Chappuis B, Chopra R, Cornelissen J, et al. Blood stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation. *Blood* 2000; 95: 3702-9.
21. Friederichs B, Tichelli A, Bacigalupo A, Russell N, Ruutu T, Beksac M, et al. Randomized comparison of bone marrow and peripheral blood stem cells for treatment of leukaemia - long-term follow-up results on survival. *Bone Marrow Transplant* 2009; 43 (Suppl. 1): S3.
22. Gallardo D, de la Cámara R, Nieto JB, Espigado I, Iriondo A, Jiménez-Velasco A, et al. Is mobilized peripheral blood

comparable with bone marrow as a source of hematopoietic stem cells for allogeneic transplantation from HLA-identical sibling donors? A case-control study. *Haematologica* 2009 (en prensa).

23. Ringden O, Labopin M, Bacigalupo A, Arcese W, Schaefer U, Willemze R, et al. Transplantation of peripheral blood stem cells as compared with bone marrow from HLA-identical siblings in adult patients with acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2002; 20: 4655-64.
24. Schmitz N, Beksac M, Bacigalupo A, Ruutu T, Nagler A, Gluckman E, et al. Filgrastim-mobilized peripheral blood progenitor cells versus bone marrow transplantation for treating leukemia: 3-year results from the EBMT randomized trial. *Haematologica* 2005; 90: 643-8.
25. Schrezenmeier H, Passweg JR, Marsh J, Bacigalupo A, Brede-son CN, Bullorsky E, et al. Worse outcome and more chronic GVHD with peripheral blood progenitor cells than bone marrow in HLA-matched sibling donor transplants for young patients with severe acquired aplastic anemia: a report from the European Group for Blood and Marrow Transplantation and the Center for International Blood and Marrow Transplant Research. *Blood* First Edition Paper, prepublished online May 2, 2007; DOI 10.1182/blood-2007-03-081596.
26. Elfenbein G, Sackstein R. Primed marrow for autologous and allogeneic transplantation: a review comparing primed marrow to mobilized peripheral blood and steady-state marrow. *Exp Hematol* 2004; 32: 327-39.

support the production of hematopoietic progenitor cells over a period of several weeks to months. Frideinstein<sup>4</sup> already described a population of adherent cells from the bone marrow that were non-phagocytic and exhibited a fibroblast-like appearance. Upon culture at low density either as whole bone marrow or following separation over a density gradient the cells formed characteristic colonies derived from a single precursor, referred to as Colony-Forming-Unit Fibroblastic or CFU-F. Following ectopic transplantation under the kidney capsule these cells gave rise to a broad spectrum of differentiated connective tissues including bone, cartilage, adipose tissue and myelo-supportive stroma. Based on these observations it was proposed that these tissues were derived from a common precursor cell residing in the bone marrow, termed the stromal stem cell, the bone marrow stromal stem cell, the mesenchymal stem cell or the skeletal stem cell.

Because of their ability to migrate to sites of tissue injury, MSCs have emerged as a promising therapeutic modality for tissue regeneration and repair. Several studies in animal models have demonstrated that MSCs are capable of long-term engraftment and in vivo differentiation, and encouraging results have been reported in clinical use. MSCs are known to secrete a number of cytokines and regulatory molecules implicated in different aspects of hematopoiesis. These characteristics have generated clinical interest to use MSCs to enhance hematopoietic stem cell engraftment. Indeed animal models provide experimental evidence that MSCs facilitate engraftment. In addition to providing critical growth factors, MSCs display immunosuppressive properties that might facilitate engraftment. In vitro studies with human, baboon, and murine MSCs demonstrated that MSCs suppress the proliferation of T cells induced by alloantigens or mitogens. Furthermore, MSCs have been reported to induce T cell division arrest, to inhibit the differentiation and maturation of dendritic cells, and to decrease the production of inflammatory cytokines by various immune cell populations. In line with their immuno-suppressive capacities in vitro, animal studies indicate that MSCs also display immunosuppressive capacities in vivo. Allogeneic MSCs may prolong skin allograft survival in immunocompetent baboons and may prevent the rejection of allogeneic tumor cells in immunocompetent mice. The mechanisms underlying these effects of MSCs have not been clearly identified. Although conflicting results have been reported, most studies agree that soluble factors are involved. The therapeutic application of the immunosuppressive properties of MSCs has already been exploited in the clinical setting for the treatment of acute graft-versus-host

## MESENCHYMAL STEM CELL THERAPY, A NEW FORM OF IMMUNE SUPPRESSION

W.E. FIBBE

*Department of Immunohematology and Blood Transfusion. University Medical Center. Leiden (Países Bajos)*

Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent progenitor cells that have emerged as a promising tool for clinical application. The interest in MSC therapy has been raised by the observation that MSCs are able to modulate immune responses in vitro and in vivo. These properties may be used in clinical therapy in the context of allogeneic stem cell transplantation, in particular to modulate Graft-versus-Host disease and graft rejection.

Human marrow stromal cells or mesenchymal stem cells comprise a heterogeneous population of cells including reticular endothelial cells, fibroblasts, adipocytes, and osteogenic precursor cells that provide growth factors, cell to cell interactions, and matrix proteins that play a role in the regulation of hematopoiesis. The notion that the stromal micro-environment could support hematopoiesis followed by the development of the long-term bone marrow culture (LTBMC) by Dexter. In this system an adherent bone marrow derived stromal culture could

disease after allogeneic stem cell transplantation and for prevention of graft rejection after haplo-identical transplantation.

In a series of 25 children undergoing haplo-identical stem cell transplantation, the co-transplantation of MSCs derived from the haplo-identical stem cell donor resulted in complete prevention of graft rejection that was observed in 20% of a cohort of historical controls. In a collaborative phase 2 study MSCs were applied in 55 patients with steroid resistant grade 2-4 graft-versus-host disease. Treinta patients (55%) had a complete response and 9 patients showed improvement, resulting in an overall response rate of 70%. Complete responding patients had significant lower transplantation related mortality one year after infusion than patients with partial or no response and also showed a higher overall survival rate at two years after transplantation. These results suggest that infusion of ex-vivo expanded mesenchymal stem

cells might be an effective therapy for patients with steroid resistant graft-versus-host disease.

---

## References

1. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, Lanino E, Sundberg B, Bernardo ME, Dini G, Egeler RM, Bacigalupo A, Fibbe WE, Ringdén O. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 2008; 371: 1579-86.
2. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 2007; 110: 3499-506.
3. Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink EL, Willemze R, Fibbe WE. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *Immunol* 2006; 177 (4): 2080-7.
4. Nauta AJ, Westerhuis G, Kruisselbrink AB, Lurvink EG, Willemze R, Fibbe WE. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood* 2006; 108: 2114-20.



## **Novedades en hemostasia e hipercoagulabilidad**

COORDINADORES: F. ESPAÑA. *Valencia*  
J. CORRAL. *Murcia*

### **Resumen del simposio**

En este simposio, quizás mas experimental, pretendemos mostrar aspectos nuevos o no discutidos habitualmente en nuestro congreso, pero que tienen verdadera relevancia en el sistema hemostático y la patología trombótica o hemorrágica y, por ello, quizás el simposio no es muy homogéneo. De hecho, creemos que esta es su riqueza, la posibilidad de discutir en el mismo simposio desde aspectos biofísicos implicados en la activación plaquetaria, a asombrarnos con las nuevas estrategias y diseños para conocer nuevos factores de riesgo trombótico, pasando por conocer mecanismos estructurales que explican la eficacia de ciertos sistemas anticoagulantes y discutir el potencial papel de ciertos RNAs en hemostasia, una molécula cuyo papel en hemostasia se centraba en su función transcritora. Todos los ponentes son expertos en el campo, y han hecho un particular esfuerzo por condensar temas verdaderamente amplios y complejos en 20 minutos.

El Dr. FR Rosendaal es un reconocido hematólogo con más de 400 publicaciones, que ha combinado de forma magistral la investigación clínica y epidemiológica en el estudio de factores de riesgo trombótico. Sus trabajos han utilizado originales y elegantes sistemas para identificar y caracterizar factores de riesgo trombótico, tanto genéticos como ambientales. En su ponencia nos describe los factores genéticos y ambientales de riesgo de trombosis, y su posible utilidad clínica en relación al uso pronóstico de estos factores en el riesgo de recurrencia, y nos orienta hacia donde se dirige la investigación en esta área. También nos ofrece su contrastada experiencia en el manejo clínico de los pacientes con estos factores y sus familiares. Finalmente, hace un excelente resumen de las manifestaciones trombóticas en lugares inusuales y la asociación con factores de riesgo.

Las proteínas son pilares fundamentales de nuestro organismo, componentes esenciales de las estructuras celulares y elementos que realizan funciones singulares en numerosos sistemas, incluido el sistema hemostático. Están codificadas en el ADN, por lo que en los últimos 20 años ha merecido especial atención el estudio de las anomalías del código genético que dan lugar a alteraciones cualitativas o cuantitativas en las proteínas. Sin embargo, desde el código genético (ADN) hasta la correcta ejecución de la función de una proteína median diversas etapas fuertemente reguladas, y en las que intervienen de una manera especial el ARN. La Dra. Zorio es una joven cardióloga con una especial formación en la hemostasia, y nos resume aquí el papel que juega el ARN en la hemostasia. Recientemente se ha descrito la presencia de ARN extracelular, precedente células necrosadas ó dañadas, el cual es capaz de ejercer funciones procoagulantes y profibrinolíticas. Más recientemente, se ha descrito la existencia de una familia de microRNAs capaces de controlar la expresión génica a nivel post-transcripcional. La ponencia revisa las posibles funciones del ARN extracelular, con especial hincapié en el papel de los microRNAs en la hemostasia y la biología celular, incluyendo la angiogénesis y la aterogénesis.

La hemorreología fue, en la década de los 70 a los 90, una disciplina de enorme interés en hemostasia, que actualmente está resurgiendo. El interés está más que justificado, pues el propio sentido del sistema hemostático y su adaptación evolutiva reside en la existencia de un sistema circulatorio cerrado y de alta presión. Las diferencias de flujo en el sistema vascular, particularmente entre arterias (de diferente calibre) y venas, son claves para entender la hemostasia fisiológica y los mecanismos patológicos, especialmente los trombóticos, como refleja de forma espléndida el Dr. Escolar en su manuscrito y ponencia. El Dr. Escolar dirige uno de los pocos laboratorios que realizan experimentos en diferentes condiciones de flujo y que por tanto se acercan más a la realidad. Es por tanto una autoridad en el tema. En su manuscrito hace una excelente revisión de la trascendencia del flujo en los elementos celulares del sistema hemostático, destacando la necesidad de tener en cuenta las implicaciones que variaciones en el flujo pueden tener en el funcionamiento

del sistema hemostático. Creemos que esta ponencia es necesaria para impedir que se olvide este factor y su importancia hemostática, y despertar inquietudes, discusión y dudas sobre la forma y peso de la hemorreología en la experimentación y clínica trombótica.

La Dra. Martínez-Martínez es una joven bioquímica que se ha especializado en serpinas hemostáticas, en particular en antitrombina. Las serpinas son moléculas extensamente estudiadas, especialmente, y por su particularidad, en el aspecto estructural. La Dra. Martínez-Martínez ofrece en su ponencia una accesible visión estructural de los procesos fisiopatológicos relacionados con las serpinas en la hemostasia. La biología estructural, como en su tiempo ocurrió con la biología molecular, es uno de los puntos débiles de la SETH. El camino a seguir debe ser el mismo, conocerla con detalle para ver que no es tan compleja, y a la vez ser conscientes de la ingente información que esta disciplina nos ofrece para conocer mejor todos los procesos bioquímicos implicados en hemostasia. El tema elegido es, sin duda, el adecuado, serpinas hemostáticas, tanto por ser estas moléculas cruciales en este sistema, como por el profundo conocimiento estructural del peculiar mecanismo inhibitorio de las serpinas. Conociendo este mecanismo podremos entender mucho mejor el peculiar equilibrio hemostático, la importancia de la regulación y el control de actividades proteolíticas en el sistema hemostático, e incluso el sentido de ciertos tratamientos anticoagulantes que han sido y son cruciales, así como el potencial uso en el diseño de nuevos fármacos. La ponencia se centrará en la antitrombina como principal serpina hemostática, pero resume los puntos más relevantes y novedosos de todas las serpinas que hoy por hoy juegan un papel en hemostasia. Destacamos la identificación de nuevas serpinas con papel en hemostasia, y sobre todo los nuevos datos que avalan el papel de ciertas serpinas como el ZPI o el cofactor II de heparina en patología trombótica.

La intención de este simposio es mostrar nuevos campos en hemostasia y trombosis, o viejos que han sido casi olvidado pese a su importancia pero que siguen siendo cruciales. Pero en todo caso, campos poco habituales en nuestras reuniones que merecen ser recordados y que sin duda van a estimular interrogantes a todos los asistentes al simposio.

## RISK FACTORS FOR VENOUS THROMBOSIS: GENES AND LIFESTYLE

F.R. ROSENDAAL

*Department of Clinical Epidemiology and Department of Thrombosis and Haemostasis. Leiden University Medical Center. Leiden (Países Bajos)*

### Introduction

Venous thrombosis is the result of occlusive clot formation in the veins. The incidence of a first venous thrombosis is 2 per 1000 individuals per year. It occurs mainly in the deep veins of the leg (deep vein thrombosis, DVT), from which parts of the clot frequently embolise to the lungs (pulmonary embolism, PE). Around two-thirds manifests as deep vein thrombosis of the leg, and one third as pulmonary embolism. Up to half of patients with pulmonary embolisms have no signs of deep vein thrombosis. Less than five percent of all venous thromboses occur at other sites. Venous thrombosis is common and often occurs spontaneously, but also frequently accompanies medical and surgical conditions, both in the community and the hospital.

The symptoms of venous thrombosis are aspecific, and therefore the clinical diagnosis is difficult and requires objective testing by imaging. Major complications of thrombosis include a disabling post-thrombotic syndrome, and death due to fatal pulmonary embolism. One to ten percent of venous thromboses prove fatal, with deaths predominantly but not exclusively among the elderly or patients with severe underlying disease, notably cancer.

Age is the strongest risk factor of thrombosis and the incidence of venous thrombosis rises exponentially with age, where a rule-of-ten applies: in children the incidence is 1 per 100 000 per year, in young adults 1 in 10 000 per year, in middle-aged 1 per 1000 per year, whereas in the elderly the incidence is one percent per year, up to nearly 10 percent per year in the very oldest. Many risk factors for thrombosis, all of them related either to immobilisation or to hypercoagulability, are known, and while it has no clinical use to assess the risk factor status after thrombosis has occurred, several acquired risk factors are so strong that they warrant prophylac-

tic anticoagulation, both in patients with a personal history of thrombosis as in those without.

The recurrence rate of thrombosis is high at around five percent per year. The risk factors for a first venous thrombosis are not the same as for recurrent venous thrombosis, and to a large extent unknown. Individuals from families with inherited thrombophilia tend to develop thrombosis at a young age, and to have frequent recurrences.

### Etiology

There are two main groups of risk factors of thrombosis: those associated with immobilization, which are usually acquired, and those associated with hypercoagulability, which can be either genetic or acquired (Table 1). Venous thrombosis is a multicausal disease, which occurs when several risk factors are present simultaneously in a particular combination. This often concerns the simultaneous presence of long-term risk factors, e.g. genetic defects, and short term acquired factors. While many factors simply add to the risk, contributing to an individual's 'thrombosis potential', some factors may interact synergistically, when the combination adds more to the risk than the sum of the separate contributions of the risk factors (e.g. factor V Leiden and oral contraceptive use).

Table 1. Risk factors for venous thrombosis

Acquired	Inherited	Mixed/unknown
Orthopedic surgery	Antithrombin deficiency	High levels of factor VIII
Neurosurgery	Protein C deficiency	High levels of factor IX
Major abdominal surgery	Protein S deficiency	High levels of factor XI
Major trauma	Factor V Leiden (FVL)	High levels of fibrinogen
Central venous catheters	Prothrombin 20210A	High levels of TAFI
Malignancy	Non-O blood group	Low levels of TFPI
Antiphospholipid syndrome	Dysfibrinogenemia	APC-resistance in the
Puerperium	Factor XIII 34val	Absence of FVL
Prolonged bed rest		Hyperhomocysteinemia
Pregnancy		High levels of PCI (PAI-3)
Obesity		
Plaster cast		
Oral contraceptives		
Hormonal replacement therapy		
Myeloproliferative disorders		
Polycythemia vera		
Long-haul travel		
Age		

TAFI: thrombin activatable fibrinolysis inhibitor; TFPI: tissue factor pathway inhibitor; PCI: protein C inhibitor; PAI-3: plasminogen activator inhibitor-3.

Some of the acquired risk factors are very strong, causing thrombosis in several percent of those afflicted, which implies a relative risk of 50 or higher. These are orthopedic, neurosurgical and major abdominal interventions, major trauma with multiple fractures, central venous catheters and metastasized cancer, particularly adenocarcinomas. Moderate risk factors are antiphospholipid antibody syndrome, puerperium, prolonged bedrest and non-metastasized cancers, while pregnancy, oral contraceptive use, hormone replacement therapy, obesity and long-haul travel constitute mild risk factors, with a 2- to 5-fold increased risk. Exercise and alcohol intake reduce the risk of thrombosis.

Homozygous protein C or protein S deficiency lead to potentially fatal purpura fulminans directly after birth, while homozygous antithrombin deficiency is not compatible with life. These are exceedingly rare except in communities with a high frequency of consanguinity. Heterozygous antithrombin deficiency and homozygous factor V Leiden are the strongest genetic risk factors, increasing the risk of thrombosis 20- to 50-fold. Heterozygous protein C and protein S deficiencies are moderate contributors to risk, with a relative risk of 10. Other genetic factors that are associated with venous thrombosis are either mild and increase the risk 2- to 5-fold, as is the case for factor V Leiden, prothrombin 20210A and non-O blood groups, or have negligible effects on risk that are only of academic interest (MTHFR 677T, factor V HR2, FXIII val34leu, PAI-1 4G/5G).

Mildly increased risks are also present for abnormalities in the coagulation system of which the origin is unclear, such as elevated levels of procoagulant factors (fibrinogen, II, vWF, VIII, IX, X, XI) and anti-fibrinolytic factors (TAFI), and low levels of anticoagulant factors (TFPI).

---

## Prognosis

After a first event of venous thrombosis patients have a high risk to again experience thrombosis between 3 and 10 percent per year. Up to half of the recurrences after a first thrombosis in the leg, occur in the other leg, indicating that systemic changes rather than residual local damage are associated with rethrombosis. Nevertheless, few of the established risk factors associated with a hypercoagulable state, such as factor V Leiden, prothrombin 20210A and elevated levels of clotting factors VIII, IX, XI, are associated with recurrence risk. Even the strongest prothrombotic abnormalities antithrombin deficiency, protein C deficiency and protein S deficiency, at most increase the risk of recurrent thrombosis by 50 percent. The only two clear risk factors for recurrence are male sex (increasing risk 3- to 4-fold) and the absence of a clear pre-

cipitating factor at the first event (doubling recurrence risk); in other words, a first thrombosis following surgery or plaster cast is unlikely to recur.

Acquired risk factors, such as surgery, immobilisation and cancer increase the risk of recurrent thrombosis as they increase the risk of a first event.

---

## Hereditary thrombophilia

Individuals from families with a hereditary tendency for venous thrombosis generally have a more severe thrombotic tendency than individuals not from such families, even when the genetic defect is the same, e.g. they have their first thrombosis at a young age (20-35 years), few never experience thrombosis and many have recurrent disease. Early studies on thrombotic risk associated with prothrombotic defects were based on such families and overestimated risks for all patients with thrombophilic defects. Generally, individuals from such families need not be treated differently than others, except that oral contraceptives containing estrogens should be discouraged in all, and postpartum anticoagulant prophylaxis should be considered in those with prothrombotic defects. Long-term treatment can be considered after a first episode of thrombosis, but only in high risk families, particularly those with antithrombin deficiency.

---

## Thrombosis at rare sites

Around four percent of venous thrombotic events occur in the arm, while other even more rare locations are the brain (cerebral vein thrombosis), the digestive system (mesenteric vein thrombosis), the liver (portal vein thrombosis, and hepatic vein thrombosis, also known as Budd-Chiari syndrome). Thrombosis of the arm is nearly invariably associated with central venous catheters. Deteriorating liver function and portal hypertension may point to thrombosis in the hepatic or portal veins, neurological defects to cerebral vein thrombosis and severe abdominal complaints to mesenteric vein thrombosis. In rare cases deep vein thrombosis may be associated with embolic stroke, when a patent foramen ovale is present (paradoxical stroke). Although local abnormalities often play a role, a procoagulant state due to cancer or hereditary abnormalities increases the incidence of thrombosis in rare locations.

---

## Conclusion

Venous thrombosis is a common disease with considerable morbidity and mortality. Its determinants are

genetic and acquired. Major unknowns are why the incidence is so steeply related to age, and why factors that are associated with a first event do not predict recurrent events.

## Suggested reading

### Incidence and fatality

- Anderson FA, Wheeler HB, Goldberg RJ, Hosmer DW, Patwardhan NA, Jovanovic B, Forrier A, Dalen JE. A population based perspective of the hospital incidence and case-fatality rates of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. The Worcester DVT study. *Arch Intern Med* 1991; 151: 933-8.
- Heit JA, Silverstein MD, Mohr DN, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ, III. Predictors of survival after deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based, cohort study. *Arch Intern Med* 1999; 159: 445-53.
- Naess IA, Christiansen SC, Romundstad P, Cannegieter SC, Rosendaal FR, Hammerstrom J. Incidence and mortality of venous thrombosis: a population-based study. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 692-9.
- Oger E. Incidence of venous thromboembolism: a community-based study in western France. *Thromb Haemost* 2000; 83: 657-60.

### Epidemiology and risk factors

- Heit JA, Silverstein MD, Mohr DN, Petterson TM, Lohse CM, O'Fallon WM, Melton LJ, III. The epidemiology of venous thromboembolism in the community. *Thromb Haemost* 2001; 86: 452-63.
- Rosendaal FR, van Hylckama Vlieg A, Doggen CJM. Venous thrombosis in the elderly. *J Thromb Haemost* 2007; 5 (Suppl. 1): 310-7.
- Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet* 1999; 353: 1167-73.

### Genetic risk factors

- Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM, Bochkov NP, Boulyjenkov V, Chandu M, Dahlbäck B, Ginter EK, Miletich JP, Rosendaal FR, Seligsohn U. Inherited thrombophilia: part 1. *Thromb Haemost* 1996; 76: 651-62.
- Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM, Bochkov NP, Boulyjenkov V, Chandu M, Dahlbäck B, Ginter EK, Miletich JP, Rosendaal FR, Seligsohn U. Inherited thrombophilia: part 2. *Thromb Haemost* 1996; 76: 824-34.
- Bovill EG, Bauer KA, Dickermann JD, Callas P, West B. The clinical spectrum of heterozygous protein C deficiency in a large New England kindred. *Blood* 1989; 73: 712-7.
- Bank I, Libourel EJ, Middeldorp S, van Pampus EC, Koopman MM, Hamulyak K, Prins MH, van der Meer J, Buller HR. Prothrombin 20210A mutation: a mild risk factor for venous thromboembolism but not for arterial thrombotic disease and pregnancy-related complications in a family study. *Arch Intern Med* 2004; 164: 1932-7.

### Acquired risk factors

- Blom JW, Doggen CJ, Osanto S, Rosendaal FR. Malignancies, prothrombotic mutations, and the risk of venous thrombosis. *JAMA* 2005; 293: 715-22.

- Rosendaal FR. Oral contraceptives and screening for factor V Leiden. *Thromb Haemost* 1996; 75: 524-5.
- Rosendaal FR, van Hylckama Vlieg A, Tanis BC, Helmerhorst FM. Estrogens, progestogens and thrombosis. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1371-80.
- Vandenbroucke JP, Rosing J, Bloemenkamp KW, Middeldorp S, Helmerhorst FM, Bouma BN, Rosendaal FR. Oral contraceptives and the risk of venous thrombosis. *N Engl J Med* 2001; 344: 1527-35.
- Cannegieter SC, Doggen CJM, van Houwelingen HC, Rosendaal FR. Travel-related venous thrombosis: Results from a large population-based case control study (MEGA study). *PLoS Med* 2006; 3.

### Recurrence risk

- Christiansen SC, Cannegieter SC, Koster T, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Thrombophilia, clinical factors, and recurrent venous thrombotic events. *JAMA* 2005; 293: 2352-61.
- Heit JA, Mohr DN, Silverstein MD, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ, III. Predictors of recurrence after deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based cohort study. *Arch Intern Med* 2000; 160: 761-8.
- 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.
- Baglin T, Luddington R, Brown K, Baglin C. High risk of recurrent venous thromboembolism in men. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 2152-5.

## NOVEDADES EN HEMOSTASIA E HIPERCOAGULABILIDAD: ARN EN HEMOSTASIA, BIOLOGÍA VASCULAR Y CARDIOPATÍAS

E. ZORIO<sup>1,2,3</sup>, L.A. RAMÓN<sup>1,3,4</sup>, P. MEDINA<sup>1,3,4</sup>, E. FERNÁNDEZ<sup>1,3</sup>, Ó. CANO<sup>1,2,3</sup>, J. NAVARRO<sup>2</sup>, A. SALVADOR<sup>2</sup>, F. ESPAÑA<sup>1</sup>, A. ESTELLÉS<sup>1</sup>, EN REPRESENTACIÓN DE LA UNIDAD DE VALORACIÓN DEL RIESGO DE MUERTE SÚBITA FAMILIAR DE LA COMUNIDAD VALENCIANA  
<sup>1</sup>Unidad de Bioquímica del Centro de Investigación. <sup>2</sup>Servicio de Cardiología. <sup>3</sup>Fundación para la Investigación del Hospital Universitario La Fe. Valencia. <sup>4</sup>RECAVA

Las proteínas son las moléculas biológicas por excelencia, ya que son los constituyentes característicos de las estructuras celulares, y son también las especies que llevan a cabo las funciones celulares más importantes. Las proteínas se encuentran codificadas en el ADN, pero desde el código genético hasta la correcta ejecución de una función celular realizada por una proteína median muchos pasos que son objeto de una estrecha regulación (Tabla 1 y Figura 1).



Tabla 1. Puntos susceptibles de control en la expresión génica de las células eucariotas

· Control pretranscripcional: condensación y metilación del ADN
· Control de la transcripción (generación de ARNm a partir de ADN): factores de transcripción, miARN
· Control postranscripcional: <ul style="list-style-type: none"> <li>- del <i>splicing</i> (proceso de corte y empalme del ARNm)</li> <li>- del transporte al citoplasma</li> <li>- de la estabilidad del ARNm: miARN</li> </ul>
· Control traduccional (generación de la secuencia de aminoácidos a partir de ARNm): agentes que interfieren con la iniciación, la elongación y la terminación del proceso, por ejemplo miARN
· Control posterior a la síntesis de la cadena polipeptídica: <ul style="list-style-type: none"> <li>- plegamiento tridimensional de la secuencia de aminoácidos: chaperonas</li> <li>- transporte hasta su lugar de acción</li> <li>- modificaciones postraduccionales</li> </ul>

## ARN

Los ácidos nucleicos se dividen en dos grupos: ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN). Los genes de todos los organismos están formados por ADN. Durante la transcripción, se sintetizan cadenas de ARNm a partir del fragmento de ADN que constituye un gen. El ARNm es el molde utilizado para la síntesis de proteínas, trasladando la información genética desde el ADN del núcleo a los ribosomas, donde se sintetizan las cadenas polipeptídicas que dan lugar a las proteínas. La molécula de ARN está formada por una única cadena polinucleotídica con estructura irregular parcialmente helicoidal mantenida por puentes de hidrógeno.

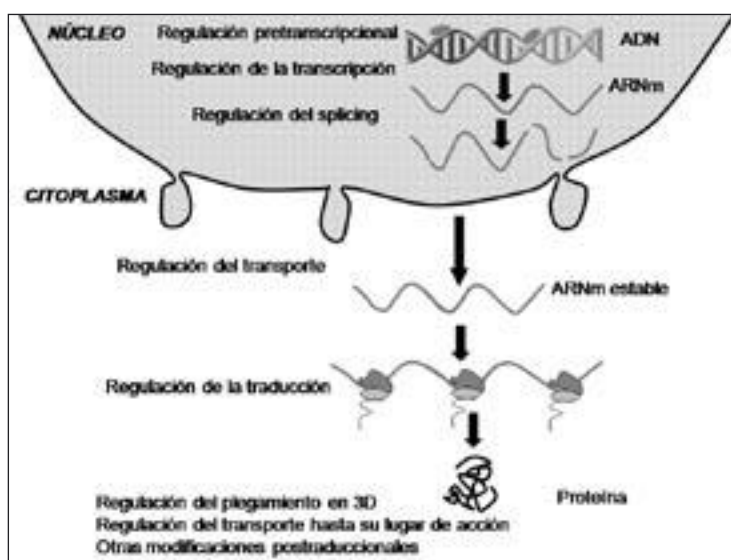


Figura 1. Esquema representativo de la expresión génica en células eucariotas.

### ARN con papel singular en hemostasia

La proteasa activadora del factor VII (FSAP) es una serín proteasa presente en el plasma para la cual se ha postulado un posible papel dual en la regulación de la coagulación y la fibrinólisis, en base a su capacidad para estimular la activación del factor VII<sup>1</sup> y de la pro-urocinasa<sup>2</sup>. Distintos estudios en humanos han apuntado resultados contradictorios en cuanto al papel en la trombosis venosa profunda de los niveles de la FSAP y del polimorfismo más estudiado de su gen, el polimorfismo Margburg I o 1601G>A, el cual mantiene la actividad protrombótica de la FSAP perdiendo la profibrinolítica<sup>3,4</sup>. Quizás, como apuntan otros trabajos, la actividad de la FSAP sea más relevante a nivel de la proteólisis extracelular que de la hemostasis intravascular<sup>5,6</sup>. En cualquier caso, en 2005 se describió por primera vez que el ARN extracelular era capaz de estimu-

lar la activación de la FSAP<sup>7</sup>. Así, se vio que el medio acondicionado derivado de diversos tipos celulares tales como células musculares lisas, células endoteliales o células de osteosarcoma contenía un factor ácido que iniciaba la (auto)-activación de la FSAP, y que la adición de ARNasa A, pero no de otras enzimas hidrolíticas (proteasas, glicanasas y ADNasa), podía abolir esta capacidad de activación de la FSAP<sup>7</sup>. Asimismo, diferentes formas naturales de ARN (ribosómico, de transferencia, viral y artificial) eran capaces también de inducir la activación de la FSAP. Esta activación era dependiente de la concentración de ARN y requería la unión de la FSAP al ARN, con una constante de disociación de 170-350 nM<sup>7</sup>. La naturaleza polianiónica del ARN parece ser la responsable de esta unión. Recientemente, se ha demostrado que el ARN extracelular, pero no el ADN, puede potenciar la función antiproliferativa de la FSAP acelerando la degradación del

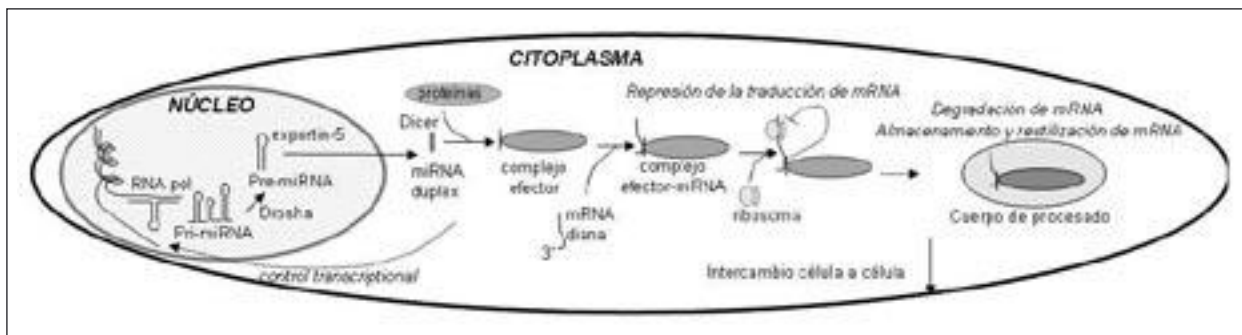


Figura 2. Esquema representativo de la biosíntesis de miRNA.

factor de crecimiento derivado de las plaquetas BB y, en definitiva, disminuyendo la proliferación de células vasculares musculares lisas<sup>8</sup>. Esta acción, sin embargo, está regulada a la baja por este mismo ARN a través de dos vías. Por una parte, aumenta la inhibición que el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) ejerce sobre la FSAP y, por otra, incrementa la vida media del PAI-1, molécula que antagoniza la acción del FSAP sobre las células vasculares lisas<sup>9</sup>.

Otros trabajos han demostrado la capacidad de promover la coagulación sanguínea por ARN de células eucariotas y procariotas a otros niveles diferentes de la FSAP, en virtud de su naturaleza polianiónica ya comentada. Así, los factores XI y XII de la coagulación, que requieren superficies cargadas negativamente para su activación<sup>10</sup>, exhibieron una fuerte capacidad de unión al ARN extracelular<sup>11</sup>, incrementando de esta forma la activación de ambos factores. Además, la administración de ARN exógeno a conejos indujo una significativa respuesta procoagulante, mientras que en un modelo de trombosis arterial en ratones se encontró ARN extracelular asociado al trombo rico en fibrina y el tratamiento previo del animal con ARNasa (pero no con ADNasa) retrasó significativamente la formación del trombo oclusivo<sup>11</sup>.

Todos estos resultados sugieren que el ARN extracelular derivado de células necrosadas o dañadas puede tener una importante función procoagulante y profibrinolítica a nivel de la FSAP pudiendo, incluso, explicar la activación *in vivo* de la vía intrínseca de la coagulación (factores XI y XII) en presencia de daño tisular.

### microARN

En la última década se ha caracterizado una familia de ARN no codificantes relacionada con gran cantidad de procesos biológicos que, por su pequeño tamaño, ha recibido el nombre de microARN (miARN). Un miARN está formado por una cadena sencilla de ARN de unos 19-22 nucleótidos capaz de controlar la expresión génica fundamentalmente a nivel postranscripcio-

nal (degradando el ARNm o inhibiendo su traducción, según el grado de complementariedad). Este efecto puede ser incluso mayor, en caso de que el miARN posea más de un punto de unión con su ARNm, debido a la acción cooperativa de las interacciones miARN-ARNm<sup>12</sup>. Además de estos reconocidos mecanismos de actuación, se ha descrito que algunos miARN pueden pasar al núcleo (p. ej., miR-29b) y, probablemente, ejercer un efecto regulador de la transcripción o del procesado de sus transcritos diana<sup>13</sup>. Finalmente, otra interesante aportación de la literatura sostiene que en determinadas circunstancias los miARN pueden, incluso, potenciar la traducción siempre que coincidan espacialmente en el ARNm diana elementos ricos en AU y las secuencias de unión al miARN en células quiescentes fuera de ciclo celular<sup>12,14</sup>.

Los miARN son producidos endógenamente con una maquinaria enzimática muy conservada en la escala filogenética (Figura 2). Se transcriben como pri-miARN desde diferentes zonas del genoma, bien regiones intrónicas de ARNm codificante o no codificante o de regiones exónicas de ARNm no codificante<sup>15</sup>. Hasta el 40% de los miARN humanos se transcriben en clústers de hasta ocho miARN en un único pri-miARN<sup>16</sup>. La ARNasa III Droscha forma un pre-miARN a partir de un pri-miARN, que ya puede ser transportado al citoplasma por la proteína de transporte Exportin-5 mediante un mecanismo Ran-GTP dependiente<sup>15</sup> y allí ser procesado por Dicer, otra ARNasa, que convierte el pre-miARN en un dúplex de 21 nucleótidos aproximadamente. El paso final de su maduración consiste en acoplar la cadena funcional del miARN al complejo multiproteico inductor de silenciamiento de ARN (RISC), cuya proteína más relevante es Argonaute2. Una vez en el RISC, el miARN reconoce a su ARNm diana gracias a la homología parcial que presentan sus secuencias, habitualmente restringida a los 6-8 nucleótidos situados en la región 3'UTR (región no traducida) del ARNm diana (secuencia semilla o *seed sequence*). Una baja complementariedad entre las secuencias conduce a una inhibición de la traducción del ARNm,

mientras que un alto grado de homología conduce a la degradación del ARNm, ya sea a través de la acción directa de Argonaute2 en el RISC o a través de su digestión en cuerpos especializados de procesamiento. Alternativamente, se ha establecido que los ARNm diana pueden ser también almacenados en esos cuerpos para ser posteriormente recuperados y reutilizados<sup>17</sup>, y que los miARN pueden regresar al núcleo para ejercer allí algún tipo de control transcripcional<sup>8</sup> (Tabla 1 y Figura 2). Finalmente, todas estas acciones pueden reproducirse asimismo en las células adyacentes gracias al intercambio intercelular de miARN a través de exosomas<sup>18</sup>.

Este proceso de biosíntesis de miARN está sujeto a diferentes puntos de regulación que van a depender tanto del tejido estudiado como del momento del desarrollo analizado. En primer lugar, la transcripción y el procesamiento intranuclear de miARN tienen un perfil tejido-específico, característica probablemente relacionada con la expresión singular de factores de transcripción de cada miARN, que pueden ser propios o compartidos con los genes que albergan la secuencia del miARN<sup>19,20</sup>. En un segundo paso, la maduración de un miARN determinado por Dicer puede ser en diferente grado retrasada o inhibida en distintos tipos celulares<sup>21</sup>. Finalmente, se ha descrito que Drosha puede ser bloqueada selectivamente en etapas iniciales del desarrollo<sup>21</sup> y gran cantidad de artículos consolidan la existencia de un patrón de expresión de miARN dinámico en el tiempo en las diferentes etapas del desarrollo<sup>22,23</sup>.

La nomenclatura de los miARN se ha ido complicando a medida que se han descrito más y más miARN. Así, se han ido añadiendo sufijos: sufijos numéricos si se codifican en más de un locus (p. ej., miR-1-1 y miR-2-2), sufijos alfabéticos si se diferencian por un número restringido de nucleótidos (p. ej., miR-133a y miR133b) y añadiendo el extremo del precursor del que proceden si dos miARN se obtienen por el distinto procesamiento de un mismo precursor (p. ej., miR-126-3p y miR-126-5p)<sup>24</sup>.

Para estimar la importancia de la acción de los miARN debe destacarse que han sido clonados entre 500 y 1.000 miARN diferentes de mamíferos (para una descripción exhaustiva consúltese <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>). Dado que los miARN son sólo parcialmente complementarios a sus ARNm diana, un único miARN puede llegar a regular un gran número de ARNms (hasta 200) con diferente intensidad, pudiendo ocasionar una reducción del 50% del nivel habitual de una proteína dada. Además, muchos miARN parecen actuar de forma cooperativa a través de distintos puntos diana en un determinado gen. En general, se acepta que el 30% de todas las secuencias codificantes podrían ser diana de los miARN y que el 2-3% de los genes humanos podría codificar genes de miARN<sup>12,24</sup>.

En la última década el estudio de los miARN en diferentes procesos biológicos ha crecido de forma exponencial, no sólo con el objetivo de explicar mecanismos de enfermedad sino también por su potencial para ser utilizados como biomarcadores en suero<sup>25,26</sup> y como dianas terapéuticas. Sin duda, el uso de miARN como dianas terapéuticas ha sido más ampliamente estudiado en el campo del cáncer<sup>27</sup>, pero a más largo plazo es previsible que se obtengan resultados prometedores en la esfera hematológica (especialmente en el tratamiento de leucemias y linfomas)<sup>16</sup> y cardiovascular (donde los estudios más avanzados se sitúan en el tratamiento de dislipemias)<sup>28</sup>.

### **miARN con papel singular en hematología y hemostasia**

Aunque resulta atractiva la hipótesis de que la amplia variabilidad observada en los niveles circulantes de los factores hemostáticos se encuentre regulada por miARN, hasta la fecha actual no hay evidencias que la sustenten. Por el contrario, sí existen trabajos publicados que describen el patrón de expresión de miARN en las diferentes líneas celulares sanguíneas (Tabla 2), tanto en proceso de diferenciación<sup>16,29</sup>, como en líneas maduras circulantes<sup>30</sup> y en situaciones patogénicas como los linfomas, las leucemias y la policitemia vera, entre otras<sup>16,31,32</sup>. En particular, en el proceso de activación de la hemostasia primaria, se han publicado datos preliminares que apoyan la participación de los miARN en la activación plaquetaria. Así, aunque las plaquetas no poseen ADN genómico retienen cierta cantidad de ARNm procedente de los megacariocitos que puede ser sometida al control de los miARN. Taniverdi y col. expusieron resultados preliminares que apoyaban la sobreexpresión de miARN en plaquetas activadas bien con trombina o con PAM3CSK4. En particular, se documentó un aumento de 1,6-4,4 veces en los niveles de hsa-miR-107, hsa-miR-126, hsa-miR-148b, hsa-miR-19a, hsa-miR-19b, hsa-miR-27a, hsa-miR-29a, hsa-miR-30b, hsa-miR30c, hsa-miR-107, y hsa-miR-600 y este aumento fue mayor tras la estimulación con trombina que con PAM3CSK4<sup>33,34</sup>.

### **miARN con papel singular en biología vascular: angiogénesis y aterogénesis**

Tanto la maquinaria enzimática implicada en la síntesis de miARN en general como algunos miARN específicos están estrechamente relacionados con la angiogénesis. En particular, Dicer juega un papel clave en la formación de vasos nuevos tanto *in vivo* como *in vitro*. Entre los mecanismos últimos de este control se incluyen la modulación de genes relacionados

**Tabla 2. miARN relacionados con los procesos de maduración de las distintas líneas hematopoyéticas y con algunos procesos neoplásicos hematológicos**

*Proceso de diferenciación y maduración:*

**Según estirpes celulares**

- Eritropoyesis: sobreexpresados miR-221, miR-222
- Megacariogénesis: sobreexpresados miR-150, miR-223; infraexpresados miR-10b, miR-126, miR-17 y miR-20
- Mielopoyesis: sobreexpresados miR-181a, miR-223 y miR-142

**Según etapa de la diferenciación**

- Evitan la diferenciación en etapas precoces de la diferenciación: miR-17, miR-24, miR-146, miR-155, miR-128, miR-181
- Evitan la diferenciación en etapas tardías de la diferenciación: miR-16-1, miR-103, miR-107
- Evitan la diferenciación en etapas terminales de la diferenciación: miR-221, miR-222, miR-223

*Procesos neoplásicos\**

- Leucemias: actúan como represores tumorales y están infraexpresados miR-15a y miR-16-1
- Linfomas: actúan con propiedades oncogénicas y están sobreexpresados miR-155 y el clúster miR-17-92
- Policitemia vera: infraexpresados o sobreexpresados según la estirpe celular analizada let-7a, miR-182, miR-143, miR-145, miR-223, miR-26b, miR-30b y miR-150

\*La mayoría de estos miARN se encuentran estrechamente relacionados con las secuencias deletionadas, translocadas o amplificadas en las alteraciones genéticas más frecuentemente relacionadas con las siguientes entidades: del13q14, BIC locus, amplificación 13q31 y JAK V617F<sup>16,30-32</sup>.

con la angiogénesis, como es el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y su receptor Flt1<sup>21,24</sup> y la interferencia con genes implicados en la señalización redox de células endoteliales, como es el supresor transcripcional de la proteína HMG-box 1, encargado de regular negativamente parte del complejo NADPH-oxidasa<sup>21</sup>. Por el contrario, el papel de Droscha en la angiogénesis es mucho más limitado<sup>21</sup>. En los últimos años se han descrito miARN con acción proangiogénica y otros con actividad antiangiogénica, tanto en situaciones basales como bajo condiciones patogénicas frecuentes, como son la hipoxia, la inflamación, el estrés de pared, cualquier factor de riesgo cardiovascular, la aterosclerosis establecida o la cardiopatía isquémica documentada (Tabla 3). En particular, el perfil de expresión de miARN en situaciones de hipoxia parece mediado por el factor inducible por hipoxia (HIF), que actúa como factor de transcripción para esos miARN<sup>35</sup>.

**miARN con papel singular en cardiopatías**

El corazón reacciona ante las “agresiones” activando un amplio abanico de vías de señalización intracelular. Estas “agresiones” pueden ser tan frecuentes como las alteraciones hemodinámicas derivadas de un infarto de miocardio, la hipertensión arterial, la estenosis aórtica, distintas miocardiopatías y la disfunción valvular, entre otras. Todas ellas pueden ser responsables de la adquisición del llamado fenotipo de insuficiencia cardiaca resultante del cambio del patrón de expresión génica hacia un perfil fetal y del desarrollo de un remodelado en la matriz extracelular con fibrosis miocárdica<sup>12,24</sup>.

El papel potencial de los miARN en distintos escenarios cardiológicos, tanto fisiológicos como patoló-

gicos, ha abierto nuevos horizontes en la comprensión de los mecanismos de la neovascularización en el contexto de la cardiopatía isquémica (revisado más arriba), la hipertrofia cardiaca, la insuficiencia cardiaca y la arritmogénesis. A pesar del alto nivel de expresión de miARN en el corazón, el papel particular de muchos de ellos es todavía desconocido, y los miARN con papel conocido pueden afectar a más de uno de estos mecanismos (p. ej., desarrollo de hipertrofia y arritmias, antiangiogénesis y arritmias, entre otros). Algunos de ellos se expresan preferencialmente en el miocardio y en el músculo esquelético (como el miR1 y el miR-133), pero otros presentan un perfil más ubicuo (como son el miR-21, miR-195, miR-206 y miR-208)<sup>24</sup>.

Como en otros ámbitos de investigación, se han utilizado distintos modelos de estudio del papel de estos miARN: modelos de animales transgénicos con sobreexpresión selectiva del miARN de interés, modelos de animales *knockdown* con bloqueadores de un miARN de interés (oligonucleótidos sin sentido, *antagomirs*, *decoys* o esponjas de miARN), cultivos celulares y modelos animales donde se crea artificialmente una situación de “agresión” (como la generación quirúrgica de una coartación aórtica o el tratamiento con calcineurina) y miocardio humano procedente de material quirúrgico o explantado<sup>12,24,36</sup>.

La Tabla 4 recoge el listado de miARN con papel relevante en el corazón, así como sus puntos de acción.

La transcripción de los clústers de miR-1 (incluyendo miR-1-1 y miR-1-2) y miR-133 (incluyendo miR-133a-1, miR-133a-2 y miR-133b) y el miR-206 se encuentra regulada por factores de diferenciación miogénica. Es más, a modo de *feedback*, los inhibidores de esos factores se ven disminuidos con la introducción de miR-206. miR-1 y



Tabla 3. miARN relacionados con la biología vascular<sup>21,24,36</sup>

miARN	Diana	Efecto
miR-130a	GAX, HOXAS	Proangiogénesis <i>in vitro</i>
clúster miARN 17-92	Trombospondina 1 (miR-19), factor de crecimiento del tejido conectivo (miR-18)	Proangiogénesis tumoral <i>in vivo</i> , maduración de linfocitos B
let-7f y miR-27	–	Proangiogénesis <i>in vitro</i>
miR-378	Sufu, Fus-1b	Proangiogénesis tumoral <i>in vivo</i>
miR-210	EphrinA3	Proangiogénesis y migración
miR-21	PTEN, Bcl2, trombospondin-1, VEGF, receptores de VEGF y eNOS	Proangiogénesis <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>
miR-126	proteincinasa activada por Ras/mitogen Spred-1, VCAM1, VEGF, receptores de VEGF y eNOS	Proangiogénesis al favorecer las vías de VEGF y FGF y antiaterogénesis al disminuir la adherencia de leucocitos al endotelio mediada por TNF- $\alpha$
miR-221 y miR-222	Kit, eNOS, p27, p57, VEGF, receptores de VEGF, receptor de angiopoyetina Tie-1, eNOS, interleucina 8 y c-Kit	Antiangiogénesis y disminución de la capacidad de migración y de cicatrización <i>in vitro</i>
miR-15, miR16, miR-20a y miR-20b	VEGF, c-MET, COX-2, uPAR y Bcl2	Antiangiogénesis (miR-15/miR-16 a través de aumentar la apoptosis <i>in vitro</i> )
miR-133	Receptores de factores angiogénicos	Antiangiogénesis
miR-195	VEGF	Antiangiogénesis
miR-155	Receptor tipo 1 de angiotensina II y factor de transcripción Pu.1	Disregulación del sistema renina-angiotensina-aldosterona y modulación de la maduración monocito-macrófago
miR-424, miR17-5p-20a106a y miR146	Factor de transcripción NFI-A (miR-424), AML1 y receptor de M-CSF (miR17-5p-20a-106a)	Proaterogénesis por el control de la maduración monocito-macrófago
miR-150	–	Proaterogénesis por el control de la maduración de linfocitos B
miR-223	–	Proaterogénesis por el control de la maduración y proliferación granulocítica durante la inflamación

miR-133 pueden ser detectados en etapas embrionarias precoces<sup>24</sup>.

Los complejos mecanismos por los que los miARN controlan la expresión proteica en ocasiones se entrecruzan con los que controlan la señalización hormonal. Así, miR208 reprime la expresión de la proteína asociada al receptor de hormona tiroidea tipo 1 (THRAP-1), en una compleja interacción con la expresión de la cadena pesada de la miosina con repercusión en el remodelado cardiaco y el desarrollo de hipertrofia cardiaca en condiciones de estrés e hipotiroidismo<sup>24,36</sup>. En cuanto a la influencia de algunos miARN en la actividad eléctrica del corazón, interesa destacar su participación en la conducción cardiaca, la repolarización ventricular, el automatismo y el potencial arrítmico causante de muerte súbita por arritmias ventriculares malignas a través de la modulación de la expresión de gran variedad de canales iónicos (distintas subunidades de IKs, IKr, IK1, If, Ito y conexina43)<sup>12,24,3</sup>

## Consideraciones finales

Tras un daño vascular, el sistema hemostático cumple el difícil reto de cohibir *localmente* la hemorragia hasta que la cicatrización repara el daño causado. Esta restricción topográfica de la coagulación se ha atribuido históricamente a la exposición *local* del factor tisular al torrente circulatorio solamente en el lugar de la agresión (activando la coagulación por la vía extrínseca). Recientemente se ha descrito que el daño tisular puede también liberar ARN a partir de las células lesionadas, que, al alcanzar el torrente circulatorio, puede exhibir una actividad procoagulante acelerando la activación del FSAP y de la fase de contacto de la coagulación (activando así la coagulación tanto por la vía intrínseca como por la intrínseca). Aunque la naturaleza e importancia *in vivo* de estos mecanismos están aún por determinar, podrían jugar un papel relevante en determinados estados pro-trombóticos (p. ej., sepsis) y, además, abren un nuevo horizonte en la búsqueda de dianas terapéuticas<sup>11</sup>.



Tabla 4. miARN relacionados con la cardiogénesis, la hipertrofia cardiaca y la estabilidad eléctrica del corazón<sup>12,24,36</sup>

miARN	Diana	Efecto
miR-1	Factor de transcripción Hand2, RasGAP, Cdk9, fibronectina, Rheb, HSP60, HSP70, acetilasa de histonas-4, conexina43, subunidad Kir2.1 de IK1, subunidad beta Mink de IKs, HCN2 o subunidad sensible a cAMP de If, factor de transcripción Irf5	Proliferación cardiaca, modulación de la morfogénesis, diferenciación mioblástica, mantenimiento del estado diferenciado, efecto proapoptótico, prolongación de la repolarización y el potencial de acción, reducción de la velocidad de conducción eléctrica con aparición de bloqueos de rama, generación posdespolarizaciones y extrasistolia ventricular, disminución de la frecuencia cardiaca
miR-21	–	Podría modular el desarrollo de hipertrofia, la proliferación y la apoptosis pero los resultados son contradictorios en distintos trabajos
miR-29	–	Inhibición del desarrollo de fibrosis
miR-133	Factor nuclear Nelf-A/WHSC2, proteína intercambiadora GDPGTP RhoA, cinasa de transducción de señal Cdc42, factor de respuesta sérica SRF, caspasa-9, subunidad $\alpha$ de IKs, subunidad HCN4 de If, IKr	Modulación de la cardiogénesis, desarrollo de hipertrofia cardiaca, disminución de la diferenciación, aumento de la proliferación mioblástica, producción de un efecto antiapoptótico, prolongación de la repolarización y el potencial de acción, disminución de la frecuencia cardiaca
miR-195	–	Desarrollo de hipertrofia cardiaca con rápida transición a miocardiopatía dilatada e insuficiencia cardiaca
miR-206	ADN polimerasa, B-ind1, proteína asociada a la diferenciación de monocito a macrófago	Efecto favorecedor de la diferenciación
miR-208	Proteína asociada al receptor de hormona tiroidea tipo 1	Efecto favorecedor del remodelado cardiaco y la hipertrofia ventricular en condiciones de estrés e hipotiroidismo

Por otra parte, la escasa homología requerida entre un miARN y su diana explica el gran número de ARNm que pueden ser regulados por un mismo miARN con distinta intensidad. Además, la posibilidad de que diferentes miARN puedan actuar cooperativamente en la modulación de un mismo ARNm complica significativamente el análisis crítico de los resultados de los experimentos realizados en este campo. A pesar de todo, los miARN han abierto nuevas perspectivas de investigación con proyección de convertirse también en dianas terapéuticas en un futuro no muy lejano (especialmente en la esfera del cáncer). Las estrategias para aumentar la expresión de un miARN o disminuir la de otro, según la patología y el miARN de interés, no están exentas de limitaciones o dificultades. Entre ellas, merece la pena destacar la complejidad para asegurar la entrega del miARN en lugar de acción (farmacocinética, biodistribución y penetración celular), la necesidad de minimizar los efectos sobre ARNm diferentes al de interés, la posibilidad de ejercer efectos terapéuticos y deletéreos simultáneamente actuando sobre un miARN dado y la potencial toxicidad de las altas dosis empleadas de los moduladores de miARN<sup>24,36</sup>.

Hoy en día existe evidencia que avala el papel de los miARN en procesos proliferativos del sistema hematopoyético (leucemias, linfomas y policitemia vera)

y sustenta la posibilidad de que en el futuro se puedan administrar moduladores que actúen a este nivel como medidas terapéuticas. En el campo de la homeostasia, por el contrario, no existen datos sólidos de la implicación de los miARN. A pesar de todo, a la vista de los resultados obtenidos en otras áreas, es realmente tentadora la posibilidad de que la modulación génica por miARN pueda participar en los fenómenos homeostáticos fisiológicos y, quizás, explicar en cierta medida la aparición de eventos trombóticos o la variabilidad de respuesta frente a antiagregantes con acción sobre COX-2 (diana de miARN como miR-15, miR-16 y miR-20). Además, en caso de confirmarse el posible papel de algunos miARN en la activación plaquetaria podría convertirlos en nuevas dianas terapéuticas antiagregantes. La reconocida interacción de los fenómenos angiogénicos e inflamatorios en general amplía el abanico de miARN candidatos a modular el equilibrio homeostático (véase apartado correspondiente).

Finalmente, en el corazón los miARN han demostrado regular una gran variedad de vías tanto en condiciones fisiológicas como en circunstancias patológicas frecuentes en la práctica clínica diaria y con un alto coste económico y social (tanto de la insuficiencia cardiaca como de la muerte súbita secundaria a arritmias ventriculares malignas). El apasionante reto

de trasladar estas evidencias del ámbito de la investigación al de la aplicación directa en la práctica clínica (bien como biomarcadores diagnósticos o pronósticos, bien como armas terapéuticas) no parece inmediato, pero puede revolucionar las guías y protocolos vigentes.

## Agradecimientos

*Este trabajo ha sido financiado por el Instituto de Salud Carlos III (RECAVA RD06/0014/0004, PI070831, CP0700326, PI080185).*

## Bibliografía

- Römisch J, Feussner A, Vermohlen S, Stóhr HA. A protease isolated from human plasma activating factor VII independent of tissue factor. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1999; 10: 471-79.
- Römisch J, Vermohlen S, Feussner A, Stóhr H. The FVII activating protease cleaves single-chain plasminogen activators. *Haemostasis* 1999; 29: 292-9.
- Hoppe B, Tolou F, Radtke H, Kieseewetter H, Dörner T, Salama A, Marburg I polymorphism of factor VII-activating protease is associated with idiopathic venous thromboembolism. *Blood* 2005; 105: 1549-51.
- Sidelmann JJ, Vitzthum F, Funding E, Münster AM, Gram J, Jespersen J. Factor VII-activating protease in patients with acute deep venous thrombosis. *Thromb Res* 2008; 122: 848-53.
- Römisch J. Factor VII activating protease (FSAP): a novel protease in hemostasis. *Biol Chem* 2002; 383: 1119-24.
- Kanse SM, Parahuleva M, Muhl L, Kemkes-Matthes B, Sedding D, Preissner KT. Factor VII-activating protease (FSAP): vascular functions and role in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2008; 99: 286-9.
- Nakazawa F, Kannemeier C, Shibamiya A, Song Y, Tzima E, Schubert U, et al. Extracellular RNA is a natural cofactor for the (auto-)activation of Factor VII activating protease (FSAP). *Biochem J* 2005; 385: 831-8.
- Shibamiya A, Jul L, Tannert-Otto S, Preissner KT, Kanse SM. Nucleic acids potentiate factor VII-activating protease (FSAP)-mediated cleavage of platelet-derived growth factor-BB and inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation. *Biochem J* 2007; 404: 45-50.
- Wygrecka M, Morty RE, Markart P, Kanse SM, Andreassen PA, Wind T, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 is an inhibitor of factor VII-activating protease in patients with acute respiratory distress syndrome. *J Biol Chem* 2007; 282: 2167-82.
- España F, Ratnoff OD. Activation of Hageman factor (factor XII) by sulfatides and other agents in the absence of plasma proteases. *J Lab Clin Med* 1983; 102: 31-45.
- Kannemeier C, Shibamiya A, Nakazawa F, Trusheim H, Ruppert C, Markart P, et al. Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 6388-93.
- Yang B, Lu Y, Wang Z. Control of cardiac excitability by microRNAs. *Cardiovasc Res* 2008; 79: 571-80.
- Hwang HW, Wentzel EA, Mendell JT. A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import. *Science* 2007; 315: 97-100.
- Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Cell-cycle control of microRNA-mediated translation regulation. *Cell Cycle* 2008; 7: 1545-9.
- Rodríguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 2004; 14: 1902-10.
- Lawrie CH. MicroRNAs and haematology: small molecules, big function. *Br J Haematol* 2007; 137: 503-12.
- Pillai RS. MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA* 2005; 11: 1753-61.
- Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvald JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 654-9.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-97.
- Li SC, Tang P, Lin WC. Intronic microRNA: discovery and biological implications. *DNA Cell Biol* 2007; 26: 195-207.
- Urbich C, Kuehnbacher A, Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res* 2008; 79: 581-8.
- Zhao Y, Ransom JE, Li A, Vedantham V, von Drehle M, Muth AN, et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell* 2007; 129: 303-17.
- Neilson JR, Zheng GX, Burge CB, Sharp PA. Dynamic regulation of miRNA expression in ordered stages of cellular development. *Genes Dev* 2007; 21: 578-89.
- Zorio E, Medina P, Rueda J, Millán JM, Arnau MA, Beneyto M, et al. Insights into the role of microRNAs in cardiac diseases: from biological signalling to therapeutic targets. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2009; 7: 82-90.
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 10513-8.
- Gilad S, Meiri E, Yogeve Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS ONE* 2008; 3: e3148.
- Mack GS. MicroRNA gets down to business. *Nat Biotechnol* 2007; 25: 631-8.
- Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, et al. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 2005; 438: 685-9.
- Georgantas RW 3rd, Hildreth R, Morisot S, Alder J, Liu CG, Heimfeld S, et al. CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 27505.
- Merkerova M, Belickova M, Bruchova H. Differential expression of microRNAs in hematopoietic cell lineages. *Eur J Haematol* 2008; 81: 304-10.
- Lu J, Guo S, Ebert BL, Zhang H, Peng X, Bosco J, et al. MicroRNA-mediated control of cell fate in megakaryocyte-erythrocyte progenitors. *Dev Cell* 2008; 14: 843-53.
- Bruchova H, Merkerova M, Prchal JT. Aberrant expression of microRNA in polycythemia vera. *Haematologica* 2008; 93: 1009-16.
- Tanriverdi K, Morin K, Beaulieu LM, Freedman JE. Activation Regulates Levels of MicroRNA. Abstract 1934. *Circulation* 2008; 118: S\_407.
- Tanriverdi K, Iafrati MD, Rex S, Blair PS, Freedman JE. Platelet MicroRNA is Altered by Thrombin-Induced Aggregation. Abstract 278. *Circulation* 2008; 118: S\_407.
- Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, Garzon R, Alder H, Agosto-Perez FJ, et al. A microRNA signature of hypoxia. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 1859-67.
- van Rooij E, Marshall WS, Olson EN. Toward microRNA-based therapeutics for heart disease: the sense in antisense. *Circ Res* 2008; 103: 919-28.

## IMPLICACIONES DE LA HEMORREOLOGÍA EN LA HEMOSTASIA Y LA TROMBOSIS: DE LA INTERACCIÓN CELULAR A LA REPERCUSIÓN MOLECULAR

G. ESCOLAR<sup>1</sup>, J. BOZZO<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Servicio de Hemoterapia y Hemostasia. Hospital Clínic i Provincial. Universidad de Barcelona. Fundació Clínic. <sup>2</sup> Antiguo colaborador del Servicio de Hemoterapia y Hemostasia. Hospital Clínic. Barcelona

### Introducción

El comportamiento de la sangre en flujo muestra unas características y propiedades dinámicas particulares debido a la existencia de una estructura interna en este fluido. La sangre no es un líquido homogéneo sino que se trata de una suspensión de elementos formes, las células sanguíneas, en un líquido complejo que es el plasma<sup>1</sup>. Entre los elementos celulares sanguíneos predominan de manera absoluta los eritrocitos (97%), que a su vez poseen unas cualidades plásticas y dinámicas particulares que confieren a la sangre una viscosidad no constante dependiente del flujo<sup>2</sup>. Así, las propiedades mecánicas de la sangre están definidas por su propia composición, por su velocidad de flujo y por las dimensiones y topología del conducto a través del cual la sangre fluye<sup>3</sup>.

El estudio de del flujo sanguíneo y su relación con las célula. Desde la década de 1970 sucesivos estudios utilizando modelos experimentales han puesto de relieve que la hemorreología tiene una influencia decisiva sobre la hemostasia y sus patologías<sup>4,5</sup>.

### Flujo laminar de la sangre y viscosidad sanguínea

La viscosidad de un fluido puede definirse como su resistencia al flujo. En una corriente estable a través de un conducto recto y rígido, un fluido simple se comporta siguiendo el modelo teórico del llamado **flujo laminar**, en el cual capas concéntricas sufren un efecto de cizalladura, es decir, se deslizan unas sobre las otras de manera que la velocidad de flujo es máxima en las capas que circulan por el centro del conducto y mínima en las que lo hacen por la periferia<sup>6</sup>, originando un perfil de velocidad que se aproxima a una parábola. La fuerza aplicada sobre una de las capas del fluido se denomina **tensión de cizalladura** (medida en milipascales [mPa]), y el gradiente de velocidad obtenido entre capas adyacentes, **índice de cizalladura** (medido en segundos inversos [ $s^{-1}$ ]). La viscosidad de un fluido

viene dada por la tensión de cizalladura dividida por el índice de cizalladura, la cual, para los fluidos simples, tiene siempre el mismo valor independientemente del índice de cizalladura al cual se mide.

Los factores intrínsecos de la sangre con influencia sobre su viscosidad se pueden dividir en dos tipos principales: plasmáticos y eritrocitarios, destacando entre estos últimos tres componentes: el hematocrito, la deformabilidad y la agregación eritrocitaria.

### Factores plasmáticos

Los factores de tipo plasmático se traducen, en su conjunto, en el valor de densidad o viscosidad. El plasma constituye aproximadamente el 55% del total del volumen sanguíneo y su viscosidad viene determinada por la concentración de grandes proteínas. El aumento de viscosidad plasmática se debe a menudo a aumentos de la concentración de fibrinógeno, lo que se traduce en elevaciones de la viscosidad sanguínea, con la particularidad de que el fibrinógeno está a su vez implicado en la agregación eritrocitaria, añadiendo un factor adicional de hiperviscosidad sanguínea<sup>7</sup>.

La viscosidad plasmática tiene un efecto directo sobre la función de las plaquetas, aunque de manera ambigua, habiéndose observado en modelos experimentales que incrementos en la viscosidad de hasta valores de 0,95 mPa disminuyen la adhesión plaquetaria con el subendotelio, pero ésta se incrementa progresivamente a partir de ese valor<sup>8</sup>. Asimismo, clínicamente se ha demostrado que existe una relación directa entre la viscosidad plasmática y la gravedad de la enfermedad cardiovascular<sup>9</sup>, y se cree que los niveles de fibrinógeno están relacionados complicaciones vasculares<sup>10</sup>.

### Factores eritrocitarios

El hematocrito es el indicador más importante de la fracción celular respecto de la fase líquida de la sangre, y tiene una influencia primordial sobre la viscosidad sanguínea: a mayor valor de hematocrito, más elevada será la viscosidad.

En condiciones estáticas, los eritrocitos tienden a agregar entre ellos en virtud de fuerzas de atracción, formando unos cilindros enlazados en una red tridimensional que ofrece una gran resistencia al flujo<sup>11</sup>. La agregación eritrocitaria es un proceso reversible, ya que las fuerzas atractivas que la causan son principalmente de carácter electrostático y de tensión superficial (Figura 1). Las cargas negativas de la membrana eritrocitaria, debidas básicamente al ácido siálico y a otras proteínas de membrana, pueden crear puentes de unión entre las células a través de proteínas plasmá-

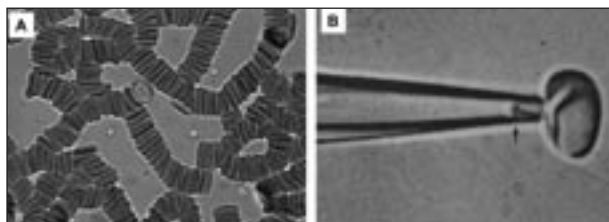


Figura 1. A) Agregados de eritrocitos apilados; el tamaño y número de estos agregados depende de las cargas negativas de la membrana eritrocitaria y está relacionado con la composición proteica de la membrana. Este tipo de agregados se producen en condiciones estáticas y tienden a desaparecer a medida que la sangre es sometida a condiciones de flujo. B) El grado de elasticidad y deformabilidad de la membrana del eritrocito depende del citoesqueleto asociado, y puede determinarse en función de la distancia máxima alcanzada durante la aspiración en condiciones estándar mediante una micropipeta.

ticas como el fibrinógeno y las globulinas. La red tridimensional de eritrocitos agregados es la responsable de la alta viscosidad de la sangre a bajos índices de cizalladura. A medida que la velocidad de flujo aumenta, las fuerzas tensionales van rompiendo los agregados, y la viscosidad sanguínea disminuye. A índices de cizalladura superiores a  $90-100 \text{ s}^{-1}$ , los agregados eritrocitarios han sido eliminados totalmente<sup>12,13</sup> y, a partir de este momento, la responsabilidad del comportamiento no newtoniano de la sangre recae sobre la deformabilidad eritrocitaria.

Se define la deformabilidad eritrocitaria como la capacidad que posee el eritrocito de cambiar de forma cuando es sometido a un estado tensional, y depende principalmente de las propiedades viscoelásticas de la membrana celular y el citoesqueleto<sup>14</sup>. En condiciones estáticas, el eritrocito tiene forma de disco bicóncavo de unos  $7,5 \mu\text{m}$  de diámetro, pero cuando se aplican sobre él tensiones de tipo hidrodinámico, puede cambiar rápidamente de forma para adaptarse al nuevo estado tensional (Figura 1). Esta capacidad de deformación de los eritrocitos les permite circular por capilares de menos de la mitad de su diámetro, y es la causante de que la sangre en flujo muestre una viscosidad menor de la que le correspondería si los eritrocitos se comportaran como cuerpos rígidos.

### Efectos físicos del flujo sobre las plaquetas y su función hemostática

Como consecuencia de las propiedades del flujo laminar en conductos cerrados, en la circulación sanguínea la tensión de cizalladura no es constante, mostrando un valor máximo en la zona próxima a la pared vascular y mínima en el centro. En general, el modelo de flujo sanguíneo consiste en una zona central, por la que circulan los eritrocitos, y una zona periférica, ocupada

por una capa plasmática. Por un efecto de colisiones y desplazamiento, las plaquetas y los leucocitos circulan predominantemente por esta capa plasmática, en contacto con la pared vascular<sup>6,15</sup>. Este efecto de desalojo de las plaquetas por parte de los eritrocitos desde el centro del flujo hacia la zona periférica viene directamente determinado por las propiedades plasmáticas y eritrocitarias anteriormente descritas, lo cual va a tener una repercusión directa sobre la actividad plaquetaria y, en consecuencia, sobre la hemostasia y la trombosis (Figura 3).

El hematocrito, considerado como fracción eritrocitaria en porcentaje de volumen en la sangre entera, influye decisivamente en el desplazamiento de las plaquetas hacia la periferia vascular<sup>16</sup>. Valores elevados de hematocrito incrementan este desplazamiento, favoreciendo la interacción de las plaquetas con las estructuras subendoteliales<sup>17</sup>. El tamaño y la deformabilidad de los eritrocitos son también factores importantes sobre el desplazamiento plaquetario y la función hemostática, de manera que los eritrocitos de mayor tamaño y más rígidos tienen mayor poder de empuje y favorecen la interacción plaquetaria con el subendotelio<sup>18,19</sup>.

Es interesante destacar que las plaquetas activadas liberan a su vez sustancias que reducen la deformabilidad eritrocitaria, originando un fenómeno de retroalimentación que puede favorecer la hemostasia local<sup>20</sup>. Finalmente, la agregación eritrocitaria tiene asimismo su papel, ya que una alta agregabilidad de los eritrocitos tenderá a favorecer que éstos circulen donde las tensiones de cizalladura son mínimas, esto es, en la zona central del flujo, con las plaquetas circulando por la zona periférica del vaso<sup>6</sup>. Aunque la relevancia de la agregación eritrocitaria sobre la hemostasia es incierta, el fenómeno no debe ser relegado, toda vez que alteraciones de la agregación eritrocitaria asociadas a la enfermedad tromboembólica<sup>21</sup>.

### Activación de las plaquetas en respuesta al flujo

Además de la influencia pasiva que el flujo sanguíneo ejerce sobre la función hemostática de las plaquetas, a causa de la acción de empuje ejercida por los eritrocitos desplazándolas hacia las inmediaciones de la pared vascular, los eritrocitos tienen a su vez un destacado papel activo en la activación plaquetaria bajo condiciones de flujo<sup>22</sup>, principalmente debido a su capacidad de liberar y recaptar sustancias agregantes o antiagregantes, como ADP y adenosina, respectivamente<sup>23</sup>.

Las propias fuerzas mecánicas derivadas del flujo tienen a su vez un papel activador directo sobre las plaquetas aun en ausencia de otras células y de agentes agonistas exógenos, existiendo evidencia de que múltiples ligandos y mecanismos de activación tie-



**Tabla 1. Valores característicos de índice de cizalladura (IC) dentro de la vasculatura humana**

Vaso	IC (s <sup>-1</sup> )
Capilares	2.500
Arteriolas	1.900
Pequeñas arterias	1.500
Arteria típica	800-1.000
Grandes arterias	300-500
Grandes venas	200
Vena típica	40-150

nen preponderancia dependiendo de las diferentes condiciones de flujo existentes en el árbol vascular<sup>24</sup> (Tabla 1).

### Eventos a altos índices de cizalladura

A altos índices de cizalladura, tales como los que se dan en pequeñas arterias, la adhesión de las plaquetas es altamente dependiente de la interacción entre el factor de von Willebrand (FVW), ya sea plasmático o inmovilizado en la pared vascular, que se une preferentemente a colágeno tipo I y III, y del complejo formado por las glicoproteínas Ib, IX y V (GPIb/IX/V) de la plaqueta<sup>25</sup>. Existen diferentes causas que determinan la preponderancia del FVW en el proceso de adhesión plaquetaria a altos índices de cizalladura, como es, por ejemplo, su gran tamaño de estructura multimérica, que le facilita un mayor número de puntos de anclaje tanto al sustrato como a los receptores plaquetarios; la eficiencia del FVW en la captura de plaquetas circulantes por su gran afinidad al complejo GPIb/IX/V; la posible dependencia del flujo de la propia estructura globular del FVW que facilitaría la disponibilidad de sitios de enlace al receptor; y el hecho de que el enlace VWF-GPIb/IX/V está modulado positivamente por el flujo<sup>26</sup>.

La interacción entre VWF y el complejo GPIb/IX/V es el suceso inicial que conduce a la activación plaquetaria, tras la cual se inicia un proceso de transducción de señal entre cuyos efectos está la activación de la GPIIb/IIIa, que a su vez es capaz de unirse al FVW y potenciar el proceso de adhesión plaquetaria en una unión más firme, así como de unirse al fibrinógeno para inducir la formación de agregados formando puentes con otras plaquetas<sup>27</sup>. Se considera que en los primeros momentos de la adhesión, cuando han tenido lugar los enlaces entre el VWF y la GPIb/IX/V, por efecto del flujo las plaquetas efectúan movimiento de rodamiento por la superficie vascular dañada, similar al que se observa en los leucocitos sobre las células endoteliales en los sitios de inflamación, hasta que se forman los enlaces más firmes mediados por la GPIIb/IIIa<sup>28</sup>.

### Eventos a bajos índices de cizalladura

A índices de cizalladura menores de 800-1000 s<sup>-1</sup>, el fibrinógeno pasa a ser la proteína con papel dominante como ligando en la agregación plaquetaria y la formación del trombo. Aunque tanto el fibrinógeno como el FVW y la fibronectina tienen una afinidad similar para la GPIIb/IIIa y compiten por el enlace, la mayor proporción molar del fibrinógeno en plasma en relación con las otras proteínas determina esta predominancia a bajos índices de cizalladura<sup>29</sup>.

### Implicaciones de los fenómenos hemorreológicos en la trombosis

Ya desde hace años se ha distinguido que las enfermedades tromboticas pueden dividirse entre aquellas que afectan al sistema arterial y las que afectan al sistema venoso<sup>30,31</sup>. Las diferencias de flujo sanguíneo existentes en ambos ramales del árbol vascular se reflejan en el tipo de trombo que puede observarse en cada una de ellas, según predominen las plaquetas o la fibrina (Figura 2).

Es importante destacar que, al contrario de lo que sucede con los elementos formes de la sangre, la circulación y el transporte de factores solubles de la coagulación no se ven afectados por las propiedades reológicas sanguíneas propias de fluido no newtoniano. Su acercamiento, disponibilidad o eliminación de las zonas de lesión vascular donde deben actuar están sujetos tan solo a los fenómenos clásicos de transporte, convección y difusión<sup>32</sup>.

### Trombosis arterial

Las características del flujo arterial, cuyos índices de cizalladura se hallan entre 200 y 2.000 s<sup>-1</sup> según el tipo de arteria, se sitúan en el rango óptimo para favorecer el transporte y deposición de plaquetas en la zona vascular dañada. La coagulación se inicia simultáneamente cuando queda expuesto el factor tisular (FT) subendotelial, que se unirá al FVII activándolo para formar el complejo FT/FVIIa. El transporte por difusión hace que el FX acceda al FT/FVIIa<sup>33</sup>, activándolo, a partir del cual se desencadena una serie de activaciones en cadena sobre los factores de la coagulación que desembocan en la formación de trombina, que inducirá la polimerización del fibrinógeno soluble en hebras de fibrina insoluble que estabilizarán el agregado plaquetario<sup>34</sup>. Como resultado, el trombo arterial característico está formado mayoritariamente por plaquetas, unidas entre sí por una más o menos densa malla de fibrina, y se le conoce también como "trombo blanco", dado su color a simple vista.



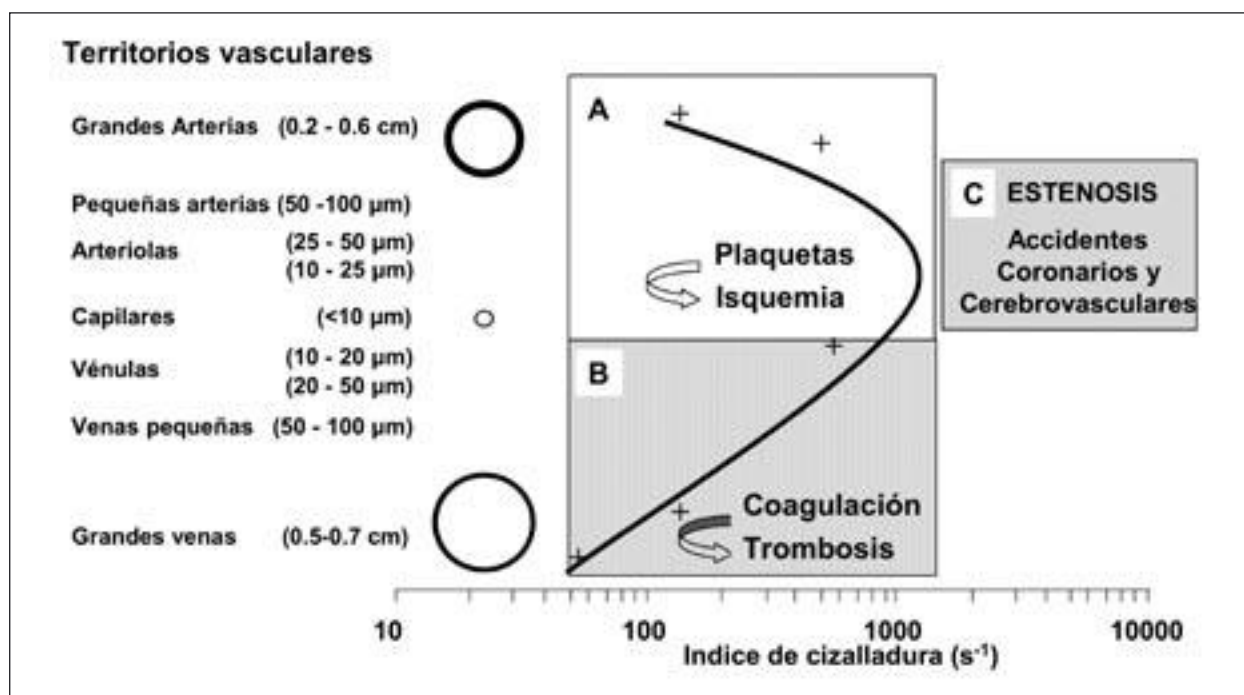


Figura 2. Variaciones del índice de cizalladura en diferentes territorios vasculares. Las áreas A y B corresponden a las situaciones fisiológicas. A) La sangre impulsada por el corazón entra a gran velocidad de flujo en arterias de gran calibre (aorta) cuyo tamaño y elasticidad compensan y hacen que el índice de cizalladura (impacto y rozamiento de los elementos formes con la pared) sea relativamente bajo. A medida que la sangre avanza a través de vasos más estrechos el índice de cizalladura se eleva, hasta llegar a un máximo en el territorio capilar; B) la situación de la circulación arterial se invierte a medida que la sangre retorna del territorio vascular a través de la vénulas. La velocidad de la sangre disminuye en el territorio venoso en el que la velocidad de flujo es baja, incluso negativa, y la luz venosa se va ampliando. El índice de cizalladura es mínimo en las venas de mayor calibre. C) En condiciones patológicas, como se pueden dar en arterias con lesiones arterioscleróticas estenosantes, los índices de cizalladura pueden alcanzar valores por encima de  $2.500 s^{-1}$ . Estos valores elevados y la posibilidad de exposición de elementos del subendotelio, por ruptura accidental de las placas, generan situaciones que favorecen la interacción de las plaquetas y la precipitación de complicaciones isquémico trombóticas (Baumgartner, 1973).

En condiciones patológicas de flujo, como las que se dan en zonas con lesión aterosclerótica, puntos de prótesis vascular o uniones anastomóticas, existen irregularidades topológicas y geométricas en el vaso que dan lugar al desarrollo de pautas de flujo complejas que pueden favorecer la trombosis. Resultan de particular interés las regiones arterioscleróticas con estenosis resultante del estrechamiento de la luz vascular. El flujo de sangre sufre una aceleración al atravesar la angostura de paso, pudiéndose alcanzar índices de cizalladura superiores a los  $10.000 s^{-1}$  en estos puntos<sup>35</sup>, seguido de un efecto de redirección, flujo turbulento y recirculación a la salida de la estenosis. La ruptura de una placa aterosclerótica inestable exponiendo componentes de matriz extracelular y un tejido rico en lípidos, combinada con las condiciones de flujo derivadas de la estenosis (Figura 2C), desencadena una rápida respuesta de adhesión y agregación plaquetaria y de coagulación para formar un trombo que puede llegar a bloquear el flujo sanguíneo<sup>36</sup>.

El propio flujo tiene también una implicación directa en el desarrollo y evolución de la aterosclerosis (Figura

3). Por ello, la aterosclerosis se desarrolla preferentemente en regiones de las arterias expuestas a condiciones específicas de flujo y turbulencia<sup>37</sup>. Las condiciones de flujo tiene también una gran influencia en los fenómenos de translocación e infiltración de leucocitos proinflamatorios (Figura 4).

Las condiciones de inflamación reinantes en la zona de lesión aterosclerótica en desarrollo activan las células endoteliales incrementando la expresión de moléculas proadhesivas en su superficie, como P-selectina o VCAM-1, que son reconocidas como punto de anclaje por los receptores de los leucocitos, como L-selectina o integrina  $\alpha 4\beta 7$ .

La adhesión de los leucocitos al endotelio se ve también favorecida en condiciones de flujo por el efecto de empuje de los eritrocitos. No obstante, el flujo también favorece el efecto de arrastre de los leucocitos ya anclados al endotelio, por lo que se considera que un bajo índice de cizalladura es la situación de equilibrio óptima entre los dos efectos contrarios que maximiza las posibilidades de penetración del leucocito a la íntima<sup>38</sup>.

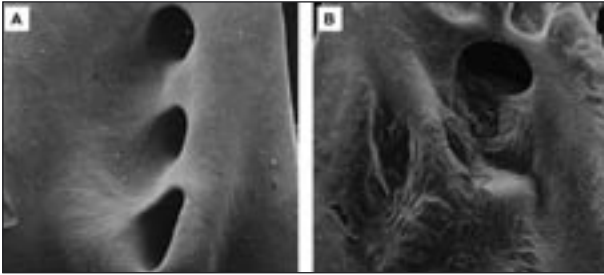


Figura 3. Las condiciones hemorreológicas condicionan la distribución de las lesiones arterioscleróticas. A) Pared arterial de la aorta de una rata normal. B) Los animales sometidos a un modelo de aterogénesis experimental desarrollan lesiones en territorios característicos como cayado aórtico, bifurcaciones a nivel de arterias renales o en zonas de tensión en las coronarias.

### Trombosis venosa

Las particulares condiciones de flujo que se dan en el árbol venoso, bajos índices de cizalladura típicamente alrededor de  $100 \text{ s}^{-1}$ , una pared vascular delgada y presencia de válvulas semilunares que impiden el retroceso de la sangre, hacen que los trombos que eventualmente puedan desarrollarse sean de características diferentes a los arteriales. La formación de fibrina se ve especialmente favorecida en los casos en que un muy bajo índice de cizalladura induce un menor efecto de arrastre de los factores de la coagulación, atrapando en la malla gran cantidad de eritrocitos, con una relativamente escasa cantidad de plaquetas. Por ello, se conoce también como “trombo rojo”.

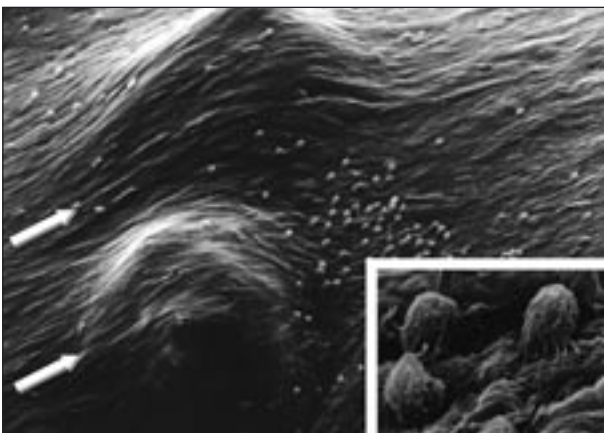


Figura 4. Las condiciones hemorreológicas favorecen también la interacción de los leucocitos con el endotelio vascular dañado. En la imagen ampliada, dos lesiones arterioscleróticas experimentales redireccionan el flujo sanguíneo y favorecen que se produzcan zonas de turbulencia y áreas protegidas del flujo en las que leucocitos y macrófagos pueden interactuar sin ser desplazados por las condiciones de flujo elevadas que se darían en condiciones fisiológicas.

Cuando existe una disfunción en las válvulas o la pared vascular está especialmente debilitada, como sucede en los casos de tromboembolismo venoso, puede llegar a producirse estasis y acumularse la sangre en la vena, causando un rápido descenso de oxigenación a nivel del bolsillo valvular, con lo que se crea el ambiente propicio para la activación de la coagulación. La hipoxia activa las células endoteliales, induciéndolas a expresar P-selectina en su superficie, sobre la que se pueden ligar microvesículas portadoras de FT, procedentes de leucocitos. A partir del FT se inicia la cascada de la coagulación y la formación de fibrina, que, bajo las condiciones de estasis en que se encuentra, atrapa numerosos eritrocitos en su crecimiento<sup>39,40</sup>.

No obstante, las diferencias existentes en la trombosis arterial y la venosa, las similitudes en su etiopatogenia hacen que exista una asociación entre ambas. Los factores de riesgo más importantes para la trombosis arterial (tabaquismo, hipertensión arterial, diabetes y dislipidemia) pueden inducir un efecto protrombótico que podrían predisponer a un riesgo incrementado de padecer trombosis venosa. Inversamente, pacientes con tromboembolismo venoso se encontrarían en riesgo de padecer subsiguiente aterotrombosis<sup>41,42</sup>.

### Conclusiones

- El entorno hemorreológico facilita el establecimiento de relaciones entre las plaquetas y la pared vascular y condiciona los mecanismos de la hemostasia y reparación de la pared arterial.
- Las condiciones hemorreológicas facilitan interacciones celulares y moleculares que tienen un papel clave no sólo en la etiopatogenia de la arteriosclerosis sino también en el desencadenamiento de complicaciones isquémico-trombóticas.
- Mientras que las implicaciones de la hemorreología en la fisiología de la hemostasia y el desarrollo de complicaciones trombóticas son evidentes, el interés médico-terapéutico en estos fenómenos es relativo, quizá debido a la dificultad de que puedan ser modulados farmacológicamente.

### Bibliografía

1. Sun C, Munn LL. Particulate nature of blood determines macroscopic rheology: a 2-D Lattice Boltzmann Analysis. *Biophysical J* 2005; 88: 1635-45.
2. Berga L. Estudio del comportamiento reológico de la sangre humana. Aplicaciones al flujo sanguíneo. Monografía Juan March, Barcelona, 1979.
3. Pries AR, Neuhaus D, Gaehtgens P. Blood viscosity in tube flow: dependence on diameter and hematocrit. *Am J Physiol* 1992; 263: H1770-8.
4. Baumgartner HR. The role of blood flow in platelet adhesion, fibrin deposition and formation of mural thrombi. *Microvasc Res* 1973; 5: 167-79.

5. Turitto VT, Baumgartner HR. Platelet deposition on subendothelium exposed to flowing blood: mathematical analysis of physical parameters. *Transact Am Soc Artif Int Org* 1977; 11: 619-32.
6. Aarts PA, van den Broek SA, Prins GW, Kuiken GD, Sixma JJ, Heethaar RM. Blood platelets are concentrated near the wall and red blood cells, in the center in flowing blood. *Arteriosclerosis*. 1988; 8: 819-24.
7. Blann A, Bignell A, McCollum C. von Willebrand factor, fibrinogen and other plasma proteins as determinants of plasma viscosity. *Atherosclerosis* 1998; 139: 317-22.
8. van Breugel HF, de Groot PG, Heethaar RM, Sixma JJ. Role of plasma viscosity in platelet adhesion. *Blood* 1992; 80: 953-9.
9. Junker R, Heinrich J, Ulbrich H, Schulte H, Schonfeld R, Kohler E, Assmann G. Relationship between plasma viscosity and the severity of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 870-5.
10. Heinrich J, Assmann G. Fibrinogen and cardiovascular risk. *J Cardiovasc Risk* 1995; 2: 197-205.
11. Kung-Ming J. Red cell interaction in macromolecular suspensions. *Biorheology* 1979; 16: 137-43.
12. Stuart J, Kenny MW. Blood rheology. *J Clin Pathol* 1980; 33: 417-29.
13. Bozzo J, Hernández MR, Galán AM, Heras M, Ordinas A, Escolar G. Impaired antiplatelet effects of aspirin associated with hypoxia and ATP release from erythrocytes: studies in a system with flowing human blood. *Eur J Clin Invest* 1999; 29: 438-44.
14. Mohandas N, Chasis JA. Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. *Semin Hematol* 1993; 30: 171-92.
15. Uijtterwaal WJ, Hijhof EJ, Bronkhorst PJH, Hartog ED, Heethaar RM. Near-wall excess of platelets induced by lateral migration of erythrocytes in flowing blood. *Am J Physiol* 1993; 264: H1239-44.
16. Tilles AW, Eckstein EC. The near-wall excess of platelet-sized particles in blood flow: its dependence on hematocrit and wall shear rate. *Microvasc Res* 1987; 33: 211-33.
17. Escolar G, Garrido M, Mazzara R, Castillo R, Ordinas A. Experimental basis for the use of red cell transfusion in the management of anemic-thrombocytopenic patients. *Transfusion*. 1988; 28: 406-11.
18. Aarts PAMM, Bolhuis PA, Sakariassen KS, Heethaar RM, Sixma JJ. Red blood cell size is important for adherence of blood platelets to artery subendothelium. *Blood* 1983; 62: 214-20.
19. Aarts PAMM, Heethaar RM, Sixma JJ. Red blood cell deformability influences platelet-vessel wall interaction in flowing blood. *Blood* 1984; 64: 1228-33.
20. Palinski W, Torsellini A, Doni L. Influence of platelet activation on erythrocyte deformability. *Thromb Haemost* 1983; 49: 84-6.
21. Boss N, Wietelmann H, Bierner M, Rudolph W, Schlepper M, Koenig-Erich S, Ruhentrost-Bauer G. Red blood cell aggregation in men with coronary artery disease. *Eur J Cardiol* 1980; 12: 47-54.
22. Goldsmith HL, Bell DN, Braovac S, Steinberg A, McIntosh F. Physical and chemical effects of red cells in the shear-induced aggregation of human platelets. *Biophys J* 1995; 69: 1584-95.
23. Alkhamis TM, Beissinger RL, Chediak JR. Artificial surface effect on red blood cells and platelets in laminar shear flow. *Blood* 1990; 75: 1568-75.
24. Goldsmith HI, Turitto VT. Rheological aspects of thrombosis and hemostasis: basic principles and applications. *Thromb Haemost* 1986; 55: 415-35.
25. Ruggeri ZM. Old concepts and new developments in the study of platelet aggregation. *J Clin Invest* 2000; 105: 699-701.
26. Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 1996; 84: 289-97.
27. De Marco L, Girolami A, Russell S, Ruggeri ZM. Interaction of asialo von Willebrand factor with glycoprotein Ib induces fibrinogen binding to the glycoprotein IIb/IIIa complex and mediates platelet aggregation. *J Clin Invest* 1985; 75: 1198-203.
28. Dopheide SM, Maxwell MJ, Jackson SP. Shear-dependent tether formation during platelet translocation on von Willebrand factor. *Blood* 2002; 99: 159-67.
29. Galnick HR, Williams SB, Collier BS. Fibrinogen competes with von Willebrand factor for binding to the glycoprotein IIb/IIIa complex when platelets are stimulated with thrombin. *Blood* 1984; 64: 707-800.
30. Jorgensen L. Experimental platelet and coagulation thrombi: a histological study of arterial and venous thrombi of varying age in untreated and heparinized rabbits. *APMS* 1964; 62: 189-223.
31. Sevitt S. The structure and growth of valve-pocket thrombin in femoral veins. *J Clin Pathol* 1974; 27: 517-28.
32. Hatlock JJ. Flow effects on coagulation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1729-37.
33. Contino PB, Andree HA, Nemerson Y. Flow dependence of factor X activation by tissue factor-factor VIIa. *J Physiol Pharmacol* 1994; 45: 81-90.
34. Mann KG, Butenas S, Brummel K. The dynamics of thrombin formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 17-25.
35. Siegel JM, Markou CP, Ku DN, Hanson SR. A scaling law for wall shear rate through an arterial stenosis. *J Biomech Eng* 1994; 116: 446-51.
36. Vorchheimer DA, Becker R. Platelets in atherothrombosis. *Mayo Clin Proc* 2006; 81: 59-68.
37. Caro CG. Discovery of the role of wall shear in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 158-61.
38. Zhu C, Yago T, Lou J, Zarnitsyna VI, McEver RP. Mechanisms for flow-enhanced cell adhesion. *Ann Biomed Eng* 2008; 36: 604-21.
39. López JA, Kearon C, Lee AYYI. Deep venous thrombosis. *Hematology. Am Soc Hematol Educ Program* 2004: 439-56.
40. Michota F. Venous thromboembolism: epidemiology, characteristics, and consequences. *Clin Cornerstone* 2005; 7: 8-15.
41. Ageno W, Dentali F. Venous thromboembolism and arterial thromboembolism. Many similarities, far beyond thrombosis per se. *Thromb Haemost* 2008; 100: 181-3.
42. Franchini M, Mannucci PM. Venous and arterial thrombosis: different sides of the same coin? *Eur J Intern Med* 2008; 19: 476-81.

## SERPINAS HEMOSTÁTICAS

I. MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, A. ORDÓÑEZ,  
V. VICENTE, J. CORRAL

*Centro Regional de Hemodonación.*

*Servicio de Hematología y Oncología Médica.*

*Hospital Universitario Morales Meseguer. Murcia*

---

### Introducción

La hemostasia y la fibrinólisis son los sistemas que garantizan un correcto flujo sanguíneo así como una adecuada respuesta procoagulante cuando es ne-





litan un plegamiento incorrecto que conduce a la formación de polímeros inactivos. Mediante este mecanismo, estos factores pueden conducir al desarrollo de un tipo particular de enfermedades conformacionales denominadas *serpinopatías*<sup>2</sup>.

Se han identificado en las serpinas diferentes modificaciones postraduccionales (glicosilación, sulfatación, fosforilación y oxidación) cuyo papel fisiopatológico puede ser relevante.

### Mecanismo de inhibición de las serpinas

Un esquema minimalista de la cinética de inhibición de las serpinas consta de dos pasos: 1) la formación de un complejo michaeliano, donde la secuencia del RCL es reconocida por la proteasa como un sustrato; y 2) la formación de un complejo covalente donde la proteasa es atrapada en un estado inactivo. Las frecuencias de formación y disociación del complejo reversible michaeliano, junto con la colocalización de proteasa e inhibidor en los tejidos determina la especificidad de esta interacción<sup>2-4</sup>. Mientras el obligatorio contacto entre el RCL y el centro activo de la proteasa contribuye significativamente a la formación del complejo michaeliano, las interacciones en el entorno también pueden estar implicadas. Como con los sustratos de las serinoproteasas, este paso prosigue con el ataque nucleofílico del puente peptídico entre los residuos P1-P1' mediante la serina catalítica de la proteasa (Figura 3).

Este último paso concluye con la formación de un enlace esterecovalente entre el residuo P1 de la serpinina y la serina catalítica de la proteasa (intermedio acil-enzima) y, por tanto, con la separación de los residuos P' del sitio activo de la proteasa. En este estado, la serpinina adopta rápidamente la conformación de menos coste energético a través de la incorporación de la porción N-terminal del RCL en la hoja  $\beta$  central formando la s4A. Este movimiento transloca a la proteasa al polo opuesto de la serpinina, y provoca la distorsión conformacional del sitio catalítico de la proteasa (Figura 3)<sup>5</sup>. Este mecanismo de inhibición por autodestrucción irreversible es extraordinariamente eficaz y potente, lo que justifica que sea ampliamente empleado en la regulación de la hemostasis y fibrinólisis.

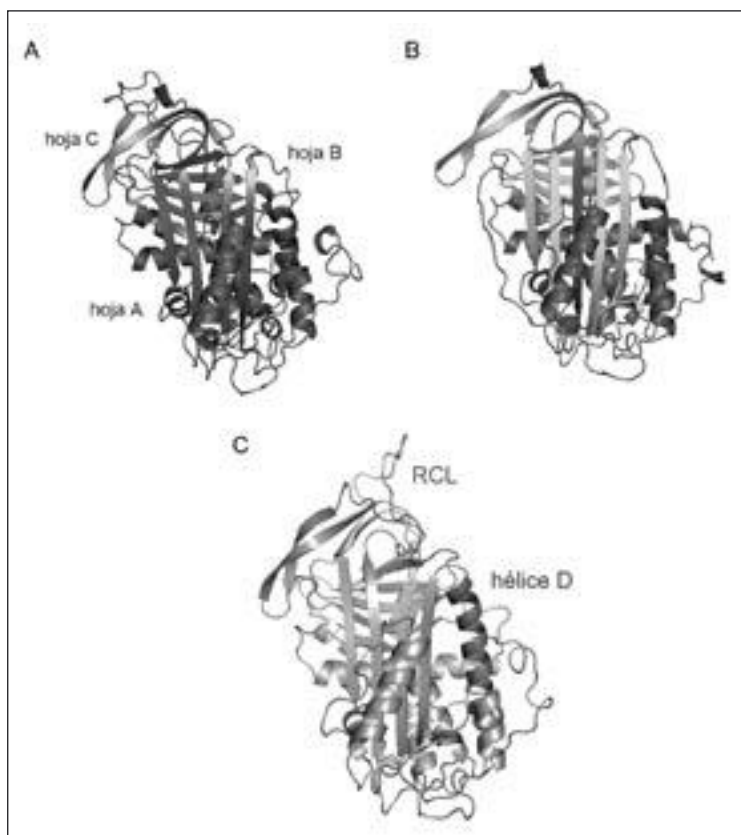


Figura 2. Estructura general de serpinas. A) Conformación nativa. Las hojas A, B y C están coloreadas en azul, gris y amarillo, respectivamente. B) Conformación latente. El centro reactivo (RCL) pasa a formar parte de la hoja A al insertarse como una nueva hebra, coloreada en verde. C) Conformación activa. El RCL se expone al medio (coloreado en amarillo) y la hélice D (coloreada en verde), experimenta un nuevo giro en el extremo N-terminal.

### Interacciones con cofactores

Puesto que la especificidad de la serpinina se determina ampliamente por la frecuencia de formación del complejo michaeliano, los cofactores que se unen a las serpinas (y a veces a la proteasa objeto) pueden alterar radicalmente la especificidad<sup>6</sup>. El cofactor para las serpinas mejor entendido es la heparina y sustenta el potencial terapéutico anticoagulante de esta molécula. La heparina se une a la mayoría de las serpinas implicadas en hemostasia y trombosis (Figura 2C). La aceleración en la inhibición de la proteasa es conferida principalmente a través de un efecto "patrón" donde la proteasa y la serpinina se unen a la misma cadena de heparina (Figura 3). La hipótesis es que la co-ocupación limita la libertad difusional a una sola dimensión e incrementa la probabilidad del encuentro. Además, la heparina también actúa como un puente entre serpinina y proteasa para ayudar a estabilizar el complejo de Michaelis. La heparina y otros glicosaminoglicanos son capaces en algunas serpinas (los mejor caracterizados son anti-trombina y cofactor II de heparina) de alterar su con-



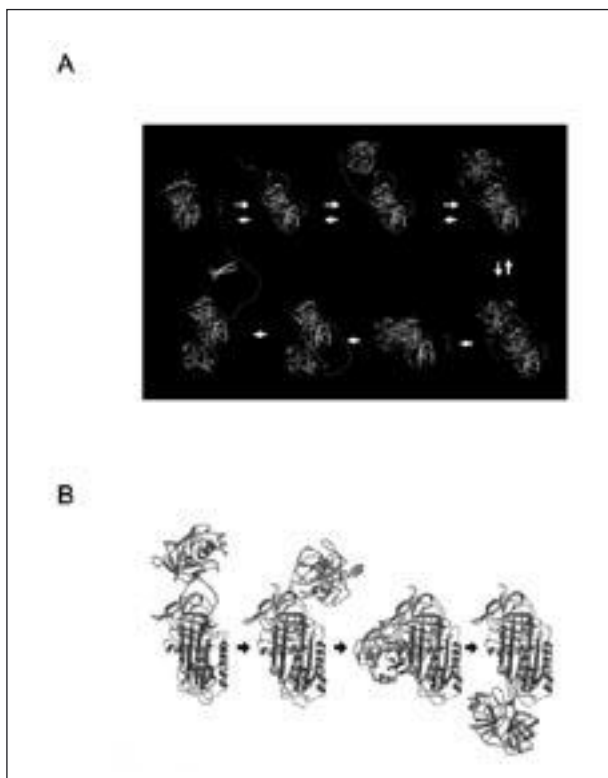


Figura 3. Mecanismo de acción de las serpinas. A) Inhibición de la trombina por el cofactor II de heparina. La extensión en N-terminal se representa coloreada en rosa. B) Inhibición de la trombina por la antitrombina.

formación, generando una forma activa que facilita la interacción con la proteasa.

### Serpinas hemostáticas

Brevemente describiremos las serpinas con un papel en hemostasia, centrándonos en las más relevantes.

#### $\alpha$ 1-antitripsina ( $\alpha$ 1-AT): *SERPINA1*

Esta glicoproteína de síntesis hepática de 51 kDa tiene una alta concentración plasmática (1,3 mg/mL) y una vida media de 4,5 días. Su diana fisiológica es la elastasa de neutrófilos, pero también inhibe a la proteína C activada (APC) de forma independiente de heparina. Algunos autores sugieren que la inhibición del APC causada por el aumento de  $\alpha$ 1-AT en infarto isquémico, particularmente en niños, podría contribuir al desarrollo de esta patología<sup>6</sup>. Pero en términos generales no se da mucho valor a la contribución de la  $\alpha$ 1-AT en la coagulación. Destacamos la variante Pittsburgh, pues la mutación M358R en el RCL transforma la  $\alpha$ 1-AT en un potente inhibidor de di-

versas serinaproteasas de la cascada de la coagulación, especialmente trombina y APC, de forma independiente de heparina u otros cofactores, lo que justifica el severo sangrado de los pacientes con esta mutación<sup>5</sup>.

$\alpha$ 1-AT es el paradigma de las serpinas, y el estudio de su estructura, plegamiento y deficiencia ha servido como base para el estudio de diversas serpinopatías.

#### Antitrombina: *SERPINC1*

Es una glicoproteína hepática de 58 kDa que se secreta al plasma, donde circula a una concentración de 150  $\mu$ g/mL con una vida media de 3 días<sup>7</sup>. Se trata sin duda de la principal serpina hemostática, y el inhibidor fisiológico más importante de la cascada de la coagulación. Como su nombre indica es el principal inhibidor de trombina, pero también inhibe FVIIa, FIXa, FXa, FXIa y FXIIa. Su actividad anticoagulante predominante se debe a la inhibición de FXa y trombina.

La actividad anticoagulante de la antitrombina es dependiente de su cofactor heparina. *In vivo*, las formas de heparina que son relevantes para la antitrombina incluyen el heparán sulfato, que se encuentra en el endotelio, y la heparina liberada de los gránulos de los mastocitos asociados al endotelio. La interacción de la antitrombina con el heparán sulfato en el endotelio y el subendotelio localiza la actividad inhibitoria a la pared del vaso y mantiene su naturaleza no trombogénica<sup>7</sup>.

En el plasma existen diferentes isoformas de antitrombina definidas por su glicosilación. La glicofoma  $\alpha$  (90% de la antitrombina total) tiene N-glicosilación en N96, N135, N155 y N192. La glicofoma  $\beta$  (10%) carece de glicosilación en posición N135, lo que explica, por menor impedimento estérico, la mayor afinidad por heparina de esta forma (Figura 4). También existe una heterogeneidad conformacional, pues, además de la forma nativa mayoritaria, un 5% de la antitrombina plasmática adopta la conformación latente, no inhibitoria.

Además de su actividad anticoagulante, la antitrombina ha demostrado funciones antiinflamatorias y antiangiogénicas. Estas propiedades son independientes de su actividad inhibitoria. La antitrombina regula la inflamación mediante señalización a través de heparán sulfato en la superficie del endotelio y de su unión al syndecan 4 en los leucocitos. Las formas rota y latente de la antitrombina tienen potente actividad anti-angiogénica, pues bloquean la formación de complejos de señalización entre el factor 2 de crecimiento de fibroblastos y el factor de crecimiento del endotelio vascular con sus proteínas receptoras<sup>8</sup>.

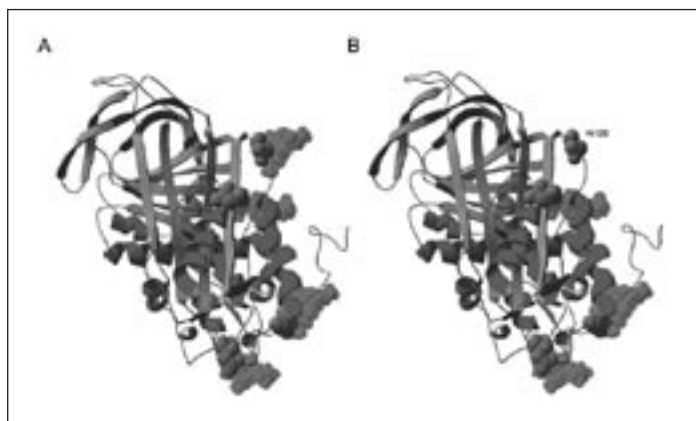


Figura 4. Isoformas de la antitrombina. A) Isoforma  $\alpha$ . B) Isoforma  $\beta$ . Los glicanos se representan coloreados en verde.

### La antitrombina en la enfermedad tromboembólica

La deficiencia de antitrombina tanto heredada como adquirida aumenta el riesgo trombótico. La deficiencia congénita de antitrombina puede ser clasificada como de tipo I o como de tipo II. Las deficiencias de tipo I, que generalmente confieren un elevado riesgo trombótico, son causadas por mutaciones que impiden la síntesis o secreción de la proteína. Las deficiencias de tipo II son causadas por mutaciones que provocan un anormal funcionamiento de la proteína y muestran mayor heterogeneidad clínica. Son ya varias las mutaciones que inducen cambios conformacionales, facilitando la transición a forma latente o induciendo la formación de oligómeros o polímeros. Existen otras mutaciones que, además de la pérdida de función anticoagulante, causan una ganancia de función protrombótica. Es el caso de los mutantes de P1 (deleción de R393, R393C y R393H). La pérdida del puente salino que se establece entre E237 y P1 (Figura 5) provocada por estas mutaciones hace que el RCL no se encuentra anclado al *core* de la proteína, afectando al sitio de unión a heparina, incrementando la afinidad por heparina. De esta forma, en condiciones limitantes de heparina, el glicosaminoglicano se uniría preferentemente a las formas mutadas, impidiendo la activación de la antitrombina silvestre y, por tanto, aumentando el riesgo trombótico.

La incidencia de deficiencia congénita de antitrombina es baja en pacientes con trombosis venosa (1-8%) pero aumenta significativamente el riesgo trombótico y de recurrencia, por lo que está justificada su inclusión en estudios de trombofilia. Su incidencia en población general es muy baja. Sin embargo, la antitrombina Cambridge (A384S), que no se identifica con ensayos anti-FXa o antigénicos, es la deficiencia congénita más frecuente (0,2% de la pobla-

ción general y 1,7% en pacientes con trombosis venosa) e incrementa moderadamente el riesgo trombótico, tanto en trombosis venosa como arterial<sup>10</sup>. Finalmente, no se han descrito polimorfismos en el gen codifica para antitrombina, lo que refleja su sensibilidad conformacional y funcional debido a su papel clave en hemostasia. Sin embargo, la actividad de la antitrombina es muy heterogénea entre la población general y la base molecular de esta heterogeneidad es poco conocida. Recientemente, hemos identificado el efecto funcional del polimorfismo rs2227589 (786 G>A) en el intrón 1 que justifican el moderado riesgo trombótico asociado con este polimorfismo<sup>9</sup>.

Otro de los aspectos que merecen una especial atención es la importancia de la glicosilación en la antitrombina. Alteraciones en el patrón de glicosilación, como la adición de una fucosa en la zona inicial del glicano, pueden provocar la pérdida de afinidad por heparina y, en consecuencia, una alteración en la funcionalidad.

Determinadas condiciones ambientales pueden provocar también efectos conformacionales en la proteína que conlleven interacciones intermoleculares dando lugar a la formación de dímeros, oligómeros y polímeros<sup>5</sup>. Así el calor y el pH inducen la transformación a las formas más estables: latente y polímeros. Recientemente se ha descrito la particular sensibilidad estructural de la antitrombina a nivel intracelular que, ante determinadas condiciones ambientales, como el tratamiento con L-asparaginasa, queda retenida como consecuencia de la formación de cuerpos de inclusión en el retículo endoplásmico de hepatocitos, que recuerdan a la forma Z de la  $\alpha$ 1-antitripsina<sup>11</sup>.

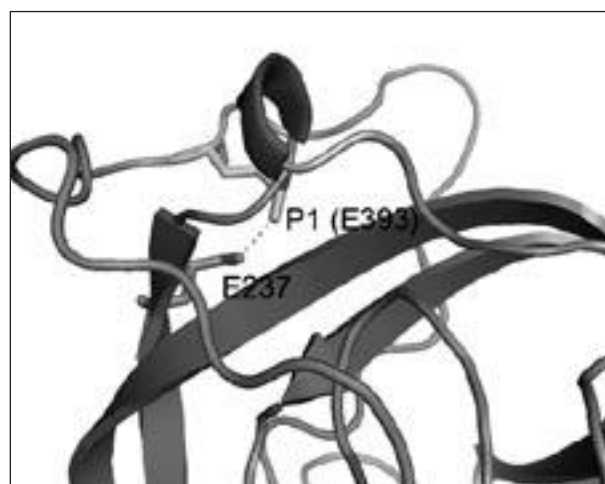


Figura 5. Representación del puente salino entre Arg393 y Glu237, que mantiene la conformación nativa de la antitrombina.

### **Cofactor II de heparina (CIIH): SERPIND1**

El CIIH es una glicoproteína de 66,5 kDa y síntesis hepática que se secreta al plasma, donde alcanza una concentración de 80 µg/mL y tiene una vida media de 2-3 días. El CIIH inhibe a la trombina en presencia de diferentes moléculas polianiónicas incluyendo a la heparina, heparán sulfato y dermatán sulfato. De hecho, el 20-30% de la inhibición de la trombina en la coagulación es mediada por el CIIH<sup>12</sup>. La presencia de un hexasacárido único dentro del dermatán sulfato parece ser el responsable de su unión con alta afinidad al CIIH. El dermatán sulfato es un cofactor específico de CIIH ya que no acelera la actividad de ninguna otra serpina. Recientemente se ha mostrado que la heparina más corta capaz de unirse con alta afinidad al CIIH tiene 14 unidades monosacarídicas y que el principal efecto de aceleración es debido al cambio alostérico en la conformación del CIIH, y no a un proceso de activación similar al que ocurre con la antitrombina<sup>5</sup>. Esta proteína tiene una extensión en N-terminal de 80 aminoácidos que contiene dos regiones ácidas críticas para su actividad antitrombina asociada a glicosaminoglicanos (Figura 3A).

La deficiencia de CIIH en humanos y en ratones no incrementa el riesgo de trombosis venosa. Sin embargo, ratones deficientes en CIIH forman trombos oclusivos más rápido que los controles tras el daño fotoquímico del endotelio de la arteria carótida. Estos resultados sugieren que el CIIH, al inhibir la función mitogénica, quimiotáctica y proliferativa que la trombina realiza en células del endotelio vascular, células del músculo liso vascular, macrófagos y fibroblasto, podría proteger del desarrollo de aterosclerosis y restenosis. También se han identificado mutaciones con efecto conformacional en el CIIH<sup>13</sup>.

### **Inhibidor de la proteasa dependiente de proteína Z (ZPI): SERPINA10**

El ZPI es una glicoproteína hepática de 72 kDa, que se secreta al plasma, donde alcanza una concentración de 1,5 µg/mL. En presencia de proteína Z, fosfolípidos y calcio, el ZPI inhibe rápidamente al FXa. En ausencia de cofactores, el ZPI inhibe además al FXIa y su inhibición puede acelerarse dos veces mediante su unión a heparina. Se piensa que la principal función fisiológica del ZPI es atenuar la respuesta de la coagulación de forma previa a la formación del complejo protrombinasa. En humanos, mutaciones en ZPI se asocian con un riesgo incrementado de trombosis venosa<sup>5,14,15</sup>. Además, menores niveles plasmáticos de proteína Z tienen como consecuencia un riesgo trombótico agravado en humanos y ratones por el factor V Leiden (FV Leiden). Un reciente trabajo demuestra que tanto ratones *knock out*

para proteína Z como para ZPI tienen un mayor riesgo trombótico, siendo los deficientes en ZPI los que presentan un fenotipo más severo. Los ratones deficientes en proteína Z mueren al nacimiento, mientras que los deficientes en ZPI mueren durante la gestación y en el periodo perinatal. En ambos casos, la muerte tiene lugar por coagulación intravascular y hemorragia<sup>16</sup>, lo que confirma la importancia hemostática del ZPI.

### **Inhibidor de la proteína C (PCI): SERPINA5**

El PCI es una glicoproteína de 57 kDa, y circula a una concentración de 5 µg/mL. Se encuentra en otros fluidos del cuerpo como la orina, saliva, fluido amniótico, leche, lágrimas y fluido seminal. El PCI es una proteína de unión a heparina que inhibe múltiples proteasas, incluyendo el APC, trombina libre y trombina unida a trombomodulina, tPA y uPA. El PCI puede, por tanto, desempeñar tanto funciones anticoagulantes como procoagulantes, dependiendo de la proteasa diana y de la presencia de cofactores específicos. En presencia de heparina, el PCI es anticoagulante, inhibiendo el corte proteolítico del fibrinógeno mediado por trombina. Sin embargo, en presencia de trombomodulina, el PCI es procoagulante, inhibiendo la activación de la proteína C a través de trombina. El RCL del PCI es inusualmente largo y flexible, respondiendo a su amplia especificidad de proteasa, y el sitio de unión a heparina está situado a lo largo de la hélice básica H, cerca del sitio de interacción con la proteasa, lo que explica el diferente efecto que la heparina puede tener sobre la actividad del PCI (acelerar la inhibición de sus proteasas o suprimirla).

El PCI no se sintetiza en el hígado de ratones, así que es improbable que juegue un papel en la hemostasia o fibrinólisis del ratón. Ratones transgénicos que sobre-expresan PCI humano han demostrado la capacidad del PCI para inhibir trombina, APC y tPA. Estos ratones tienen menores niveles de complejos TAT que los de control, lo que sugiere que el PCI compite con la antitrombina en la inhibición de trombina. Además, se observa un descenso en los niveles de tPA libre y, en consecuencia, de la fibrinólisis. Finalmente, el tratamiento con APC de la endotoxemia en estos ratones es menos eficaz por tener menor capacidad anticoagulante y antiinflamatoria<sup>17</sup>.

### **α2-antiplasmina (α2-AP): SERPINF2**

La α2-AP es una glicoproteína hepática de 63 kDa. Circula en el plasma a 70 µg/mL, con una vida media de 2,6 días<sup>18</sup>. La α2-AP presenta extensiones únicas en N y C terminal de 42 y 55 aminoácidos, respectivamente. Es el principal inhibidor fisiológico de la plasmina,

aunque también se ha descrito que inhibe a otras enzimas como la tripsina, la elastasa o el APC. La deficiencia homocigota de  $\alpha 2$ -AP provoca una fibrinólisis descontrolada y en consecuencia, tendencias hemorrágicas severas<sup>5</sup>.

### **Inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1): SERPINE1**

El PAI-1 es la principal serpina fibrinolítica. Se trata de una glicoproteína de 50 kDa sintetizada en las células endoteliales, plaquetas y otras células mesenquimales que rodean la vasculatura. Se trata de una serpina inestable, con una vida media de 1-2 horas en circulación, que se transforma espontáneamente a forma latente. De hecho, por esta razón, los estudios estructurales y bioquímicos realizados con PAI-1 recombinante se han realizado con una variante que tiene cuatro mutaciones que estabilizan la forma nativa.

Sin embargo, el PAI-1 mantiene su forma nativa si se une a la vitronectina, una proteína de la matriz extracelular. El complejo PAI-1-vitronectina tiene una vida media más alargada, de 4-6 horas.

El PAI-1 regula tPA y uPA y es considerado el inhibidor fisiológico de la activación del plasminógeno<sup>19</sup>. Cuando las plaquetas son activadas como consecuencia del daño vascular, liberan PAI-1, que protege el desarrollo del trombo de la fibrinólisis prematura. La unión posterior de tPA a la fibrina del trombo le protege de la inhibición por PAI-1, lo que junto a la colocación de plasminógeno, conduce a la generación de plasmina y la activación de la fibrinólisis<sup>19</sup>. PAI-1 puede inhibir también al APC y trombina en presencia de vitronectina o heparina, aunque se desconoce la importancia de estas funciones en la coagulación. Por el contrario, el APC proteoliza el PAI-1 inactivándolo.

### **PAI-1 en la enfermedad cardiovascular**

Diferentes estudios muestran que la síntesis incrementada de PAI-1 contribuye a la enfermedad cardiovascular. Múltiples factores fisiopatológicos como la diabetes o ciertos fármacos incrementan los niveles de PAI-1, e incluso se ha sugerido una regulación circadiana. También existen alteraciones genéticas que regulan los niveles de PAI-1. Dentro de este último grupo, destacamos el polimorfismo 4G/5G localizado en el promotor, pues a pesar de tener significativo efecto funcional, su asociación con la enfermedad cardiovascular es controvertida<sup>20</sup>. Experimentos con ratones deficientes en PAI-1 demuestran su papel en el desarrollo del embolismo pulmonar, y apoyan que su inhibición disminuye la mortalidad en el embolismo pulmonar agudo.

### **Conclusiones y perspectivas futuras**

Dentro de la compleja secuencia de reacciones proteolíticas que tienen lugar en la hemostasia y fibrinólisis, el papel de las serpinas como reguladoras de múltiples proteasas es crucial. Las serpinas son la proteína perfecta para ejercer esta función de control gracias a sus peculiaridades estructurales y mecanismos de control por cofactores. Los estudios de estas proteínas en general, y de la antitrombina en particular, como principal serpina hemostática, han generado resultados que son extrapolables al conjunto de la superfamilia de las serpinas, como el mecanismo de polimerización. Se han identificado mutaciones que, por diferentes mecanismos, incluido el conformacional, causan deficiencias asociadas con patologías tromboticas o hemorrágicas. Se han descrito nuevas serpinas hemostáticas y nuevos papeles en hemostasia y fuera de la hemostasia de estas serpinas. Y han permitido el desarrollo de tratamientos de gran relevancia, como las heparinas. Sin embargo, quedan cuestiones por aclarar, como el efecto que tiene la variabilidad interindividual o la heterogeneidad de estas serpinas en el riesgo trombotico o hemorrágico, la relevancia de su sensibilidad estructural en diferentes procesos o el desarrollo de nuevos fármacos que potencien o inhiban sus funciones.

### **Agradecimientos**

*Este trabajo ha sido financiado por la Fundación Séneca (04545/GERM/06), el Ministerio de Ciencia y Tecnología y Fondos FEDER (SAF2006-06242), y RETICS (RECAVA) del Instituto de Salud Carlos III. I.M.M. es investigadora de la Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias (FFIS). A.O. es becaria predoctoral del Instituto de Salud Carlos III.*

### **Bibliografía**

1. Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PG, et al. The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem* 2001; 276 (36): 33293-6.
2. Stein PE, Carrell RW. What do dysfunctional serpins tell us about molecular mobility and disease? *Nat Struct Biol* 1995; 2 (2): 96-113.
3. Gettins PG. Serpin structure, mechanism, and function. *Chem Rev* 2002; 102 (12): 4751-804.
4. Huntington JA. Shape-shifting serpins: advantages of a mobile mechanism. *Trends Biochem Sci* 2006; 31 (8): 427-35.
5. Rau JC, Beaulieu LM, Huntington JA, Church FC. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *J Thromb Haemost* 2007; 5 Suppl 1: 102-15.
6. Burghaus B, Langer C, Thedieck S, Nowak-Gottl U. Elevated alpha1-antitrypsin is a risk factor for arterial ischemic stroke in childhood. *Acta Haematol* 2006; 115 (3-4): 186-91.



7. Quinsey NS, Greedy AL, Bottomley SP, Whisstock JC, Pike RN. Antithrombin: in control of coagulation. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36 (3): 386-9.
8. Zhang W, Swanson R, Xiong Y, Richard B, Olson ST. Antiangiogenic antithrombin blocks the heparan sulfate-dependent binding of proangiogenic growth factors to their endothelial cell receptors: evidence for differential binding of antiangiogenic and anticoagulant forms of antithrombin to proangiogenic heparan sulfate domains. *J Biol Chem* 2006; 281 (49): 37302-10.
9. Antón AI, Teruel R, Corral J, Minano A, Martínez-Martínez I, Ordóñez A, et al. Functional consequences of the prothrombotic SERPINC1 rs2227589 polymorphism on antithrombin levels. *Haematologica* 2009; 94 (4): 589-92.
10. Corral J, Hernández-Espinosa D, Soria JM, González-Conejero R, Ordóñez A, González-Porrás JR, et al. Antithrombin Cambridge II (A384S): an underestimated genetic risk factor for venous thrombosis. *Blood* 2007; 109 (10): 4258-63.
11. Hernández-Espinosa D, Minano A, Martínez C, Pérez-Ceballos E, Heras I, Fuster JL, et al. L-asparaginase-induced antithrombin type I deficiency: implications for conformational diseases. *Am J Pathol* 2006; 169 (1): 142-53.
12. Tollefsen DM. Heparin cofactor II modulates the response to vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27(3): 454-60.
13. Corral J, Aznar J, González-Conejero R, Villa P, Minano A, Vaya A, et al. Homozygous deficiency of heparin cofactor II: relevance of P17 glutamate residue in serpins, relationship with conformational diseases, and role in thrombosis. *Circulation* 2004; 110 (10): 1303-7.
14. Al-Shanqeeti A, van H, V, Berntorp E, Rosendaal FR, Broze GJ, Jr. Protein Z and protein Z-dependent protease inhibitor. Determinants of levels and risk of venous thrombosis. *Thromb Haemost* 2005; 93 (3): 411-3.
15. Corral J, González-Conejero R, Soria JM, González-Porrás 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 (1): 177-83.
16. Sofi F, Cesari F, Tu Y, Pratesi G, Pulli R, Pratesi C, et al. Protein Z-dependent protease inhibitor (ZPI) and protein Z in peripheral arterial disease patients. *J Thromb Haemost* 2009; 7 (5): 731-5.
17. Nishii Y, Gabazza EC, Fujimoto H, Nakahara H, Takagi T, Bruno N, et al. Protective role of protein C inhibitor in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *J Thromb Haemost* 2006; 4 (11): 2331-9.
18. Coughlin PB. Antiplasmin: the forgotten serpin? *FEBS J* 2005; 272(19): 4852-7.
19. Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol* 2005; 129 (3): 307-21.
20. Moore JH, Smolkin ME, Lamb JM, Brown NJ, Vaughan DE. The relationship between plasma t-PA and PAI-1 levels is dependent on epistatic effects of the ACE I/D and PAI-1 4G/5G polymorphisms. *Clin Genet* 2002; 62 (1): 53-9.



## **Trasplante de progenitores hemopoyéticos**

COORDINADORES: I. ESPIGADO. *Sevilla*  
M. JURADO. *Granada*

## IMPACTO CLÍNICO DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN EL TRASPLANTE ALOGÉNICO

M. GRANELL

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

---

### Introducción

Dos individuos no familiares comparten alrededor del 99,9% de la secuencia de ADN. Dado que el genoma humano está compuesto por más de tres billones de pares de bases, el ADN de estos dos individuos diferirá "tal sólo" en unos pocos millones de pares de bases. Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) son variaciones en un único par de bases nitrogenadas en la secuencia del genoma que se encuentran presentes en, al menos, un 1% de la población normal<sup>1</sup>. Los SNP situados en los exones de los genes pueden dar lugar a un cambio de aminoácido en la secuencia de la proteína que codifican dichos genes. En cambio, los SNP situados en las regiones no codificantes pueden dar lugar a variaciones en la expresión de los genes. Durante los últimos años se ha intentado relacionar los SNP con la presencia de enfermedades o la respuesta a tratamientos en diversos ámbitos de la medicina, entre ellos en el trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos (alo-TPH). Los SNP que tienen una mayor significación clínica en el alo-TPH son aquellos que forman parte del sistema mayor de histocompatibilidad o HLA. (La histocompatibilidad del receptor y el donante es vital para el éxito del trasplante y constituye un factor limitante para la realización del mismo; sin embargo, este aspecto del trasplante queda fuera del ámbito de esta revisión.)

En los últimos años se ha estudiado la relación de determinados SNP que no forman parte del sistema HLA con la evolución del alo-TPH. Entre ellos podemos diferenciar tres grandes grupos: SNP en genes de citocinas y sus receptores, SNP en genes que participan en el metabolismo de fármacos y SNP en genes de la inmunidad innata. A continuación se exponen algunos ejemplos de los dos primeros grupos y una revisión de los SNP en genes de la inmunidad innata y su relación con la evolución del trasplante.

---

### SNP en citocinas y sus receptores

Numerosos estudios han examinado el papel de polimorfismos en genes inmunorreguladores con la evolución del alo-TPH, revisado en<sup>2,3</sup>. Las citocinas pro y antiinflamatorias más frecuentemente estudiadas

han sido TNF, IL-1, IL-RN (que codifica el antagonista del receptor de IL-1), IL-2, IL-6, IL-10 e IFN- $\gamma$ . Las asociaciones que con más frecuencia se han analizado han sido la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) aguda, la mortalidad relacionada con el trasplante (MRT), la supervivencia libre de recaída (SLE) y la supervivencia global (SG). La mayoría de los estudios publicados se han llevado a cabo en cohortes relativamente pequeñas de pacientes, de uno o unos pocos centros y en trasplantes a partir de hermano HLA-idéntico<sup>4</sup>.

---

### SNP en el metabolismo de fármacos

La farmacogenómica examina la relación entre polimorfismos en enzimas metabolizadoras de fármacos con la farmacocinética, los efectos y la toxicidad de los medicamentos. En el ámbito del alo-TPH se ha estudiado la relación entre la farmacogenómica de algunos medicamentos utilizados en el acondicionamiento o en la profilaxis de la EICH con su toxicidad. Por ejemplo, el metotrexato es ampliamente utilizado como profilaxis de la EICH, sobre todo en regímenes de acondicionamiento mieloablativo. La metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) es una enzima clave en el metabolismo del metotrexato que posee dos SNP, C677T y A1298C, que modifican la actividad de la enzima. Ulrich *et al.*<sup>5</sup> analizaron los genotipos C677T de la MTHFR en un grupo de pacientes que recibieron un alo-TPH con metotrexato y observaron que aquellos que presentaban el genotipo 677TT tenían más mucositis y necesitaban más tiempo para la recuperación plaquetaria después del trasplante.

---

### SNP en genes de la inmunidad innata

#### MBL2

MBL es una proteína plasmática perteneciente a la familia de las colectinas con capacidad de oligomerizarse y reconocer estructuras de carbohidratos (manosa, mucosa...) presentes en la superficie de diversos microorganismos. Una vez unido a su ligando, MBL activa la vía del complemento de manera independiente de la presencia de anticuerpos. En el gen MBL existen seis SNP, tres en la región promotora UTR5' (-551, -221 y +4) y tres en la región codificante, en los codones 52, 54 y 57. Los individuos con las formas variantes del gen *MBL* ven significativamente disminuidos los niveles plasmáticos funcionales de la proteína MBL. Aproximadamente un tercio de la población caucásica tiene genotipos de *MBL* que se asocian a niveles bajos de la proteína, y un 5% con niveles muy bajos. El déficit de MBL es la principal causa de inmunodeficiencia<sup>6</sup>.

Tabla 1. Estudios de asociación de SNP en MBL2 en alo-TPH

Autor/año	N	Tipo TPH	SNP estudiados	Asociación
Mullighan/027	97	Familiar HLA id.	-550, -221, 52, 54, 57	Infección grave
Rocha/028	107	Hermano HLA id.	52, 54, 57	No asociación con infección
Granel/069	106	Hermano HLA id.	-550, -221, 52, 54, 57	Infección fúngica invasora
Mullighan/0810	142	Hermano HLA id. (59 alo-TIR)	-550, -221, 52, 54, 57	Infección grave

HLA id.: HLA idéntico; alo-TIR: trasplante de intensidad reducida.

En el ámbito del alo-TPH, algunos estudios han analizado la influencia de los polimorfismos en *MBL* en la incidencia de complicaciones infecciosas, con resultados discordantes. Mullighan *et al.*<sup>7</sup> estudiaron el genotipo de *MBL* en 97 parejas paciente-donante que recibieron un alo-TPH por diferentes enfermedades hematológicas a partir de un donante familiar. El régimen de acondicionamiento era mieloablativo en todos los casos. En dicho estudio se definía como infección grave una infección microbiológicamente documentada sistémica, invasiva o rápidamente progresiva. Se estudiaron los SNP en la región promotora y en el primer exón del gen *MBL*. Los autores observaron un mayor riesgo de infección grave en aquellos pacientes con genotipos deficientes en *MBL*. Rocha *et al.*<sup>8</sup> sobre un grupo de 107 parejas paciente-donante trasplantados a partir de hermano HLA idéntico con acondicionamiento mieloablativo, no encontraron asociación entre los SNP en el primer exón de *MBL* y la incidencia de infecciones víricas, bacterianas o fúngicas. En dicho trabajo no se estudiaron los polimorfismos en la región promotora. Nuestro grupo observó una mayor incidencia de infección fúngica invasiva en aquellos pacientes trasplantados que presentaban las formas variantes de *MBL*, tanto a nivel del promotor como del primer exón<sup>9</sup>. En un nuevo estudio prospectivo, Mullighan *et al.*<sup>10</sup> observaron que el impacto de los SNP en

*MBL* en la incidencia de infecciones se limitaba únicamente a los pacientes que recibían un alo-TPH con intensidad de acondicionamiento mieloablativo con irradiación corporal total.

### NOD2

Nod2 es una proteína citoplasmática que participa en el mantenimiento de la homeostasis de la flora intestinal. Reconoce el MDP, un componente del peptidoglicano presente en la pared de bacterias tanto grampositivas como gramnegativas. Al unirse a su ligando, Nod2 se oligomeriza y activa la vía de señalización de NF-κB que, a su vez, promueve la transcripción de numerosos genes que codifican citocinas inflamatorias<sup>11</sup>. Nod2 se expresa, en condiciones normales, en células mieloides y en las células de Paneth del epitelio intestinal. Se ha implicado a los SNP R702W (SNP 8), G908R (SNP12) y L1007insC (SNP13) en la patogenia de la enfermedad inflamatoria intestinal<sup>12</sup>.

En las primeras fases del desarrollo de la EICH, el daño tisular provocado por la quimioterapia y la radioterapia sobre el tubo digestivo facilita la translocación bacteriana. Se ha observado que la descontaminación intestinal es un factor protector de la EICH<sup>13</sup>. En este sentido, la disfunción de Nod2, que participa en la pri-

Tabla 2. Estudios de asociación de SNP en NOD2 en alo-TPH

Autor/año	N	Tipo TPH	Asociación
Holler/0414	169	Hermano HLA id. y DNE (40% alo-RIC)	MRT EICHa
Holler/0615	303	Hermano HLA id.	MRT SG
Granel/0616	85	Hermano HLA id. DLT	SLE
Mayor/0817	196	alo-DNE por LA (83% DLT)	Recaída SG
Sairafi/0818	198	Familiar, DNE	No asociación con EICH ni MRT

HLA id.: HLA idéntico. DNE: donante no emparentado. alo-TIR: trasplante de intensidad reducida. MRT: mortalidad relacionada con el trasplante. SG: supervivencia global. DLT: depleción linfóide T. SLE: supervivencia libre de enfermedad. LA: leucemia aguda. EICH: enfermedad del injerto contra el huésped.

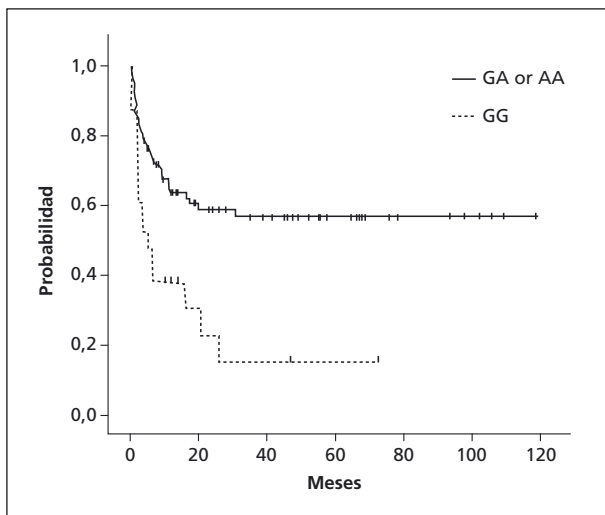


Figura 1. Supervivencia global según el genotipo NLRP2 rs1043684 del donante. N = 116, GG 15% vs. GA/AA 57% (P = .001).

mera línea de defensa frente a los microorganismos intestinales, podría tener un papel importante en el desarrollo de la EICH.

Holler *et al.*<sup>14</sup> analizaron la influencia de los SNP en *NOD2* en un grupo heterogéneo de 169 pacientes sometidos a alo-TPH. Observaron una mayor incidencia de EICH aguda grave y una mayor MRT cuando los pacientes o sus donantes presentaban las formas variantes de *NOD2*. Posteriormente, los mismos autores han confirmado los hallazgos en una serie de más de trescientos trasplantes a partir de hermano HLA-idéntico, un tercio de ellos de intensidad reducida<sup>15</sup>. En el segundo trabajo, los autores observaron una clara asociación de los SNP en *NOD2* presentes en el donante o el paciente con la SG. El impacto de los polimorfismos en *NOD2* en EICH aguda y MRT se observó únicamente en aquellos pacientes que no habían recibido descontaminación intestinal para gérmenes grampositivos. En consecuencia, los autores concluían que las bacterias grampositivas podrían tener un papel relevante en la activación de la inflamación mediada por Nod2. De forma interesante, en ambos estudios la causa de muerte en los pacientes con SNP en *NOD2* es EICH aguda, como era esperable, pero también de insuficiencia respiratoria primaria o secundaria. En un grupo de pacientes sometidos a alo-TPH con depleción CD34 positiva, esta modalidad de trasplante se caracteriza por una muy baja incidencia de EICH aguda grave, y se observa una asociación entre los SNP en *NOD2* con la supervivencia libre de progresión<sup>16</sup>. Estos resultados orientan hacia un efecto deletéreo de los SNP en *NOD2* al margen de sus efectos sobre la EICH aguda. Por otra parte, Mayor *et al.*,<sup>17</sup> sobre una cohorte de pacientes trasplantados a partir de donante no em-

parentado por leucemia aguda, observaron que aquellos que presentaban SNP en *NOD2* tenían una menor SG debido a una mayor recaída, sugiriendo un efecto de injerto contra leucemia relacionado con *NOD2*. En algunos estudios no se ha observado asociación entre los SNP en *NOD2* y la evolución del trasplante<sup>18</sup>.

### Inflamosoma

Los inflamomasas son complejos citosólicos de macromoléculas implicados en la producción de IL-1 e IL-18 en respuesta a diferentes estímulos derivados de patógenos<sup>19</sup>. Las interleucinas anteriormente citadas están implicadas en la patogenia de la EICH. Nuestro grupo analizó la asociación entre 14 SNP frecuentes presentes en cinco genes que forman parte del inflamomasoma (*NLRP1*, *NLRP2*, *NLRP3*, *CARD8* y *CASP5*) y la evolución del trasplante en un grupo de 133 pacientes que recibieron un alo-TPH de hermano HLA idéntico en el Hospital Clínic de Barcelona. La presencia del genotipo TT en el donante en el locus rs10925027 del gen *NLRP3* se asoció con la recaída. Asimismo, el genotipo GG en el donante en el locus rs1043684 del gen *NLRP2* se asoció con MRT y SG (Figura 1)<sup>20</sup>.

### Conclusiones

En el ámbito de los polimorfismos de genes implicados en la inmunidad innata se puede concluir que: a) los SNP en la región promotora y en el primer exón del gen *MBL* se relacionan con una mayor incidencia de infecciones en pacientes que reciben un alo-TPH con un régimen de acondicionamiento mieloablativo con irradiación corporal total, aunque ello no parece traducirse en una mayor mortalidad; b) los SNP en *NOD2* parecen relacionarse con una menor supervivencia que pudiera deberse a una mayor EICH aguda, a complicaciones pulmonares o a una mayor recaída; y c) algunos SNP en genes que forman parte del inflamomasoma, concretamente *NLRP3* y *NLPR2*, podrían asociarse a recaída o MRT, respectivamente. En el caso de *NLPR2* podría existir también relación con la SG.

Numerosos estudios han relacionado la presencia de variaciones genéticas con la evolución del alo-TPH, principalmente con recaída, EICH aguda, MRT y supervivencia. Son menos frecuentes las asociaciones con infecciones y EICH crónica. La mayoría de dichos estudios se han limitado a relativamente pocos SNP en genes que se han implicado en la patogenia de complicaciones del trasplante. La mayoría de estos estudios se han realizado en grupos relativamente pequeños de pacientes, cosa que dificulta la realización de análisis multivariantes que puedan incluir factores de riesgo clínicos y biológicos.

## Bibliografía

1. Gutmacher AE, Collins FS. Genomic medicine: a primer. *N Engl J Med* 2002; 347 (19): 1512-20.
2. Barret AJ, Rezvani K, Solomon S, Dickinson AM, Wang XN, Strak G, et al. New developments in allotransplant immunology. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2003; 350-71.
3. Mullighan CG, Bardy PG. New directions in the genomics of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007; 13: 127-44.
4. Dickinson AM, Middleton PG, Rocha V, Gluckman E, Holler E. Genetic polymorphisms predicting the outcome of bone marrow transplants. *Br J Haem* 2004; 127: 479-90.
5. Ulrich CM, Yasui Y, Storb R, Schubert MM, Wagner JL, Bigler J, et al. Pharmacogenetics of methotrexate: toxicity among marrow transplantation patients varies with the methylentetrahydrofolatereductase C677T polymorphism. *Blood* 2001; 98: 231-4.
6. Jack DL, Klein NJ, Turner MW. Mannose-binding lectin targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. *Immunol Rev* 2001; 180: 86-99.
7. Mullighan CG, Heatley S, Doherty K, Szab F, Grigg A, Hughes TP, et al. Mannose-binding lectin gene polymorphisms are associated with major infection following allogeneic hemopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2002; 99: 3524-9.
8. Rocha V, Franco RF, Porcher R, Bittencourt H, Silva WA, Latouche A, et al. Host defense and inflammatory gene polymorphisms are associated with outcomes after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood* 2002; 100: 3908-18.
9. Granell M, Urbano-Ispizua A, Suárez B, Rovira M, Fernández-Avilés F, Martínez C, et al. Mannan-binding lectin pathway deficiencies and invasive fungal infections following allogeneic stem cell transplantation. *Exp Hem* 2006; 34: 1435-41.
10. Mullighan CG, Heatley SL, Danner S, Dean MM, Doherty K, Hahn U, et al. Mannose-binding lectin status is associated with risk of major infection following myeloablative sibling allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2008; 112: 2120-8.
11. Maeda S, Hsu LC, Liu H, Bankston LA, Iimura M, Kagnoff MF, et al. NOD2 mutation in Crohn's disease potentiates NF- $\kappa$ B activity and IL-1 $\beta$  processing. *Science* 2005; 307: 734-8.
12. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 599-603.
13. Beleen DW, Haralambie E, Brandt H, Linzenmeier G, Müller KD, Quabeck K, et al. Evidence that sustained growth suppression of intestinal anaerobic bacteria reduces the risk of acute graft-versus-host disease after sibling marrow transplantation. *Blood* 1992; 80: 2668-76.
14. Holler E, Rogler G, Herfarth H, Brenmoehl J, Wild PJ, Hahn J, et al. Both donor and recipient NOD2/CARD15 mutations associate with transplant-related mortality and GvHD following allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2004; 104: 889-94.
15. Holler E, Rogler G, Brenmoehl J, Hahn J, Greinix H, Dickinson AM, et al. Prognostic significance of NOD2/CARD15 variants in HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation: effect of long-term outcome is confirmed in 2 independent cohorts and may be modulated by the type of gastrointestinal decontamination. *Blood* 2006; 107: 4189-93.
16. Granell M, Urbano-Ispizua A, Aróstegui JI, Fernández-Avilés F, Martínez C, Rovira M, et al. Effect of NOD2/CARD15 variants in T-cell depleted allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2006; 91: 1372-76.
17. Mayor NP, Shaw BE, Hughes DA, Maldonado-Torres H, Madrigal JA, Keshav S, et al. Single nucleotide polymorphisms in the NOD2/CARD15 gene are associated with an increased risk of relapse and death for patients with acute leukaemia after hematopoietic stem cell transplantation with unrelated donors. *J Clin Oncol* 2007; 25: 4262-9.
18. Sairafi D, Uzunel M, Remberger M, Ringdén O, Mattsson J. No impact of NOD2/CARD15 on outcome after SCT. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41: 961-4.
19. Drenth JPH, van der Meer JWM. The inflammasome: a line-backer of innate defense. *New Engl J Med* 2006; 355: 730-2.
20. Granell M, Urbano-Ispizua A, Pons A, Aróstegui JI, Gel B, Navarro A, et al. Common variants in NLRP2 and NLRP3 genes are strong prognostic factors for the outcome of HLA-identical sibling allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2008; 112: 4337-42.

## CYTOMEGALOVIRUS INFECTION IN HAEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATIONS

I. GRACIA-AHUFINGER<sup>1</sup>,  
F. DE LA CRUZ-VICENTE<sup>2</sup>, I. ESPIGADO-  
TOCINO<sup>2</sup>, O.J. BENMARZOUK-HIDALGO<sup>1</sup>,  
J. MIER-MOTA<sup>1</sup>, J.M. CISNEROS-HERREROS<sup>1</sup>,  
Á. URBANO-ISPIZUA<sup>2</sup>, P. PÉREZ-ROMERO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Service of Infectious Diseases

<sup>2</sup>Service of Haematology and Haemotherapy

Hospitales Universitarios Virgen del Rocío. Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS). Sevilla, Spain

### Introduction

Cytomegalovirus (CMV) infection continues to be an important cause of morbidity and mortality for solid organ transplantation (SOT) and haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) recipients<sup>1</sup>. Serologically CMV positive HSCT recipients with a negative donor (D-/R+) are at especially high risk for CMV infection, since specific immune effectors, depleted by the conditioning regimen cannot be adequately restored by the donor graft. Allogeneic haematopoietic transplants are considered of higher risk in the following cases: T-cell depletion, non related graft, non identical HLA, use of high dose of corticoids and conditioning based on antilymphocytic globulin, alemtuzumab or purine analogs<sup>2</sup>.

Two major factors are essential in order to control the infection, the detection of CMV replication and the generation of a CMV specific immune response. Without intervention, the majority of CMV replication and disease occurs early during the first three months post-transplantation, during the administration of the most intense immunosuppressive treatment<sup>3</sup>. Successful long-term prevention of CMV disease requires the generation of a CMV-specific T cell



response acquired after the recognition of CMV antigens by the patient immune response<sup>4</sup>. After antigenic stimulation, naive T cells proliferate and differentiate in memory cells that will protect during later CMV reactivation. CMV specific T cells, CD4+ and CD8+, are characterized by their ability to secrete IFN $\gamma$  after CMV antigen stimulation. Measuring CMV-specific T cells allows for the detection of an adaptive immune response to CMV<sup>5</sup>.

The development of antiviral strategies has resulted in a large decrease in the incidence of CMV disease. Currently, two strategies are used to treat CMV infection after transplantation, preemptive therapy and prophylaxis, and both have been shown to be very similar in efficacy<sup>6,7</sup>. In the prophylaxis strategy, patients receive continuous treatment of valganciclovir during three months after transplantation, preventing CMV viremia and disease. This approach has several disadvantages: higher risk for late-onset CMV disease, selection of ganciclovir resistance mutations, development of side effects and a delay in eliciting a CMV-specific immune response. Allograft rejection was found to be strongly associated with the occurrence of late-onset CMV disease<sup>8</sup>. This is particularly important in allogeneic HSCT recipients where the mortality rate from late-onset CMV disease is notably high<sup>9</sup>. Furthermore, prophylaxis with ganciclovir may expose a significant proportion of patients who would never have developed disease to a prolonged course of antiviral therapy. This is of particular importance since ganciclovir treatment has severe side effects such as neutropenia.

In the preemptive strategy treatment is initiated as soon as CMV replication reaches an established threshold<sup>10</sup> and it is discontinued when CMV replication decreases under the limit of detection. This approach reduces the use of antivirals, preventing side effects. In addition, it does not promote the selection of resistant strains<sup>11</sup>. The short periods of viral replication may allow for the stimulation of a CMV specific immune response, which may prevent late-onset disease. Indeed, subclinical viremia, if promptly aborted, and viral replication that is not allowed to progress to prolonged or sustained CMV viremia are not associated with suboptimal outcomes<sup>12</sup>.

For the preemptive administration of ganciclovir it is essential to use a sensitive and specific method to detect CMV replication to tightly control virus replication to prevent long periods of low level CMV replication<sup>13</sup>. In our laboratory we have optimized a molecular approach involving a real time polymerase chain reaction (rt-PCR) that is particularly sensitive for monitoring early CMV replication compared to antigenemia. Our results showed that rt-PCR technique was able to detect primary CMV infection in 46% of the tested samples while antigenemia only de-

tected it in 7% of samples<sup>14</sup>. Our results suggest that this rt-PCR method is more sensitive for the detection of CMV replication and would therefore be a useful method for guiding treatment.

Based on previous results in solid organ transplant patients we have prospectively monitored HSCT recipients receiving pre-emptive treatment. The goal of this study was to evaluate the administration of pre-emptive treatment, while monitoring for CMV replication with a sensitive real time PCR technique to successfully control CMV infection. Furthermore we have monitored lymphocyte reconstitution after HSCT and measured CMV-specific T-cell response to determine immune protection against CMV.

---

## Design and methods

### *Patients and samples*

We performed a prospective study of all consecutive patients over the age of 16 undergoing unmanipulated allogeneic HSCT at the University Hospital Virgen del Rocío, from April 2008 to May 2009. All patients gave informed consent. The follow up schedule, beginning two weeks after transplant, was as follows: weekly for the first three months and every other week between months three and six. The study was approved by the institutional ethical committee.

### *Clinical management*

Patients in this study were pre-emptively treated guided by the rt-PCR results. Ganciclovir i.v. (5mg/kg/12h) or oral Valganciclovir (900 mg/12h) was administered when the viral load was higher than 1,000 copies/ml and it was continued for two weeks or until CMV viral load reached the lower detection limit of the real time PCR test. CMV infection and disease were defined as described by Ljungman *et al*<sup>15</sup>.

Prophylaxis for graft versus host disease (GvHD) consists of cyclosporine A and methotrexate (CsA/MTX) or CsA and mycophenolate mofetil (MMF). Patients were treated with prednisone (2 mg/kg/day).

### *CMV DNA extraction and rt-PCR*

Viral DNA was extracted from 200  $\mu$ l of plasma using the Affigene DNA Extraction assay (Cepheid AB, Bromma, Sweden) according to the manufacturer's instructions. Twenty-five microliters of eluted DNA were used for rt-PCR using the Affigene CMV Trender diagnostic assay (Cepheid AB, Bromma, Swe-

den)<sup>14</sup>. Amplification was performed on a MX3000P instrument (Stratagene Instruments Systems, La Jolla, CA, USA). Viral loads were obtained using the Affigene Analysis software.

### Flow cytometry

The frequency of CMV-antigen-specific IFN $\gamma$ -producing T-cells by intracellular cytokine staining was carried out as follows. Blood was collected in Na-heparin anti-coagulated-vacutainers (Becton Dickinson, Allschwil, Switzerland). To induce antigen-specific activation and cytokine induction, 1 ml of whole peripheral blood was incubated in the presence of 10  $\mu$ g/ml of  $\alpha$  CD28/ $\alpha$  CD49d (1  $\mu$ g/ml, Becton Dickinson NJ USA). To test for T-cell response the preparation was stimulated with 50  $\mu$ g/ml of CMV infected human foreskin fibroblast lysates (Advanced Biotechnologies Inc, Columbia, MD, USA). As positive controls, samples were stimulated with 25 ng/ml of 4-alpha-phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and 1.5  $\mu$ g/ml of *Streptomyces* ionomycin calcium salt (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland). Unstimulated preparations served as negative controls. After two hours, brefeldin A (10  $\mu$ g/ml, Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland) was added to prevent IFN $\gamma$  and IL-4 secretion and was incubated for four hours at 37°C. Adherent cells were eliminated by adding 100  $\mu$ l of 0.5 M EDTA and incubating for 15 minutes at room temperature. Peripheral blood mononuclear cells were washed for 15 minutes in BD lysing solution to recover the leucocyte population. Cells were washed twice with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde, then with 1% paraformaldehyde, permeabilized with 0.1% saponin (Sigma-Aldrich Buchs, Switzerland) in PBS and stained at room temperature in the dark with the following antibodies:  $\alpha$  CD3,  $\alpha$  CD4,  $\alpha$  CD8,  $\alpha$  CD69 and  $\alpha$  IFN $\gamma$ -IL-4, (all Becton-Dickinson, NJ USA). Among 15,000-30,000 CD3+ lymphocytes were analyzed on a FACSCanto (Becton-Dickinson, NJ USA). The frequency of CMV-specific T-cells was analyzed for each antigen and was expressed as the percentage of CD69 and IFN $\gamma$  double positive CD4+CD3+ or CD8+CD3+ cells. Negative controls were subtracted to determine the antigen-specific frequency. A sample was considered positive when the percentage of T-cells positive for CD69 was over 0.25%, and over 1% were positive for IFN $\gamma$ .

### Statistical analysis

CMV viral loads and the decrease of CMV viral load during treated replication episodes were compared by

the Wilcoxon test. Differences were considered statistically significant for p values < 0.05. SPSS 14.0 software (SSPS Inc., Chicago, IL) was used to perform all statistical analysis.

## Results

### Patients

From April 2007 to May 2008, ten cases met the requirements for inclusion in the study. Clinical data from patients included are shown in Table 1. The median age was 34 with a range of 17-59. Five out of the eight cases with acute evolved to chronic GvHD. The pre-transplant conditioning treatment was non-mieloablative in 40% of the patients.

### Characterization of viral replication

Replication episodes first occurred in five of the recipients between days 7 and 63 post-transplant, with a median of 35 days. All but one of the episodes showed viral load values below 1,000 copies/ml (Figure 1A). Six of the HSCT recipients had another period of CMV replication between days 77 and 119 post-transplant, with a median of 84 days. Of those, only two had viral load values over 10,000 copies/ml. After day 105, there were no CMV replication event over 10,000 copies/ml, and during this time, only one patient presented viral load values over 1,000 copies/ml (Figure 1A).

Only one recipient never developed viral infection. For the other patients, viral load was detected at median day 56 post-transplantation with viral load below 10,000 copies/ml, and only two patients with levels over 1,000 copies/ml (Figure 1B).

### Pre-emptive treatment administration and CMV disease

There were a total of 9 replication episodes over 1,000 copies/ml that needed treatment. The treatment was administered for a total of 343 days; each replication episode lasted an average of 38.1 days ( $\pm$ 12.1 days). The reduction in viral load during treatment is described in Figure 2. The median reduction in viral load compared to the value at the initiation of the treatment, at day 1, was significant after four weeks of treatment with a median reduction of 3.27 log<sub>10</sub> copies/ml (IQR: 0-2.3; p<0.05).

No side effect requiring the interruption of treatment was observed in any of the patients during valganciclovir therapy. During the six months follow up one of the patients (10%) developed CMV disease (Table 1) completely recovering after treatment.

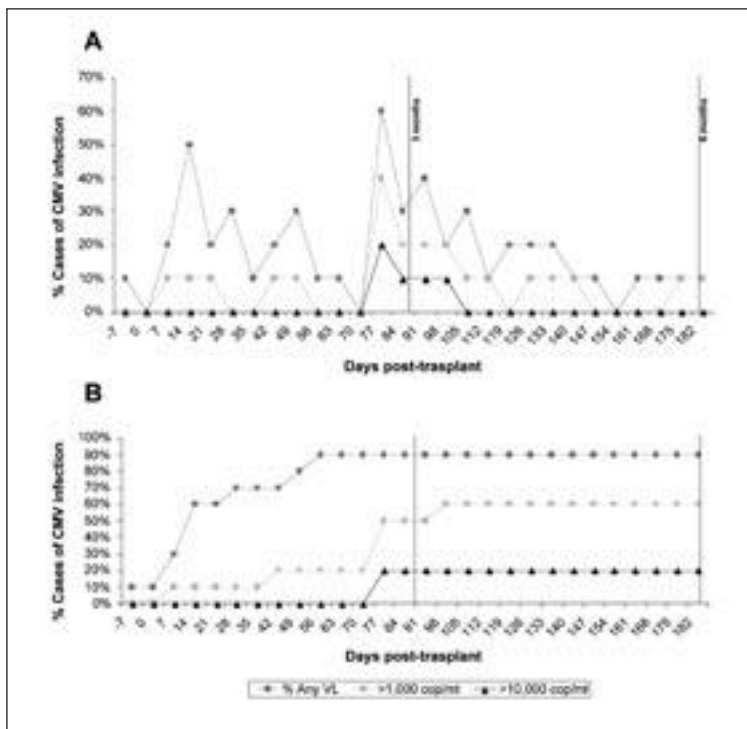


Figure 1. CMV infection time course during the first six months after transplantation. A. Percentage of cases of CMV infection determined by real-time PCR. B. Time to first detection of CMV infection measured by real-time PCR results.

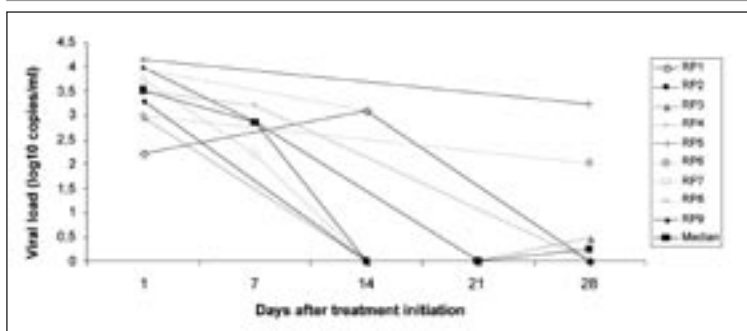


Figure 2. Evolution of CMV viral load during replication episodes that needed valganciclovir administration. Notes: RP, replication episode. \* Statistically significant  $p < 0.05$  compared to the first day of treatment; Wilcoxon test.

### Lymphocyte reconstitution and activation of the specific T-cell immune response

In order to determine the optimal conditions for characterizing the immune response during the first six months after the transplant we followed one patient by measuring during CMV replication events reconstitution of the lymphocyte population and the activated T-cell subpopulations that produced  $IFN\gamma$  against CMV antigens.

As shown in Figure 3A this patient experienced two replication episodes that needed to be treated. At 35

days post-transplantation the total number of lymphocytes reached  $200 \text{ cells}/\mu\text{l}$ , a count sufficient for analyzing between 15,000-30,000  $CD3+$  lymphocyte events by flow cytometry. The total number of lymphocytes further increased reaching a maximum of  $1400 \text{ cells}/\mu\text{l}$  at day 98 after transplant (Figure 3 B-C). After day 98 the level of lymphocytes decreased which correlated with an episode of CMV replication that required the administration of valganciclovir. We first detected  $CD4+$  and  $CD8+$  positive for  $CD69$  at day 42 after the transplant, but only  $CD4+$  cells were expressing  $IFN\gamma$ . We first detected  $CD8+$  cells producing  $IFN\gamma$  at day 98 after the transplant indicating that at this point the patient had acquired specific immunity against CMV.

### Discussion

CMV infection is one the major cause of morbidity and mortality after HSCT. Episodes of prolonged activation of CMV replication and also multiple replication episodes can contribute to increase the morbidity in these patients<sup>16</sup>.

Pre-emptive treatment has several advantages over prophylactic treatment, one of which is that only patients who develop infection are treated, preventing unnecessary treatment<sup>10,14</sup>. Furthermore, it may promote the acquisition of a CMV specific immune response. In addition, the antiviral treatment administration period is shorter, which may help to prevent the selection of resistance mutations and decrease valganciclovir side effects such as leucopenia, which is especially critical for HSTC patients<sup>9,10</sup>. Monitoring CMV infection remains essential for efficiently managing transplant recipients, especially those receiving pre-emptive therapy.

Our data suggest that pre-emptive administration of valganciclovir in HSCT patients guided by a real-time PCR method is a good alternative for patient management. Pre-emptive therapy ensures that treatment is only administered to patients who develop CMV infection, preventing overtreatment and maximizing cost-benefit.

The reconstitution of the CMV specific T cell immune response is one of the major risk factors associated with the development of CMV disease after

Table 1. Clinical data of patients receiving allogeneic Haematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT)

Patient	Age	Sex	Indication for HSCT	HSC source	Donor	Conditioning regimen	Prophylaxis GvHD	Acute GvHD (degree)	Chronic GvHD (degree)	CMV disease	CMV serology R/D
1	17	F	AML M6	UCB	Unrelated	Busulphan Thiotepa Fludarabine ATG	CsA MMF	Yes (II)	Yes (local)	No	+/U
2	31	M	CML	PB	Unrelated	TBI Cyclophosphamide	CsA MTX	Yes (II)	Yes (extended)	No	+/+
3	34	M	AML t(8:21)	PB	Related HLA identical	Busulphan Cyclophosphamide	CsA MTX	Yes (II)	Yes (local)	No	U/+
4	59	M	AML M2	PB	Unrelated	Fludarabine Melphalan	CsA MMF	Yes (II)	No	No	U/U
5	55	M	AML secondary to chemotherapy	PB	Unrelated	Fludarabine Busulphan	CsA MMF	Yes (I)	Yes (extended)	No	+/U
6	29	F	T lymphoblastic lymphoma	PB	Related HLA identical	Fludarabine Melphalan	CsA MTX	Yes (I)	No	No	+/+
7	34	F	AML M1	PB	Unrelated	Busulphan Cyclophosphamide	CsA MTX	Yes (I)	No	No	-/-
8	35	M	AML M4	PB	Related HLA identical	IDICE + Melphalan	CsA MMF	No	No	No	+/-
9	36	M	ALL B	PB	Unrelated	Busulphan Cyclophosphamide	CsA MTX	Yes (IV)	Yes (extended)	Yes	U/+
10	33	F	ALL B	PB	Related HLA identical	TBI Cyclophosphamide	CsA MTX	No	No	No	+/+

NOTES: F: Female; M: Male; CML: Chronic Myelogenous Leukemia; AML: Acute Myelogenous Leukemia; ALL B: Acute lymphoblastic leukemia type B; UCB: Umbilical cord blood; PB: peripheral blood; ATG: Anti-thymo-globulin; TBI: total body irradiation; R/D: Recipient/Donor; U: Unknown; CsA, cyclosporine A; MMF, mycophenolate mofetil; MTX: methotrexate.



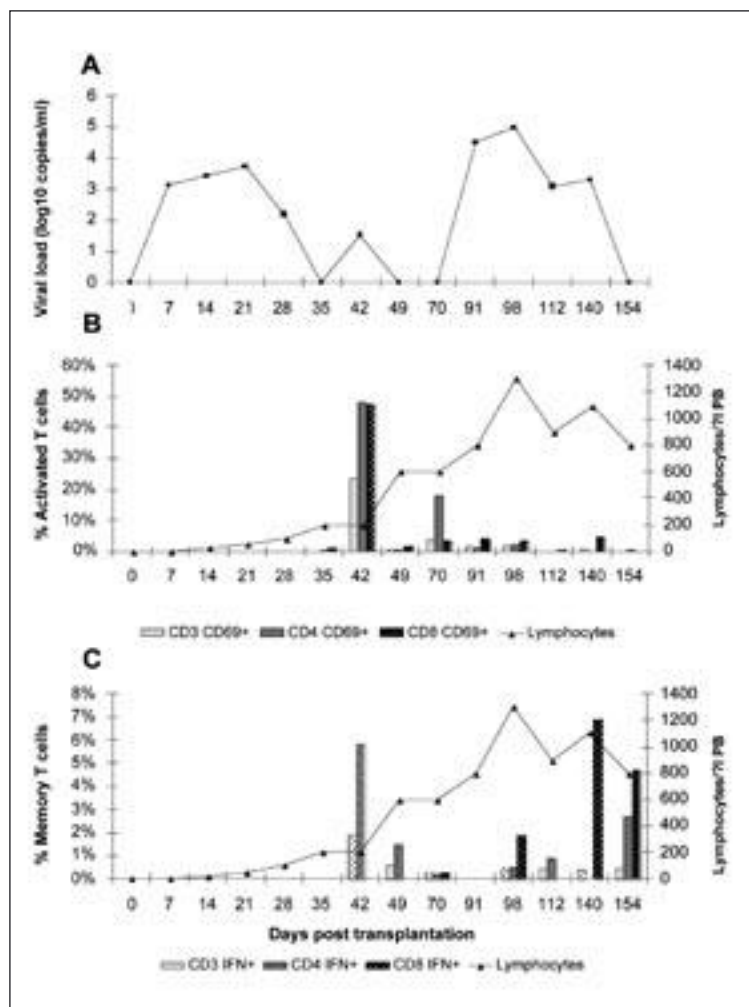


Figure 3. Lymphocyte reconstitution and activation of the specific T-cell immune response during the first six months after transplant. A. CMV replication events measured by rt-PCR. B. Detection of CD4+ and CD8+ positive for CD69 compared to lymphocyte population. C. Detection of CD4+ and CD8+ positive for IFN $\gamma$  compared to lymphocyte population. Notes: PB, peripheral blood.

transplant<sup>4</sup>. The preconditioning regimen for HSCT produces the depletion of the bone marrow allowing for the allograft implant. After transplant, the hematological reconstitution in HSCT patients begins 10 to 14 after infusion and the immunological reconstitution of T-cells and B-cells takes place around six months after the transplant<sup>17</sup>. Our results show that in patients undergoing HSCT the total leukocytes reconstitution kinetics, and in particular the peripheral blood lymphocytes, are limiting factors in the detection of the CMV specific immune response by flow cytometry. In one of the cases shown, CMV specific T-cells were detected 14 weeks after HSCT. It has been shown that the CMV specific immune response reconstitution early after the transplant correlated with a protection against the late-onset CMV reactivation, in patients after solid organ transplantation<sup>17</sup> and in patients after

HSCT<sup>18</sup>. On the other hand, it has been established that lymphopenia is a predicting factor for CMV replication after the transplant that could be used as a surrogate marker of a poor specific immune response in those situations in which the technology to determine the specific immune response is not available<sup>19</sup>.

In summary, pre-emptive therapy guided by rt-PCR was effective in preventing CMV disease during the first six months after HSCT. In this setting, measuring CMV-specific T cells for the detection of the adaptive immune response could be useful in the management of CMV infection.

## References

1. Bennekov T, Spector D, Langhoff E. Induction of immunity against human cytomegalovirus. *Mt Sinai J Med* 2004; 71: 86-93.
2. Hebart H, Brugger W, Grigoleit U, Gscheidle B, Loeffler J, Schäfer H, et al. Risk for cytomegalovirus disease in patients receiving polymerase chain reaction-based preemptive antiviral therapy after allogeneic stem cell transplantation depends on transplantation modality. *Blood* 2001; 97: 2183-5.
3. Legendre C, Pascual M. Improving outcomes for solid-organ transplant recipients at risk from cytomegalovirus infection: late-onset disease and indirect consequences. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 732-40.
4. Hakki M, Riddell SR, Storek J, Carter RA, Stevens-Ayers T, Sudour P, et al. Immune reconstitution to cytomegalovirus after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: impact of host factors, drug therapy and subclinical reactivation. *Blood* 2003; 102: 3060-67.
5. Moss P, Khan N. CD8(+) T-cell immunity to cytomegalovirus. *Hum Immunol* 2004; 65: 456-64.
6. Khoury JA, Storch GA, Bohl DL, Schuessler RM, Torrence SM, Lockwood M, et al. Prophylactic versus preemptive oral valganciclovir for the management of cytomegalovirus infection in adult renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2006; 6: 2134-43.
7. Reischig T, Jindra P, Hes O, Svecova M, Klaboch, Treska V. Valacyclovir prophylaxis versus preemptive valganciclovir therapy to prevent cytomegalovirus disease after renal transplantation. *Am J Transplant* 2008; 8: 69-77.
8. Razonable RR, Rivero A, Rodríguez A, Wilson J, Daniels J, Jenkins G, et al. Allograft rejection predicts the occurrence of late-onset cytomegalovirus (CMV) disease among CMV-mismatched solid organ transplant patients receiving prophylaxis with oral ganciclovir. *J Infect Dis* 2001; 184: 1461-4.
9. Hebart H, Einsele H. Clinical aspects of CMV infection after stem cell transplantation. *Hum Immunol* 2004; 65: 432-6.
10. Khoury JA, Storch GA, Bohl DL, Schuessler RM, Torrence SM, Lockwood M, et al. Prophylactic versus preemptive oral ganciclovir for the management of cytomegalovirus in-



- fection in adult renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2006; 6: 2134-43.
11. Emery VC, Griffiths PD. Prediction of cytomegalovirus load and resistance patterns after antiviral chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 8039-44.
  12. Singh N. Preemptive therapy versus universal prophylaxis with ganciclovir for cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 742-51.
  13. Len O, Gavaldà J, Aguado JM, Borrell N, Cervera C, Cisneros JM, et al. Valganciclovir as treatment for cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 20-7.
  14. Benmarzouk-Hidalgo OJ, Cordero E, Martín-Peña A, García-Prado E, Gentil MA, Gómez-Bravo MA, et al. Prevention of cytomegalovirus (CMV) disease using pre-emptive treatment after solid organ transplant in patients at high risk for CMV infection. *Antivir Ther* 2009; 14 (5): 641-7.
  15. Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 1094-97.
  16. Moins-Teisserenc H, Busson M, Scieux C, Bajzik V, Cayuela JM, Clave E, et al. Patterns of Cytomegalovirus reactivation are associated with distinct evolutive profiles of immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *JID* 2008; 198: 818-26.
  17. Gerna D, Lilleri D, Fornara C, Comolli G, Lozza L, Campana C, et al. Monitoring of human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T-cell immunity in patients receiving solid organ transplantation. *Am J Transplant* 2006; 6: 2356-64.
  18. Lilleri D, Gerna D, Fornara C, Lozza L, Maccario R, Locatelli F. Prospective simultaneous quantification of human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T-cell reconstitution in young recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants. *Blood* 2006; 108: 1406-12.
  19. Pourgheysari B, Piper KP, McLammon A, Arrazi J, Bruton R, Clark F, et al. Early reconstitution of effector memory CD4+ CMV-specific T cells protects against CMV reactivation following allogeneic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2008; 1-9.

## CÉLULAS MESENQUIMALES Y TRASPLANTE HEMATOPOYÉTICO

M.C. DEL CAÑIZO, S. CARRANCIO,  
F.M. SÁNCHEZ-GUIJO, M. DÍEZ CAMPELO,  
J.A. PÉREZ SIMÓN

*Servicio de Hematología. Hospital Universitario de Salamanca. Centro de Investigación del Cáncer-IBMCC (Universidad de Salamanca-CSIC). Centro en Red de Medicina Regenerativa y Terapia Celular de Castilla y León (SACYL-ISCIII)*

### Introducción

El trasplante hematopoyético es un procedimiento terapéutico cuyo objetivo final es sustituir una hematopoyesis enferma por una sana en pacientes afectados por diferentes hemopatías –malignas o no–, así como algunas enfermedades congénitas. Por razones evidentes, durante muchos años se han estudiado las células progenitoras hematopoyéticas (CPH), su forma de ob-

tención, anidación, el número requerido para su uso etc. Sin embargo, se está dando cada vez más importancia a los mecanismos implicados en el anidamiento y regulación de las CPH y, por lo tanto, al micromedioambiente medular implicado en estos procesos.

En 1968, Friedenstein *et al.* demostraron la existencia en MO de unas células con capacidad clonogénica, de aspecto fibroblástico a las que denominaron *CFU-F*. En el momento actual, estas células se denominan *células madre mesenquimales* (MSC) y son las células progenitoras del estroma medular. El micromedioambiente hematopoyético constituye un complejo órgano en el que las células del estroma ejercen su función reguladora local, facilitando contactos celulares adecuados y sintetizando moléculas que contribuyen al mantenimiento celular, así como a la producción del número conveniente de precursores comprometidos para el adecuado desarrollo de la hematopoyesis. La población de células que forman el estroma hematopoyético es heterogénea, con gran diversidad de tipos celulares implicados en la regulación de la hematopoyesis, pero proceden de un progenitor común: las MSC<sup>1-3</sup>.

El estudio de las MSC ha permitido poner en evidencia su capacidad de diferenciarse hacia distintos tejidos –su multipotencialidad–, así como la capacidad inmunomoduladora, lo que hace de ellas una fuente celular muy atractiva en modelos de medicina regenerativa y trastornos inmunitarios<sup>4,5</sup>.

Estos antecedentes indujeron a diversos grupos de investigadores a analizar el papel que estas células pudieran tener en el trasplante alogénico en dos contextos diferentes: mejorar el injerto hematopoyético (IH) y tratar la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH).

### Las MSC y su papel en el injerto de los progenitores hematopoyéticos

#### Estudios preclínicos

La primera cuestión que se plantea al hablar de MSC en el contexto del trasplante alogénico es la de si estas células son capaces de injertar en la MO del receptor. Los datos existentes son contradictorios. Mientras que la mayoría de los estudios consideran que, tras el trasplante alogénico, las células del estroma no injertan y la mayoría son del receptor<sup>6</sup>, otros grupos<sup>7,8</sup> –entre los que se encuentra el nuestro– han comprobado que en algunas ocasiones un pequeño porcentaje de las MSC son del donante. El hallazgo en común es que se trata de pacientes con enfermedades en las cuales se encuentra el estroma dañado, de tal manera que, probablemente, en ausencia de un “defecto” en las CSM es difícil de demostrar su injerto tras el trasplante<sup>6</sup>. Recientemente se ha desarrollado un modelo

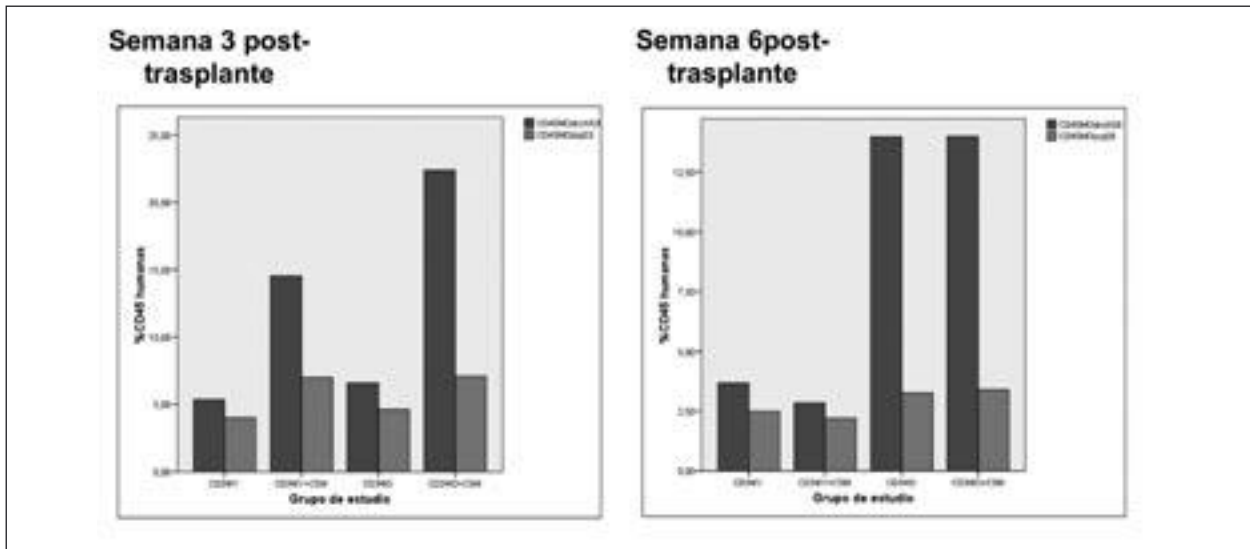


Figura 1. Quimerismo de CPH humanas en modelo murino. IV: inyección intravenosa; IO: inyección intraósea. CSM: células mesenquimales.

animal en el que se reproduce la hematopoyesis humana al inyectar MSC expandidas *in vitro* tras su inyección intraósea<sup>9</sup>. Utilizando este modelo animal e inyectando progenitores hematopoyéticos junto con la inyección intraósea de MSC humanas hemos comprobado que éstas aceleran el injerto y mejoran el quimerismo humano (Figura 1)<sup>10</sup> y en este contexto se pueden encontrar MSC humanas en el hueso en que se ha realizado la inyección. Una de las hipótesis que

se plantean en la actualidad es que las CSM podrían actuar, en el contexto del trasplante hematopoyético, mejorando el funcionalismo de un micromedioambiente dañado por la radioquimioterapia. Nosotros, en un modelo desarrollado *in vitro* de daño del micro-medioambiente por la acción del VP 16 hemos comprobado que la adición de MSC sanas al lecho dañado mejora la capacidad de mantenimiento de la hematopoyesis (Figura 2)<sup>10</sup>.

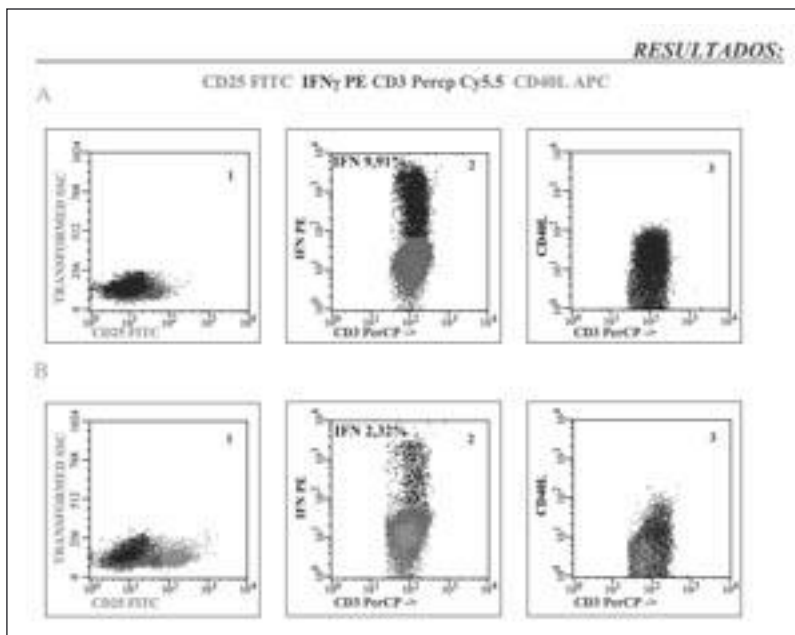


Figura 2. Acción de las CSM sobre los linfocitos T. A) En ausencia de MSC. B) En presencia de MSC.

### Estudios clínicos

Basados en estos hallazgos algunos autores han iniciado ya ensayos con el fin de mejorar el injerto. Los primeros en realizarlo fueron Frassoni *et al.*, quienes infundieron MSC junto a las CPH y comprobaron que efectivamente éstas eran capaces de acelerar el injerto y que, además, disminuía la incidencia de EICH<sup>11</sup>. Más recientemente<sup>12</sup>, en un ensayo piloto, se han utilizado MSC de donantes en pacientes sometidos a trasplante alogénico que presentaban un injerto pobre. En algunos pacientes se observó una recuperación de las cifras. Asimismo, se ha comprobado que estas células pueden ser útiles en el tratamiento de la aplasia pura de células rojas secundaria a incompatibilidad mayor ABO<sup>13</sup>.

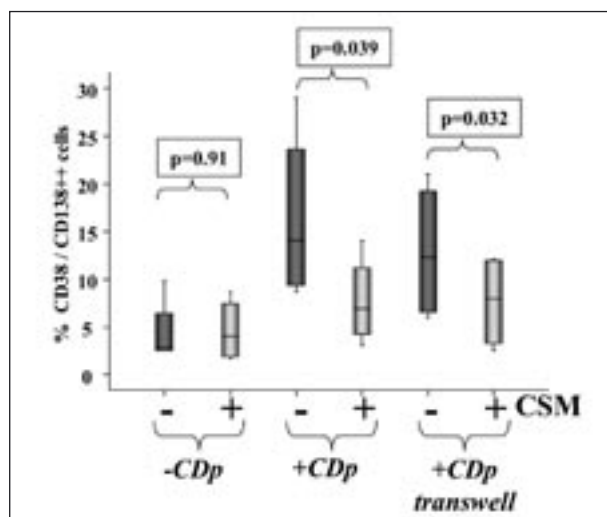


Figura 3. Efecto de las CSM sobre diferenciación de células B hacia células plasmáticas.

### Las MSC y su papel inmunoregulator en el trasplante de progenitores hematopoyéticos

Una de las características que hacen a las células mesenquimales candidatas ideales en programas de terapia celular es su baja alogenicidad y su capacidad inmunomoduladora. Hacer una revisión exhaustiva de las múltiples acciones inmunomoduladoras que ejercen estas células está fuera del propósito de este trabajo, por lo que nos limitaremos a resaltar lo que consideramos más relevante.

#### Estudios preclínicos

Numerosos estudios *in vitro* han demostrado que las MSC son capaces de inhibir la respuesta alógena de los linfocitos T estimulados en cultivo mixto o que inhiben la proliferación linfocitaria inducida por mitógenos<sup>14</sup>.

En nuestra experiencia, las CSM bloquean el ciclo celular de linfocitos estimulados con PHA, anti-CD3 o anti-CD28, e independientemente del estímulo las CSM reducen la expresión de IFN- $\gamma$  intracitoplasmático en los linfocitos T (Figura 2). Cuando analizamos las vías de señalización implicadas comprobamos que las CSM inhiben la fosforilación tanto de la vía de Akt como de la vía de Erk 1/2.

En contraste con la amplia información relativa al efecto de las CSM sobre los linfocitos T, son pocos los estudios que se han centrado en evaluar el efecto de las CSM sobre los linfocitos B y, aunque los datos en ocasiones son discordantes, cada vez es más evidente el efecto pleiotrópico de estas células<sup>15,16</sup>.

En nuestra experiencia<sup>17</sup>, las CSM incrementan la viabilidad de los linfocitos B de forma significativa, tanto en situación de reposo (cultivo con Ig+CpG) como de proliferación (cultivo con Ig+CpG+CD40L+IL-4) e incrementan el número de células B en fase G0/G1; es decir, las CSM mantienen la viabilidad y bloquean la proliferación de los linfocitos B (Figura 3). Analizamos su efecto sobre la diferenciación B y comprobamos que en presencia de células dendríticas plasmocitoides se incrementa el número de células positivas para los marcadores CD38/CD138; pero, cuando se añaden CSM, se produce una disminución significativa en el porcentaje de estas células, es decir, las CSM bloquean la diferenciación de los linfocitos B hacia células plasmáticas.

#### Ensayos clínicos

El efecto inmunomodulador de las CSM ha motivado su utilización en el tratamiento de la EICH. Desde la publicación inicial de Le Blanc *et al.*<sup>18</sup> en la que se describe cómo la infusión de CSM haploidénticas permite rescatar a un paciente con EICHa severa, la experiencia clínica utilizando este procedimiento se ha ampliado notablemente. Así, estos mismos investigadores publicaron posteriormente un ensayo clínico llevado a cabo en Europa<sup>19</sup>. Estos pacientes presentaban EICHa refractaria. La dosis media de CSM infundida fue de  $1,4 \times 10^6$  (rango:  $0,4-9 \times 10^6$ ) / kg. La respuesta global fue de 71%; 30 pacientes alcanzaron RC y 9 mejoría de su EICH. La mediana de tiempo entre la infusión y la respuesta fue de 18 días (rango: 3-63). Curiosamente el grado de identidad HLA entre paciente y donante de CSM no se relacionó con el grado de respuesta.

Recientemente, en un ensayo con menor número de pacientes se obtienen también un número de respuestas significativo, aunque los resultados no son tan impresionantes como los previamente descritos<sup>20</sup>.

Por otra parte, dado el efecto inmunosupresor de las CSM, no está claro si su infusión puede tener un efecto adverso sobre el control de la enfermedad de base, incrementando el riesgo de recaída<sup>21</sup>.

Uno de los problemas de los ensayos clínicos descritos es el uso de suero bovino fetal en el medio de cultivo. Para evitar este inconveniente, en colaboración con la Clínica Universitaria de Navarra hemos llevado a cabo un estudio en el que se compara la capacidad de expansión de las CSM y los efectos inmunomoduladores de las mismas empleando suero bovino fetal frente a suero humano<sup>22</sup>. Hemos podido comprobar que, tanto el lisado plaquetario como el suero humano constituyen alternativas válidas al suero bovino fetal para la expansión de las CSM y sin el riesgo de transmisión de zoonosis.

En base a los hallazgos de este estudio estamos realizando un ensayo clínico de tratamiento de EICH refractario con CSM expandidas con suero autólogo +/- lisado plaquetario (código CSM/EICH2005). El procedimiento ha sido seguro, sin efectos secundarios relacionados con la infusión aunque algún paciente ha desarrollado procesos infecciosos intercurrentes.

## Conclusiones

Las CSM pueden ejercer un efecto múltiple en el trasplante hematopoyético: por un lado, pueden favorecer el injerto y, por otro, pueden ejercer un efecto inmunomodulador que tendría una aplicación evidente para prevenir o tratar la enfermedad del injerto contra el huésped. Sin embargo, los datos existentes en el momento actual son aún preliminares por lo que su utilización en el trasplante hematopoyético, en cualquiera de sus aplicaciones, debe continuarse haciendo en el contexto de ensayos clínicos controlados.

## Agradecimientos

*Algunos resultados indicados en el presente trabajo han sido posibles en parte como consecuencia de los siguientes proyectos de investigación: GRS/222/A/08 (Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León), PEI 052 180 (Instituto de Salud Carlos III)*

*S.C. es una investigadora predoctoral financiada con una beca de formación de personal investigador de la Junta de Castilla y León.*

## Bibliografía

- Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* 2001; 226: 507-20.
- Dominici M, Hofmann TJ, Horwitz EM. Bone marrow mesenchymal cells: biological properties and clinical applications. *J Biol Regul Homeost Agents* 2001; 15: 28-37.
- Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000; 28: 875-84.
- Dominici M, Hofmann TJ, Horwitz EM. Bone marrow mesenchymal cells: biological properties and clinical applications. *J Biol Regul Homeost Agents* 2001; 15:28-37.
- Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000; 28: 875-84.
- Bacigalupo A. Mesenchymal stem cells and haematopoietic stem cell transplantation. *Best Pract Res Clin Hematol* 2004; 17: 387-99.
- Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nature Med* 1999; 5: 309-13.
- Villaron EM, Almeida J, López-Holgado N, et al. Mesenchymal stem cells are present in peripheral blood and can engraft after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2004; 89: 1421-7.
- Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, et al. Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood* 2006; 107: 1878-87.
- Carrancio S, Sanchez-Guijo FM, López-Holgado N, et al. Human mesenchymal stem cells can ameliorate hematopoietic function after chemo-radiotherapy induced stromal damage. 14<sup>th</sup> Congress EHA, Berlin 2009.
- Frassoni F, Labopin M, Bacigalupo A, et al. Expanded mesenchymal stem cells co-infused with HLA identical hematopoietic stem cell transplants reduce acute and chronic graft versus host disease: a matched pair analysis. *Bone Marrow Transplant* 2002; 29: S2.
- Meuleman N, Tondreau T, Ahmad I, et al. Infusion of mesenchymal stromal cells can aid hematopoietic recovery following allogeneic hematopoietic stem cell myeloablative transplant: a pilot study. *Stem Cells Develop* 2009 (prepublished online).
- Fang B, Song Y, Li N, Li J, Han Q, Zhao RC. Mesenchymal stem cells for the treatment of refractory pure red cell aplasia after major ABO-incompatible hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Hematol* 2009; 88: 261-6.
- Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; 105: 1815-22.
- Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 2005; 105: 2821-7.
- Krampera M, Cosmi L, Angeli R, et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006; 24: 386-98.
- Tabera S, Pérez-Simón JA, Díez-Campelo M, et al. The effect of Mesenchymal Stem Cells on the viability, proliferation and differentiation of B lymphocytes. *Hematologica* 2008; 93: 1301-9.
- Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004; 36 (3): 1439-41.
- Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, et al. Mesenchymal stem cells for the treatment of steroid resistant, severe, acute graft versus host disease: a phase II study. *Lancet* 2008; 371: 1579-89.
- von Bonin M, Stölzel F, Goedecke A, Richter K, Wuschek N, Hölig K, et al. Treatment of refractory acute GVHD with third party MSC expanded in platelet lysate-containing medium. *Bone Marrow Transplant* 2009; 43 (3): 245-51.
- Ning H, Yang F, Jiang M, et al. The correlation between co-transplantation of MSC and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical trial. *Leukemia* 2008; 22: 593-9.
- Pérez-Illarbe M, Díez-Campelo M, Aranda P, et al. Comparison of ex vivo expansion culture conditions of mesenchymal stem cells for human cell therapy. *Transfusion* (en prensa).



## Genética en hemopatías malignas

COORDINADORES: F. PRÓSPER. *Pamplona*  
J. HERNÁNDEZ-RIVAS. *Salamanca*

### Resumen del simposio

Los avances en el conocimiento de nuestro genoma han supuesto una de las mayores revoluciones en curso en el comienzo del presente siglo. Su aplicación en el diagnóstico y pronóstico de los tumores es cada vez mayor y en las nuevas clasificaciones de la OMS de cualquier tipo de tumores se incluyen los datos genéticos y moleculares como herramienta básica en su diagnóstico. Por consiguiente el conocimiento de estas metodologías se hace imprescindible en Hematología. El diagnóstico debe seguir basándose en la correcta aplicación de los conocimientos morfológicos con la ayuda del inmunofenotipo, pero atrás deben quedar los años en los que el hematólogo prosiga su quehacer de espaldas a los datos genéticos de estas enfermedades.

La Genética es una especialidad en constante evolución y su desarrollo es extraordinario y rápido. Sus límites son imprecisos y si la consideramos en un sentido amplio integra el estudio del ADN y del ARN. Además en los últimos años el conocimiento de las variaciones epigenéticas ha enriquecido la genética más clásica y más recientemente, la descripción de los miRNA y sus alteraciones relacionadas con el cáncer han ampliado aún más estos horizontes. Es evidente que serán precisos varios años para afianzar estos conocimientos y de todos es conocido que media siempre un tiempo entre la descripción de una determinada alteración genética y su aplicación en la clínica dado que son precisos estudios de validación, incorporación a ensayos clínicos, etc. Baste recordar el tiempo que han tardado en ser incorporados los estudios citogenéticos al diagnóstico de las leucemias y de los linfomas.

En la aplicación de los estudios genéticos en Hematología se han incorporado en los últimos años las técnicas de biochips o microarrays, que permiten analizar en un solo experimento decenas de miles de secuencias genéticas, lo que contribuye al conocimiento exhaustivo del genoma y del transcrito de la célula tumoral. Estos estudios generan una gran cantidad de datos, solo analizables mediante sofisticadas técnicas bioinformáticas, por lo que su incorporación al diagnóstico no está siendo rápida. Sin embargo, la gran cantidad de datos producidos ha permitido mejorar nuestro conocimiento de la biología tumoral. Esta situación se ha incrementado por la aplicación de las técnicas de secuenciación masiva del genoma, que proporcionarán la secuencia completa de los genomas, incluidos los tumorales.

En este simposio se presentan las tendencias más modernas de los análisis genéticos aplicados al estudio de las hemopatías malignas: los miRNA son moléculas de pequeño tamaño capaces de alterar la expresión génica que desempeñan un papel muy relevante en el desarrollo de los tumores. Los estudios epigenéticos han confirmado que el mecanismo de metilación de algunos genes produce su silenciamiento lo que colabora en la producción de algunos tumores. De hecho, ya usamos en la clínica fármacos que actúan inhibiendo la metilación. Algunas de las ponencias desarrollarán estos conceptos con claros ejemplos de su implicación en la producción de los linfomas y de la leucemia aguda linfoblástica.

Por todo ello, el estudio de las alteraciones genéticas y epigenéticas enriquece nuestro conocimiento de las alteraciones moleculares subyacentes en una enfermedad tan compleja como el cáncer. Es preciso que el hematólogo conozca estos avances dado que, es más que previsible, que algunos de los hallazgos expuestos en este simposio serán una ayuda en el diagnóstico y se reconocerán como un factor pronóstico.



## PAPEL DE LAS ALTERACIONES EPIGENÉTICAS EN LA PATOGÉNESIS Y PRONÓSTICO DE LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA Y TUMORES MALIGNOS

J. ROMÁN-GÓMEZ<sup>1</sup>, X. AGIRRE<sup>2</sup>, A. JIMÉNEZ-VELASCO<sup>3</sup>, V. MARTÍN<sup>1</sup>, V. ARQUEROS<sup>1</sup>, A.I. HEINIGER<sup>3</sup>, F. PRÓSPER<sup>2</sup>, A. TORRES<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Hematología. Hospital Reina Sofía. Córdoba

<sup>2</sup>Área de Terapia Celular. Departamento de Hematología. Clínica Universidad de Navarra. Pamplona

<sup>3</sup>Servicio de Hematología. Hospital Regional Universitario Carlos Haya. Málaga

El cáncer ha sido considerado durante muchos años como una enfermedad originada por eventos genéticos. Sin embargo, en esta última década hemos sido testigos de la modificación de esta definición del cáncer debido a que diversos estudios han demostrado una contribución y cooperación directa entre las alteraciones genéticas y epigenéticas en el desarrollo y progresión tumoral<sup>1</sup>. La epigenética hace referencia a aquellos cambios hereditarios en los patrones de expresión génica que no dependen de alteraciones en la secuencia normal de los nucleótidos que componen el genoma. A diferencia de las alteraciones genéticas que se presentan de forma permanente en el genoma, las modificaciones epigenéticas son potencialmente reversibles. Esta diferencia entre la genética y epigenética la describe de una forma sencilla y cotidiana Thomas Jenuwein en la página de Internet de la Red de excelencia Europea para la investigación del Epigenoma (<http://epigenome.eu>):

«La diferencia entre genética y epigenética probablemente puede compararse con la diferencia que existe

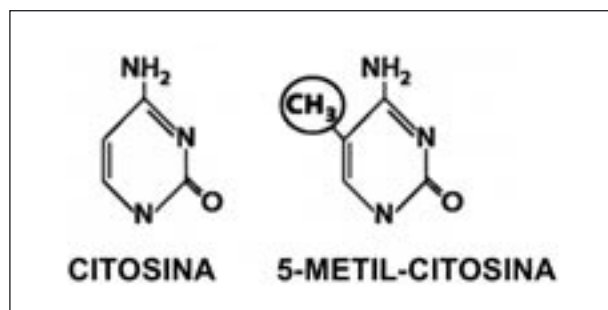


Figura 1. La metilación del ADN supone la adición de un grupo metilo al carbono en posición 5 del anillo de la citosina. En el genoma de los mamíferos, la metilación tiene lugar únicamente en las bases citosínicas que están localizadas en la posición 5' respecto a la guanina en un dinucleótido CpG.

entre escribir y leer un libro. Una vez que el libro ha sido escrito, el texto (los genes o la información almacenada en el ADN) será el mismo en todas las copias que se distribuyan entre los lectores. Sin embargo, cada lector podría interpretar la historia del libro de una forma ligeramente diferente, con sus diferentes emociones y proyecciones que pueden ir cambiando a medida que se desarrollan los capítulos. De una forma muy similar, la epigenética permitiría diferentes interpretaciones de un molde fijo (el libro o código genético) y daría lugar a diferentes lecturas, dependiendo de las condiciones variables en las que se interprete el molde».

En las células, la acumulación de la información epigenética prácticamente ocurre por la modificación covalente de dos moléculas: el ADN y las histonas. Entre estos dos eventos epigenéticos existentes, el que más estudiado y mejor caracterizado está es la metilación del ADN.

### Metilación del ADN

Esta modificación consiste en la adición enzimática, mediada por las ADN metiltransferasas (DNMT), de un grupo metilo al carbono en posición 5' de la citosina que forma parte del dinucleótido CpG (citosina-fosfato-guanina)<sup>2</sup> (Figura 1). La mayor parte de las 5-metilcitosinas (5mC) en el ADN humano están presentes en los dinucleótidos CpG, aunque recientemente se ha demostrado que también son susceptibles de sufrir esta alteración las citosinas internas del dominio CCWGG (siendo W = A o T)<sup>3,4</sup>. Los dinucleótidos CpG no se encuentran distribuidos de forma uniforme en el genoma ya que han sido convertidos progresivamente a timinas debido a una desaminación hidrolítica a lo largo de la evolución de los homínidos<sup>1,2,5</sup>. En el 98% del genoma, los dinucleótidos CpG aparecen una vez cada 100 dinucleótidos y aproximadamente el 70% de estos se encuentran fuertemente metilados con objeto de estructurar la cromatina nuclear en un estado represivo, manteniendo de esta forma la integridad cromosómica e impidiendo la transcripción de regiones repetitivas, parasíticas, poco útiles y potencialmente peligrosas del ADN, tales como las secuencias repetitivas *Alu* o transposones<sup>1,6,7</sup>. Gracias a este mecanismo, además de impedir la transcripción de secuencias parásitas del ADN, se produce la inactivación de uno de los cromosomas X en la mujer, la impresión génica (este proceso supone la adquisición de un estado de cromatina cerrada e hipermetilación del ADN en uno de los alelos del gen de forma precoz en las células germinales del padre o de la madre, lo que conduce a la expresión monoalélica del mismo<sup>8</sup>) y silenciamiento de genes específicos de tejidos, como es el caso del gen *SERPINB5*<sup>9</sup>, en aquellos tipos celulares don-

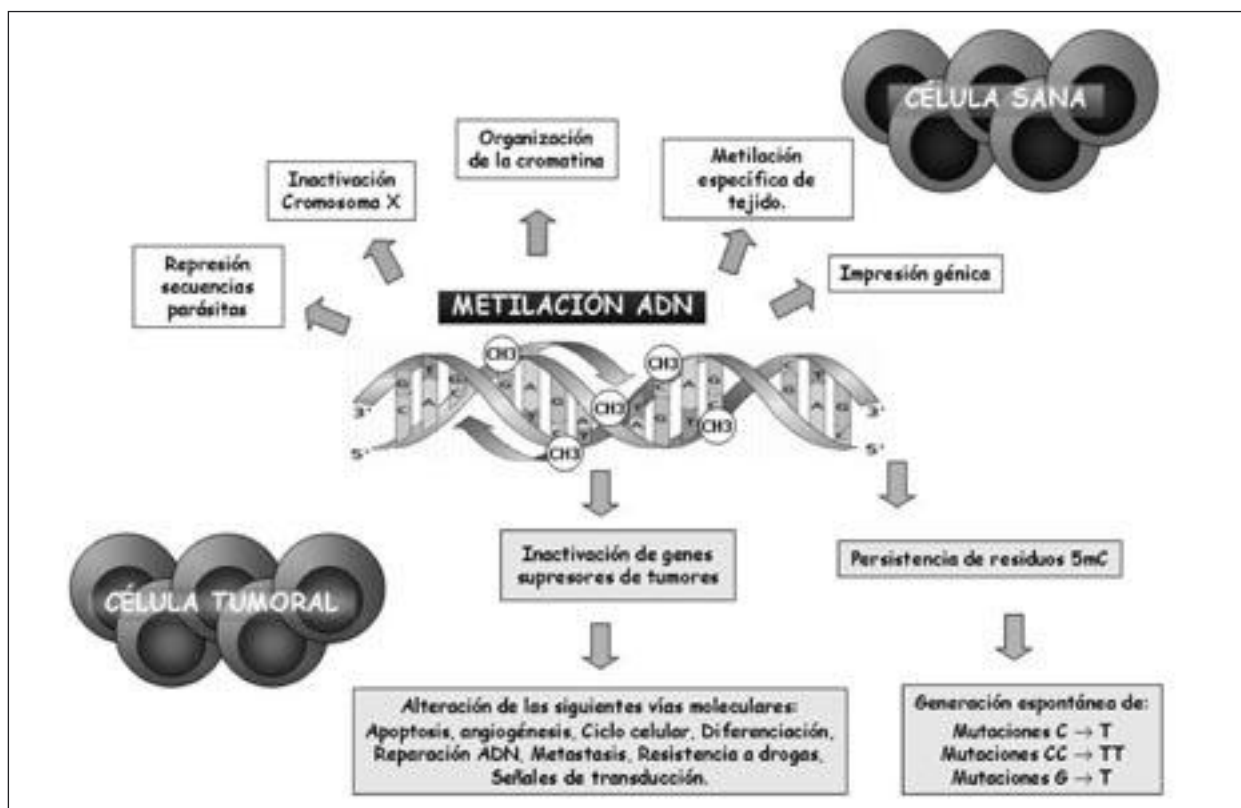


Figura 2. Papel de la metilación del ADN en el comportamiento normal y maligno de la célula.

de no deberían ser expresados (Figura 2). En contraste, regiones pequeñas del ADN que van desde 200 pb hasta varias kilobases, denominadas “islas CpG”, contienen la frecuencia esperada de dinucleótidos CpG (1 por cada 10 dinucleótidos). Estas áreas están protegidas de la metilación y se encuentran localizadas en las regiones promotoras proximales de cerca del 50-60% de todos los genes. Esta ausencia de metilación constituye un requisito básico para la transcripción activa y normal funcionamiento de los mismos. Por tanto, la principal consecuencia de la metilación del ADN es el silenciamiento en la expresión de la región o secuencia correspondiente<sup>2,3,10,11</sup>.

Aunque la importancia funcional de la metilación en la pérdida de función génica está claramente establecida, los mecanismos moleculares implicados en este proceso no han sido totalmente dilucidados. Recientemente, se ha demostrado la implicación funcional de la asociación entre metilación y una cromatina nuclear inactiva desde el punto de vista transcripcional, donde las proteínas de unión a los CpG metilados y las DNMT están asociados con desacetilasas y metiltransferasas de histonas, grandes reguladores de las modificaciones de las histonas. Por tanto, podemos decir que la metilación del ADN ocurre junto con otras modificaciones epigenéticas como son las modificaciones de las histonas o también denominado “código de histonas”<sup>12-20</sup>.

### Código de histonas

Las histonas acumulan su información epigenética mediante un conjunto de modificaciones químicas posttraduccionales como son la acetilación, metilación fosforilación, ubiquitinación y sumoilación. La mayoría de estas modificaciones ocurren en aminoácidos bien conservados durante la evolución que se localizan en las regiones o “colas” amino-terminales de las histonas que forman el nucleosoma (esta estructura de la cromatina se compone de unos 146 pb de ADN enrollado alrededor de un octámero formado por dos unidades de cada una de las siguientes cuatro histonas, la H2A, H2B, H3 y H4). La teoría que se propone es que en las histonas ocurren varias modificaciones que actúan secuencialmente o en combinación, definiendo lo que se denomina el “código de histonas”, confiriendo a una región concreta de la cromatina el estado general de transcripción<sup>21</sup>. En general, en células normales la acetilación de las lisinas de las histonas se asocia con regiones genómicas en conformación activa de la transcripción. La metilación de las histonas puede ocurrir en residuos de lisina o arginina y su consecuencia funcional depende de cuál sea el residuo o la región que se haya modificado. Así, la trimetilación de la lisina en posición 4 o 79 y de la arginina en posición 17 de la histona 3 se asocia con una transcripción activa, mientras

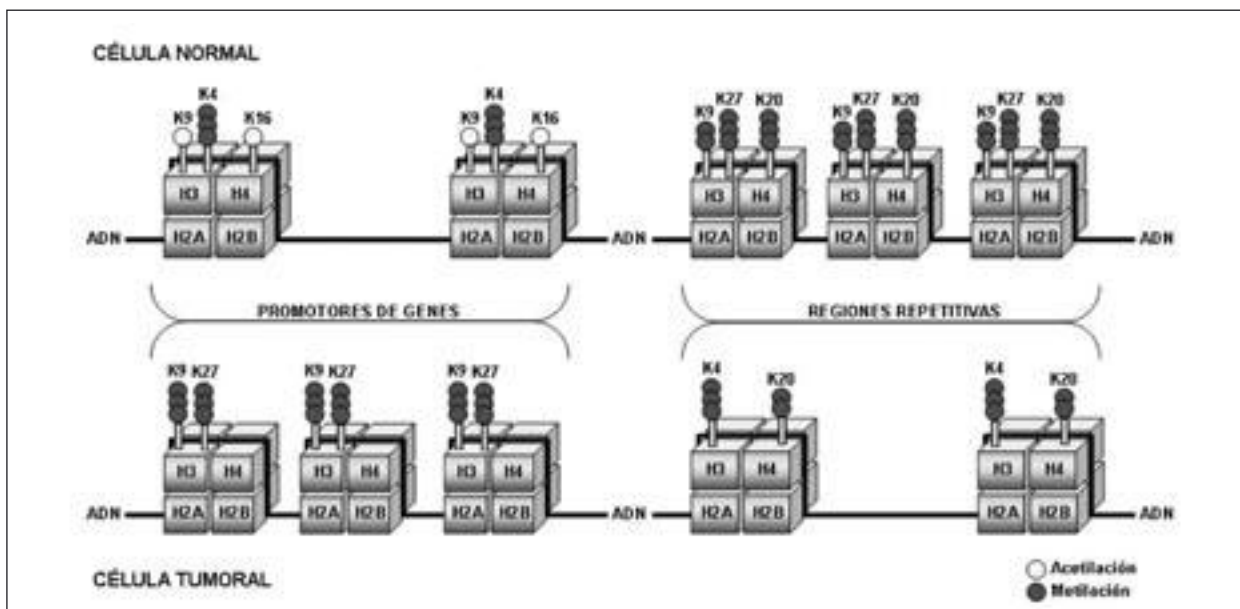


Figura 3. Código de las histonas. En una célula normal, las regiones de los promotores de los genes se asocian con marcas de cromatina abierta como son la Ach3 y Ach4 y la 3meK4H3, mientras que las regiones repetitivas se asocian con marcas de cromatina cerrada como son la 3meK9H3, la 3meK27H3 y la trimetilación de la lisina 20 de la H4. En la célula tumoral, se pierden las marcas de cromatina abierta y se ganan las marcas de cromatina cerrada como son la 3meK9H3 y 3meK27H3 en los promotores mientras que se pierden estas marcas en las regiones repetitivas del genoma.

que la trimetilación de la lisina en posición 9, 27 o 36 de la histona 3 y la lisina en posición 20 de la histona 4 se asocia con una represión de la transcripción. En una célula normal, las regiones de los promotores de los genes se asocian con marcas de cromatina abierta como son la acetilación de la H3 y H4 y la trimetilación de la lisina 4 de la H3, mientras que las regiones repetitivas se asocian con marcas de cromatina cerrada como son la dimetilación de la lisina 9 y la trimetilación de la lisina 27 de la H3 y la trimetilación de la lisina 20 de la H4. En contraposición, en el caso de una célula tumoral, se pierden las marcas de cromatina abierta y se ganan las marcas de cromatina cerrada como son la trimetilación de la lisina 9 y 27 de la H3 en los promotores mientras que se pierden estas marcas en las regiones repetitivas del genoma (Figura 3). En conclusión, las modificaciones de las histonas, al igual que la metilación del ADN, tienen una gran importancia en el mantenimiento de la integridad del genoma y en la regulación normal de la transcripción génica<sup>1,21-22</sup>.

### Metilación del ADN en el cáncer humano

La metilación de las regiones promotoras de los genes es, en la actualidad, el evento epigenético mejor caracterizado de las células tumorales; se encuentra virtualmente en todos los tipos de neoplasias humanas y se asocia con el inapropiado silenciamiento transcrip-

cional y pérdida de función de estos genes<sup>1-2</sup>. Sorprendentemente, esta metilación es, al menos, tan frecuente como las mutaciones o deleciones que se presentan en los genes supresores de tumores clásicos. La metilación de genes que juegan papeles críticos en la oncogénesis y que se encuentran no metilados en los tejidos sanos se observa de forma precoz en el proceso de tumorigénesis<sup>2,7,23</sup>. Estos eventos epigenéticos precoces ocasionan la pérdida de control del ciclo celular, de la regulación de los factores de transcripción, de los mecanismos de reparación del ADN, de la apoptosis y de la angiogénesis, creando un fenotipo de inestabilidad genómica típico de las células tumorales (Figura 2)<sup>24-34</sup>.

Adicionalmente, el patrón de metilación génica aporta información importante sobre la célula neoplásica: a) cada tipo de tumor presenta un grupo de genes con especial predilección para sufrir metilación. Este patrón es diferente para cada tipo de tumor, determinando un perfil específico de metilación para la neoplasia denominado "hipermetiloma"<sup>35</sup>; b) cada tumor individual en un paciente determinado presenta un único mapa epigenético reflejo de su evolución y que difiere del patrón encontrado en otro paciente con el mismo tipo de tumor<sup>36</sup>. La detección de estos perfiles específicos de neoplasia y de paciente permite conocer mejor la metilación coordinada de diversos genes en los sucesivos estadios de la enfermedad y pueden ser usados como marcadores biológicos para mejorar el diagnóstico y determinar el pronóstico del proceso maligno.

Tabla 1. Genes metilados en la leucemia linfoblástica aguda

Gen	Localización	Función	Pacientes metilados (%)
ADAMTS1	21q21.2	Metaloproteasa	45
ADAMTS5	21q21.3	Metaloproteasa	36
APAF1	12q23	Regulación apoptosis	23
ARTS	17q22-23	Regulación apoptosis	22
ASPP1	14q32-33	Coestimulador p53; regulación apoptosis	22
CHD1	16q22	Adhesión célula-célula	37
CHD13	16q24	Adhesión célula-célula	35
DAPK	9q34	Regulación apoptosis	12
DBC1	9q32-33	Regulación apoptosis	13
DIABLO	12q24.31	Regulación apoptosis	22
DKK3	11p15	Antagonista señales vía Wnt	33
FHIT	3p14.2	GST; metabolismo purinas	19
HDPR1	14q23.1	Antagonista señales vía Wnt	26
hRFC	21q22.3	Transportador folato	18
LATS1	6q23-25	GST; control ciclo celular G2-M	34
LATS2	13q11-12	Control ciclo celular G1-S	28
LNHX2	9q33-34.1	Control diferenciación y crecimiento	12
NES1	19q13	Control diferenciación y crecimiento	56
P14	9p21	Control ciclo celular; regulación apoptosis	8
P15	9p21	Control ciclo celular G1-S	18
P16	9p21	GST; control ciclo celular G1-S	15
P57	11p25	Control ciclo celular G1-S	9
P73	1p36	Control ciclo celular G1-S	19
PACRG	6q26	Ubiquitinación	27
PARK2	6q26	Ubiquitinación	27
PTEN	10q23	GST; adhesión/movilidad celular; apoptosis; angiogénesis; regulación ciclo celular G1; transducción señales	16
PGR	11q22-23	Receptor progesterona	40
REPRIMO	2q23.3	Control ciclo celular G2-M	28
RIZ	1p36	GST; vía retinoblastoma	26
sFRP1	8p12-11.1	Antagonista señales vía Wnt	38
sFRP2	4q31.3	Antagonista señales vía Wnt	17
sFRP4	7p14.1	Antagonista señales vía Wnt	21
sFRP5	10q24.1	Antagonista señales vía Wnt	28
SHP1	12p13	Inhibidor señales vía Jak/STAT	12
SMCIL1	Xp11.22	Reparación ADN	8
SMCIL2	22q13.31	Reparación ADN	59
SYK	9q22	Transducción señales	14
TMS1	16p11-12	Regulación apoptosis	10
WIF1	12q14.3	Antagonista señales vía Wnt	30

### Metilación del ADN en la patogenia de la LLA

Esta metilación específica de tumor también es evidente en las neoplasias hematológicas, siendo en la LLA donde mejor se encuentra caracterizada (Tabla 1).

En los últimos años, varios grupos de trabajo incluyendo el nuestro han mostrado que la inapropiada metilación de múltiples genes es un fenómeno común en las células de la LLA humana y constituye el mecanismo más importante para inactivar genes relacionados con el cáncer en esta enfermedad<sup>23-34,37-43</sup>; entre el



70-90% de los casos presentan, al menos, un gen metilado, mientras que el 25-40% presentan más de dos genes metilados, ya sea al diagnóstico<sup>23-34,37-43</sup> o en la recaída<sup>44,45</sup>.

La metilación en la LLA participa en la inactivación de cinco vías moleculares esenciales:

1) eventos que desregulan la proliferación celular alterando el punto de control tardío en la transición G1-S del ciclo celular, bien directamente (inactivando *p21*, *p15*, *p16* y *p57*) o indirectamente (inactivando *p73*, *PTEN*, *NES1* y *LATS2*) y alterando también la transición G2-M (inactivando *LATS1* y *REPRIMO*)<sup>23-34,37-43</sup>;

2) el programa apoptótico mediante la inactivación de *DAPK*, *p14*, *TMS1*, *APAF1*, *DIABLO*, *DBC1* y *ASPP1*<sup>23-34,37-43</sup>;

3) inhibiendo los antagonistas de la vía de señales WNT/beta-catenina permitiendo la activación constitutiva de la misma (metilación de *DKK3*, *sFRP1*, *sFRP2*, *sFRP4*, *WIF1* y *HDPR1*)<sup>32-34</sup>;

4) la adhesión celular, inactivando la familia de las cadherinas (*H-cadherina* y *E-cadherina*) y la familia de las metaloproteasas (*ADAMTS1* y *ADAMTS5*)<sup>23-34,37-43</sup>; y

5) inactivando varias proteínas con actividad cinasa o fosfatasa, las cuales son moduladas por diversos receptores de citocinas (*SHP1* y *SYK1*)<sup>46,47</sup>.

Todas estas anomalías no deben sorprendernos ya que, subyacente a la complejidad de cada tumor, todos ellos presentan un cierto número de “misiones críticas” que conducen a la célula tumoral y a su progenie hacia la expansión incontrolada. Una de éstas es la desregulación de la proliferación celular, que, junto a la obligada supresión de la apoptosis, crean una plataforma mínima necesaria para el desarrollo neoplásico. Nuestros datos demuestran que en la LLA esta plataforma común se obtiene a través de un mecanismo epigenético de metilación. Más aún, aunque las anomalías del gen supresor *p53* son las más frecuentemente observadas en los tumores sólidos<sup>48</sup>, estas lesiones son raras en la LAL<sup>49</sup>. Una hipótesis que nace a la luz de nuestros resultados es que la metilación de los promotores en la LLA inactiva las respuestas apoptóticas y de control de la proliferación, bien por encima (*p14*, *DAPK*, *ASPP1*) o por debajo (*p21*, *APAF1*) de *p53*. Esto implica que en la LAL, también existe una fuerte selección celular para perder la funcionalidad de *p53*, pero, en este caso, mediante una vía epigenética alternativa.

### Metilación de promotores como factor pronóstico en la LAL

Está claramente demostrado que las características clínicas de la LAL (edad, número de leucocitos al diagnóstico) constituyen factores pronósticos relevantes en estos pacientes. Sin embargo, a pesar de una correcta clasificación en grupos de riesgo, hasta un 20%

de los pacientes con LAL pediátrica de riesgo estándar y más del 50% de los adultos que reciben una terapia optimizada acabarán recayendo<sup>50</sup>. Otros marcadores biológicos, tales como el inmunofenotipo o las alteraciones genéticas, se han incorporado más recientemente como indicadores de un curso más agresivo y su uso se ha generalizado en la mayoría de los protocolos de tratamiento empleados en la actualidad<sup>50</sup>.

Junto a estos marcadores tradicionales, la metilación de los promotores de genes relacionados con el cáncer y que son importantes desde el punto de vista funcional pueden, también, afectar a la conducta tumoral influenciando el pronóstico final de los pacientes. El silencio epigenético de genes que controlan la invasión neoplásica, el crecimiento y la muerte celular pueden determinar el patrón de recurrencia tumoral tras la quimioterapia y de este modo determinar la supervivencia. Puesto que cada tumor presenta un grupo de genes susceptibles de sufrir metilación, cada tumor individual podría exhibir un patrón característico de metilación potencialmente predictivo del curso clínico del mismo.

Con objeto de confirmar esta hipótesis en la LAL, nuestro grupo ha estudiado el estado de metilación de 39 genes pertenecientes a las principales vías de transformación e inmortalización celular (Tabla 1) y ha comparado el pronóstico de los pacientes (n = 201) con un fenotipo metilador positivo (CIMP+, más de dos genes metilados) con los pacientes (n = 106) que presentan un fenotipo metilador negativo (CIMP-, menos de tres genes metilados)<sup>40,42,43</sup>.

Las tasas de remisión completa (RC) de los pacientes CIMP- y CIMP+ fueron 91% y 87% respectivamente, lo que sugiere que el patrón de metilación no influye en la respuesta al tratamiento de inducción a la remisión. Sin embargo, los pacientes CIMP- presentaron una tasa de recaídas (26% vs. 58%,  $P < 0,0001$ ) y de mortalidad (34% vs. 58%,  $P < 0,001$ ) significativamente más bajas que los pacientes del grupo CIMP+. La supervivencia libre de enfermedad (SLE) estimada a los 14 años fue del 68% para el grupo CIMP- y 32% para el grupo CIMP+ ( $P < 0,0001$ , Figura 4-A). La supervivencia global (SG) calculada a los 14 años fue del 63% para los pacientes CIMP- y 32% para el grupo CIMP+ ( $P = 0,0002$ ) (Figura 4B). El análisis multivariante puso de manifiesto que el patrón de metilación constituía un factor pronóstico independiente tanto para la SLE ( $P < 0,0001$ ) como para la SG ( $P = 0,003$ ).

Un aspecto muy interesante es que el patrón de metilación fue capaz de redefinir el pronóstico clínico de pacientes con LAL y que presentaban factores pronósticos claramente establecidos y aceptados por la comunidad internacional. De este modo, la existencia de un fenotipo CIMP- mejoró significativamente los resultados clínicos de pacientes considerados clásicamente



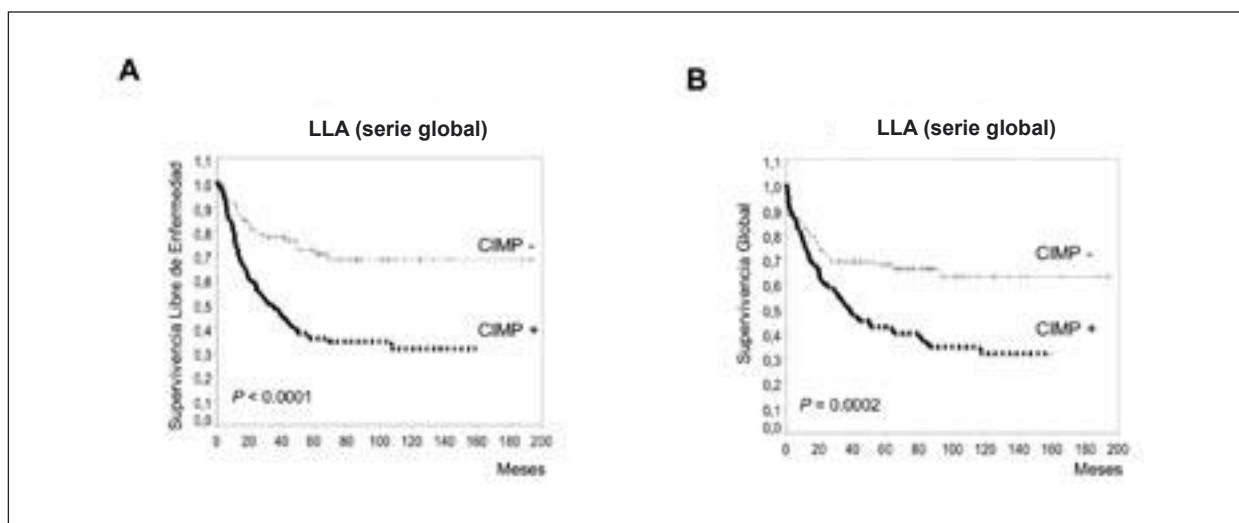


Figura 4. Curvas de supervivencia libre de enfermedad (A) y supervivencia global (B) en pacientes afectados de LLA (n = 307) de acuerdo con el perfil de metilación génica. CIMP- (pacientes con 0-2 genes metilados); CIMP+ (pacientes con más de dos genes metilados).

como de mal pronóstico, especialmente aquellos que presentaban el cromosoma Filadelfia<sup>34,40</sup>, un fenotipo celular de estirpe T<sup>42</sup> o un número elevado de leucocitos al diagnóstico<sup>40</sup>. En contraste, la presencia de un fenotipo CIMP+ empeoró el pronóstico del grupo de pacientes con reordenamiento *TEL-AML1*, considerados clásicamente como de buen pronóstico<sup>43</sup>.

Todos estos resultados demuestran que el patrón de metilación tiene importantes implicaciones clínicas en la LAL y junto con los estudios inmunológicos, citogenéticos y moleculares podría emplearse para la elaboración de una estrategia terapéutica adaptada al riesgo en los pacientes con LAL.

### Regulación epigenética de microRNA en la LAL

Recientemente, se ha observado que la inapropiada metilación puede afectar a la expresión de microRNA (miRNA) englobados directamente o que presentan en su región 5' una isla CpG<sup>51</sup>. Los miRNA conforman un nuevo grupo de genes que en la mayoría de los casos se localizan en regiones intergénicas e intrónicas del genoma, dando lugar a pequeñas moléculas de RNA no codificante de cadena simple, con una longitud de unos 21-25 nucleótidos y que regulan negativamente la expresión de genes codificantes a nivel postranscripcional. Distintos estudios han demostrado una disminución o falta de expresión de los miRNA en distintos tejidos tumorales respecto a su contrapartida normal, sugiriendo una función supresora de tumores y siendo la epigenética una de los posibles causas de esta falta de expresión. Este mecanismo de hipermetilación se ha observado en el caso del miRNA inhibidor del oncogén *BCL6* el *hsa-miR-127*<sup>52</sup>, *hsa-miR-124a* que regula

la expresión del oncogén *CDK6*<sup>53</sup> y el *hsa-miR-342* en cáncer de colon<sup>54</sup> y los miRNA *hsa-miR-9-1*, *hsa-miR-124a3*, *hsa-miR-148*, *hsa-miR-152* y *hsa-miR-663* en tumores primarios de cáncer de mama<sup>55</sup>.

En este sentido, nuestro grupo ha demostrado que un análisis integrado y secuencial usando ChIP-on-chip para la modificación de histonas, estudio de la metilación génica y análisis de expresión es capaz de identificar eficientemente miRNA supresores de tumores silenciados por metilación en las células de la LAL<sup>56</sup>. Nuestros datos muestran una marcada diferencia en los niveles de K4H3me3 y K9H3me2 entre los linfocitos normales y los tumorales. De hecho, las islas CpG asociadas a 13 miRNA mostraban altos niveles de K9H3me2 y/o bajos niveles de K4H3me3, un patrón que indica una estructura cromatínica cerrada asociada a una represión en la expresión génica. En adición, estas islas CpG se encontraron metiladas y la expresión disminuida de los miRNA pudo recuperarse tras el tratamiento con el agente desmetilante la decitabina, lo que sugiere que los eventos epigenéticos contribuyen a la alteración de los miRNA en las fases tempranas de la leucemogénesis linfoide. Además, el perfil de metilación de miRNA influyó el pronóstico de los pacientes con LAL. La supervivencia libre de recaídas (SLR) y la supervivencia global (SG) a los 14 años fue del 78% y 71% para los pacientes no metilados y del 24% y 28% para los pacientes metilados ( $P = 0,00001$ ). El análisis multivariante demostró que dicho perfil de metilación era un factor pronóstico independiente para la SLR ( $P = 0,0001$ ) y SG ( $P = 0,0001$ ).

Un aspecto interesante es que la mayoría de los pacientes con LAL presentaban metilación de algún miembro de la familia de miRNA *hsa-miR-124a*. Esto tiene importantes repercusiones funcionales, ya que

estos miRNA tienen como proteína diana a CDK6, la cual participa en la progresión del ciclo celular y la diferenciación. Nuestro grupo ha demostrado que la inactivación epigenética del *miR-124a* incrementa la expresión de CDK6 y la fosforilización de la proteína del retinoblastoma contribuyendo a la proliferación anómala de las células de LAL tanto *in vitro* como *in vivo*<sup>57</sup>.

## Hipometilación del ADN en la LAL

La hipometilación del ADN asociada al cáncer humano es tan prevalente como la hipermetilación, pero estos dos tipos de anomalías epigenéticas afectan a secuencias genómicas diferentes. La metilación se observa con mayor frecuencia en las islas CpG de los promotores de los genes, mientras que la hipometilación afecta a las regiones repetitivas del ADN, especialmente a retrotransposones y retrovirus endógenos (los cuales constituyen la mayor parte de todas nuestras secuencias genómicas)<sup>6</sup>. El significado biológico de la hipometilación en el cáncer es menos conocido que el de la hipermetilación; sin embargo, estudios realizados en ratones demuestran que la hipometilación inducida es capaz de producir tumores en los mismos<sup>58</sup>. En humanos, la alta frecuencia de hipometilación ligada al cáncer, la naturaleza de las secuencias afectadas y la ausencia de una asociación clara con la hipermetilación hablan en favor de un papel importante e independiente de la hipometilación en la génesis y progresión tumoral<sup>59</sup>.

Nuestro grupo ha analizado recientemente la frecuencia de hipometilación e hipermetilación en una serie amplia de pacientes con LAL (n = 307)<sup>60</sup> con objeto de determinar si ambos eventos son independientes y, por tanto, reflejan subtipos de LAL con características clínicas y biológicas diferentes. Nuestros resultados demuestran que la hipometilación del retrotransposón LINE1 está presente en el 24% de las LAL y que no existe ninguna asociación entre esta hipometilación y la hipermetilación de 39 islas CpG estudiadas. Esto sugiere que ambos cambios epigenéticos contribuyen a la leucemogénesis linfóide de una forma separada e independiente. Además, al contrario de lo que sucede con el patrón de hipermetilación, la hipometilación del ADN constituye un factor pronóstico favorable, estableciendo un grupo de muy bajo riesgo entre los pacientes con LAL.

## Perspectivas terapéuticas

Al contrario que los cambios genéticos, los cambios epigenéticos son potencialmente reversibles. Por lo tanto, existe la posibilidad de reactivar los genes inactivados epigenéticamente en el cáncer con fines te-

rapéuticos<sup>61</sup>. El agente desmetilante 5-azacitidina y su derivado 5-aza-2'-deoxicitidina (decitabina) son poderosos inhibidores de la metilación del ADN. De hecho, estos fármacos ya se han empleado con éxito en el tratamiento de enfermedades hematológicas, tales como los síndromes mielodisplásicos o la LMA<sup>62</sup>.

El hecho de que la desacetilación de histonas aparece conjuntamente con la metilación del ADN en el proceso de inactivación génica ha llevado al uso terapéutico de los antagonistas de las desacetilasas de histonas (HDAC). Por ejemplo, el ácido hidroxámico suberoilánilida (AHSA), o vorinostat, ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento de linfomas de células T y se ha demostrado su efectividad contra células cultivadas y primarias de leucemia, al utilizarse conjuntamente con el agente MK-0457<sup>63</sup>. Otro inhibidor de HDAC es el compuesto LBH-589 (panobinostat), que está todavía en estudio para el tratamiento de diversos cánceres, incluidas las neoplasias hematológicas<sup>64</sup>.

## Agradecimientos

*Este trabajo ha sido financiado en parte por ayudas de: Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) PI070602, PI070608, PI060003, CP07/00215 y RD06/0020; Junta de Andalucía 0004/2007 y 06/0356, Beca Ortiz Landázuri 2006 (Dpto. Salud-Gobierno de Navarra), Fundación IMABIS, CIMA y Asociación Medicina e Investigación (AMI). V. M. disfruta de un contrato de formación en investigación Río Hortega (Instituto de Salud Carlos III).*

## Bibliografía

1. Grønbaek K, Hother C, Jones PA. Epigenetic changes in cancer. *APMIS*. 2007; 115: 1039-59.
2. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*. 2003; 349: 2042-54.
3. Malone CS, Miner MD, Doerr JR, Jackson JP, Jacobsen SE, Wall R et al. C<sup>m</sup>C(A/T)GG DNA methylation in mature B cell lymphoma gene silencing. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98: 10404-9.
4. Agirre X, Vizmanos JL, Calasanz MJ, García-Delgado M, Laráyoz MJ, Novo FJ. Methylation of CpG dinucleotides and/or CCWGG motifs at the promoter of *TP53* correlates with decreased gene expression in a subset of acute lymphoblastic leukemia patients. *Oncogene*. 2003; 22: 1070-2.
5. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*. 2003; 33: 245-54.
6. Román-Gómez J, Jiménez-Velasco A, Agirre X, Cervantes F, Sánchez J, Gárate L, et al. Promoter hypomethylation of the LINE-1 retrotransposable elements activates sense/antisense transcription and marks the progression of chronic myeloid leukemia. *Oncogene*. 2005; 24: 7213-23.
7. Brena RM, Costello JF. Genome-epigenome interactions in cancer. *Human Molecular Genetics*. 2007; 16: 96-105.

8. Reik W, Murrell A. Genomic imprinting. Silence across the border. *Nature*. 2000; 405: 408-9.
9. Futscher BW, Oshiro MM, Wozniak RJ, Holtan N, Hanigan CL, Duan H, et al. Role for DNA methylation in the control of cell type specific maspin expression. *Nature Genetics*. 2002; 31: 175-9.
10. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4: 143-53.
11. Singal R, Ginder GD. DNA methylation. *Blood*. 1999; 93: 4059-70.
12. Struhl K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev*. 1998; 12: 599-606.
13. Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*. 1998; 393: 386-9.
14. Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass KU, Landsberger N, et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet*. 1998; 19: 187-91.
15. Mannervik M, Nibu Y, Zhang H, Levine M. Transcriptional coregulators in development. *Science*. 1999; 284: 606-9.
16. Hendrich B, Bird A. Mammalian methyltransferases and methyl-CpG binding domains: proteins involved in DNA methylation. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2000; 249: 55-74.
17. Rountree MR, Bachman KE, Herman JG, Baylin SB. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene*. 2001; 20: 3156-65.
18. Im H, Grass JA, Christensen HM, Perkins A, Bresnick EH. Histone deacetylase-dependent establishment and maintenance of broad low-level histone acetylation within a tissue-specific chromatin domain. *Biochemistry*. 2002; 41: 15152-60.
19. El Osta A. DNMT cooperativity-the developing links between methylation, chromatin structure and cancer. *Bioessays*. 2003; 25: 1071-84.
20. Dobosy JR, Selker EU. Emerging connections between DNA methylation and histone acetylation. *Cell Mol Life Sci*. 2001; 58: 721-7.
21. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature Reviews Genetics*. 2007; 8: 286-98.
22. Ballestar E, Esteller M. Chapter 9: epigenetic gene regulation in cancer. *Advances in Genetics*. 2008; 61: 247-67.
23. Román-Gómez J, Jiménez-Velasco A, Barrios M, Prosper F, Heiniger A, Torres A, Agirre X. Poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia may relate to promoter hypermethylation of cancer-related genes. *Leukemia Lymphoma*. 2007; 48: 1269-82.
24. Román-Gómez J, Castillejo JA, Jiménez A, González MG, Reina ML, Rodríguez MC, et al. Hypermethylation of the calcitonin gene in acute lymphoblastic leukemia is associated with unfavourable clinical outcome. *Br J Haematol*. 2001; 113: 329-38.
25. Román-Gómez J, Castillejo JA, Jiménez A, González MG, Moreno F, Rodríguez MC, et al. 5' CpG island hypermethylation is associated with transcriptional silencing of the p21CIP1/WAF1/SD1 gene and confers poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2002; 99: 2291-6.
26. Román-Gómez J, Jiménez-Velasco A, Agirre X, Castillejo JA, Barrios M, Andreu EJ, et al. The normal epithelial cell-specific 1 (NES1) gene, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 19q13.3-4, is downregulated by hypermethylation in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2004; 18: 362-5.
27. Román-Gómez J, Jiménez-Velasco A, Agirre X, Castillejo JA, Navarro G, Barrios M, et al. Transcriptional silencing of the Dickkopf-3 (Dkk-3) gene by CpG hypermethylation in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Cancer*. 2004; 91: 707-13.
28. Jiménez-Velasco A, Román-Gómez J, Agirre X, Barrios M, Navarro G, Vázquez I, et al. Downregulation of the large tumor suppressor 2 (LATS2 / KPM) gene confers poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2005; 19: 2347-50.
29. Agirre X, Román-Gómez J, Vázquez I, Jiménez-Velasco A, Gárate L, Montiel-Duarte C, et al. Abnormal methylation of the common PARK2 and PACRG promoter is associated with downregulation of gene expression in Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) and Chronic Myeloid Leukemia (CML). *Int J Cancer*. 2006; 118: 1945-53.
30. Agirre X, Román-Gómez J, Jiménez-Velasco A, Gárate L, Montiel-Duarte C, Navarro G, et al. ASP1, a common activator of TP53, is inactivated by aberrant methylation of its promoter in acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene*. 2006; 25: 1862-70.
31. San José-Eneriz E, Agirre X, Román-Gómez J, Cordeu L, Gárate L, Jiménez-Velasco A, et al. Downregulation of DBC1 expression in acute lymphoblastic leukaemia is mediated by aberrant methylation of its promoter. *Br J Haematol*. 2006; 134: 137-44.
32. Román-Gómez J, Cordeu L, Agirre X, Jiménez-Velasco A, San José-Eneriz E, Gárate L, Calasanz MJ, Heiniger A, Torres A, Prosper F. Epigenetic regulation of WNT signaling pathway in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2007; 109: 3462-9.
33. Román-Gómez J, Jiménez-Velasco A, Cordeu L, Vilas-Zornosa A, San José-Eneriz E, Gárate L et al. Wnt5a, a putative tumour suppressor of lymphoid malignancies, is inactivated by aberrant methylation in acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Cancer*. 2007; 43: 2736-46.
34. Martin V, Agirre X, Jiménez-Velasco A, San José-Eneriz E, Cordeu L, Gárate L, et al. Methylation status of the wnt signaling pathway genes affects the clinical outcome of Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Sci*. 2008; 99: 1865-8.
35. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res*. 2001; 61: 3225-9.
36. Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, et al. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet*. 2000; 24: 132-8.
37. García-Manero G, Daniel I, Smith TL, Kornblau SM, Kantarjian HM, Issa J-P. DNA methylation of multiple promoter-associated CpG islands in adult acute lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res*. 2002; 8: 2217-24.
38. Gutiérrez MI, Siraj AK, Bhargava M, Ozbek U, Banavali S, Chaudhary MA, et al. Concurrent methylation of multiple genes in childhood ALL: Correlation with phenotype and molecular subgroup. *Leukemia*. 2003; 17: 1845-50.
39. Shen L, Toyota M, Kondo Y, Obata T, Daniel S, Pierce S, et al. Aberrant DNA methylation of p57KIP2 identifies a cell-cycle regulatory pathway with prognostic impact in adult acute lymphocytic leukemia. *Blood*. 2003; 101: 4131-6.
40. Román-Gómez J, Jiménez-Velasco A, Castillejo JA, Agirre X, Barrios M, Navarro G, et al. Promoter hypermethylation of cancer-related genes: a strong independent prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2004; 104: 2492-8.
41. Takahashi T, Shivapurkar N, Reddy J, Shigematsu H, Miyajima K, Suzuki M, et al. DNA methylation profiles of lymphoid and hematopoietic malignancies. *Clin Cancer Res*. 2004; 10: 2928-35.
42. Román-Gómez J, Jiménez-Velasco A, Agirre X, Prosper F, Heiniger A, Torres A. Lack of CpG island methylator phenotype defines a clinical subtype of T-cell acute lymphoblastic leukemia associated with good prognosis. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 7043-9.
43. Román-Gómez J, Jiménez-Velasco A, Agirre X, Castillejo JA, Navarro G, Calasanz MJ, et al. CpG island methylator phe-

- notype redefines the prognostic effect of t(12; 21) in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res.* 2006; 12: 4845-50.
44. García-Manero G, Bueso-Ramos C, Daniel J, Williamson J, Kantarjian HM, Issa JP DNA methylation patterns at relapse in adult acute lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res.* 2002; 8: 1897-903.
  45. Matsushita C, Yang Y, Takeuchi S, Matsushita M, van Dongen JJ, Szczepanski T, et al. Aberrant methylation in promoter-associated CpG islands of multiple genes in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Oncol Rep.* 2004; 12: 97-9.
  46. Oka T, Ouchida M, Koyama M, Ogama Y, Takada S, Nakatani Y, et al. Gene silencing of the tyrosine phosphatase SHP1 gene by aberrant methylation in leukemias/lymphomas. *Cancer Res.* 2002; 62: 6390-4.
  47. Goodman PA, Burkhardt N, Juran B, Tibbles HE, Uckun FM Hypermethylation of the spleen tyrosine kinase promoter in T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene.* 2003; 22: 2504-14.
  48. Ponder BAJ. Cancer genetics. *Nature.* 2001; 411: 336-41.
  49. Wada M, Bartram CR, Nakamura H, Hachiya M, Chen DL, Borenstein J, et al. Analysis of p53 mutations in a large series of lymphoid hematologic malignancies of childhood. *Blood.* 1993; 82: 3163-9.
  50. Pui C-H, Evans WE. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 1998; 339: 605-15.
  51. Esteller M. Epigenetics in Cancer. *N Engl J Med.* 2008; 358: 1148-59.
  52. Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, Coetzee GA, et al. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell.* 2006; 9: 435-43.
  53. Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, Fraga MF, Cerrato C, Setién F, et al. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res.* 2007; 67: 1424-9.
  54. Grady WM, Parkin RK, Mitchell PS, Lee JH, Kim YH, Tsuchiya KD, et al. Epigenetic silencing of the intronic microRNA hsa-miR-342 and its host gene EVL in colorectal cancer. *Oncogene.* 2008; 27: 3880-8.
  55. Lehmann U, Hasemeier B, Christgen M, Müller M, Römermann D, Länger F, et al. Epigenetic inactivation of microRNA gene hsa-mir-9-1 in human breast cancer. *J Pathol.* 2008; 214: 17-24.
  56. Román-Gómez J, Agirre X, Jiménez-Velasco A, Arqueros V, Vilas-Zornoza A, Rodríguez-Otero P, et al. Epigenetic regulation of microRNAs in acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 2009; 27: 1316-22.
  57. Agirre X, Vilas-Zornoza A, Jiménez-Velasco A, Martín-Subero I, Cordeu L, Gárate L, et al. Epigenetic silencing of the tumor suppressor microRNA hsa-mir-124a regulates CDK6 expression and confers a poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.* 2009; 69 (10): 4443-53.
  58. Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene.* 2002; 21: 5400-13.
  59. Kaneda A, Tsukamoto T, Takamura-Enya T, Watanabe N, Kaminishi M, Sugimura T, et al. Frequent hypomethylation in multiple promoter CpG island is associated with global hypomethylation, but not with frequent promoter hypermethylation. *Cancer Sci.* 2004; 95: 58-64.
  60. Román-Gómez J, Jiménez-Velasco A, Agirre X, Castillejo JA, Navarro G, Gárate L, et al. Promoter hypermethylation and global hypomethylation are independent epigenetic events in lymphoid leukemogenesis with opposing effects on clinical outcome. *Leukemia.* 2006; 20: 1445-8.
  61. Esteller M. DNA methylation and cancer therapy: new developments and expectations. *Curr Opin Oncol.* 2005; 17: 55-60.
  62. Kaminskas E, Farrel A, Abraham S, Baird A, Hsieh LS, Lee SL, et al. Approval summary: azacitidine for treatment of my-

elodysplastic syndrome subtypes. *Clin Cancer Res.* 2005; 11: 3604-8.

63. Fiskus W, Wang Y, Joshi R, Rao R, Yang Y, Chen J, et al. Cotreatment with vorinostat enhances activity of MK-0457 (VX-680) against acute and chronic myelogenous leukemia cells. *Clin Cancer Res.* 2008; 14: 6106-15.
64. Scuto A, Kirschbaum M, Kowolik C, Kretzner L, Juhasz A, Atadja P, et al. The novel histone deacetylase inhibitor, LBH589, induces expression of DNA damage response genes and apoptosis in Ph- acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood.* 2008; 111: 5093-100.

## MicroRNA Y TUMORES HEMATOLÓGICOS

A. NAVARRO, T. DÍAZ, M. MONZÓ

*Laboratorio de Oncología Molecular. Anatomía y Embriología Humana. Facultad de Medicina. Universidad de Barcelona*

---

### Los microRNA

Los microRNA (miRNA) son pequeñas moléculas de RNA endógeno que no codifican para proteínas sino que actúan regulando la expresión génica. Pertenecen a una de las clases más abundantes de moléculas reguladoras génicas de los organismos multicelulares. Realizan su función mediante la unión a los RNA mensajeros (mRNA) inhibiendo así su traducción a proteínas.

Estas pequeñas moléculas de RNA no codificante fueron descubiertas en 1993 por Victor Ambros, Rosalind Lee y Rhonda Feinbaum, cuando observaron que *lin-4*, un gen que actuaba en el control del desarrollo de *C. elegans*, no codificaba para proteína sino que actuaba inhibiendo la traducción a proteína del gen *lin-14*<sup>1</sup>. Desde el descubrimiento de *lin-4* en *C. elegans*, se han ido descubriendo miRNA en otras especies y ahora sabemos que los organismos multicelulares expresan cientos de miRNA con un patrón de expresión dependiente de tejido y de tipo celular.

Según el último recuento de mirBase<sup>2</sup> en 2009, hay más de 700 miRNA maduros registrados en humanos. Actualmente se están identificando sus dianas y funciones, entre las que destacan: el control de la proliferación y la muerte celular, la regulación de la embriogénesis o la modulación de la diferenciación del linaje hematopoyético.

---

### Biogénesis de los miRNA

Los genes que codifican para los miRNA están localizados, principalmente (90%), dentro de los intrones de genes que pueden codificar para proteínas. Así,



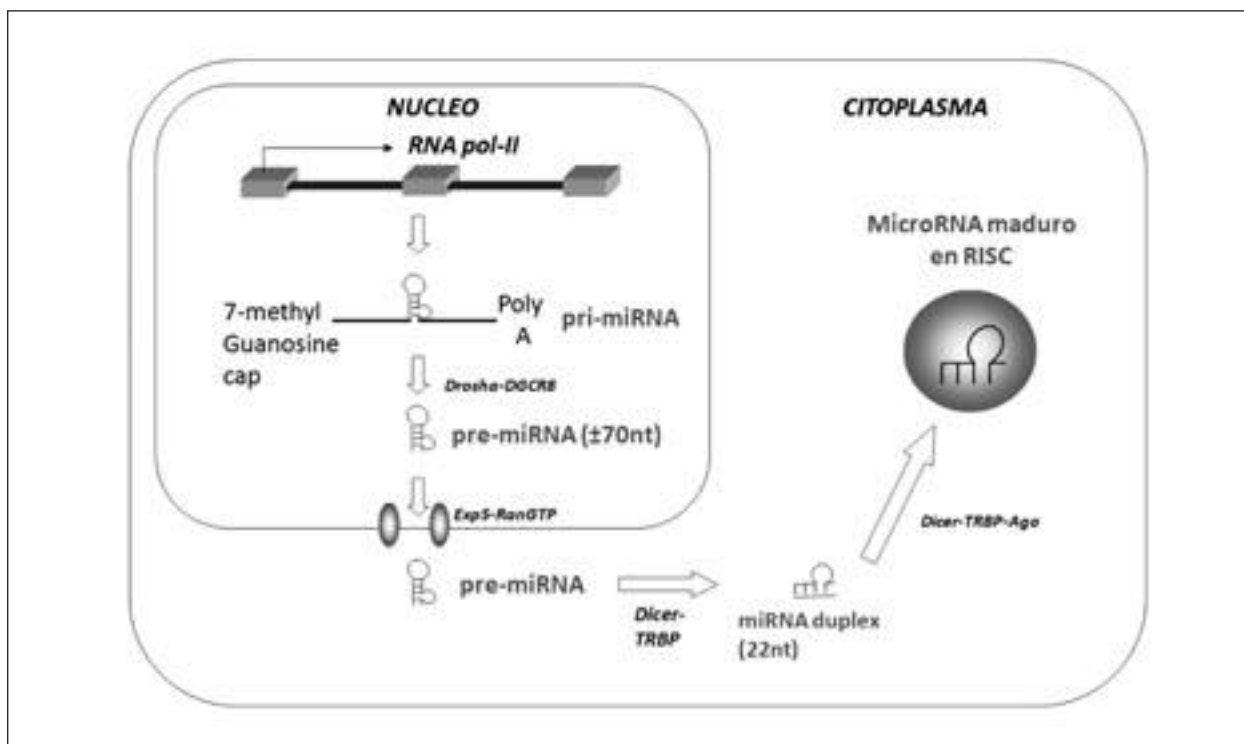


Figura 1. Proceso de transcripción y maduración de los miRNA.

su expresión se puede correlacionar con la regulación transcripcional de su gen huésped explicando la especificidad tisular. Con menor frecuencia, los miRNA pueden localizarse en regiones intergénicas o exónicas. En este caso, su expresión puede ser regulada de forma independiente a través de sus propios elementos reguladores.

La biogénesis de los miRNA maduros, moléculas de unos 20-25 nucleótidos de longitud con un grupo fosfato en el extremo 5' y un grupo hidroxilo en el extremo 3', se inicia en el núcleo de la célula y termina en el citoplasma, donde realizan su función (Figura 1). Son transcritos por la RNA polimerasa II, que produce una larga molécula de RNA que puede exceder 1 kb, conocida con el nombre de "miRNA primario" (pri-miRNA). Éste forma una estructura en *hairpin stem-loop*, que es cortada en el núcleo por la endonucleasa RNasa III Droscha asociada a la proteína DGCR8. Droscha corta de forma asimétrica ambas cadenas en las zonas cercanas a la base de la estructura primaria en *stem-loop*, de modo que el producto resultante es una molécula de unos 60-70 nucleótidos denominada "pre-miRNA". Este pre-miRNA es exportado al citoplasma de forma activa a través del complejo dependiente de RAN-GTP, Exportina-5. Una vez en el citoplasma, esta molécula, de unos 70nt, será cortada por la endonucleasa RNasa III Dicer, asociada a las proteínas TRBP y PACT, dando lugar a una molécula de doble cadena conocida como "miRNA dúplex". Cuando las dos ca-

denas del miRNA dúplex se separaran, una de ellas da lugar al miRNA maduro que se incorpora al complejo ribonucleoproteico conocido como *RNA-induced silencing complex* (RISC), el cual es la maquinaria catalítica responsable de la degradación del mRNA diana y/o de la inhibición de la traducción, mientras que la otra cadena, conocida como miRNA\*, es degradada en la mayoría de los casos<sup>3</sup>.

En el complejo miRISC humano formado por TRBP, Dicer, AGO2 y PACT, el enzima catalítico que corta el mRNA diana es AGO2. Los dos pasos cruciales en el ensamblaje de miRISC son: la selección de la cadena de miRNA *sense* o *antisense*, seguida de la potencial destrucción de la otra cadena. Estos mecanismos no se conocen con exactitud y no está claro si la cadena *sense* es destruida en todas las especies; pero, una vez que el miRISC se ha ensamblado con la cadena que le hace de guía, éste se unirá al mRNA diana en la región UTR 3' para bloquear su traducción.

### Mecanismos de acción de los miRNA

Los miRNA pueden regular negativamente la expresión génica a través de dos mecanismos principales: la degradación o la represión traduccional del mRNA diana. La utilización de un mecanismo u otro dependerá del mRNA diana. Una vez que el miRNA se incorpore en el complejo citoplasmático RISC, actua-



Tabla 1. Principales bases de datos de microRNA humanos y de predicción de dianas

Base de Datos	URL	Características
MIRBASE	<a href="http://microma.sanger.ac.uk/">http://microma.sanger.ac.uk/</a>	Secuencias, dianas y registro
TARGETSCAN	<a href="http://www.targetscan.org/">http://www.targetscan.org/</a>	Dianas predichas de miRNA
TARBASE	<a href="http://www.diana.pcbi.upenn.edu/tarbase.html">http://www.diana.pcbi.upenn.edu/tarbase.html</a>	Dianas validadas experimentalmente
MIRANDA	<a href="http://www.microrna.org/">http://www.microrna.org/</a>	Dianas predichas
miRNAMap	<a href="http://mirmap.mbc.nctu.edu.tw/">http://mirmap.mbc.nctu.edu.tw/</a>	Dianas, localización y estructura
miRGen	<a href="http://www.diana.pcbi.upenn.edu/miRGen.html">http://www.diana.pcbi.upenn.edu/miRGen.html</a>	Organización genómica y función. Clústers de miRNA
DIANA-MicroT Analyzer	<a href="http://diana.pcbi.upenn.edu/">http://diana.pcbi.upenn.edu/</a>	Predicción de dianas de miRNA

rá un mecanismo u otro dependiendo del grado de complementariedad del miRNA con su diana. Si la complementariedad es elevada o total, se producirá la degradación del mRNA, mientras que, si no es total o es insuficiente, se producirá una inhibición de la traducción<sup>3</sup>.

Después de la degradación del mRNA, el miRNA permanece intacto y puede guiar al complejo RISC hacia el reconocimiento y la destrucción de mRNA adicionales. En general, en este mecanismo de acción, la complementariedad se puede dar tanto en regiones codificantes como en regiones UTR 3', mientras que cuando actúa inhibiendo la traducción suele unirse a la región UTR 3' del mRNA. Excepcionalmente, se ha observado que miR-122 afecta positivamente la replicación del virus de la hepatitis C uniéndose a la región 5' no codificante (UTR 5'). En este caso, el miRNA tiene función activadora de la expresión génica<sup>4</sup>.

### Identificación de las dianas de los miRNA

La identificación experimental de dianas de los miRNA es difícil debido a que un miRNA puede tener muchos mRNA diana y un mRNA puede estar regulado por más de un miRNA. En la mayoría de casos para que un miRNA se una a su mRNA diana no es necesaria una complementariedad total, es suficiente con la unión de los 7-8 nucleótidos que conforman la región conocida como *seed sequence*. En consecuencia, la predicción bioinformática de dianas juega un papel fundamental<sup>5</sup> (Tabla 1). Los primeros resultados de estas predicciones fueron muy diversos, pero los últimos análisis sugieren que al menos un 30% de dianas conservadas de miRNA pueden ser predichas con cierta seguridad, cuando consideramos unas 60 familias de miRNA conservadas<sup>6</sup>.

### Regulación de la expresión de los miRNA

El genoma humano contiene más de mil genes que codifican para miRNA, aproximadamente el 1-5% de los genes expresados. Estos miRNA están conservados filogenéticamente y, a menudo, se organizan en tándem o en clústers. Estas organizaciones pueden tener una particular importancia en el control de la expresión génica y en la propia expresión de estos miRNA: cuando un grupo de miRNA de secuencias similares se encuentra agrupado en un clúster, los productos de la expresión de estos miRNA se pueden sincronizar para regular un conjunto de mRNA dianas. Sin embargo, estos clústers pueden contener también miRNA con diferentes secuencias, que se dirigirán cada uno hacia sus dianas específicas.

Poco se conoce del control de la expresión de estas moléculas reguladoras de muchos de los procesos celulares, aunque podemos encontrar algunos ejemplos: la vía de señalización LIN-12/Notch regula la expresión del gen MIRN16. Esto parece mostrar que la regulación de la expresión de los miRNA sigue el modelo clásico de control de la expresión de los mRNA. Otro ejemplo es MIRN146 que contiene en su región UTR 5' tres secuencias consenso de unión de NF-κB, cosa que muestra que MIRN146 es un gen dependiente de NF-κB.

Cualquier mecanismo que pueda provocar la sobreexpresión o infraexpresión de un gen, como la amplificación génica o la delección, podrá afectar a los niveles de miRNA. En este sentido, los mecanismos epigenéticos que pueden controlar la expresión de genes que codifican para proteína, podrán jugar un papel fundamental en el control de la expresión de los miRNA. Saito y colaboradores mostraron que mecanismos como la metilación del DNA y las modificaciones de histonas pueden afectar a la expresión de miRNA<sup>7</sup>.

## Infecciones virales y miRNA

Los miRNA reúnen varias características que los hacen una opción atractiva para los virus en la regulación de la expresión génica. La primera es su pequeño tamaño, que les permite estar fácilmente codificados en los genomas virales, donde el espacio es algo de vital importancia. Otra característica importante es que los miRNA no son inmunogénicos y tienen la ventaja de ser un mecanismo de regulación intrínseco del propio huésped. Y la última característica importante es que con un miRNA se puede alterar el patrón de expresión de un gran número de genes.

En la complejidad de las interacciones que se producen entre la célula huésped y el virus, los miRNA pueden actuar en la patogenia viral de diferentes modos: mediante una regulación de la expresión de genes virales por miRNA de la célula huésped, mediante una regulación de la expresión de genes virales por miRNA virales o por una regulación de la expresión de genes del huésped por miRNA virales.

Todavía hay mucho que estudiar sobre la estrecha relación que se produce entre un virus y su célula huésped, pero en la intrincada red que se establece entre ellos, los miRNA juegan un papel fundamental en ambas direcciones<sup>8</sup>.

## miRNA y cáncer

La importancia de los miRNA en cáncer se fundamenta en que la mayoría de los miRNA humanos se encuentran localizados en, o cerca de, sitios frágiles, o en regiones genómicas asociadas a cáncer<sup>9</sup>, y hay una evidencia creciente que sugiere que la expresión anormal de miRNA es una característica común de los procesos neoplásicos. Además, los patrones de expresión de miRNA pueden distinguir tumores según su diagnóstico y estadio de desarrollo, de forma mucho más precisa que los estudios tradicionales de expresión génica<sup>10,11</sup>.

Los miRNA juegan un papel directo en la oncogénesis, actuando como oncogenes o como genes supresores de tumores<sup>12,13</sup>. La expresión aberrante de estos miRNA se ha asociado con muchos tipos de cáncer, incluyendo tumores sólidos y hematopoyéticos. En algunos casos la expresión aberrante se ha asociado a alteraciones cromosómicas, pero en general parece que los mecanismos por los cuales se ve alterada su expresión no están claros debido a una falta de comprensión de los mecanismos que regulan la expresión de los miRNA.

## MicroRNA en la hematopoyesis

Los miRNA juegan un papel clave como precisos moduladores en la diferenciación hematopoyética y cual-

quier alteración del miRNome, conjunto de miRNA de una célula, puede justificar el desarrollo de un fenotipo maligno.

La primera evidencia de que los miRNA participan en la hematopoyesis surgió de Chen y colaboradores<sup>14</sup>, quienes clonaron aproximadamente 150 miRNA de medula ósea de ratón y vieron que miR-181a, miR-223 y miR-142 estaban expresados, principalmente, en tejidos hematopoyéticos. Además, vieron que la sobreexpresión de miR-181a en células madre hematopoyéticas, posteriormente trasplantadas en ratones irradiados de forma letal, daba lugar a un incremento significativo de células B y un descenso de células T.

El estudio de la expresión de miRNA durante el proceso de diferenciación de una célula madre hematopoyética hacia los diferentes linajes, linfoides o mieloides mostró diferentes grupos de miRNA claves, esquematizados en la Figura 2.

También participan en la modulación de la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, miR-155 modula la función del centro germinal, la respuesta dependiente de anticuerpo de las células T y la producción de citocinas, además de ser necesario para las funciones normales de las células B y T. Otro ejemplo es MiR-181a, el cual regula la sensibilidad del receptor linfocítico T (TCR) durante el desarrollo.

## MicroRNA en leucemias

### Leucemia mieloide aguda

El análisis del patrón de expresión de miRNA en 240 pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) (predominantemente riesgo intermedio), por Garzon y colaboradores<sup>15</sup>, identificó patrones de miRNA asociados a las translocaciones balanceadas 11q23, a la trisomía 8 aislada y a las mutaciones de FLT3 (FLT3-IDT). En estos pacientes la expresión de miRNA aparece desregulada por alteraciones citogenéticas. Además, identificaron dos miRNA, miR-191 y miR-199a, con valor pronóstico para la supervivencia. El mismo grupo en un trabajo reciente encontró un patrón de miRNA que caracterizaba a los pacientes con NPM1 mutado y con FLT3-ITD+. Los pacientes con NPM1 mutado presentaban sobreexpresados a miR-10a, miR-10b y a varios miembros de la familia de let-7 y de miR-29, e infraexpresados, entre otros, a miR-204, que inhibe a HOXA10 y MEIS1. La sobreexpresión de genes HOX observada en los casos con NPM1 mutada se podría explicar por la pérdida de algunos miRNA. Los pacientes con FLT3-ITD+ se caracterizaron por la sobreexpresión de miR-155, aunque se ha demostrado que la sobreexpresión de este miRNA es independiente de FLT3. MiR-155 bloquea la diferen-

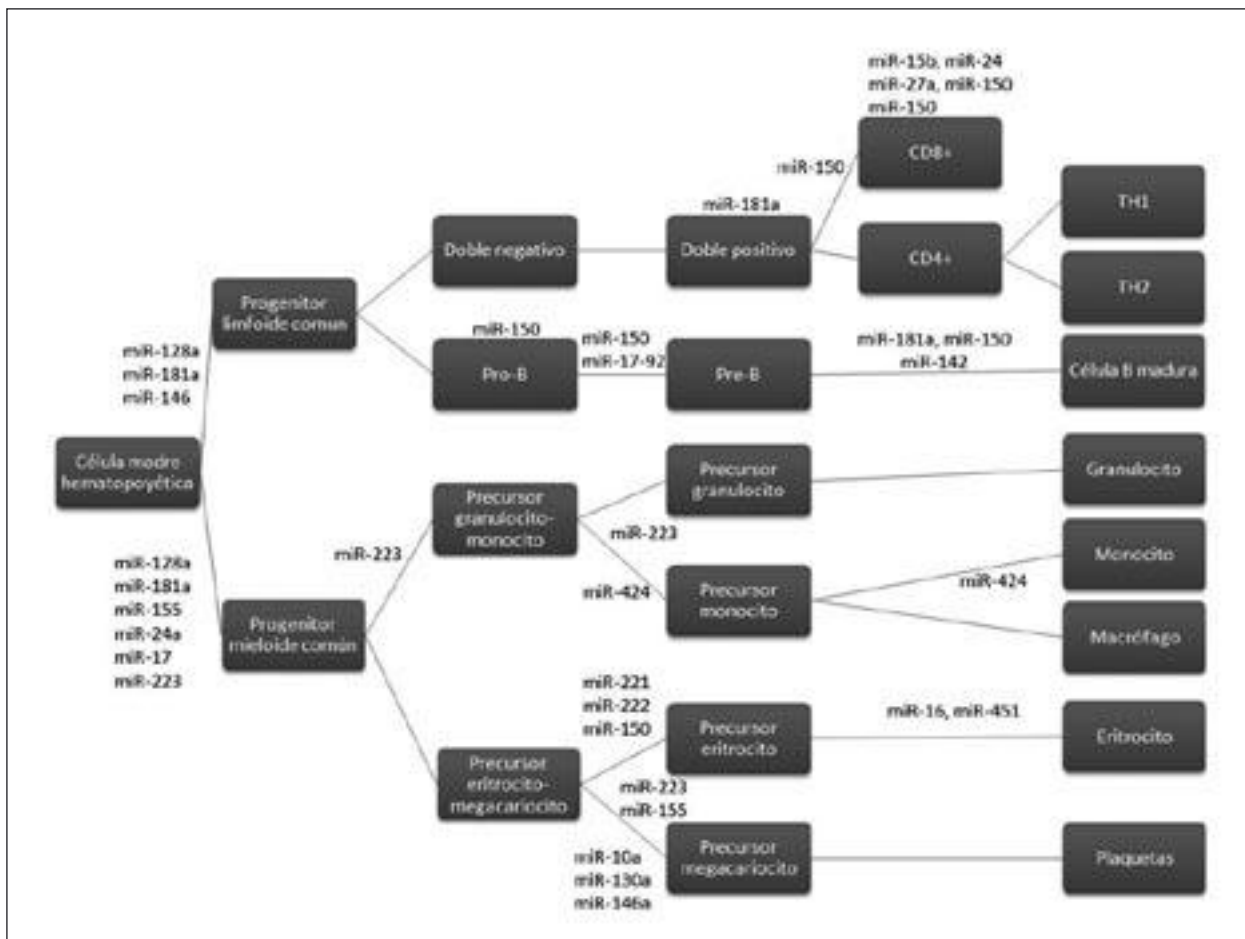


Figura 2. Principales microRNA que actúan durante el proceso de diferenciación hematopoyética.

ciación megacariocítica/eritrocítica y está así involucrado en la patogenia de FLT3-ITD.

Un estudio retrospectivo en pacientes con LMA, con citogenética normal y con factores moleculares de alto riesgo como FLT-IDT+, NPM1 no mutada o ambos, identificó que la infraexpresión de la familia miR-181 contribuye a un fenotipo de LMA más agresivo mediante la acción sobre TLR y IL-1b.

En los casos con t(8;21) se ha visto que la oncoproteína AML1/ETO induce la silenciación, por remodelación de la cromatina, de miR-223, miRNA, importante en la ontogenia mieloide normal<sup>16</sup>.

### Leucemia mieloide crónica

En la leucemia mieloide crónica (LMC) se ha descrito, en líneas celulares, la sobreexpresión del clúster miR-17-92 (miR-17-5p, miR-17-3p, miR-18, miR-19a, miR-20, miR-19b y miR-92-1) como resultado de la transactivación inducida por BCR-ABL y c-Myc. Concretamente, esta sobreexpresión puede inducir-

se en la fase crónica temprana, pero no en la fase de crisis blástica, sugiriendo que participa en el desarrollo de la LMC. Recientemente, se ha observado que ABL1 está regulado por miR-203. Este miRNA aparece hipermetilado en tumores Ph+. Su reexpresión provoca una reducción drástica de la proliferación dependiente de ABL1 en células tumorales<sup>16</sup>.

### Leucemia linfocítica crónica

En leucemia linfocítica crónica (LLC), la alteración cromosómica más frecuente es la delección de la región 13q14 (50% de los casos). Calin y colaboradores<sup>17</sup> mostraron que dos miRNA, miR-15a y miR-16-1, estaban localizados en esta región y estaban delecionados o infraexpresados en el 68% de pacientes con LLC en comparación con linfocitos normales CD5+ de donantes sanos. El efecto antitumoral de miR-15a y miR-16-1 se realizaba mediante su diana BCL2. Recientemente, se han identificado mutaciones en estos miRNA que también se asocian a diferentes fenotipos de LLC.

Otros miRNA con función supresora de tumores en LLC son miR-29b y miR-181b que tienen como diana TCL1. Este oncogén es un marcador de LLC agresiva y presenta una correlación con los niveles de ZAP70 y con IgV<sub>H</sub> no mutada. Otro miRNA que aparece sobreexpresado en LLC es miR-155<sup>16</sup>.

### Leucemia linfoblástica aguda

Pocos estudios han analizado el papel de los miRNA en LLA. Zanette y colaboradores compararon la expresión de miRNA en 7 pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA) respecto a células B normales CD19+ de 6 individuos sanos e identificaron el clúster oncogénico miR-17-92 sobreexpresado. En otro estudio, Mi y colaboradores encontraron una firma de miRNA capaz de discriminar con una precisión del 98% muestras de LLA de muestras de LMA. Concretamente, miR-128a y miR-128b aparecían sobreexpresados y let-7b y miR-223 infraexpresados en LLA. MiR-128b era específico de LLA ya que estaba también sobreexpresado en LLA respecto a las células CD19+<sup>16</sup>.

## MicroRNA en linfomas

### Linfomas no Hodgkin

MiR-155 es uno de los miRNA con un papel oncogénico mejor establecido. Éste aparece sobreexpresado en muchos tumores. En linfomas se ha identificado en el linfoma difuso de células grandes (LDCG), en el linfoma primario mediastínico de células B, en el linfoma pediátrico de Burkitt y en el linfoma de Hodgkin. Este miRNA presenta un valor pronóstico en el LDCG. Otros miRNA identificados son miR-21 y miR-221, que junto con miR-155 son marcadores de mal pronóstico en LDCG. En otro estudio se mostró que miR-330, miR-17-5p, miR-106a y miR-210 permitían discriminar entre LDCG, linfomas foliculares y ganglios linfáticos reactivos. MiR-17-5p y miR-106 son miembros del clúster miR-17-92, que se localiza en la región cromosómica 13q31-32. Esta región se encuentra frecuentemente amplificada en linfomas B y aparece sobreexpresada en el 65% de pacientes con un linfoma B. O'Donnell y colaboradores<sup>18</sup> mostraron que la expresión de este clúster se inducía por c-Myc y, una vez transcritos, tenían como diana a E2F1, actuando así en el control de la proliferación celular.

Actuando como genes supresores de tumores encontramos a miR-143 y miR-145, que aparecen infraexpresados en LLC, linfomas de célula B, en líneas celulares de linfoma de Burkitt y en líneas celulares transformadas por VEB. Su acción se asocia a su diana Erk5, una MAPK recientemente caracterizada<sup>16</sup>.

### Linfoma de Hodgkin

En el linfoma de Hodgkin (LH), el primer miRNA identificado con papel oncogénico fue miR-155 por Kluiver y colaboradores. Recientemente, nuestro grupo identificó una firma de 25 miRNA que permitía discriminar entre LH clásico y ganglios linfáticos reactivos. Además, identificamos 36 miRNA que estaban diferencialmente expresados entre los subtipos de LH clásico esclerosis nodular y celularidad mixta. Entre los 25 miRNA de la firma de LH clásico encontramos a miR-21, miR-134 y miR-138 que se detectaron en las células de Hodgkin/Reed Sternberg mediante hibridación *in situ*. En los pacientes VEB+ detectamos selectivamente infraexpresados a miR-96, miR-128a y miR-128b<sup>19</sup>. Otros estudios en líneas celulares de LH mostraron una expresión característica de miRNA en estas células; entre ellos, miR-9 y let-7a, que tienen como diana a PRDM1/blimp-1, molécula clave en la regulación terminal en la diferenciación de las células B.

## Consideraciones finales

Los miRNA son pequeñas moléculas de RNA reguladoras del proceso de traducción de un mRNA a proteína. Éstos nos están ofreciendo un sistema ultrafino de regulación celular que permite modular la expresión génica, incluso una vez el mRNA ha sido transcrito. Su expresión específica, de tejido y de tipo celular, permite una mejor discriminación entre subtipos tumorales, facilitando la subclasificación tumoral. Además, su pequeño tamaño los hace ideales para el estudio en muestras incluidas en parafina o para estudios de RNA circulante en suero, con la intención de detectar nuevos marcadores de progresión tumoral. La desregulación de la expresión de los miRNA en muchos tipos de tumores y su importancia en el proceso de diferenciación hematopoyética sugiere que la actuación sobre los miRNA pueda abrir puertas hacia nuevas terapias basadas en el silenciamiento o sobreexpresión de determinados miRNA claves en las neoplasias hematológicas<sup>20</sup>.

## Bibliografía

1. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993; 75: 843-54.
2. Griffiths-Jones S. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res*. 2004; 32: D109-D111.
3. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004; 116: 281-97.
4. Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*. 2005; 309: 1577-81.



5. Rajewsky N, Socci ND. Computational identification of microRNA targets. *Dev Biol.* 2004; 267: 529-35.
6. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature.* 2005; 433: 769-73.
7. Kim VN, Nam JW. Genomics of microRNA. *Trends Genet.* 2006; 22: 165-73.
8. Cullen BR. Viral and cellular messenger RNA targets of viral microRNAs. *Nature.* 2009; 457: 421-5.
9. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101: 2999-3004.
10. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6: 857-66.
11. Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 2005; 435: 834-8.
12. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6: 259-69.
13. He L, Thomson JM, Hemann MT, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature.* 2005; 435: 828-33.
14. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science.* 2004; 303: 83-6.
15. Garzon R, Volinia S, Liu CG, et al. MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2008; 111: 3183-9.
16. Fabbri M, Croce CM, Calin GA. MicroRNAs in the ontogeny of leukemias and lymphomas. *Leuk Lymphoma.* 2009; 50: 160-70.
17. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2005; 353: 1793-801.
18. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 2005; 435: 839-43.
19. Navarro A, Gaya A, Martínez A, et al. MicroRNA expression profiling in classic Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2008; 111: 2825-32.
20. Wurdinger T, Costa FF. Molecular therapy in the microRNA era. *Pharmacogenomics J.* 2007; 7: 297-304.

## NEW MOLECULAR ASPECTS OF MALIGNANT LYMPHOMAS

J.I. MARTÍN-SUBERO

*Cancer Epigenetics and Biology Program, Bellvitge Institute for Biomedical Research-Catalan Institute of Oncology (IDIBELL-ICO). Barcelona, Spain*

Nowadays, the clinical importance of detecting chromosomal changes associated with different types of lymphomas is beyond doubt. The World Health Organization (WHO) classification of hematological disorders highlights that chromosomal alterations, in addition to morphological and immunophenotypical parameters, are essential in the diagnostic process and prognostic evaluation of lymphomas<sup>1</sup>.

In spite of the importance of well-known genetic changes, research guided by technical developments

in the last years has allowed us to obtain new insights into the molecular mechanisms underlying lymphomagenesis. Thus, this short review will provide a summary of new molecular findings derived from high-throughput genomic, transcriptional and epigenomic profiling.

---

### Genomic profiling of lymphomas

Many non-Hodgkin lymphoma subtypes are associated with characteristic chromosomal translocations that are considered to be primary transforming events in the process of lymphomagenesis. Typical examples of this sort of alteration are the t(8; 14)(q24; q32) and its variants t(2; 8) and t(8; 22) in Burkitt lymphoma/leukemia (BL), t(11; 14)(q13; q32) in mantle cell lymphoma (MCL) or t(14; 18)(q32; q21) in follicular lymphoma (FL)<sup>2,3</sup>. According to transgenic mouse models, these primary chromosomal translocations, including t(11; 14) and t(14; 18), usually lead to hyperproliferation and cell immortalization, but additional chromosomal changes are required to induce phenotypic transformation and lymphomas<sup>4,5</sup>. This is also typically observed in human lymphomas, in which primary chromosomal changes are accompanied by other alterations, the so called secondary changes. These are accumulative events, frequently involving unbalanced rearrangements such as duplications, amplifications and deletions. Although chromosome-based cytogenetics has led to the identification of many of these secondary changes, this approach is limited by the need of metaphases, and thus, growing cells, and the low resolution.

Using the microarray technology, this resolution has increased dramatically, and today it is possible to detect very small chromosomal imbalances. There are currently two main strategies to detect chromosomal changes with microarrays: array-based comparative genomic hybridization (CGH) and SNP-chips. The former is based on the competitive hybridization of differentially labeled tumor and normal DNA onto microarrays containing spotted DNA fragments and allows to obtain a comprehensive overview of chromosomal imbalances in a given lymphoma sample. A large number of array-CGH studies have been published in lymphomas, which have led to a better characterization of chromosomal imbalances and the identification of novel lymphoma-related genes<sup>6</sup>.

SNP-chip analyses are usually based on a one-color microarray hybridization, and the fluorescence intensities are then compared to those obtained in normal controls with a dedicated software, so that an overview of chromosomal imbalances can be obtained. Furthermore, SNP-chips are also able to detect the so called "partial uniparental disomies", e.g. loss of het-



erozygosity without loss of genetic material, which is a novel type of chromosomal change in lymphomas<sup>7,8</sup>.

In the case of Hodgkin lymphoma (HL), it represents a peculiar subtype of lymphoid neoplasia. In contrast to other lymphomas, the tumor cells in this disease only represent 0.1-10% of the tumor biopsies, the rest being non-tumoral cells derived from an intense inflammatory reaction. Therefore, cytogenetic studies from HL biopsies are very challenging and frequently render normal karyotypes<sup>9</sup>. When the chromosomal analysis is informative, karyotypes are extremely complex. With the help of molecular cytogenetic techniques, several studies have further characterized the cytogenetic profile of cHL. The most frequent are gains of chromosomal material (e.g. duplications or amplifications) in 2p13-16 (affecting the REL oncogene) in approximately 40-50% of the cases and in 9p24 (being JAK2, PDL1 and PDL2 the best candidate genes) in 30-40%<sup>10,11</sup>. Furthermore, recent studies have demonstrated the presence of IGH translocations in 15-20% of the cHL<sup>12,13</sup>. Using array CGH in HL cell lines, a large number of chromosomal imbalances could be identified, including several homozygous deletions pointing to novel candidate tumor suppressor genes<sup>14</sup>. These included A20 in 6q23, which was recently shown to be a tumor suppressor gene in HL and other lymphomas<sup>15</sup>.

### Transcriptional profiling of lymphomas

Gene expression profiling (GEP) is an experimental approach aimed at identifying the expression of a set of genes in a biologic sample using microarray technology. Various common lymphoma subtypes have been characterized by GEP, including DLBCL, BL, FL, MCL and HL<sup>16,17</sup>. GEP studies have not only shown that known lymphoma subtypes have different gene expression signatures, but have allowed us to identify multiple molecularly and clinically distinct lymphoma entities. Due to its heterogeneity, DLBCL is a classical example to highlight the potential of GEP to characterize the biology of lymphomas. GEP has identified that DLBCL consists of three gene expression subgroups, named germinal center B-cell-like (GCB), activated B-cell like (ABC) and primary mediastinal B-cell lymphoma (PMBCL)<sup>17</sup>. Interestingly, the GEP of PMBCL is similar to that of classical HL, which is not surprising considering that these two diseases show similar chromosomal changes including gains in 2p13-16 and 9p24. Supporting the different GEP of the 3 molecular subtypes of DLBCL is the fact that they display a distinct pattern of chromosomal changes, such as gains in 3q and 18q and losses in 6q in the ABC subtype, gains in 12q in the GCB subtype and as already mentioned, gains in 2p and 9p in PMBCL<sup>18</sup>.

Additional studies have used GEP to define the boundaries between BL and DLBCL<sup>19,20</sup>. A study combining genetic and transcriptional profiling has proposed a molecular definition of BL, which is characterized by a differential GEP, chromosomal breakpoints affecting MYC and low number of chromosomal imbalances<sup>20</sup>.

Another relevant aspect of GEP is that it has been used to create gene expression-based models of survival in lymphomas (so-called outcome predictors), which have identified biological features that are associated with their clinical behavior. For instance, survival in MCL is primarily affected by a proliferation rate signature. In DLBCL and FL, it seems that the molecular and cellular features of the tumor microenvironment play a major role in influencing survival<sup>17,21</sup>.

### DNA methylation profiling of lymphomas

The best studied epigenetic change in cancer is the hypermethylation of CpG islands located in the promoter region of tumor suppressor genes, which is associated with gene inactivation<sup>22,23</sup>. The presence of CpG island hypermethylation affects genes regulating virtually all important cellular functions, such as cell cycle (p16/INK4a, p15/INK4b, RB1, p14/ARF), DNA repair (BRCA1, hMLH1, MGMT, WRN), cell adherence and invasion (CDH1, CDH13, EXT1, SLIT2, EMP3), apoptosis (DAPK, TMS1, SFRP1), carcinogen metabolism (GSTP1), hormonal response (RARβ2, ER, PRL, TSH receptors), Ras signaling (RASSF1A, NORE1A), and microRNAs, among others. Similarly to solid tumors, aberrant DNA methylation is an important pathomechanism in different subtypes of lymphomas<sup>24,25</sup>. In these neoplasms, genes frequently targeted by hypermethylation and downregulated expression are e.g. p15/INK4b, p16/INK4a, SHP1, DAPK and GSTP1<sup>6</sup>.

Another gene shown to be frequently methylated and transcriptionally silenced in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is the DNA repair gene MGMT, coding for the O6-methylguanine DNA methyltransferase<sup>26</sup>. Interestingly, hypermethylation of genes like Lamin A/C, FHIT, P16, SHP1 or MGMT have been shown to be associated with clinical outcome in patients with DLBCL.

Most epigenetic studies in hematological neoplasms have focused on the analysis of a limited number tumor suppressor genes<sup>24,25</sup>. However, with the recent application of microarray technologies to epigenetic profiling, the analysis of the lymphoma methylome is now becoming feasible<sup>27</sup>.

We have recently performed a microarray-based DNA methylation profiling of 83 mature aggressive B-cell non-Hodgkin lymphomas (maB-NHL) character-

ized for their morphologic, genetic and transcriptional features<sup>28</sup>. These lymphomas included molecular Burkitt lymphomas and diffuse large B-cell lymphomas. Although several microarray approaches have been developed for DNA methylation profiling<sup>29</sup>, the GoldenGate Methylation Cancer Panel I (Illumina Inc., San Diego, CA) was used for those experiments, which has the advantage of accurately measuring the methylation status of multiple specific CpG dinucleotides<sup>30</sup>. This array was made of 807 genes and included oncogenes and tumor suppressor genes, previously reported differentially methylated or differentially expressed genes, imprinted genes, genes involved in various signaling pathways, and genes responsible for DNA repair, cell cycle control, metastasis, differentiation and apoptosis (www.illumina.com).

The data were analyzed with unsupervised and supervised statistical approaches. Unsupervised hierarchical clustering indicated that methylation patterns in maB-NHL were not clearly associated with morphologic, genetic or transcriptional features. By supervised analyses, a total of 56 genes were hypermethylated in all lymphoma subtypes studied whereas 22 were hypermethylated in a lymphoma subtype-specific manner.

An interesting aspect of this study was that a large number of hypermethylated genes were targets of the polycomb repressive complex in embryonic stem cells. This finding suggests that de novo DNA methylation is frequently mediated by polycomb proteins, which is congruent with studies demonstrating that EZH2, a polycomb protein, is able to recruit DNA methyltransferases<sup>31</sup>. Also, in line with similar findings in solid tumors<sup>32-34</sup>, this observation led us to postulate that lymphomas with different morphologic, genetic and transcriptional background might derive from precursor cells with stem cell-like features. This hypothesis requires further validation, and also, the genome-wide profile of polycomb binding sites in normal lymphoid tissues needs to be generated.

We recently used the novel Infinium HumanMethylation27 BeadChip, which covers approximately 27.000 CpGs from 14.000 well-characterized genes to analyze the methylome of lymphoma cell lines. We were able to identify over 5,000 differentially hypermethylated CpGs (representing ~2,500 genes) as compared to control samples. Furthermore, in line with recent reports on aberrant DNA methylation of microRNAs in solid tumors and acute lymphoblastic leukemias<sup>35,36</sup>, we identified several hypermethylated microRNA-specific CpGs in lymphoma cell lines.

### Future directions

In spite of the potential of microarrays to characterize the genome, transcriptome and epigenome of lymphomas,

they are limited either by resolution, type and number of sequences analyzed or by their quantification accuracy. The development of a new generation of sequencers<sup>37,38</sup> is revolutionizing this field of research. These new sequencing technologies are based e.g. on pyrosequencing using millions of picoliter-scale reactions, sequencing by synthesis and sequencing by ligation<sup>37</sup>, and can able to sequence several gigabases in a single experiment. Thus, we are now moving into an era in which the complete lymphoma genome, transcriptome and epigenome can be completely sequenced. This will not only provide unprecedented insights into the biology of the complex process of lymphomagenesis but also lead to the discovery of novel markers with increased diagnostic and prognostic value.

### References

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri S, Stein H, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press, 2008.
2. Chaganti RS, Nanjangud G, Schmidt H, Teruya-Feldstein J. Recurring chromosomal abnormalities in non-Hodgkin's lymphoma: biologic and clinical significance. *Semin Hematol.* 2000; 37 (4): 396-411.
3. Willis TG, Dyer MJ. The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies. *Blood.* 2000; 96(3): 808-22.
4. Bodrug SE, Warner BJ, Bath ML, Lindeman GJ, Harris AW, Adams JM. Cyclin D1 transgene impedes lymphocyte maturation and collaborates in lymphomagenesis with the myc gene. *Embo J.* 1994; 13 (9): 2124-30.
5. McDonnell TJ, Korsmeyer SJ. Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14;18). *Nature.* 1991; 349 (6306): 254-6.
6. Nieländer I, Bug S, Richter J, Giefing M, Martín-Subero JJ, Siebert R. Combining array-based approaches for the identification of candidate tumor suppressor loci in mature lymphoid neoplasms. *APMIS* 2007; 115: 1107-34.
7. Nielaender I, Martín-Subero JJ, Wagner F, Martínez-Climent JA, Siebert R. Partial uniparental disomy: a recurrent genetic mechanism alternative to chromosomal deletion in malignant lymphoma. *Leukemia.* 2006; 20 (5): 904-5.
8. Vater I, Wagner F, Kreuz M, Berger H, Martín-Subero JJ, Pott C, et al. GeneChip analyses point to novel pathogenetic mechanisms in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2009; 144 (3): 317-31.
9. Atkin NB. Cytogenetics of Hodgkin's disease. *Cytogenet Cell Genet.* 1998; 80 (1-4): 23-7.
10. Joos S, Menz CK, Wrobel G, Siebert R, Gesk S, Ohl S, et al. Classical Hodgkin lymphoma is characterized by recurrent copy number gains of the short arm of chromosome 2. *Blood.* 2002; 99 (4): 1381-7.
11. Martín-Subero JJ, Gesk S, Harder L, Sonoki T, Tucker PW, Schlegelberger B, et al. Recurrent involvement of the REL and BCL11A loci in classical Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2002; 99 (4): 1474-7.
12. Martín-Subero JJ, Klapper W, Sotnikova A, Callet-Bauchu E, Harder L, Bastard C, et al. Chromosomal breakpoints affecting immunoglobulin loci are recurrent in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma. *Cancer Res.* 2006; 66 (21): 10332-8.

13. Szymanowska N, Klapper W, Gesk S, Kuppers R, Martin-Subero JI, Siebert R. BCL2 and BCL3 are recurrent translocation partners of the IGH locus. *Cancer Genet Cytogenet.* 2008; 186 (2): 110-4.
14. Giefing M, Armemann J, Martin-Subero JI, Nielerander I, Bug S, Hartmann S, et al. Identification of candidate tumour suppressor gene loci for Hodgkin and Reed-Sternberg cells by characterisation of homozygous deletions in classical Hodgkin lymphoma cell lines. *Br J Haematol.* 2008; 142 (6): 916-24.
15. Schmitz R, Hansmann ML, Bohle V, Martin-Subero JI, Hartmann S, Mechttersheimer G, et al. TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma. *J Exp Med.* 2009; 206 (5): 981-9.
16. Leich E, Hartmann EM, Burek C, Ott G, Rosenwald A. Diagnostic and prognostic significance of gene expression profiling in lymphomas. *Apmis.* 2007; 115 (10): 1135-46.
17. Staudt LM, Dave S. The biology of human lymphoid malignancies revealed by gene expression profiling. *Adv Immunol.* 2005; 87: 163-208.
18. Bea S, Zettl A, Wright G, Salaverria I, Jehn P, Moreno V, et al. Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood.* 2005; 106 (9): 3183-90.
19. Dave SS, Fu K, Wright GW, Lam LT, Kluin P, Boerma EJ, et al. Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma. *N Engl J Med.* 2006; 354 (23): 2431-42.
20. Hummel M, Bentink S, Berger H, Klapper W, Wessendorf S, Barth TF, et al. A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N Engl J Med.* 2006; 354 (23): 2419-30.
21. Lenz G, Wright G, Dave SS, Xiao W, Powell J, Zhao H, et al. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med.* 2008; 359 (22): 2313-23.
22. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med.* 2008; 358(11): 1148-59.
23. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell.* 2007; 128 (4): 683-92.
24. Esteller M. Profiling aberrant DNA methylation in hematologic neoplasms: a view from the tip of the iceberg. *Clin Immunol.* 2003; 109 (1): 80-8.
25. Galm O, Herman JG, Baylin SB. The fundamental role of epigenetics in hematopoietic malignancies. *Blood Rev.* 2006; 20 (1): 1-13.
26. Esteller M, Gaidano G, Goodman SN, Zagonel V, Capello D, Botto B, et al. Hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine DNA methyltransferase and survival of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Natl Cancer Inst.* 2002; 94 (1): 26-32.
27. Martin-Subero JI, Ballestar E, Esteller M, Siebert R. Towards defining the lymphoma methylome. *Leukemia.* 2006; 20 (10): 1658-60.
28. Martin-Subero JI, Kreuz M, Bibikova M, Bentink S, Ammerpohl O, Wickham-García E, et al. New insights into the biology and origin of mature aggressive B-cell lymphomas by combined epigenomic, genomic, and transcriptional profiling. *Blood.* 2009; 113 (11): 2488-97.
29. Ammerpohl O, Martin-Subero JI, Richter J, Vater I, Siebert R. Hunting for the 5th base: Techniques for analyzing DNA-methylation. *Biochim Biophys Acta.* 2009.
30. Bibikova M, Lin Z, Zhou L, Chudin E, García EW, Wu B, et al. High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays. *Genome Res.* 2006 Mar; 16 (3): 383-93.
31. Vire E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, et al. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature.* 2006; 439 (7078): 871-4.
32. Ohm JE, Baylin SB. Stem cell chromatin patterns: an instructive mechanism for DNA hypermethylation? *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 2007; 6 (9): 1040-3.
33. Schlesinger Y, Straussman R, Keshet I, Farkash S, Hecht M, Zimmerman J, et al. Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. *Nature genetics.* 2007; 39 (2): 232-6.
34. Widschwendter M, Fiegl H, Egle D, Mueller-Holzner E, Spizzo G, Marth C, et al. Epigenetic stem cell signature in cancer. *Nature genetics.* 2007; 39 (2): 157-8.
35. Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, Fraga ME, Cerrato C, Sestien F, et al. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res.* 2007; 67 (4): 1424-9.
36. Román-Gómez J, Agirre X, Jiménez-Velasco A, Arqueros V, Vilas-Zornoza A, Rodríguez-Otero P, et al. Epigenetic regulation of microRNAs in acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 2009; 27 (8): 1316-22.
37. Fan JB, Chee MS, Gunderson KL. Highly parallel genomic assays. *Nat Rev Genet.* 2006; 7 (8): 632-44.
38. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature.* 2005; 437 (7057): 376-80.

## MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS INHIBIDORES DE TIROSINA-CINASA EN LA LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

A. JIMÉNEZ-VELASCO<sup>1</sup>, J. ROMÁN-GÓMEZ<sup>2</sup>, X. AGIRRE<sup>3</sup>, M. ALCALÁ<sup>1</sup>, F. PRÓSPER<sup>3</sup>, A. TORRES<sup>2</sup>, A.I. HEINIGER<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Regional Universitario Carlos Haya. Málaga

<sup>2</sup>Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba

<sup>3</sup>Área de Terapia Celular. Departamento de Hematología. Clínica Universidad de Navarra. Pamplona

El imatinib (IM) constituye el tratamiento de elección en la leucemia mieloide crónica (LMC) en fase crónica (FC). Tras siete años de seguimiento del estudio IRIS, los pacientes presentan una supervivencia global estimada del 86% y una disminución progresiva de la probabilidad de evolución a fase acelerada o crisis blástica<sup>1</sup>.

A pesar de los excelentes resultados obtenidos con IM, aproximadamente un 25% de pacientes van a presentar durante su evolución bien una falta de respuesta inicial al tratamiento (resistencia primaria), una respuesta subóptima, una pérdida de respuesta citogenética o hematológica (resistencia secundaria) o bien una intolerancia al mismo<sup>2</sup>.

Conocer los mecanismos de resistencia que ocasionan la falta de respuesta o la pérdida de la misma nos va a permitir tomar la decisión clínica más adecuada. Dependiendo de la causa de resistencia, unos pacientes se podrán beneficiar de un aumento de dosis de IM, mientras que en otros estará indicado realizar un



cambio a inhibidores de segunda generación (nilotinib o dasatinib) o incluir al paciente en un ensayo clínico con nuevos fármacos.

### Mecanismos de resistencia primaria

Cuando tratamos pacientes con LMC en primera FC, la falta de respuesta inicial al tratamiento con IM es más frecuente que la pérdida de respuesta y, a diferencia de los pacientes que presentan una resistencia secundaria, las mutaciones del dominio cinasa de *ABL* raramente son la causa. En tan sólo un 10-15% de los pacientes con LMC en 1.<sup>a</sup> FC tratados en primera línea con IM y que presentan resistencia primaria se detectan mutaciones en el dominio cinasa de *ABL*<sup>3</sup>.

Dentro de los mecanismos de resistencia primaria, tienen especial interés los implicados en la resistencia a IM de la célula madre quiescente Filadelfia-positiva. Cuando se comparan células madre CD34 positivas, CD38 negativas con células más comprometidas CD34 positivas y CD38 positivas se observan diferencias que pueden explicar la distinta sensibilidad de las mismas al tratamiento con IM. Así, las células CD34+ CD38- presentan mayor nivel de expresión de la proteína BCR-ABL y mayor nivel de fosforilación de sustratos que las células CD34+ CD38+. Otro hecho biológico que las diferencia son los distintos niveles de actividad de las proteínas transportadoras de IM. Las células CD34+ CD38- tienen menor nivel de actividad de la proteína OCT1 (introduce IM dentro de la célula) y mayor nivel de actividad de las proteínas ABCB1 y ABCG2 (expulsan IM de la célula) que las células más comprometidas CD34+ CD38+<sup>4,5</sup>.

La actividad de la proteína transportadora OCT1, la cual introduce IM en el interior celular, ha sido la más estudiada en pacientes con LMC tratados con IM y que presentan resistencia primaria o respuesta subóptima. En aquellos tratados con dosis inferiores a 600 mg de IM y baja actividad de OCT1 sólo un 18% presentaron una respuesta molecular mayor (RMoM) a los 18 meses, frente a un 83% de los que presentaban una actividad normal de OCT1. Estas diferencias en la respuesta desaparecen cuando los pacientes son tratados con dosis superiores a 600 mg. A diferencia de lo que sucede con IM, el nivel de actividad de OCT1 no influye en la respuesta obtenida cuando los pacientes son tratados con inhibidores de segunda generación (nilotinib o dasatinib)<sup>6,7</sup>.

Diferentes polimorfismos genéticos de las proteínas transportadoras de IM se han relacionado con el nivel de respuesta alcanzado. Se han estudiado polimorfismos del gen de multiresistencia a drogas (*MDR1* o *ABCB1*) en 90 pacientes con LMC tratados con IM, y se han relacionado con la probabilidad de obtener una RMoM y con las concentraciones plasmáticas de IM.

Los pacientes con el genotipo T1236T consiguieron de forma significativa mayor porcentaje de RMoM y presentaban mayores niveles plasmáticos de IM que los que tenían los genotipos C1236C o C1236T<sup>8</sup>.

La variabilidad en los niveles plasmáticos de IM es otro de los mecanismos más estudiados en pacientes con resistencia primaria o respuesta subóptima. En un subanálisis del estudio IRIS se analizó el valor de los niveles plasmáticos de IM, determinados en el día 29 de tratamiento, en relación con la respuesta obtenida. Los pacientes se dividieron en tres grupos en función del cuartil donde se hallaban sus niveles de IM (Q1 < 647 ng/mL, Q2-Q3 ≥ 647-1170 ng/mL y Q4 > 1170 ng/mL). Aquellos con niveles comprendidos dentro del grupo Q1 (< 647 ng/mL) presentaron una menor probabilidad de obtener una respuesta citogenética completa (RCyC) durante los 5 años de seguimiento<sup>9</sup>.

Como causa de resistencia primaria o respuesta subóptima, hemos de destacar aquellos mecanismos que son independientes de BCR-ABL y que, por lo tanto, escaparían a la acción de los inhibidores específicos de la tirosina-cinasa BCR-ABL<sup>10</sup>. El más estudiado es la vía de la SRC cinasa Lyn, la cual se ha visto que puede estar activada, de forma independiente de BCR-ABL, en líneas celulares resistentes a IM y también en un algunos pacientes con resistencia<sup>11</sup>.

Nuestro grupo está trabajando en los mecanismos epigenéticos implicados en la resistencia al tratamiento con IM; en concreto, en el mecanismo de regulación de la proteína proapoptótica BIM, la cual es mediadora de la acción de IM<sup>12</sup>. Los pacientes con disminución de la expresión de BIM, debido a metilación de su región promotora, presentan menores niveles de respuesta a IM a los 6, 12 y 18 meses de iniciado el tratamiento, que los pacientes con niveles de expresión normales de BIM<sup>13</sup>.

### Mecanismos de resistencia secundaria o pérdida de respuesta

Las mutaciones en el dominio cinasa de *ABL* son la causa más frecuente de la pérdida de respuesta hematológica o citogenética. Hasta el momento se han descrito más de 70 mutaciones diferentes en *ABL* que pueden afectar a 50 aminoácidos diferentes<sup>14</sup>. La identificación de la mutación responsable de la resistencia nos va a permitir decidir si hemos de aumentar la dosis de IM o cambiar a un inhibidor de segunda generación y, además, a cuál de ellos: nilotinib o dasatinib<sup>15</sup>. Las mutaciones F317L, V299L y T315A presentan un alto grado de resistencia al dasatinib, por lo que deberemos optar por el cambio a nilotinib. Sin embargo, si detectamos las mutaciones Y253H/F, E255V/K o la F359, el inhibidor de segunda línea que deberemos utilizar será el dasatinib<sup>16,17</sup>.

La mutación T315I continúa siendo un problema sin resolver debido a su total insensibilidad al tratamiento con IM, nilotinib o dasatinib. Si detectamos dicha mutación, el paciente deberá ser incluido en un ensayo clínico con nuevos inhibidores o fármacos activos sobre ella, o bien sometido a un trasplante alogénico si reúne las condiciones adecuadas para el mismo<sup>18,19</sup>.

Con el uso secuencial de los distintos inhibidores de la cinasa ABL, cada vez se describen más casos en los que cambia el estado mutacional en un mismo paciente durante su evolución. Dependiendo del inhibidor empleado y de la clona celular resistente, cambiarán las mutaciones responsables de las pérdidas de respuesta<sup>20</sup>.

El estudio de mutaciones en pacientes que presentan una RCyC no se recomienda de forma rutinaria, pues hasta ahora carecía de significado clínico<sup>21,22</sup>. Sin embargo, en un trabajo reciente publicado por el grupo del Hospital Hammersmith se estudia la presencia de mutaciones durante el seguimiento de 214 pacientes en RCyC, encontrando algunas mutaciones en 10 de ellos (4,7%). En este trabajo, el hallazgo de mutaciones, sobre todo en la región P-loop, fue predictivo de la pérdida de la RCyC, con un intervalo medio de 20,7 meses (rango: 2,8-49,1 meses) desde que se detecta la mutación. En el análisis multivariante, la detección de una mutación durante el seguimiento de los pacientes en RCyC fue el único factor predictivo independiente de la pérdida de respuesta<sup>23</sup>.

Dentro de los métodos de laboratorio empleados en el estudio de mutaciones, la secuenciación directa de *BCR-ABL* sigue siendo el método de referencia; la sensibilidad de esta técnica en la detección de una mutación es del 25%, es decir, deben existir al menos un 25% de células portadoras de la mutación para poder ser detectada por secuenciación. Para encontrar unos niveles de mutación de al menos el 25%, el paciente debe encontrarse en recaída citogenética. En otras palabras: si un paciente presenta un ascenso de un logaritmo en los niveles de expresión de *BCR-ABL* partiendo de un 0,1% (aumenta de 0,1% a 1%), estaría indicado un estudio de mutaciones según las recomendaciones actuales<sup>24</sup>, pero la secuenciación directa sería incapaz de detectarla debido a su limitada sensibilidad. Otros métodos más sensibles, como la PCR cuantitativa específica de secuencia (ASO-PCR), la cromatografía (D-HPLC) o la pirosecuenciación, están siendo empleados cada vez con más frecuencia para el estudio de mutaciones<sup>25,26</sup>.

Si bien debe ser comprobado en series más amplias y homogéneas de pacientes, hemos de destacar, por su alta frecuencia, un mecanismo de resistencia recientemente descrito. Se trata de la presencia, en aproximadamente el 60% de los pacientes resistentes estudiados, de un reordenamiento alternativo del gen *BCR-ABL*, en el que se ha detectado 35 nucleótidos in-

sertados entre el exón 8 y 9 del gen *ABL*. La importancia clínica de esta anomalía radica en que la proteína BCR-ABL que se genera adquiere una conformación espacial muy parecida a la que adopta la proteína resultante de la mutación T315I. Según los autores, no sólo va a tener importancia clínica detectar este reordenamiento atípico, sino también cuantificar su proporción respecto al reordenamiento normal *BCR-ABL*<sup>27</sup>.

---

## Conclusiones

- Actualmente, la mayoría de los enfermos con LMC tratados con IM comienzan el tratamiento en fase crónica precoz y sin haber recibido previamente ningún otro fármaco. En los pacientes con estas características, la resistencia primaria al tratamiento es más frecuente que la resistencia secundaria o pérdida de respuesta, y las mutaciones del dominio cinasa de *ABL* sólo explican un pequeño porcentaje de las resistencias primarias. Esto implica que los mecanismos de resistencia primaria dependientes del metabolismo del inhibidor, de factores farmacogenéticos, epigenéticos o de la activación de vías independientes de BCR-ABL cada vez tienen mayor trascendencia clínica.

- Las mutaciones de *ABL* continúan siendo la causa más frecuente de pérdida de respuesta. La identificación de la mutación responsable de la misma nos permitirá elegir el tratamiento de segunda línea más indicado en este grupo de pacientes, sin olvidarnos de que con el cambio de inhibidor podemos seleccionar otra clona celular distinta de la que condicionó la primera pérdida de respuesta.

- La tendencia actual, en la que trabajan distintos grupos, es la de establecer perfiles de expresión proteica, genética y epigenética que puedan permitirnos predecir cual será la respuesta individual de cada paciente y su mejor opción terapéutica desde el inicio del tratamiento con inhibidores de BCR-ABL.

---

## Bibliografía

1. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2006; 355 (23): 2408-17.
2. Deininger M. Resistance and relapse with imatinib in CML: causes and consequences. *J Natl Compr Canc Netw*. 2008; 6 Suppl 2: S11-S21.
3. Soverini S, Colarossi S, Gnani A, Rosti G, Castagnetti F, Poerio A, et al. Contribution of ABL kinase domain mutations to imatinib resistance in different subsets of Philadelphia-positive patients: by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res*. 2006; 12 (24): 7374-9.
4. Jiang X, Zhao Y, Smith C, Gasparetto M, Turhan A, Eaves A, et al. Chronic myeloid leukemia stem cells possess multiple unique features of resistance to BCR-ABL targeted therapies. *Leukemia*. 2007; 21 (5): 926-35.



5. Valent P. Emerging stem cell concepts for imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia: implications for the biology, management, and therapy of the disease. *Br J Haematol.* 2008; 142 (3): 361-78.
6. Crossman LC, Druker BJ, Deininger MW, Pirmohamed M, Wang L, Clark RE. hOCT 1 and resistance to imatinib. *Blood.* 2005; 106 (3): 1133-4.
7. Giannoudis A, Davies A, Lucas CM, Harris RJ, Pirmohamed M, Clark RE. Effective dasatinib uptake may occur without human organic cation transporter 1 (hOCT1): implications for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2008; 112 (8): 3348-54.
8. Dulucq S, Bouchet S, Turcq B, Lippert E, Etienne G, Reiffers J, et al. Multidrug resistance gene (MDR1) polymorphisms are associated with major molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2008; 112 (5): 2024-7.
9. Larson RA, Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Riviere GJ, Krahnke T, et al. Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study. *Blood.* 2008; 111 (8): 4022-8.
10. Jilani I, Kantarjian H, Gorre M, Cortes J, Ottmann O, Bhalla K, et al. Phosphorylation levels of BCR-ABL, CrkL, AKT and STAT5 in imatinib-resistant chronic myeloid leukemia cells implicate alternative pathway usage as a survival strategy. *Leuk Res.* 2008; 32 (4): 643-9.
11. Mahon FX, Hayette S, Lagarde V, Belloc F, Turcq B, Nicolini F, et al. Evidence that resistance to nilotinib may be due to BCR-ABL, Pgp, or Src kinase overexpression. *Cancer Res.* 2008; 68 (23): 9809-16.
12. Aichberger KJ, Mayerhofer M, Krauth MT, Vales A, Kondo R, Derdak S, et al. Low-level expression of proapoptotic Bcl-2-interacting mediator in leukemic cells in patients with chronic myeloid leukemia: role of BCR/ABL, characterization of underlying signaling pathways, and reexpression by novel pharmacologic compounds. *Cancer Res.* 2005; 65(20): 9436-44.
13. San José-Eneriz E, Agirre X, Jiménez-Velasco A, Cordeu L, Martín V, Arqueros V, et al. Epigenetic down-regulation of BIM expression is associated with reduced optimal responses to imatinib treatment in chronic myeloid leukaemia. *Eur J Cancer.* 2009; 45 (10):1877-89.
14. Volpe G, Panuzzo C, Ulisciani S, Cilloni D. Imatinib resistance in CML. *Cancer Lett.* 2009; 274 (1): 1-9.
15. Jabbour E, Cortes J, Kantarjian H. Treatment selection after imatinib resistance in chronic myeloid leukemia. *Target Oncol.* 2009; 4 (1): 3-10.
16. Weisberg E, Manley PW, Cowan-Jacob SW, Hochhaus A, Griffin JD. Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2007; 7 (5): 345-56.
17. Redaelli S, Piazza R, Rostagno R, Magistroni V, Perini P, Marena M, et al. Activity of bosutinib, dasatinib, and nilotinib against 18 imatinib-resistant BCR/ABL mutants. *J Clin Oncol.* 2009; 27 (3): 469-71.
18. Gontarewicz A, Balabanov S, Keller G, Colombo R, Graziano A, Pesenti E, et al. Simultaneous targeting of Aurora kinases and Bcr-Abl kinase by the small molecule inhibitor PHA-739358 is effective against imatinib-resistant BCR-ABL mutations including T315I. *Blood.* 2008; 111 (8): 4355-64.
19. Sanchez-Guijo FM, Lopez-Jiménez J, Gonzalez T, Santamaria C, Gonzalez M, Del Canizo MC. Multitargeted sequential therapy with MK-0457 and dasatinib followed by stem cell transplantation for T315I mutated chronic myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2009; 33 (6): e20-2.
20. Breccia M, Frustaci AM, Cannella L, Soverini S, Stefanizzi C, Federico V, et al. Sequential development of mutant clones in an imatinib resistant chronic myeloid leukaemia patient following sequential treatment with multiple tyrosine kinase inhibitors: an emerging problem? *Cancer Chemother Pharmacol.* 2009; 64 (1): 195-7.
21. Willis SG, Lange T, Demehri S, Otto S, Crossman L, Niederwieser D, et al. High-sensitivity detection of BCR-ABL kinase domain mutations in imatinib-naive patients: correlation with clonal cytogenetic evolution but not response to therapy. *Blood.* 2005; 106 (6): 2128-37.
22. Sherbenou DW, Wong MJ, Humayun A, McGreevey LS, Harrell P, Yang R, et al. Mutations of the BCR-ABL-kinase domain occur in a minority of patients with stable complete cytogenetic response to imatinib. *Leukemia.* 2007; 21 (3): 489-93.
23. Khorashad JS, de LH, Apperley JF, Milojkovic D, Reid AG, Bua M, et al. Finding of kinase domain mutations in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia responding to imatinib may identify those at high risk of disease progression. *J Clin Oncol.* 2008; 26 (29): 4806-13.
24. Baccarani M, Saglio G, Goldman J, Hochhaus A, Simonsson B, Appelbaum F, et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European Leukemia Net. *Blood.* 2006; 108 (6): 1809-20.
25. Soverini S, Martinelli G, Amabile M, Poerio A, Bianchini M, Rosti G, et al. Denaturing-HPLC-based assay for detection of ABL mutations in chronic myeloid leukemia patients resistant to Imatinib. *Clin Chem.* 2004; 50 (7): 1205-13.
26. Ross DM, Hughes TP. Current and emerging tests for the laboratory monitoring of chronic myeloid leukaemia and related disorders. *Pathology.* 2008; 40 (3): 231-46.
27. Lee TS, Ma W, Zhang X, Giles F, Cortes J, Kantarjian H, et al. BCR-ABL alternative splicing as a common mechanism for imatinib resistance: evidence from molecular dynamics simulations. *Mol Cancer Ther* 2008; 7 (12): 3834-41.

## El histiocito

COORDINADORES: L. FLORENSA. *Barcelona*  
M. BARBÓN. *León*

### Resumen del simposio

Desde hace unos años en los Simposios del Grupo Español de Citología Hematológica se vienen tratando individualmente las principales células de la hematopoyesis con sus patologías más relevantes. Nos corresponde el presente año hablar del histiocito.

El histiocito forma parte del sistema mononuclear fagocítico (SMF) que engloba un conjunto de células derivadas de los precursores de los monocitos. El SMF es un sistema celular representado en todos los órganos, con un papel primordial en los mecanismos de defensa y que colabora en distintas situaciones reactivas y malignas.

El histiocito quizás sea una de las células hematopoyéticas cuya patología es menos conocida por la mayoría de los hematólogos, en parte debido a su infrecuencia y a su presentación más habitual en niños. Hemos querido englobar en este simposio las enfermedades más significativas de este tipo de células, incluyendo la clásica histiocitosis de las células de Langerhans, a pesar de que en la actualidad se sabe que su origen está relacionado con la célula dendrítica.

Estamos orgullosos de poder haber reunido a un grupo de ponentes, todos ellos con brillantísima trayectoria profesional y enorme reconocimiento.

En primer lugar, la Dra. Soledad Woessner, del Hospital del Mar de Barcelona, conocida entre todos los hematólogos, madre “y padre” de la citología española, nos expone los aspectos morfológicos de las células que forman el SMF con la ponencia titulada “del monoblasto al histiocito-macrófago”.

A continuación, la Dra. Pilar Giraldo, del Hospital Miguel Servet de Zaragoza, Jefe de Grupo de Investigación del Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) y máxima exponente española de la enfermedad de Gaucher, nos hablará de “El macrófago de las enfermedades de depósito lisosomal”.

La ponencia de la Dra. Itziar Astigarraga, del Hospital de Cruces de Bilbao, presidenta del Comité de Histiocitosis de la Sociedad Española de Hemato-Oncología Pediátrica (SEHOP), versará sobre “Linfohistiocitosis hemofagocítica”, poniendo énfasis en los criterios diagnósticos de este proceso.

Por último, el Dr. Carlos Rodríguez-Galindo, del Dana Farber Cancer Institute y Children’s Hospital de Boston, secretario de la Sociedad Americana del Histiocito, comentará sobre “Patología proliferativa de las células de Langerhans”.

Esperamos que este simposio satisfaga las expectativas de los asistentes, permita conocer un poco más a fondo las principales patologías derivadas del SMF y el histiocito y contribuya a fomentar el diagnóstico precoz de estas enfermedades.

## DEL MONOBLASTO AL HISTIOCITO/MACRÓFAGO

S.WOESSNER<sup>1</sup>, L. ARENILLAS<sup>1,2</sup>, A. FERRER<sup>1,2</sup>,  
E. PÉREZ-VILA<sup>1,2</sup>, L. FLORENSA<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Escola de Citologia Hematològica  
Soledad Woessner-IMAS. Hospital del Mar. Barcelona.*

<sup>2</sup> *Laboratorio de Citología Hematológica.  
Hospital del Mar. Barcelona*

### Generalidades

El sistema mononuclear fagocítico (SMF), término adoptado por Van Furth<sup>1</sup> en sustitución del de sistema reticuloendotelial, comprende un conjunto de células derivadas de los precursores monocíticos medulares, de los cuales el primero reconocible morfológicamente es el monoblasto y cuyo siguiente eslabón madurativo es el promonocito. El siguiente estadio evolutivo es el monocito, que, tras un paso sanguíneo efímero, se afina en los diversos tejidos del organismo y se constituye en el histiocito o macrófago, última etapa evolutiva de las células del SMF en condiciones de normalidad (Figura 1).

El SMF es un sistema celular importantísimo en la defensa innata del organismo, debido a su gran capacidad de fagocitosis, que ejerce con la máxima “profesionalidad” y que además segrega multitud de citoquinas pro y antiapoptóticas (TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, entre otras), presenta antígenos a las células T –aunque con menor eficacia que las células dendríticas– y ayuda a la reconstitución tisular así como a la eliminación de partículas extrañas.

Todas las células del SMF en su compartimiento medular, sanguíneo o tisular muestran similitudes con respecto a la tinción de esterasas inespecíficas, posesión de receptores IgG y de complemento así como en relación con su actividad fagocítica y de pinocitosis. Son marcadores de la serie monocítica los antígenos CD11c, CD14, CD36, CD64 y la lisozima o muramidasa. Los macrófagos son intensamente CD68 positivos.

Un 80% de los promonocitos incorporan 3H-timidina; son, por tanto, células que se dividen activamente. Los monocitos y los macrófagos se marcan mínimamente con 3H-timidina, lo que indica una escasa capacidad de división.

Los macrófagos recién llegados a un tejido, que aún no han sufrido estimulación por agentes inflamatorios o inmunológicos, representan una población celular quiescente cuyas capacidades funcionales aparecen sólo esbo-

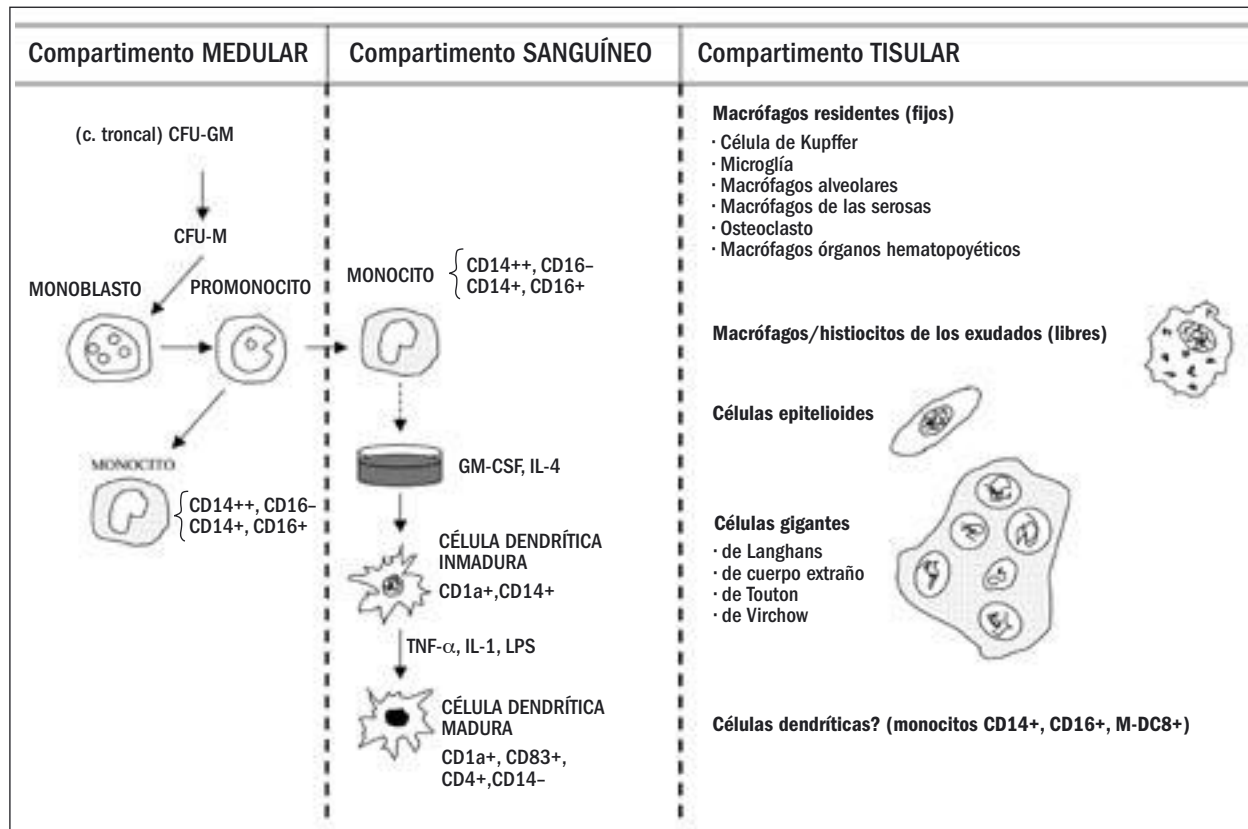


Figura 1. Secuencia madurativa esquemática de las células que integran el sistema mononuclear fagocítico.

zadas; al sufrir una estimulación de naturaleza diversa, se agrandan y experimentan un aumento de su capacidad quimiotáctica y fagocítica, tanto de partículas orgánicas como inorgánicas, un incremento de su dotación de gránulos lisosómicos ricos en hidrolasas ácidas y un aumento de su metabolismo oxidativo con gran producción de iones superóxido entre las sustancias más destacadas. Las distintas localizaciones y microambientes tisulares influyen marcadamente en el fenotipo de los macrófagos que hallamos en los distintos tejidos.

---

### El monoblasto

Procede directamente de una célula troncal comprometida hacia la serie monocítica y es la forma más joven, reconocible morfológicamente, de esta línea celular. Es una célula inmadura, de tamaño superior al del mieloblasto, con un núcleo situado generalmente en posición central, de contorno regular, redondo u ovalado con cromatina fina, generalmente con varios nucléolos bien visibles. El citoplasma es basófilo y puede contener pequeñas vacuolas y tenue granulación azurófila. Su atributo citoquímico más fidedigno es la positividad de esterasas inespecíficas, de patrón difuso y fluoruro-sensible. Su actividad de mieloperoxidasa es muy débil. Posee distintos marcadores inmunofenotípicos como moléculas HLA-DR, CD13, CD33 y CD15, entre otros.

---

### El promonocito

Es la célula que sigue al monoblasto en su maduración. Aunque su proporción es minoritaria en una médula ósea normal, se identifica con facilidad. Posee un núcleo muy característico de contorno no redondo –a diferencia del monoblasto– plegado o hendido con cromatina fina, aunque algo más condensado que su predecesor, con algún pequeño nucléolo visible con el microscopio de luz. El citoplasma ofrece una tonalidad grisácea y está finamente granulado. Su dotación enzimática es la propia de la serie monocítica y, en cuanto a su dotación de antígenos, además de expresar los del monoblasto presenta positividad para CD11b y CD14. Conviene recordar que en la clasificación de las leucemias (M4 y M5) de la OMS, el promonocito se equipara a un monoblasto, de ahí que sea esencial su correcto reconocimiento.

---

### El monocito

El siguiente eslabón madurativo lo constituye la célula de mayor tamaño hallada en una sangre normal. Su diámetro se cifra entre 15 y 30 micrómetros. El núcleo, posicionado centralmente, es voluminoso y adopta

formas abigarradas: en herradura o con dobleces e indentaciones; su cromatina es más densa que la del promonocito y ya no presenta nucléolos visibles. El citoplasma es amplio, de color azul plomizo, comparable al de los barcos de guerra, y contiene un número variable de gránulos azurófilos. El contorno citoplasmático puede ser algo irregular con presencia de pequeñas excrescencias o mamelones, que son la traducción de la actividad superficial observada con el microscopio electrónico y que le habilita para englobar partículas externas previamente a su digestión. Conviene tener presente el aspecto morfológico bastante diferente que puede presentar una serie monocítica patológica según se examine en la sangre periférica o en el aspirado medular. La característica positividad de las esterasas inespecíficas y su fluoruro-sensibilidad alcanza en este estadio la máxima expresividad.

Modernos estudios fenotípicos y de cultivos celulares han demostrado una gran heterogeneidad de los monocitos sanguíneos<sup>2,3</sup>. Existen dos subpoblaciones bien reconocidas: una mayoritaria (CD14<sup>++</sup>, CD16<sup>-</sup>, considerados como los monocitos clásicos), y otra minoritaria (CD14<sup>+</sup>, CD16<sup>+9</sup>), que comprende aproximadamente el 10% de la población monocítica; ambos tipos, si se cultivan con GM-CSF e IL-4, se transforman en células dendríticas mieloides inmaduras, que, a su vez, bajo el influjo del TNF y de lipopolisacáridos, evolucionan a células dendríticas mieloides maduras. Los monocitos CD14<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> expresan mayor número de moléculas HLA-DR, mayor potencial proinflamatorio por sobreproducción de citocinas (TNF e IL-6), aumento de la expresión de p53 y telómeros más cortos que los monocitos CD14<sup>++</sup>, CD16<sup>-</sup><sup>4</sup>. Tienen menor capacidad de adherencia al plástico y menor capacidad de fagocitosis que los monocitos clásicos. Muestran asimismo similitud con células dendríticas debido a su gran capacidad de presentación antigénica y expresan CD209, que es un marcador de célula dendrítica<sup>5</sup>. Con todo, estas células CD14<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> se asignan a la serie monocítica por su morfología, por su expresión de moléculas monocito-asociadas y por su positividad de esterasas inespecíficas fluorurosensibles. Los monocitos CD14<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> se relacionan fenotípicamente con macrófagos alveolares, especulando algunos autores que tendrían un especial tropismo por el pulmón. Más recientemente se ha definido un tercer subtipo de monocitos CD14<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD64<sup>+</sup> que combina características de monocitos y de célula dendrítica, con alta expresión de CD86, de moléculas HLA-DR y gran capacidad estimuladora de linfocitos T<sup>6</sup>.

---

### Los macrófagos inmaduros o histiocitos

Derivan de los monocitos que han atravesado por diapedesis el endotelio vascular y se han afincado en los

diversos tejidos del organismo. Macrófagos e histiocitos son términos sinónimos en opinión de la mayoría de autores<sup>7,8</sup>. Personalmente, preferimos catalogar de **histiocito** a aquella célula tisular del SMF que no presenta material fagocitado, en tanto que reservar el término de **macrófago** a aquel histiocito en el que sí podemos detectar material fagocitado.

El macrófago, término acuñado por Elie Metchnikoff en 1908, padre de los fagocitos, deriva etimológicamente de las palabras griegas *μακρος* ('grande') y *πηγαιν* ('comer'). Son los *big eaters* de los anglosajones: células con gran capacidad fagocítica y de ciclo vital largo, que pueden subsistir durante meses en los diversos tejidos. Es posible una proliferación local de los mismos. En condiciones normales, el macrófago afinado en un tejido no vuelve a la sangre sino que permanece en él hasta finalmente ser destruido in situ o en los ganglios regionales.

La morfología del histiocito/macrófago es muy variada dependiendo del tejido en donde asiente y cuya heterogeneidad refleja la especialización en la función adoptada según la ubicación anatómica (Figura 2); así, tenemos los macrófagos específicos del hígado que son las células de Kupffer, los osteoclastos en el tejido óseo, la microglia, uno de los histiocitos más representativos del sistema nervioso central, los macrófagos de las cavidades serosas, los macrófagos alveolares del pulmón, los macrófagos de la lámina propia del intestino, los macrófagos del bazo y de los ganglios. En la médula ósea existen distintos tipos de macrófagos, entre los que destacan los que centran los islotes eritroblásticos, cuya importancia es capital para una eritropoyesis adecuada. Su aspecto también depende de la capacidad degradativa de todo lo que puede ingerir y atesorar. Una característica morfológica constante del macrófago es su gran tamaño, relación núcleo/citoplasma mucho menor que la del monocito, con el núcleo generalmente rechazado hacia la periferia celular; la cromatina está finamente reticulada, como peinada, y consta de una malla laxa de filamentos entremezclados que se hacen muy evidentes en la zona contigua a la membrana nuclear, que, por ello, queda muy resaltada. Habitualmente se detectan 1 o 2 pequeños nucléolos de color azul celeste en la tinción panóptica. El citoplasma es amplio, de contorno mal definido, y contiene mayor o menor cantidad de granulación azurófila rica en enzimas lisosómicas (fosfatasa ácida, esterasas inespecíficas); y, en relación con el momento funcional, pueden observarse multitud de sustancias o células ingeridas o detritus procedentes de su digestión. El contorno citoplasmático suele estar poco definido, y por microscopía electrónica se observa una superficie de aspecto irregular debida a la presencia de pseudópodos y múltiples microvellosidades que los macrófagos precisan para poder ejercer una correcta fagocitosis y pinocitosis. Los macrófagos pueden fagocitar una gran variedad de bac-

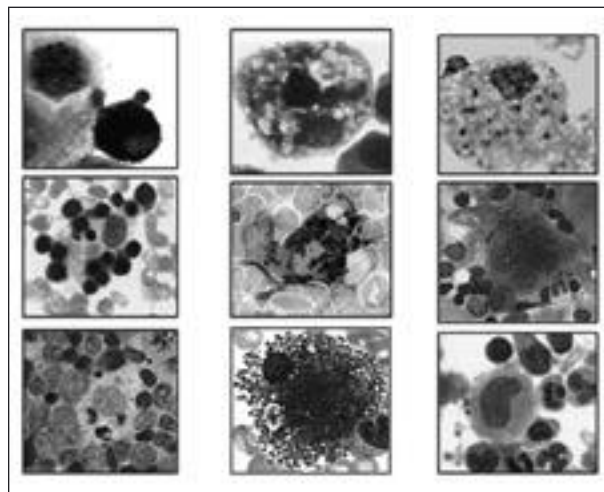


Figura 2. Células del sistema mononuclear fagocítico de aspecto muy diverso en función del tejido en el que asientan. (Tinciones de May Grünwald-Giemsa y de Perls.)

terias, protozoos, parásitos, hongos, hematíes sensibilizados recubiertos de IgG, hematíes senescentes que son reconocidos por los macrófagos gracias a su receptor fosfatidil-serina (CD36), leucocitos, plaquetas, células cancerosas, células dañadas o envejecidas, estructuras cristalinas: sílice, berilio, carbón, hierro, asbesto, pirofosfato cálcico, cristales de ácido úrico, pigmentos y sustratos varios que, en ocasiones, no pueden degradar, transformándose en las denominadas células de tesaurismosis (célula de Gaucher, de Niemann-Pick, histiocito azul marino, entre otras). Cuando atesoran material lipídico se constituyen en los histiocitos espumosos que pueden hallarse en multitud de patologías como diversas formas de hiperlipidemias, enfermedad de Wolman, gangliosidosis de tipo I y II, manosidosis o sialidosis, entre otras. En algunas patologías, como por ejemplo en la fiebre tifoidea, los macrófagos suelen adoptar un aspecto muy peculiar que ya describió Rindsfleisch en el siglo XIX y etiquetó de "células tíficas", que, al agruparse, se constituyen en los tifomas hallados en los cortes histológicos de las placas de Peyer infartadas de los enfermos afectados de fiebre tifoidea y que pueden hallarse también en la médula ósea en una tercera parte de estos pacientes<sup>9</sup>.

Una actividad fagocítica exaltada corresponde a situaciones de activación, como la observada en los síndromes hemofagocíticos, en que se asiste a una auténtica tormenta de citocinas, en tanto que en situaciones proliferativas de las células del SMF, los macrófagos no suelen presentar gran actividad fagocítica (macrófagos inapetentes). La dotación citoquímica de los macrófagos se resume en una gran riqueza de hidrolasas ácidas (fosfatasa ácida, betaglucuronidasa, alfa-naftilacetatoesterasa ácida), de esterasas inespecíficas con un patrón de positividad intenso y difuso; contienen tam-



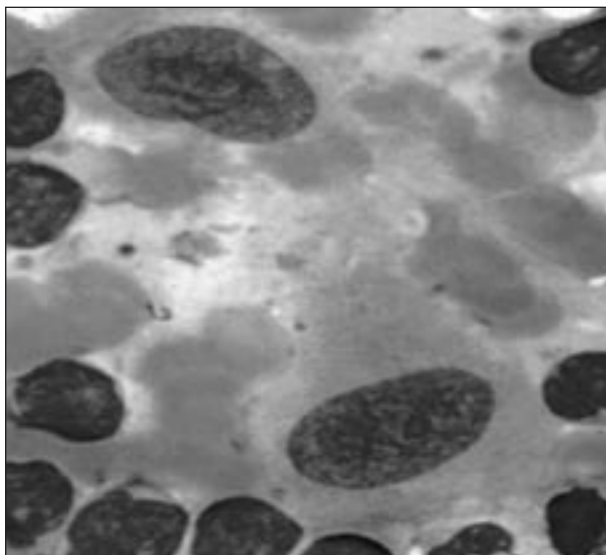


Figura 3. Dos células epitelioides en un aspirado ganglionar. (Tinción de May Grünwald-Giemsa.)

bién muramidasa y hemosiderina, siempre y cuando no exista una situación de ferropenia. Habitualmente son mieloperoxidasa-negativos, pero pueden mostrar positividad si han fagocitado elementos de la granulopoyesis.

Los conocimientos inmunofenotípicos de esta población son más bien escasos; expresan los antígenos CD14, CD11c, CD 68 y CD163.

Conviene recordar que existen algunos macrófagos que presentan apetencias fagocíticas selectivas; tal es el caso de la proteinosis lisinúrica, en que los fagocitos sólo, o preferentemente, fagocitan eritroblastos<sup>10</sup>; el macrófago de cuerpos tingibles de los centros germinales, con apetencia muy selectiva hacia células linfoides apoptóticas; o el histiocito sinusal de la enfermedad de Rosai Dorfman, que engloba preferentemente linfocitos<sup>11</sup>.

Los macrófagos son importantes células secretoras de múltiples citocinas y quimiocinas, de diversas enzimas y participan activamente en variados procesos inflamatorios e inmunitarios. Son células presentadoras de antígenos, si bien con menor efectividad que las células dendríticas. Los macrófagos participan en multitud de fenómenos fisiológicos como la hemostasia, al producir una serie de sustancias que participan en la coagulación como trombomodulina, factor VIII, factor XIII, inhibidor del activador del plasminógeno y proteína C, entre otras. También tienen la misión de reciclar el hierro de los hematíes procedentes de la eritrofagocitosis.

En determinadas circunstancias patológicas los monocitos –y, posiblemente, también los histiocitos– pueden dar lugar a otros dos tipos celulares: las células epitelioides y las células gigantes multinucleadas.

Tabla 1. Diferencias entre monocitos y células epitelioides

	Monocitos	Células epitelioides
Diámetro	15-20 micras	25-40 micras
Tonalidad del citoplasma	azul plumizo	pálida
Límites citoplasmáticos	bien definidos	imprecisos
Configuración nuclear	arriñonada	elongada “en zapatilla”
Aspecto de la cromatina	algo condensada	laxa
Enzimas lisosómicos	+	++
Mieloperoxidasa	+ débil	negativa

### Células epitelioides

Proceden de monocitos en un estadio precoz de diferenciación hacia macrófago y están inducidas por una particular respuesta inflamatoria (Figura 3). Cuando el monocito no puede acabar con el agente agresor mediante fagocitosis (p. ej., micobacterias), cambia su estrategia defensiva y se convierte en célula epiteliode secretora de múltiples citocinas, lo que ocurre en diversas enfermedades granulomatosas. Su tamaño es ligeramente superior al del monocito; se reconocen por un núcleo alargado, ovalado, algo hendido en forma de zapatilla, de cromatina muy fina y poco teñida con algún pequeño nucléolo en las formas más jóvenes; los elementos más envejecidos ofrecen una cromatina más condensada, sin nucléolos visibles (formas escirro). El citoplasma es amplio, de perfil mal delimitado y con escasa apetencia tintorial. Tienen gran tendencia a agruparse y son elementos constitutivos mayoritarios de los granulomas.

Poseen actividad catalásica, pero no peroxidásica. Contienen marcadores histiocíticos como muramidasa y alfa-1-antiquimiotripsina<sup>12</sup>. Los marcadores inmunofenotípicos son los propios de las células del SMF. En la Tabla 1 se anotan las principales diferencias entre monocitos y células epitelioides.

### Células gigantes multinucleadas

Constituyen un posible estadio evolutivo posterior del macrófago y pueden observarse en determinadas situaciones patológicas, muchas veces formando parte de un granuloma<sup>13</sup>. Las células gigantes multinucleadas se forman generalmente por endomitosis, mitosis que no van seguidas de división citoplásmica, o bien por fusión celular mediada por diversos factores promotores de la fusión y de diversas citocinas como la IL-4 y la IL-13 dando lugar a células gigantes de cuerpo extraño, en tanto que otras sustancias como CSF-GM o el interferón gamma inducen preferentemente a las células gigantes de Langhans.

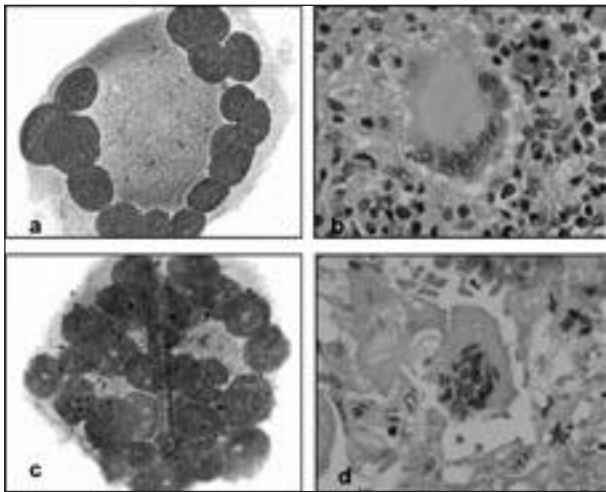


Figura 4. Célula gigante de Langhans. Aspecto morfológico en un frotis (a) y en un corte histológico (b). Célula gigante de cuerpo extraño en un frotis (c) y en un corte histológico (d). (Tinciones de May Grünwald-Giemsa y de hematoxilina-eosina.)

Las células gigantes multinucleadas son, como su nombre indica, de gran tamaño (pueden superar los 100  $\mu\text{m}$ ) y poseen varios núcleos bien individualizados, que en número puede superar la treintena; observadas con el microscopio electrónico de transmisión, se demuestra claramente la ausencia de membrana citoplasmática entre los núcleos; si están presentes en un aspirado medular, no deben confundirse con megacariocitos dismórficos. Pueden ser de distintos tipos:

- La célula gigante de Langhans (Figura 4a y b) posee múltiples núcleos dispuestos en la periferia citoplasmática en forma de paleta de pintor; dichos núcleos delimitan una amplia zona centrosómica formada por la fusión de varios cuerpos de Golgi, y en su citoplasma hay múltiples lisosomas distribuidos uniformemente. Forman parte de granulomas de distintas etiologías, especialmente de la tuberculosa.

- Otro tipo de célula gigante es la célula gigante de cuerpo extraño (Figura 4c y d); en éstas, a diferencia de las células de Langhans, los múltiples núcleos adoptan una situación central y los lisosomas tienden también a concentrarse en el centro del citoplasma.

- Una variedad de célula gigante es la célula gigante de Touton, también denominada gigante xantelmática (Figura 5). Se caracteriza por ser gigante, multinucleada y contener lípidos en su citoplasma; es requerimiento para su formación que, al estímulo que condiciona la fusión celular, se le añada un factor de absorción lipídica, el cual está ausente en la formación de los otros tipos de células gigantes. La microscopía electrónica muestra abundantes gotas lipídicas en su citoplasma, y la reacción del rojo al aceite suele ser positiva. La abundancia de antiqumiotripsina, anti-alfa 1 antitripsina y lisozima certifica su pertenencia al SMF.

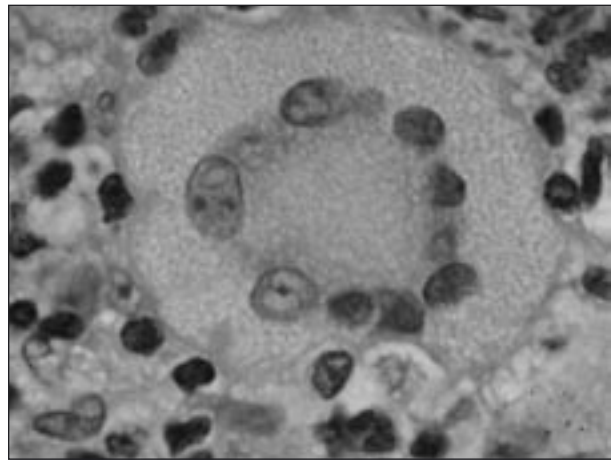


Figura 5. Célula gigante multinucleada de Touton en un xantelasma. (Tinción de hematoxilina-eosina.)

- Las células de Virchow son otras células gigantes multinucleadas que contienen bacilos de Hansen; poseen de 3 a 10 núcleos de cromatina finamente reticulada y con nucléolos visibles. En ocasiones se observa una imagen negativa (espacios intracitoplasmáticos no teñidos) que aparece como pequeñas estructuras cristaloides en la tinción de Giemsa y que corresponden a haces de *Mycobacterium leprae* evidenciados mediante la tinción de Ziehl-Neelsen modificada<sup>14</sup>, imagen muy parecida al del citoplasma de las células pseudo-Gaucher repleto de *Mycobacterium avium* de los enfermos de sida.

Finalmente aludiremos a unos tipos de macrófagos con especial relevancia en el contexto hematológico: el macrófago que centra el islote eritroblástico medular y el macrófago con cuerpos tingibles de los centros germinales del ganglio y los macrófagos esplénicos.

### Macrófagos de la médula ósea

El macrófago medular con mayor personalidad es el que forma parte del islote eritroblástico (Figura 6). El islote eritroblástico es una estructura anatómica constituida por un macrófago central rodeado de múltiples eritroblastos en distintos estadios evolutivos. Fue descrito hace ya 50 años por Marcel Bessis gracias a estudios ultraestructurales de secciones de médula ósea. Los islotes eritroblásticos no se observan frecuentemente en los aspirados medulares, ya que suelen dislacerarse con las maniobras de aspiración y extensión del material obtenido por punción. Los eritroblastos, en número que oscila entre 5 y 30, circundan al macrófago y comparten extensos contactos membranarios con el mismo con intercambio de información entre ambos tipos celulares. Estudios moleculares recientes han renovado el interés por esta estructura anatómica, que es muy importante para un desarrollo eritroblástico normal. En un nido

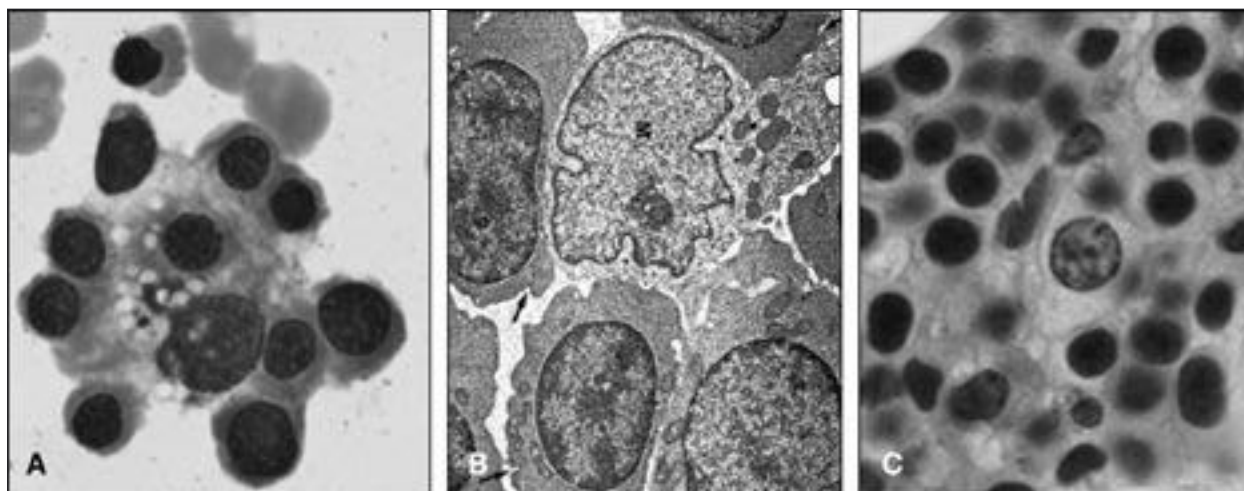


Figura 6. Macrófago de un islote eritroblástico observado en un aspirado medular (A) con el microscopio electrónico de transmisión (B) y en un corte histológico (C).

eritroblástico normal los eritroblastos más cercanos al macrófago corresponden a las formas más jóvenes, situándose los reticulocitos en la periferia del nido eritroblástico. El macrófago que centra un islote eritroblástico aporta a los eritroblastos diversas sustancias tróficas como determinadas citocinas, factores de crecimiento como eritropoyetina y, así como ferritina, que los eritroblastos incorporan por el mecanismo de la rofeocitosis; se justifica, pues, el calificativo de **célula nodriza** para este macrófago<sup>15</sup>; además, no experimenta estallidos respiratorios y, en consecuencia, no desprende moléculas oxidantes tóxicas, por lo cual merece el calificativo de “célula nodriza perfecta”<sup>16</sup>. Otra importante función de la célula nodriza es la de fagocitar los núcleos de los eritroblastos que éstos expulsan en su etapa terminal de diferenciación. Por otra parte, al igual que los macrófagos persinusoidales, fagocitan células eritroides defectuosas o envejecidas, impidiendo su paso a la circulación. La célula nodriza y los eritroblastos experimentan interacciones de adherencia que mantienen la integridad del islote. En esta interacción eritroblasto-macrófago intervienen diversas moléculas de adhesión que, por parte del macrófago, se refiere a la molécula EMP (*erythroblast macrophage protein*), VCAM-1, alfa (v) integrina, entre otras. Se ha podido demostrar que la molécula de adhesión ICAM-4 es crítica en la constitución del islote eritroblástico al unirse a la molécula alfa (v) del macrófago<sup>17</sup>. El ambiente extracelular vecino al nido eritroblástico también está modulado en parte por el macrófago central, facilitando el movimiento de los islotes hacia los sinusoides medulares y el consiguiente paso de los reticulocitos a la circulación.

La importancia del macrófago central se ve reforzada con estudios experimentales que han demostrado de modo fehaciente que el contacto directo con aquél favorece in vitro la proliferación de eritroblastos; éstos

prolifera tres veces más que si los precursores eritroides se cultivan solos<sup>18</sup>. Asimismo, anomalías en la función macrofágica (por alteraciones de la paladina, de la proteína supresora del tumor del retinoblastoma, etc.) pueden conducir a perturbaciones en la función del nicho eritroide<sup>19</sup>. Todo ello apoya el concepto de que una función macrofágica perturbada pueda dar lugar a una anemia que responda mal al tratamiento con eritropoyetina, como sucede en las anemias asociadas a neoplasias malignas o a inflamación crónica.

Este macrófago comparte las características citoquímicas propias de las células del SMF, así como los marcadores inmunofenotípicos, y además expresa los antígenos CD69 y CD163 que se han identificado como receptores de eritroblastos.

El macrófago medular también puede rodearse de otras células que no sean eritroblastos, como linfocitos B o células plasmáticas, en cuyo caso se constituye el islote inmunológico. El macrófago está cargado de antígenos y se establece un estrecho contacto macrófago-célula linfoide, una auténtica sinapsis inmune. El paso de la información antigénica del macrófago al linfocito hace que éste experimente una metamorfosis y se transforme en célula plasmática productora de anticuerpos. Asimismo, es posible la formación de rosetas constituidas por un macrófago central al que se adhieren varios linfocitos T<sup>20</sup>.

Otros macrófagos de la médula ósea son los persinusoidales que no presentan atributos especiales aparte de su localización.

### Macrófagos ganglionares

El ganglio posee unos macrófagos muy peculiares que se denominan **macrófagos con cuerpos tingibles** (*tingi-*



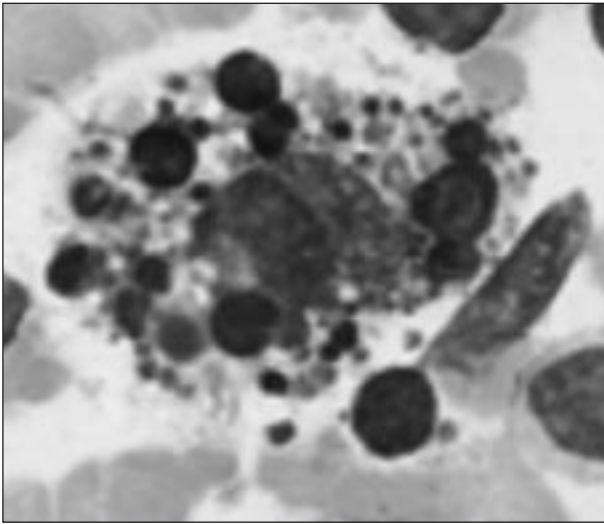


Figura 7. Macrófago con cuerpos tingibles en un aspirado ganglionar. (Tinción de May Grünwald-Giemsa.)

*ble body macrophages*), que se ubican en los centros germinales próximos a las células foliculares dendríticas<sup>21</sup>. (Figura 7). Contienen en su citoplasma abundantes detritus nucleares (de donde procede el nombre) provenientes mayoritariamente de linfocitos B apoptóticos; también contienen detritus citoplasmáticos y hematíes en distintos estadios de lisis. Por endocitosis adquieren y presentan antígenos y así ayudan a regular la magnitud de las reacciones del centro germinal. Estos macrófagos segregan una glicoproteína, denominada MFG-E8, que atrae las células apoptóticas con la finalidad de ser fagocitadas.<sup>22</sup> También se ha constatado su riqueza en prostaglandina en comparación con la de otros macrófagos ganglionares externos al centro germinal.

Se suele detectar una gran proliferación de estos macrófagos centrofoliculares en diversas situaciones patológicas, tanto reactivas como neoplásicas, especialmente en los linfomas de alto grado de malignidad. La gran abundancia de macrófagos de cuerpos tingibles proporciona al corte histológico del centro germinal un aspecto comparado al de un cielo estrellado (Figura 8). Otros histiocitos ganglionares son los ubicados en los senos ganglionares y están involucrados preferentemente en la fagocitosis de partículas extrañas; finalmente están los histiocitos presentes en las áreas paracorticales, ricas en linfocitos T; todos estos macrófagos comparten características inmuno e histoquímicas propias de las células del SMF (HLA-DR +, receptores de complemento y de IgG+, CD11+, CD14+, CD4+, CD68+, fosfatasa ácida+, esterasas inespecíficas+, lisozima+, alfa-1-antiquimiotripsina+).

Para terminar, una breve referencia a los macrófagos del bazo, órgano extraordinariamente rico en fagocitos. La pulpa roja del bazo y sus senos venosos están revestidos de multitud de macrófagos. El paso enlen-

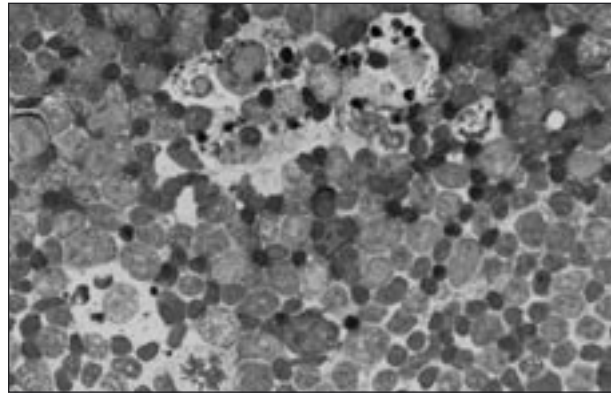


Figura 8. Tres macrófagos con cuerpos tingibles que proporcionan al corte histológico el aspecto en cielo estrellado. (Tinción de hematoxilina-eosina.)

tecido de la sangre a través de los cordones de Billroth crea una situación ambiental y metabólica muy favorable para que los macrófagos puedan fagocitar desechos indeseables de la sangre, en especial hematíes envejecidos o con taras, así como diversas inclusiones de su interior. Además de los macrófagos de la pulpa roja debemos citar los macrófagos de la zona marginal esplénica, de capital importancia en la defensa antiinfecciosa pero sin atributos morfológicos especiales. Los macrófagos de la pulpa blanca del bazo ofrecen también el aspecto de macrófagos con cuerpos tingibles.

Como se desprende de lo expuesto, el SMF es, pues, un sistema celular ampliamente representado en todos los órganos, de gran importancia en nuestros mecanismos defensivos y que participa en multitud de situaciones reactivas, pero también en patologías malignas, a veces de difícil diagnóstico, que precisan la conjunción de todas las técnicas hoy día a nuestro alcance.

## Bibliografía

1. Van Furth R, Raeburn JA, van Zwet TL. Characteristics of human mononuclear phagocytes. *Blood*. 1979; 54: 485-500.
2. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5: 953-64.
3. Ziegler-Heitbrock HW. Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14+, CD16+ subpopulation. *Immunol Today*. 1996; 17: 424-8.
4. Carracedo J, Merino A, Noguerras S, Carretero D, Berdud I, Ramírez R, et al. On-line hemodiafiltration reduces the proinflammatory CD 14+ CD16+ monocyte derived dendritic cells: a prospective, crossover study. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17: 2315-21.
5. Geissmann F, Auffray C, Palframan R, Wirrig C, Ciocca A, Campisi L, et al. Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell response. *Immunology and Cell Biology*. 2008; 86: 398-408.
6. Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M, Bzowska M, Skrzeczyńska J, Pryjma J. Human MO subsets as defined by expression of CD 65 and CD 16 differ in phagocytic activity and generation of oxygen intermediates. *Immunobiology*. 2000; 202: 42-50.



7. Gordon S. The macrophage: past present and future. *Eur J Immunol.* 2007; 37 (Suppl. 1): 9-17.
8. Züllig S, Hengartner MO. Tickling macrophages, a serious business. *Science.* 2004; 304: 1123-4.
9. Navarro JA. La célula tífica en la médula ósea. *Sangre.* 1962; 7: 287-97.
10. Parenti G, Sebastio G, Strisciuglio P, Incerti B, Pecoraro C, Terraciano L, et al. Lysinuric protein intolerance characterized by bone marrow abnormalities and severe clinical course. *Pediatr.* 1995; 126: 246-51.
11. Carbone A, Passannante A, Gloghini A, Devaney KO, Rinaldo A, Ferlito A. Review of sinus histiocytosis with massive lymphadenopathy (Rosai-Dorfman disease) of head and neck. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1999; 108: 1095-104.
12. Knolle J. Immunohistochemical characterization of epithelioid cells. *Acta Histochem Suppl.* 1983; 35: 159-64.
13. Anderson JM. Multinucleated giant cells. *Curr Opin Hematol.* 2000; 7: 40-7.
14. Gupta SR, Kumar B, Kaur S. Aspiration cytology of lymph nodes in leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1981; 49: 9-15.
15. Chassis JA, Monadas N. Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. *Blood.* 2008; 112: 470-8.
16. Manwani D, Bieker JJ. The erythroblastic island. *Curr Top Dev Biol.* 2008; 82: 23-53.
17. Lee G, Lo A, Short SA, Mankelov TJ, Spring F, Parsons SF, et al. Targeted gene deletion demonstrates that the cell adhesion molecule ICAM-4 is critical for erythroblastic island formation. *Blood.* 2006; 108: 2064-71.
18. Leimberg MJ, Prus E, Konijn AM, Fibach E. Macrophages function as a ferritin iron source for cultured human erythroid precursors. *J Cell Biochem.* 2008; 103: 1211-8.
19. Liu XS, Li XH, Wang Y, Shu RZ, Wang L, Lu SY, et al. Disruption of palladin leads to defects in definitive erythropoiesis by interfering with erythroblastic island formation in mouse fetal liver. *Blood.* 2007; 110: 870-6.
20. Novak IT, Cabral HR. Rosette formation by macrophages with altered T lymphocytes is precluded by inhibitors of antigen processing and presentation. *Biocell.* 2008; 32: 169-74.
21. Smith JP, Burton GF, Tew JC, Szakal AK. Tangible body macrophages in regulation of germinal center reactions. *Dev Immunol.* 1998; 6: 285-94.
22. Hanayama R, Miyasaka K, Nakaya M, Nagata S. MFG-E8-dependent clearance of apoptotic cells, and autoimmunity caused by its failure. *Curr Dir Autoimmun.* 2006; 9: 162-72.

## EL HISTIOCITO: EL MACRÓFAGO DE LAS ENFERMEDADES DE DEPÓSITO LISOSOMAL

P. GIRALDO<sup>1</sup>, P. IRÚN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Servicio de Hematología. Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza. CIBERER*

<sup>2</sup>*Laboratorio de Investigación Molecular. Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza*

### Introducción

Las enfermedades de depósito lisosomal (EDL) son un conjunto de entidades clínicas caracterizadas por amplia variabilidad genotípica y fenotípica, la implicación de diferentes órganos y sistemas, su carácter genético hereditario y el importante protagonismo

Tabla 1. Funciones del monocito-macrófago

1. Producción de enzimas lisosomales
2. Fagocitosis y eliminación de partículas
3. Función adaptativa inmunomoduladora

del que goza la línea celular implicada, el monocito-macrófago<sup>1-3</sup>.

### Monocito-macrófago

El monocito, célula procedente fundamentalmente de la línea mieloide-granulocitaria de la médula ósea, es la célula “diana” de las EDL, consiste en una célula multifuncional comprometida y versátil (Tabla 1). Su morfología uniforme en la médula ósea y sangre periférica es cambiante y se adapta al entorno cuando se transforma, de acuerdo con las condiciones ambientales, en macrófago<sup>4</sup>.

La maduración del monocito-macrófago transcurre en la médula ósea, con una duración temporal de siete días desde que la célula madre pluripotencial es comprometida hacia la producción de la línea celular mononuclear-macrófaga. Del progenitor mieloide común deriva la unidad formadora de colonias granulocito/macrófago (CFU-GM). Las células que forman estas colonias pasan a monocitos al ser estimuladas por IL-3 o GM-CSF (factor estimulante de colonias granulocito/macrófago)<sup>5</sup>. Si los monocitos son estimulados con M-CSF (factor estimulante de colonias de macrófagos), dan lugar a macrófagos, mientras que si son estimulados con GM-CSF, IL-4 y TNF- $\alpha$  originan células dendríticas. Las citocinas del entorno y otras señales de diferenciación estimulan la interconversión de estas células entre sí<sup>6</sup> (Tabla 2).

En la sangre periférica los monocitos son minoritarios, representan el 2-9% del total de los leucocitos circulantes, y, además, están en tránsito durante un máximo de 72 horas para llegar a los diferentes tejidos. Sin embargo, las células de esta línea celular produci-

Tabla 2. Proteínas reguladoras de la actividad del monocito-macrófago. Citocinas

1. IL-10 estimula la expresión de receptor 1 de la fracción constante (Fc) de la IgG en el macrófago estimulando la fagocitosis mediada por IgG y por complemento
2. Interferón gamma estimula la expresión del receptor 1 de la fracción constante de la IgG
3. IL-4 disminuye la expresión de todos los receptores de IgG disminuyendo la fagocitosis mediada por IgG y activando la expresión de los receptores de la molécula del factor 3 del complemento activando la fagocitosis mediada por C3

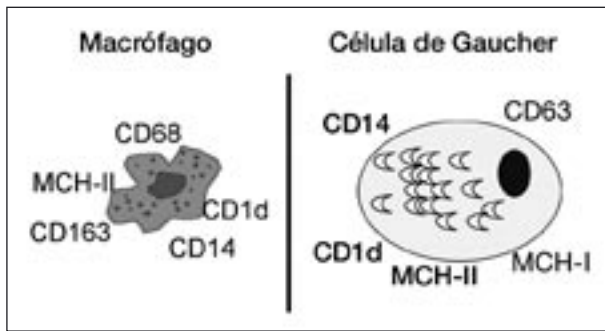


Figura 1. Marcadores de superficie del macrófago y de las células de Gaucher.

das en la médula ósea tienen una función primaria que es la endocitosis y, cuando emigran a los diferentes tejidos, desarrollan funciones propias del órgano donde asientan en función de las condiciones ambientales a las que son sometidas. Entre ellas existe una gran heterogeneidad, por lo que en cada órgano hay subpoblaciones fenotípicamente diferentes. La diversidad de los macrófagos se expresa por el gran número de anticuerpos monoclonales que puede ser dirigido hacia ellos. La expresión de CD14 y CD68 es muy común entre los macrófagos; sin embargo, no es un marcador universal. La expresión del receptor M-CSF es reconocido por el anticuerpo CD115, pero tampoco constituye un marcador universal del macrófago. La heterogeneidad de los marcadores expresa la multifunción de esta línea celular, con gran cantidad de vías de activación y distintos perfiles de expresión<sup>7,8</sup>. Sin duda, la aplicación de tecnología *microarray* para identificar el perfil molecular de la célula puede contribuir a precisar la promiscuidad de la expresión de los marcadores de superficie<sup>9</sup>. En las células de Gaucher la expresión de los antígenos de HLA-DR es de mayor intensidad que en los monocitos normales<sup>10</sup> (Figura 1).

La proteína soluble CD163 (sCD163) se ha identificado en el plasma como procedente del monocito-macrófago y aparece incrementada en pacientes con enfermedad de Gaucher así como en leucemia mieloide o infecciones<sup>11</sup>.

La heterogeneidad del macrófago viene explicada en parte por el origen en diferentes precursores, la mayoría proceden de la línea mieloide, pero también algunos precursores linfoides pueden madurar a macrófagos; por tanto, las células del sistema pueden ser inmunofenotípicamente diferentes. En segundo lugar, los factores ambientales son fundamentales para la transformación a los diferentes subtipos celulares con distinta funcionalidad. La naturaleza de células centinela les confiere una especial sensibilidad para el entorno, estando especialmente atentas a las señales y a transportar información no solamente al sistema inmunitario sino también a otros como el hematopoyético y neuroendocrino.

Tabla 3. Denominación de los macrófagos según el órgano en que asientan

«Los macrófagos presentan, además de diferente morfología dependiendo del órgano donde se localicen, distinta actividad según su grado de maduración, su activación y su propia localización.»
Hígado: células de Kuffer
Tejido óseo: osteoclastos
Tejido nervioso: células de microglia
Piel: células de Langerhans
Bazo: células dendríticas
Sistema linfático: monocitos, macrófagos, células dendríticas
Pulmón: macrófagos alveolares
Tejido conectivo: histiocitos

El paso a los tejidos tiene lugar por la capacidad del monocito para reconocer a las células endoteliales y unirse a ellas. La unión se produce mediante las moléculas de adhesión ICAM-1 expresadas en las células endoteliales y las LFA-1 presentes en los monocitos; una vez que tiene lugar el reconocimiento, se produce el paso hacia los tejidos, un mecanismo funcional de singular importancia porque permite entender que los monocitos pueden llegar a todos los lugares del organismo a través de la sangre y vehiculizar sustancias a pequeña concentración para colocarlas en “santuarios” adonde no pueden acceder moléculas terapéuticas<sup>12</sup>.

Al llegar el monocito a los tejidos por la influencia de proteínas y señales celulares a las que son muy sensibles, se transforman en macrófagos diferenciados fenotípicamente según el tejido donde asientan, para llevar a cabo sus diferentes funciones (Tabla 3).

En el citoplasma del macrófago se encuentran los lisosomas, estructuras de 5-10 nm de diámetro, a modo de vesículas que contienen enzimas hidrolíticas que desarrollan su máxima actividad a pH ácido; son hidrolasas ácidas. Se producen en el aparato de Golgi y las enzimas se sintetizan en el retículo endoplásmico rugoso. La fusión en el citoplasma con los fagosomas que contienen material extracelular desencadena la secreción de las hidrolasas, que desarrollan una intensa actividad enzimática catalizando la degradación intracelular de moléculas complejas derivadas del metabolismo intra o extracelular, enlazando con la función de fagocitosis y eliminación de partículas y restos celulares rodeados de IgG y de factores del complemento para favorecer la internalización<sup>13</sup>.

El macrófago como protagonista de la función adaptativa es indispensable para la correcta modulación del sistema inmunitario, desempeñando un papel estimulador o inhibitor en amplio número de entidades. En la complejidad del sistema inmunitario interviene presentando el antígeno al linfocito B a través del APC (*antigen presenting cell*), y expresa MHC-II (complejo prin-

**Tabla 4. Citocinas producidas por el macrófago**

• MCP-1
• RANTES
• MIP
• TNF- $\alpha$
• IL-1, IL-2, IL-6, IL-12
• Interferón gamma
• C2, C3, C4, C5

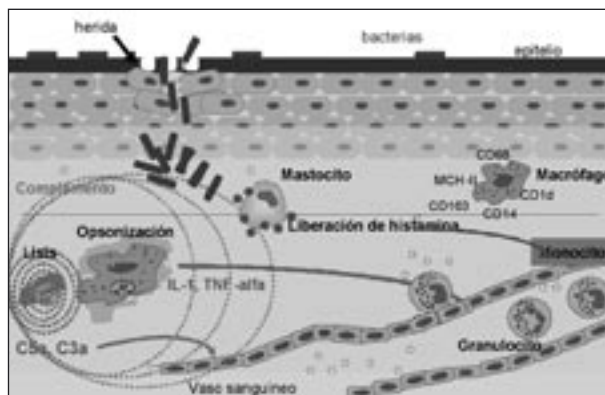
principal de histocompatibilidad de tipo II)<sup>14</sup>. La expresión antigénica es regulada también por IL-4 y el interferón gamma estimulando la expresión de MHC-II, mientras que la IL-10 la inhibe (Tabla 4).

En el proceso de la inflamación, los macrófagos activados sintetizan y liberan moléculas que atraen a los monocitos a la zona de inflamación y aumentan la expresión de las moléculas de adhesión en éstos y en las células endoteliales de vasos sanguíneos para favorecer la extravasación a tejidos (Figura 2).

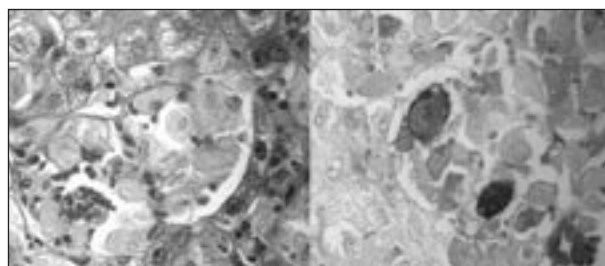
Estas moléculas son citocinas procedentes del macrófago, como la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1: *Monocyte Chemoattractic Protein-1*), la quimiocina secretada y expresada por las células T normales mediante activación celular (RANTES: *Regulated-upon-Activation, Normal T-cells Expressed and Secreted chemokine*) y la proteína inflamatoria de los macrófagos (MIP: *Macrophage Inflammatory Protein*)<sup>15</sup>. Los macrófagos activos también puede sintetizar otras citocinas como el TNF, IL-1 y el interferón gamma (Tabla 5).

Todos estos procesos se ven alterados y comprometidos en las EDL; así, las citocinas MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  están significativamente elevadas en la EG y de manera similar a lo que ocurre en las complicaciones esqueléticas del mieloma múltiple<sup>16</sup>.

Los macrófagos almacenan el hierro procedente de los eritrocitos lisados. Lo incorporan a través de receptores para la ferritina y para la transferrina. En los pacientes con enfermedad de Gaucher se produce en los depósitos de ferritina un incremento atribuido, en parte, a la activación del monocito-macrófago por el incremento de los depósitos intracelulares y, en parte, al bloqueo inducido por la cronicidad del proceso<sup>17</sup>. De hecho, más de la mitad de los pacientes con enfermedad de Gaucher de tipo I presentan concentración



**Figura 2. Inflamación y citocinas involucradas.**



**Figura 3. Células de Gaucher con depósitos intracelulares de hierro.**

basal de ferritina sérica elevada al diagnóstico, y ésta disminuye en relación con la respuesta al tratamiento (Figura 3).

Se ha especulado sobre la mayor incidencia de infecciones en los pacientes con EG justificando esta mayor tendencia en los pacientes esplenectomizados. Sin embargo, en los pacientes no esplenectomizados y que presentan infecciones recurrentes la función anti-infecciosa del macrófago podría estar comprometida por el defecto enzimático<sup>18</sup>.

**Tabla 5. Clasificación de los receptores de membrana de las citocinas**

Receptores de factores de crecimiento hematopoyético: IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, GM-CSF y G-CSF
Receptores de interferón (IFN). Tienen receptores a y b. Pertenecen a esta familia: IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$
Receptores de factores de crecimiento transformante (TGF). Pertenecen a esta familia: TGF- $\alpha$ y TGF- $\beta$
Receptores del factor de necrosis tumoral (TNF). Pertenecen: TNF- $\alpha$ y TNF- $\beta$
Receptores de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Pertenecen a esta familia: IL-1a, IL-1b, IL-16a, IL-1b, IL-16, IL-8
Factor activador de las plaquetas (PAF)

### Enfermedades de depósito lisosomal

En el macrófago de las enfermedades lisosomales se produce por error genético una hidrolasa funcionalmente defectuosa que puede ser catalíticamente inactiva o tener defectos en el procesamiento postsíntesis de la enzima o producirse déficit de proteína activadora o bien déficit de la proteína transportadora necesaria para evacuar el material digerido desde el lisosoma, y como consecuencia se produce un acúmulo de sustrato en el interior de la célula debido al catabolismo incompleto del mismo con acumulación del metabolito insoluble parcialmente degradado en el interior.

Los lisosomas aumentan en cantidad y tamaño para intentar resolver la situación y se produce interferencia con la función celular normal.

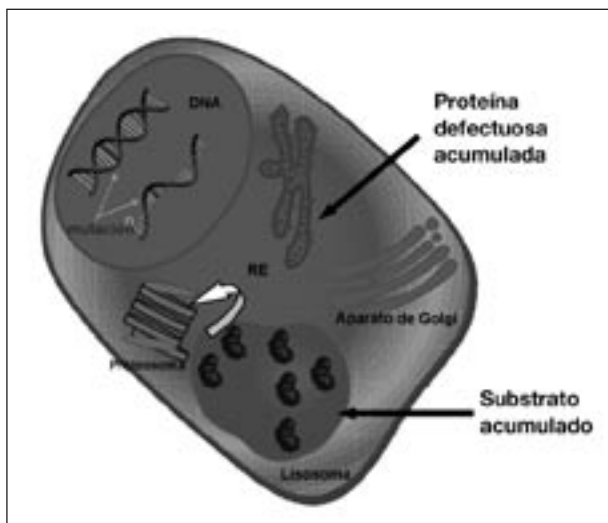


Figura 4. Lisosomas y mecanismo del depósito.

Recientemente, la Dra. Mia Horowitz, de Israel, ha demostrado que la GC es sintetizada en el retículo endoplásmico unido a los polirribosomas. A continuación se produce la N-glicosilación y es transportada al aparato de Golgi desde donde se intercambia con los ribosomas. El estudio demuestra que las variantes mutantes de b-GC presentan niveles variables de retención y retraso en la degradación en el proteosoma. Este proceso puede ser uno de los factores que condicionan la mayor o menor gravedad de la enfermedad<sup>19</sup>.

El proceso de acúmulo del sustrato en los lisosomas comienza en el periodo fetal, pero en muchas enfermedades no se producen síntomas clínicos hasta el primer año de vida; y, en algunas de ellas, en las formas juveniles y del adulto los síntomas se presentan mucho más tardíamente (Figura 4).

Como consecuencia del estímulo constante del monocito-macrófago también se produce incremento en otras enzimas y citocinas (Tabla 6). Una de ellas, la quitotriosidasa, pertenece a la familia de las quitinasas, unas enzimas que hidrolizan quitina y se encuentran abundantes en una amplia variedad de especies no vertebrados incluyendo bacterias, peces, hongos, insectos, nematodos y plantas, los macrófagos humanos producen este análogo de quitina: quitotriosidasa (QT). Esta enzima es de interés por varias razones: se produce en grandes cantidades por los macrófagos con déficit enzimático lisosomal, especialmente en la enfermedad de Gaucher, en que se encuentra una actividad cientos de veces elevada con respecto a los sujetos sanos. También aparece elevada en los pacientes con enfermedad de Niemann-Pick, en infecciones fúngicas, por micobacterias y por leishmanias, también en granulomatosis como sarcoidosis.

Tabla 6. Marcadores de actividad macrófaga

Fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP)
β-hexosaminidasa
Lisozima
Ferritina
Glucosilceramida
Proteína asociada a la membrana lisosomal (LAMP)
Enzima convertidora de la angiotensina (ACE)

La QT se está utilizando como marcador de respuesta a tratamiento en los pacientes con EG, aunque no es un marcador de excelencia, ya que tiene varios problemas; si bien es sensible al efecto que produce el tratamiento en el macrófago, no todos los sujetos tienen una producción estable y comparable, ya que la duplicación de 24 pb en el gen de la QT es bastante frecuente (30-40%) entre la población y condiciona que los portadores del defecto tengan una producción disminuida con respecto a los que poseen los dos alelos activos; además, hasta el 6% de la población caucásica carece por completo de actividad, al heredar la duplicación en los dos alelos del gen y tener, por tanto, un gen nulo para la QT<sup>20</sup>.

Un marcador subrogado de macrófago activado: la citocina CCL18/PARC, marcador de activación del macrófago pulmonar, se está utilizando como marcador de seguimiento de los pacientes con EG ya que esta proteína se encuentra 29 veces más elevada en los pacientes con EG y no existe solapamiento entre pacientes y controles.

### Enfermedad de Gaucher

Más de ciento veinte años después de su descripción, la EG continúa siendo, por una parte, una enfermedad enigmática en muchos aspectos; y, por otra, un modelo de actuación para otras enfermedades metabólicas hereditarias, de menor prevalencia pero con rutas metabólicas compartidas. Fue la primera en disponer de tratamiento enzimático sustitutivo, a principio de la década de los noventa; después, otras enfermedades lisosomales de acúmulo como la enfermedad de Fabry, la enfermedad de Pompe y la enfermedad de Hunter han conseguido también disponer de TES.

La variabilidad de las manifestaciones clínicas, la repercusión del tratamiento sobre la evolución natural de la enfermedad y la ausencia de una buena correlación genotipo-fenotipo suponen retos para la investigación de cuestiones todavía no resueltas. Hay preguntas importantes por responder, como el hecho sorprendente de que hasta entre hermanos que han heredado los mismos genes defectuosos la enferme-



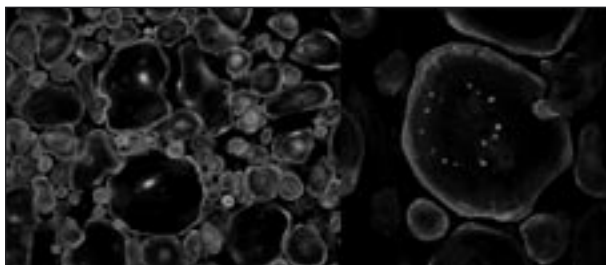


Figura 5. Imágenes de la transformación de monocitos a macrófagos y cinturón de actina.

dad se manifiesta con distinta intensidad y diferentes características. Es decir, la mutación en el gen de la GC no se traduce en un fenotipo homogéneo; posiblemente, otros defectos en proteínas activadoras o en el propio mecanismo de acción de la GC podrían ser la clave de estas diferencias.

Otro aspecto no aclarado es la predilección por el lugar de depósito: ¿por qué es predominante en tejido nervioso o en el hueso? ¿Tienen los macrófagos de la EG algunas características peculiares? ¿Hay un sustrato diferente?

Las lesiones óseas constituyen algunas de las complicaciones más importantes de la enfermedad y siguen apareciendo en un porcentaje elevado de casos a pesar del tratamiento enzimático sustitutivo prolongado.

Para valorar la influencia que el medio tiene en la transformación del monocito a macrófago, nuestro grupo está realizando experimentos *in vitro* mediante cultivos de monocitos obtenidos de sangre periférica de sujetos normales y de pacientes con EG de tipo 1 con distintos grados de afectación ósea para inducir posteriormente su transformación a osteoclastos (OC) mediante el aporte de factor estimulante de formación de colonias de macrófago (M-CSF) y de receptor ligando del activador del factor nuclear  $\kappa$ B (RANKL). Para el seguimiento de la evolución de los cultivos, utilizamos como marcadores de OC el receptor de vitronectina CD51/61, la actividad fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) y la concentración de proteína inflamatoria MIP-1 $\beta$ . Los resultados obtenidos indican que el marcador más adecuado para seguir la formación de OC es la actividad TRAP 5b, que se incrementa a partir del día 14 del inicio del cultivo, sin encontrar diferencias entre monocitos cultivados únicamente con M-CSF y aquellos en los que, además, se incorpora RANKL. Asimismo, determinamos la liberación del fragmento polipeptídico derivado del colágeno de tipo I (CTX-I) como marcador de resorción ósea. Estos experimentos nos sirven de base para incorporar al medio de cultivo los diferentes agentes terapéuticos y determinar su influencia en la transformación a osteoclastos<sup>21</sup> (Figura 5).

## Influencia del estímulo prolongado de los mecanismos de la inflamación y desarrollo de comorbilidades

Se especula sobre la influencia que el acúmulo anómalo de glucocerebrósido en el macrófago induce la activación del sistema reticuloendotelial desencadenando de forma crónica y constante un estímulo para la línea linfocítica B, que podría justificar parcialmente, y junto al desequilibrio en el metabolismo lipídico, la mayor incidencia de gammopatías policlonales, superior al 70% en el Registro Español de Enfermedad de Gaucher<sup>22</sup>.

Se ha discutido *in extenso* la asociación entre EG y enfermedades linfoproliferativas. Diversos autores refieren que el 85% de los pacientes afectados de EG de menos de 50 años presentan componentes oligoclonales séricos. Como justificación a este hecho hay que considerar que el monocito-macrófago es una célula muy comprometida en el funcionamiento del sistema inmunitario humano, actuando directamente como elemento efector de la fagocitosis y como presentadora de antígenos para los elementos linfocíticos de la línea B, entre otros cometidos importantes en el funcionalismo de la inmunidad; se especula en este sentido si la constante estimulación del sistema inmunitario que sufre el paciente con EG condicionaría la eventual aparición de gammopatías monoclonales y síndromes linfoproliferativos, incluido el mieloma múltiple. Recientemente se han publicado dos estudios epidemiológicos –en 460 y 1.525 pacientes, respectivamente, con enfermedad de Gaucher de tipo 1– que evaluaban el riesgo de desarrollo de enfermedades neoplásicas: en el primero se estima un riesgo elevado de mieloma múltiple (RR: 25; IC 95%: 9,17-54,40) y otras neoplasias hematológicas (RR: 3,45; IC 95%: 1,49-6,79) y cáncer sólido (RR: 1,80; IC 95%: 1,32-2,40). En el segundo estudio, el riesgo de cáncer (RR: 0,91; IC 95%: 0,76-1,08 [n = 137])<sup>23,24</sup>.

## Enfermedad de Niemann-Pick

Otra de las enfermedades lisosomales más estudiada es la enfermedad de Niemann-Pick, un déficit enzimático lisosomal en el que se produce acúmulo en el macrófago tisular de esfingomielina, principalmente en los histiocitos, debido al déficit de esfingomielinasa, codificada por un gen localizado en el cromosoma 11p15.1-p15.4.

La célula de Niemann-Pick es similar a la de Gaucher; macrófago relleno de contenido espumoso, se distribuye en el parénquima hepático, esplénico y la médula ósea. Son de gran tamaño, con núcleo excéntrico y citoplasma abundante y pálido, finamente vacuolado y de aspecto espumoso (*foam cells*).

En las secciones teñidas con hematoxilina-eosina, algunas células contienen un pigmento amarillo o amarillento-marrón que es material ceroides o su equivalente, la lipofuscina. En la tinción de Giemsa, algunos de los macrófagos pueden contener gránulos en el citoplasma de color azul o azul verdoso, que les confieren la denominación de “histiocitos azul marino”. Al MET, las inclusiones lipídicas presentan en su periferia una disposición lamelar concéntrica.

Al igual que en la EG, la presencia de células espumosas es sugestiva de la enfermedad de Niemann-Pick pero no diagnóstica, puesto que en otras tesaurismosis también pueden verse histiocitos de aspecto espumoso. Para el diagnóstico se requiere la demostración química de la disminución de actividad de esfingomielina en los tipos A y B.

En esta enfermedad de acúmulo predomina el daño neurológico en mayor o menor grado. Clínicamente cursa con trastornos neurológicos y hepatoesplenomegalia. También puede haber adenopatías, erupción xantomatosa, infiltrados pulmonares difusos y manchas de color rojo cereza en la retina.

Según el grado evolutivo y la presencia o ausencia de afección del sistema nervioso, se consideran varias formas de la enfermedad, denominadas tipos A, B, C y D.

- En el tipo A existe afección neurológica desde la primera infancia, mientras que en el tipo B se dan todas las manifestaciones clínicas descritas menos la afección cerebral. En los tipos C y D, además de hepatoesplenomegalia y de la presencia de histiocitos espumosos en médula ósea, hay afección neurológica de comienzo tardío.
- En los tipos C y D la acumulación de esfingomielina suele ser sólo moderada, y el principal trastorno metabólico consiste en un aumento del colesterol intracelular no esterificado.

Los signos clínicos neurológicos que presentan estos pacientes son paresia de la mirada vertical de tipo supranuclear, ataxia, deterioro intelectual y trastornos extrapiramidales (disonía y coreoatetosis).

Los pacientes pueden presentar diversos grados de citopenia y la presencia de linfocitos y monocitos vacuolados. El tipo A suele ser fatal en la primera infancia, mientras que los niños con enfermedad del tipo B suelen sobrevivir aunque con hepatoesplenomegalia.

## Tratamiento

No existe, por el momento, ningún tratamiento para la enfermedad de Niemann-Pick A/B. Se ha conseguido la normalización de la actividad de esfingomielinasa en dos enfermos tras el trasplante de médula ósea. Los valores de esfingomielina plasmática se normalizaron en ambos niños durante más de un año, aunque

la esplenomegalia y los trastornos neurológicos no se modificaron.

Muy recientemente ha sido aprobada por la EMEA la indicación de miglustat para el tratamiento de la variedad C de la enfermedad de Niemann-Pick, a partir de los resultados obtenidos en tratamiento a largo plazo<sup>25</sup>.

## Conclusiones

1. La heterogeneidad de los marcadores de superficie del monolito-macrófago es una característica de la multifunción de esta línea celular.
2. La producción de citocinas proinflamatorias procedentes del monolito-macrófago está alterada en la enfermedad de Gaucher, y las citocinas MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  se encuentran significativamente elevadas.
3. El estímulo constante del monocito-macrófago en las EDL produce incremento de actividad en otras enzimas y citocinas como la quitotriosidasa, que aumenta cientos de veces en la EG y CCL18/PARC, que aumenta 29 veces su valor respecto a los controles sanos, siendo útiles como biomarcadores de seguimiento.
4. El marcador más adecuado para comprobar la transformación de monolito-macrófago a osteoclastos es la actividad TRAP 5b.
5. La estimulación constante del sistema inmunitario que se produce en los pacientes con enfermedad de Gaucher condicionaría un mayor riesgo de aparición de neoplasias.

## Bibliografía

1. Staretz-Chacham O, Lang TC, LaMarca ME, Krasnewich D, Sidransky E. Lysosomal storage disorders in the newborn. *Pediatrics*. 2009; 123: 1191-207.
2. Ballabio A, Gieselmann V. Lysosomal disorders: from storage to cellular damage. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1793: 684-96.
3. Pastores GM. Musculoskeletal complications encountered in the lysosomal storage disorders. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2008; 22: 937-47.
4. Naito M, Hasegawa G, Takahashi K. Development, differentiation, and maturation of Kupffer cells. *Microsc Res Tech*. 1997; 39: 350-64.
5. Cerrato L, Valeri A, Bueren JA, Albella B. In vitro sensitivity of granulo-monocytic progenitors as a new toxicological cell system and endpoint in the ACuteTox Project. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009; 238 (2): 111-9.
6. Svensson M. Isolation and culture of human hematopoietic progenitors for studies of dendritic cell biology. *Methods Mol Biol*. 2009; 531: 187-202.
7. Way KJ, Dinh H, Keene MR, White KE, Clanchy FI, Lusby P, Roiniotis J, Cook AD, Cassady AI, Curtis DJ, Hamilton JA. The generation and properties of human macrophage populations from hemopoietic stem cells. *J Leukoc Biol*. 2009; 85: 766-78.

8. Backe ES, Gerdes J, Ernst M, Stein H Ber-MAC3: new monoclonal antibody that defines human monocyte/macrophage differentiation antigen. *J Clin Pathol.* 1991; 44: 936-45
9. Maouche S, Poirier O, Godefroy T, Olaso R, Gut I, Collet JP, Montalescot G, Cambien F. Performance comparison of two microarray platforms to assess differential gene expression in human monocyte and macrophage cells. *BMC Genomics.* 2008; 9: 302.
10. Boven LA, Meurs M, Boot RG, Mehta A, Boon L, Aerts JM, Laman JD. Gaucher cells demonstrate a distinct macrophage phenotype and resemble alternatively activated macrophages. *Am J Clin Pathol.* 2004; 122: 359-69.
11. Møller HJ, de Fost M, Aerts H, Hollak C, Moestrup SK. Plasma level of the macrophage-derived soluble CD163 is increased and positively correlates with severity in Gaucher's disease. *Eur J Haematol.* 2004; 72: 135-9.
12. Evans BJ, McDowall A, Taylor PC, Hogg N, Haskard DO, Landis RC. Shedding of lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) in a human inflammatory response. *Blood.* 2006; 107: 3593-9.
13. Germain DP. Lysosomes and lysosomal storage diseases. *J Soc Biol.* 2002; 196: 127-34.
14. Yang XY, Cai SX, Zhang WJ, Tang XL, Shin HY, Lee JY, Gu QQ, Park H. Semi-vioxanthin isolated from marine-derived fungus regulates tumor necrosis factor-alpha, cluster of differentiation (CD) 80, CD86, and major histocompatibility complex class II expression in RAW264.7 cells via nuclear factor-kappaB and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Biol Pharm Bull.* 2008; 31: 2228-33.
15. Kim JS, Kim JG, Moon MY, Jeon CY, Won HY, Kim HJ, Jeon YJ, Seo JY, Kim JI, Kim J, Lee JY, Kim PH, Park JB. Transforming growth factor-beta1 regulates macrophage migration via RhoA. *Blood.* 2006; 108: 1821-9.
16. Gervás J, Quintana L, Giraldo P, Pocovi M. Proinflammatory bone cytokine profile in type 1 Gaucher disease. (Abstract Book) 9th International Symposium on Lysosomal Storage Diseases. 2009. 86.
17. Laine F, Guyader D, Turlin B, Moirand R, Deugnier Y, Brissot P. Hyper-ferritinemia and Gaucher disease. *Gastroenterol Clin Biol.* 1996; 20: 512-3.
18. Aker M, Zimran A, Abrahamov A, Horowitz M, Matzner Y. Abnormal neutrophil chemotaxis in Gaucher disease. *Br J Haematol.* 1993; 83: 187-91.
19. Ron I, Horowitz M. ER retention and degradation as the molecular basis underlying Gaucher disease heterogeneity. *Hum Mol Genet.* 2005; 14: 2387-98.
20. Giraldo P, Cenarro A, Alfonso P, Pérez-Calvo JI, Rubio-Félix D, Giralt M, Pocovi M. Chitotriosidase genotype and plasma activity in patients type 1 Gaucher's disease and their relatives (carriers and non carriers). *Haematologica.* 2001; 86: 977-84.
21. Irún MP, Alfonso P, Gervás J, Giraldo P, Pocovi M. Transformación "in vitro" de monocitos a osteoclastos. Influencia de M-CSF y RANK-L (Abstract Book) II Congreso CIBERER. Valencia 2008. 45.
22. Giraldo P, Pocovi M, Pérez-Calvo J, Rubio-Félix D, Giralt M. Report of the Spanish Gaucher's Disease Registry: clinical and genetic characteristics. *Haematologica.* 2000; 85: 792-9.
23. Taddei TH, Kacena KA, Yang M, Yang R, Malhotra A, Boxer M, Aleck KA, Rennert G, Pastores GM, Mistry PK. The underrecognized progressive nature of N370S Gaucher disease and assessment of cancer risk in 403 patients. *Am J Hematol.* 2009; 84: 208-14.
24. Landgren O, Turesson I, Gridley G, Caporaso NE. Risk of malignant disease among 1525 adult male US Veterans with Gaucher disease. *Arch Intern Med.* 2007; 167: 1189-94.
25. Patterson MC, Vecchio D, Prady H, Abel L, Wraith JE. Miglustat in Niemann-Pick C disease: results of the first 12 months' treatment. *Lancet Neurol.* 2007; 6: 765-72.

## LINFOHISTIOCITOSIS HEMOFAGOCÍTICA

I. ASTIGARRAGA AGUIRRE

*Servicio de Pediatría. Hospital de Cruces.  
Baracaldo (Vizcaya)*

---

### Introducción

Bajo la denominación de linfohistiocitosis hemofagocítica (HLH) se incluyen diversas entidades: una forma genética o familiar<sup>1</sup> y formas secundarias asociadas con infecciones, cáncer o enfermedades autoinmunes<sup>2</sup>. La HLH en pacientes con enfermedades reumáticas suele denominarse "síndrome de activación macrofágica".

La identificación de los defectos en los mecanismos de linfocitotoxicidad ha supuesto su reciente inclusión como inmunodeficiencia primaria en la última clasificación. También puede ser la forma de presentación de diversas inmunodeficiencias raras como síndrome de Chédiak-Higashi, Griscelli linfoproliferativo ligado a X<sup>3</sup>.

---

### Etiopatogenia

La HLH no es una enfermedad única, sino un síndrome clínico que se puede encontrar asociado a diversas condiciones genéticas o adquiridas. Todas se caracterizan por una respuesta inflamatoria excesiva, causada por una proliferación incontrolada de linfocitos activados e histiocitos que secretan gran cantidad de citocinas<sup>4</sup>. Se producen defectos en los mecanismos reguladores de la respuesta inmune e inflamatoria y en el control de la proliferación y destrucción celular, debido a una hiperactivación de las células presentadoras de antígenos (macrófagos e histiocitos) y de linfocitos T CD8+, junto a una proliferación excesiva y migración ectópica de células T<sup>6</sup>. En la mayoría de los pacientes con todas las formas de la HLH, se observan alteraciones en la función de las células *natural killer* (NK)<sup>8</sup> y elevación de los niveles de diversas citocinas proinflamatorias<sup>9,10</sup>.

Las formas familiares de la HLH (FHLH) se asocian con defectos en la apoptosis y una herencia autosómica recesiva<sup>12,13</sup>. Su incidencia estimada es de 1:50.000 nacimientos<sup>1</sup>. Investigaciones genéticas han mostrado mutaciones en el gen de la perforina (*PRF1*), primera publicación en 1999, y en los genes *MUNC 13-4* y *syntaxin 11*<sup>14-16</sup>. Estas alteraciones genéticas se encuentran sólo en el 40-50% de los casos y se observan claras diferencias étnicas<sup>17</sup>. Se han podido establecer correlaciones genotipo-fenotipo y asociaciones entre el

tipo de mutación y las diferentes formas de deficiencia de células NK descritas<sup>6,18-20</sup>. Los padres y hermanos de pacientes con FHLH también suelen presentar disminución de la función de las células NK, aunque estén sanos, y no se conocen bien los mecanismos implicados<sup>8</sup>.

Las alteraciones genéticas de los síndromes asociados (Griscelli, Chediak-Higashi y XLP) se conocen mejor y también están implicadas en la vía de citotoxicidad mediada por perforina<sup>3</sup>. Las formas adquiridas o reactivas aparecen en personas previamente sanas, de cualquier edad, y no se conocen bien las causas por las que se desarrolla el síndrome hemofagocítico<sup>2,3,9</sup>.

---

## Histopatología

La primera descripción clínica de FHLH se publicó en 1952<sup>21</sup>. La primera revisión retrospectiva, en 1983, describía una supervivencia media de menos de un mes tras el inicio de los síntomas y una supervivencia global del 5% un año después del diagnóstico<sup>22</sup>. Los estudios de autopsias mostraban una infiltración difusa por linfocitos T e histiocitos que afectaba prácticamente a todos los órganos y de forma especial al hígado, bazo, ganglios linfáticos, médula ósea y sistema nervioso central, y el cuadro histológico era indistinguible en las formas familiares y adquiridas<sup>23</sup>. La hemofagocitosis sólo se encontraba en la mitad de las biopsias hepáticas<sup>24</sup>.

En revisiones muy recientes también se comprueba que la presencia de hemofagocitosis en médula ósea es un hallazgo poco sensible y poco específico de la enfermedad, con grados de afectación muy variables (25- 100%) y heterogéneas, tanto en las formas familiares como secundarias<sup>25</sup>. Estos hallazgos apoyan la necesidad de buscar otros criterios diagnósticos y no considerar la presencia de hemofagocitosis como factor clave para distinguir pacientes con HLH de otros síndromes clínicos, ni para tomar decisiones sobre el tratamiento<sup>28</sup>.

---

## Clínica

Las manifestaciones clínicas principales de la HLH son la fiebre y la hepatoesplenomegalia<sup>1-4</sup>. La sintomatología neurológica puede dominar el curso clínico inicial con las convulsiones, irritabilidad y signos de meningitis como manifestaciones más frecuentes<sup>27,28</sup>, e incluso pueden ser la primera y única manifestación de HLH<sup>29</sup>. Las adenopatías, exantema, edemas o diarrea son menos frecuentes.

En los análisis de sangre destacan las citopenias, especialmente anemia y trombopenia, elevaciones de triglicéridos, ferritina, transaminasas, bilirrubina, lac-

tato-deshidrogenasa y disminuciones del fibrinógeno, albúmina y sodio.

En los estudios de líquido cefalorraquídeo destacan la pleocitosis (leve o moderada) y un discreto aumento de las proteínas, incluso sin clínica neurológica.

Los hallazgos radiológicos más característicos se observan en ecografías abdominales que muestran aumento del tamaño de hígado y bazo. En RM cerebrales (30% de los casos) se observan signos de atrofia cerebral generalizada, seguidos de lesiones de la sustancia blanca y desmielinización<sup>28</sup>.

Todos estos hallazgos clínicos, analíticos y radiológicos se pueden explicar por la hipercitocinemia e infiltración de los órganos por los linfocitos e histiocitos y pueden aparecer idénticas, tanto en formas genéticas como adquiridas.

El concepto clásico de que FHLH aparece durante los primeros meses o años de la vida, observado en las primeras series (70-80% en el primer año)<sup>22,30</sup>, se ha modificado y se han descrito muchos casos de inicio más tardío y en la edad adulta, confirmados en los estudios genéticos<sup>19,30,32,33</sup>.

Otro concepto importante es que la identificación de un germen infeccioso no ayuda a discriminar entre las formas genéticas y adquiridas, ya que la mayoría de los episodios se desencadenan por infecciones, también en los casos genéticos<sup>32</sup>. Por este motivo, el tratamiento apropiado no debe retrasarse en base a unos resultados microbiológicos positivos.

El principal problema diagnóstico es que el cuadro clínico inicial es similar al de una infección normal en un paciente inmunocompetente. Tanto la sintomatología clínica como los datos analíticos y radiológicos son inespecíficos y aparecen también en otros cuadros clínicos infecciosos por bacterias, virus o parásitos (especialmente por VEB, CMV, parvovirus y *Leishmania*)<sup>2,4,9,34</sup>, en forma de sepsis, hepatitis o meningoencefalitis. También se deben diferenciar de procesos infiltrativos como leucemia, linfoma, histiocitosis de células de Langerhans o enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide juvenil<sup>4,29,35</sup>.

La HLH es una enfermedad progresiva: el porcentaje de pacientes que muestran los síntomas y signos clínicos característicos, es mucho menor en la primera presentación y el tiempo medio para el diagnóstico es prolongado en muchos casos (3,5 meses en una revisión de 65 pacientes alemanes)<sup>4</sup>. Además, en los primeros días o meses de la enfermedad, los síntomas pueden mejorar espontáneamente y aparecer reactivaciones clínicas posteriores<sup>3,31</sup>. Mientras que la mayoría de los síntomas de HLH se encuentran en pacientes inmunocompetentes en respuesta a agentes infecciosos, estas manifestaciones son más pronunciadas en pacientes con HLH. Esta progresión de la clínica o de la analítica debería alertar a los médicos de que se trata de una respuesta anormal ante la infección<sup>4</sup>.



## Diagnóstico

La ausencia de un marcador específico y definitivo de HLH representa una gran dificultad diagnóstica y origina muchos retrasos en el inicio del tratamiento.

En 1991 el grupo de estudio de la HLH de la Sociedad del Histiocito (Histiocyte Society) publicó las primeras guías diagnósticas, con cinco criterios.

Estas recomendaciones diagnósticas fueron revisadas y publicadas en 2007<sup>26</sup>. Se añadieron tres criterios más, los últimos del listado, y se incluyen en el protocolo HLH-2004:

- Historia familiar o diagnóstico genético específico.
- Criterios clínicos y de laboratorio (deben cumplirse 5 de 8):
  - 1) Fiebre
  - 2) Esplenomegalia
  - 3) Citopenias (2 o 3 líneas celulares)
    - Hemoglobina < 90 g/L
    - Plaquetas <  $100 \times 10^9/L$
    - Neutrófilos <  $1 \times 10^9/L$
  - 4) Hipertrigliceridemia o hipofibrinogenemia
    - Triglicéridos en ayunas  $\geq 3$  mmol/L
    - Fibrinógeno < 1,5 g/L
  - 5) Hemofagocitosis en médula ósea, LCR o ganglios linfáticos
  - 6) Ferritina  $\geq 500$   $\mu\text{g/L}$
  - 7) Factor soluble de la interleucina 2 o sCD25  $\geq 2.400$  U/mL
  - 8) Disminución o ausencia de actividad de células NK

Según estas recomendaciones, en ausencia de historia familiar o de diagnóstico genético específico se deben cumplir 5 de los 8 criterios definidos. Los 3 últimos estudios se añadieron a los criterios clásicos y reflejan la importancia de realizar estudios inmunológicos completos a los pacientes para confirmar el diagnóstico de HLH. La positividad de los resultados genéticos específicos es suficiente para el diagnóstico de esta enfermedad. También la hiperferritinemia se ha introducido como un criterio de gran utilidad diagnóstica por su accesibilidad y sensibilidad<sup>36</sup>.

## Tratamiento

1) El objetivo inmediato en el tratamiento de cualquier paciente con HLH es la supresión de la hiperinflamación, responsable del fallo multiorgánico y de los síntomas que amenazan la vida del paciente.

2) Un segundo objetivo es combatir el agente patógeno desencadenante, generalmente infeccioso, aunque no suele ser suficiente para controlar la situación, excepto en la leishmaniasis.

3) El tercer objetivo, y fundamental en las formas genéticas, es el trasplante de progenitores hematopo-

yéticos para reconstituir la alteración del sistema inmunitario por células normales<sup>4,26</sup>.

Teniendo en cuenta la posibilidad de evolución rápidamente fatal del HLH, se recomienda iniciar el tratamiento ante un alto grado de sospecha clínica, incluso aunque los resultados de algunas pruebas diagnósticas estén pendientes y, por ello, se considera como una urgencia terapéutica<sup>26</sup>. La heterogeneidad de la evolución clínica, con rápida progresión, curso tórpido y persistente, resoluciones espontáneas y las reactivaciones con intervalos muy variables, indica la necesidad de un buen control y seguimiento clínico para el diagnóstico correcto de la enfermedad<sup>29,35</sup>.

Los pacientes con HLH pueden desarrollar meningoencefalitis, y se ha comprobado que una alta proporción (61%) tienen síntomas neurológicos o alteraciones de LCR en el momento del diagnóstico. Además, los niños con afectación neurológica sufren mayor riesgo de mortalidad y mayor incidencia de secuelas neurológicas a largo plazo (aproximadamente, un 15% tiene retraso mental, epilepsia, sordera a los 5 años)<sup>28</sup>. Por ello, el tratamiento debe incluir fármacos que atraviesen la barrera hematoencefálica y controlen la inflamación cerebral.

Los tratamientos efectivos de HLH han incluido fármacos que neutralizan la función de los histiocitos y macrófagos activados (esteroides, etopósido y gammaglobulinas en dosis altas) y de las células T activadas (esteroides, ciclosporina A, globulinas anti-timocíticas, 2CdA), interrumpiendo el ciclo descontrolado de activación inmunitaria característico<sup>3,26,37</sup>. La decisión de iniciar tratamiento con corticoides, inmunosupresores y citostáticos en un paciente con fiebre y pancitopenia es muy difícil por la falta de un marcador diagnóstico específico. Sin embargo, si no se logra controlar la hiperinflamación, el paciente morirá por fallo multiorgánico, infección bacteriana o fúngica por neutropenia prolongada o por disfunción cerebral<sup>4</sup>.

Las formas más graves de HLH, y especialmente en los niños más pequeños, se deben tratar con combinaciones de fármacos como dexametasona, ciclosporina y etopósido, independientemente de la identificación de un germen infeccioso (con la posible excepción de *Leishmania*). En 1994, la Sociedad del Histiocito elaboró un protocolo (HLH-94) que incluía estos tres fármacos, y en 2004 se introdujo una pequeña modificación, manteniendo los mismos agentes<sup>26</sup>. Otros grupos de expertos han propuesto otras combinaciones que incluyen la globulina antitimocítica<sup>37</sup>. Las formas moderadas pueden responder bien a los esteroides e inmunoglobulinas inespecíficas<sup>4</sup>. Los bolos de metilprednisolona han demostrado su efectividad en muchos casos de síndrome de activación macrofágica.

En las reactivaciones de HLH es necesario reiniciar el tratamiento específico y son indicativas de la nece-

sidad de tratamiento definitivo con trasplante de progenitores hematopoyéticos. El trasplante es también el único tratamiento curativo en las formas familiares o genéticas, en el síndrome de Chédiak-Higashi, Griscelli y linfoproliferativo ligado a X<sup>26,38</sup>.

El pronóstico de los niños tratados con el protocolo HLH-94 se publicó en 2002. La supervivencia global a 3,1 años fue del 55% sobre 113 pacientes y del 51% en los casos familiares<sup>39</sup>. La respuesta inicial fue buena en el 75%, pero el 22% falleció antes del trasplante. En pacientes trasplantados, la supervivencia a tres años alcanzó el 63% (70% si donantes idénticos). Este tratamiento con inmunoterapia ha demostrado su efectividad y ha mejorado notablemente el pronóstico de esta enfermedad, considerada letal hace 25 años. La administración tardía de etopósido en los casos de HLH secundario a VEB es un factor pronóstico importante de mortalidad (riesgo de muerte 14 veces superior si se retrasa más de 4 semanas del diagnóstico).

### Consideraciones finales

- A pesar de los avances en el diagnóstico, tratamiento y pronóstico de HLH, y de la enorme contribución de las guías internacionales en los últimos 15 años, el conocimiento de esta enfermedad tiene todavía numerosas cuestiones pendientes de resolver a nivel de identificación de nuevos genes implicados, de factores inmunológicos que contribuyan a superar las dificultades diagnósticas de HLH con criterios más específicos y precoces. También es necesario correlacionar mejor los factores clínicos y biológicos, para facilitar las decisiones terapéuticas relativas a las indicaciones del tratamiento inmunocitotóxico y del trasplante de progenitores hematopoyéticos así como para evitar la alta tasa de mortalidad y de secuelas neurológicas.

- La presentación clínica de las formas de HLH familiares, genéticas o asociadas a infección, neoplasia o enfermedad autoinmune puede ser idéntica e indistinguible. El factor desencadenante infeccioso es frecuente en todos los tipos. El curso clínico es muy variable y oscila desde regresión espontánea a reactivaciones múltiples o deterioro progresivo grave y fatal.

- Las recomendaciones actuales para el diagnóstico indican la importancia de realizar estudios genéticos e inmunológicos específicos, y se ha comprobado que la hemofagocitosis está ausente en muchos pacientes.

- El inicio de tratamiento precoz, ante una fuerte sospecha clínica incluso con negatividad o falta de resultado de algunos criterios, puede evitar un fallo multiorgánico fatal o secuelas neurológicas permanentes.

- El tratamiento recomendado por la Histiocyte Society (HLH-94) con dexametasona, VP-16, ciclosporina y trasplante de progenitores hematopoyéticos ha mejorado el pronóstico con tasas de supervivencia a 3 años del 55% y del 63% en los casos trasplantados.

### Bibliografía

1. Weitzmann S, Egeler RM. Histiocytic Disorders of children and adults. Basic Science and Clinical Features and Therapy. 1ª Ed. Cambridge University Press 2005
2. Ladish S, Jaffe E. The histiocytosis. In Pizzo PA, Poplack DG. Principles and Practice of Pediatric Oncology Lippincott, Philadelphia. 5ª Ed. 2005. pp: 768-785
3. Allen CE. Highly elevated ferritin levels and the diagnosis of HLH. *Pediatr Blood Cancer* 2008;50:1227-1235
4. Arico M. HLH. Report of 122 children from the International Registry. *Leukemia* 1996;10:197-
5. Cooper N, Rao K, Goulden N, Webb D, Amrolia P, Veys P. The use of reduced-intensity stem cell transplantation in HLH and LCH. *Bone Marrow Transplant* 2008; 42 suppl 2: S47-50
6. Dapena JL. Haemophagocytic syndrome: A common pathogenic mechanism of various aetiologies. *An Pediatr (Barc)* 2009; 71(2): 110-6
7. Fadeel B. FHLH: Too little cell death may seriously damage your health. *Leukemia Lymphoma* 2001;42:13-20
8. Filipovich AH. Life-threatening syndromes: current outcomes with hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Transplant* 2005;9 Suppl 7:87-9
9. Filipovich AH. HLH and other related disorders. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2008; 28(2):293-313
10. Gonzalez-Posada JM. HLH in a pancreas-kidney transplant recipient: response to dexamethasone and cyclosporine. *Clin Nephrol* 2008; 70(1): 82-6
11. Gupta A. The role of hemophagocytosis in bone marrow aspirates in the diagnosis of HLH. *Pediatr Blood Cancer* 2008; 50:192-194
12. Henter JI. Treatment of HLH with HLH-94 immunotherapy and bone marrow transplantation. *Blood* 2002;100:2367-2373.
13. Henter JI, Horne AC, Arico M et al. HLH 2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for HLH. *Ped Blood Cancer* 2007; 48: 124-131.
14. Horne AC, Trottestam H, Arico M et al. Frequency and spectrum of CNS involvement in 193 children with HLH. *Br J Haematol* 2008;140(3):327-335
15. Ishii E. Nation survey of HLH in Japan. *Int J Hematol* 2007; 86(1): 58-65
16. Janka GE. Familial and acquired HLH. *Eur J Pediatr* 2007;166:95-109.
17. Janka GE. Hemophagocytic syndromes. *Blood Reviews* 2007; 21:245-253.
18. Mahlaoui N. Immunotherapy of FHL with antithymocyte globulins: A single center retrospective report of 38 patients. *Pediatrics* 2007;120(3):622-628. 1
19. Mancebo E. FHL in an adult patient homozygous for A91V in the perforin gene, with tuberculosis infection. *Haematologica.* 2006; 91:1257-60
20. Nagafuji K. Perforin gene mutations in adult-onset HLH. *Haematologica* 2007; 92(7): 978-81
21. Santamaria M. Leishmaniasis and concurrent hemophagocytosis with or without transient perforin expression perturbation. *Pediatr Blood Cancer* 2008;Apr 3
22. Trizzino A. Genotype-phenotype study of FHL due to perforin mutations. *J Med Genet* 2008;45(1):15-21.

## ESTADO ACTUAL EN EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LAS HISTIOCITOSIS DE CÉLULAS DE LANGERHANS

C. RODRÍGUEZ-GALINDO

*Dana Farber Cancer Institute / Children's Hospital de Boston. Universidad de Harvard (EE UU)*

La histiocitosis de células de Langerhans (HCL) es un desorden proliferativo de células de Langerhans (CL) activadas con una gran variedad de comportamiento biológico y gravedad clínica<sup>1</sup>. La histopatología de las lesiones es uniforme independientemente de la gravedad clínica de la enfermedad, y consiste en acúmulos de CL, células interdigitantes y macrófagos, con la presencia constante de linfocitos T y números variables de histiocitos gigantes multinucleados y eosinófilos<sup>2</sup>. La patogenia de la HCL no está bien definida. La demostración de que la HCL es una enfermedad monoclonal podría sugerir que se trata de una enfermedad neoplásica<sup>3</sup>. Sin embargo, los distintos patrones de presentación clínica parecen indicar otros mecanismos patogénicos. La ocurrencia de remisiones espontáneas y la apariencia histopatológica benigna de las lesiones en la HCL sugieren una enfermedad clonal reactiva antes que un proceso maligno. Las CL, al igual que otras células dendríticas, tienen un papel crítico en el sistema inmunitario, y se ha sugerido que la HCL podría ser el resultado de desregulación inmunológica. A pesar de que no se han descrito alteraciones inmunológicas consistentes, existe cierta evidencia que sugiere que la HCL puede ser el resultado de una proliferación anormal e incontrolada de CL secundaria a una desregulación inmunológica o como respuesta a un estímulo indeterminado<sup>4</sup>. Con la finalidad de reconciliar el origen clonal de las CL patológicas con las evidencias de desregulación inmunológica, se ha propuesto la hipótesis de que la expansión monoclonal podría representar una respuesta del huésped a una estimulación antigénica crónica. Bajo condiciones de estimulación crónica, podrían emerger clones de células dendríticas dominantes que retendrían cierta habilidad para responder a las señales reguladoras inmunológicas normales, ejemplificado por los casos de remisiones espontáneas o aquellos que responden a ciclosporina.

### Tratamiento de HCL

Los cambios en el tratamiento de la HCL durante las últimas décadas reflejan los conceptos cambiantes sobre la enfermedad. De hecho, las dificultades para

desarrollar terapias más efectivas están directamente relacionadas con las deficiencias en el estudio de la patogenia de la HCL. Los estudios retrospectivos de Lahey<sup>5</sup> demostraron que, si bien distintos órganos pueden tener infiltración por CL, la afectación es solamente de importancia pronóstica si existe disfunción orgánica. Siguiendo este concepto, los pacientes podrían ser estratificados en distintos grupos de riesgo en función de la extensión de la enfermedad y el grado de disfunción orgánica. Estudios cooperativos confirmaron dichos conceptos a la vez que identificaron un subgrupo de pacientes (definido por edad > 2 años y ausencia de disfunción orgánica) con un pronóstico excelente a pesar de la afectación multisistémica<sup>6</sup>. En la actualidad, el tratamiento de pacientes con HCL es adaptado al riesgo: pacientes con enfermedad en un sistema único con lesión única generalmente requieren solamente terapia local u observación; pacientes con enfermedad más extensa (lesiones óseas o linfadenopatías múltiples) generalmente requieren terapia sistémica. La mejor opción terapéutica en esos casos no ha sido definida; se pueden observar respuestas con ciclos cortos de corticoides con o sin la adición de agentes quimioterápicos. El tratamiento recomendado por la Sociedad del Histiocito para este grupo de pacientes incluye una inducción de 6 semanas con prednisona y vinblastina, seguida de un tratamiento de continuación con pulsos de los mismos agentes cada tres semanas. El pronóstico para este grupo de pacientes es generalmente excelente, si bien aproximadamente el 30% de los pacientes sufren reactivaciones que siguen respondiendo a tratamiento. Siete estudios cooperativos han estudiado el tratamiento de pacientes con enfermedad multisistémica: el protocolo Italiano AIEOP-CNR-HX 83 Protocol<sup>7</sup>, el protocolo Austriaco/Alemania DAL-HX 83/90<sup>8</sup>, el protocolo del Grupo Japonés de HCL-96<sup>9</sup> y los tres estudios de la Sociedad del Histiocito (protocolos LCH-I<sup>9</sup>, LCH-II<sup>10</sup> y LCH-III). Todos ellos fueron adaptados al riesgo y se basaron en distintas combinaciones de prednisona, vinblastina, etopósido, metotrexato, ARA-C y 6-mercaptopurina. En todos estos estudios, las tasas de supervivencia fueron superiores al 90% para pacientes con enfermedad multisistémica sin afectación de órganos de riesgo. El protocolo LCH-III, recientemente completado, aleatorizó a pacientes con enfermedad multisistémica sin afectación de órganos de riesgo a un mantenimiento de 6 vs. 12 meses con la finalidad de evaluar el impacto de la duración del tratamiento en la incidencia de reactivaciones. Los pacientes aleatorizados al tratamiento más prolongado tuvieron unas tasas de reactivación significativamente inferiores. Para este grupo de pacientes, el tratamiento actual recomendado por la Sociedad del Histiocito es un régimen de 12 meses con prednisona y vinblastina. La afectación de órganos de riesgo acarrea un peor pronóstico. Este gru-

po de pacientes está caracterizado por presentación a edad temprana (generalmente < 2 años), y diferentes grados de afectación de hígado, bazo, sistema hematopoyético y pulmón. Estos pacientes responden pobremente al tratamiento, y la mortalidad es cercana al 40%. En el estudio LCH-III recientemente completado, estos pacientes fueron aleatorizados a un tratamiento basado en prednisona, vinblastina y 6-mercaptopurina con o sin metotrexato. Los resultados preliminares indican que la inclusión de metotrexato no es beneficiosa.

### Tratamiento de la HCL recurrente o refractaria

La reactivación de la enfermedad es común en pacientes con HCL, y parecen identificarse dos grupos:

1. Pacientes con reactivaciones de "bajo riesgo". Este grupo está formado por pacientes que presentan reactivación de enfermedad multifocal ósea o de enfermedad multisistémica de bajo riesgo (sin afectación de órganos de riesgo). En estos casos, las reactivaciones ocurren en aproximadamente una tercera parte de los pacientes y suelen responder bien a las terapias de segunda línea. Varios regímenes han demostrado eficacia en estas situaciones, incluyendo 6-mercaptopurina y metotrexato orales<sup>11</sup>, indometacina<sup>12</sup>, bisfosfonatos<sup>13</sup> y cladribina<sup>14</sup>.
2. Pacientes con reactivaciones de "bajo riesgo". Este grupo está caracterizado por la presencia de afectación de órganos de riesgo y pobre respuesta a la terapia inicial. La mortalidad es elevada, y estudios recientes sugieren que un régimen intenso con cladribina y altas dosis de ARA-C puede ser efectivo<sup>4</sup>. El trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas también ha demostrado eficacia en estos casos<sup>15</sup>.

### Tratamiento de la HCL recurrente o refractaria con análogos de nucleósidos

La enzima adenosina-deaminasa (ADA) juega un papel esencial en la degradación de los nucleósidos de purina derivados del procesamiento del ADN. En las células deficientes en ADA, la deoxiadenosina es metabolizada por la deoxicitidina cinasa (dCk), lo cual da lugar a concentraciones elevadas de deoxiadenosina mono-, di- y trifosfato (dAMP, dADP y dATP), que son tóxicas para las células. La 2-clorodeoxiadenosina (2-CdA, cladribina) es un análogo de las purinas resistente a la ADA pero no a la dCk. Ello da lugar a una acumulación de nucleótidos de deoxiadenosina clorinada que pueden ser eventualmente incorporados al ADN de las células en división, lo cual da a

lugar a un arresto en la fase S del ciclo celular y subsecuente activación de la apoptosis. Sin embargo, en contraste con los antimetabolitos convencionales, la cladribina es extremadamente tóxica para linfocitos maduros que no están en fase de división. Las elevadas concentraciones de deoxinucleótidos podrían interferir con la reparación de las rupturas en las cadenas de ADN e iniciar así el proceso de muerte celular programada. En niños, la cladribina ha sido utilizada principalmente en el tratamiento de la leucemia aguda mieloide, donde se han obtenido respuestas cercanas al 60%<sup>16</sup>. Los linfocitos y monocitos maduros expresan altos niveles de dCk. Estudios in vitro han demostrado que la cladribina es un agente muy selectivo contra monocitos, causando una disminución de la función y viabilidad de los monocitos, así como una disminución de la secreción de IL-6<sup>17</sup>. Dado que los histiocitos tisulares son derivados de la misma célula madre que los monocitos circulantes, la cladribina ha sido investigada en el tratamiento de pacientes con enfermedades histiocíticas. Respuestas clínicas excelentes, con respuesta global del 82%, han sido descritas en adultos con HCL recurrente<sup>18</sup>. En niños, el papel de la cladribina ha sido evaluado en dos situaciones clínicas:

- a) En pacientes con reactivaciones de 'bajo riesgo', la cladribina ha dado lugar a respuestas en > 90% de los pacientes, si bien nuevas reactivaciones todavía pueden ocurrir<sup>14,19</sup>. Un beneficio adicional de la cladribina es su efecto sobre la enfermedad del SNC (una complicación común en HCL)<sup>20</sup>. Una limitación importante del uso de la cladribina es su limitación a un curso corto de tratamiento: más de 4 o 6 ciclos han sido asociados a mielosupresión prolongada, ocasionando un cuadro similar a la mielodisplasia.
- b) Para pacientes con reactivación de 'alto riesgo', la cladribina como fármaco único tiene poco efecto<sup>19</sup>, y es necesario un régimen más intensivo. La combinación de altas dosis de cladribina (9 mg/m<sup>2</sup>/d × 5 días) con citarabina (1 gr/m<sup>2</sup>/d × 5 días) ha demostrado inducir respuestas en pacientes con enfermedad refractaria<sup>4</sup>. Si bien este tratamiento parece ser efectivo, está asociado a alta morbilidad, y una mortalidad asociada a toxicidad superior al 20%.

La clofarabina, un miembro de la segunda generación de análogos de la deoxiadenosina, está siendo investigada actualmente en la situación de enfermedad refractaria. Estudios preliminares sugieren que la clofarabina puede tener un efecto superior a la cladribina.

En conclusión, la HCL es una enfermedad proliferativa de las CL con manifestaciones clínicas heterogéneas. El factor pronóstico más importante es la presencia de enfermedad en los órganos de riesgo y, para este grupo de pacientes, nuevas terapias deben ser desarrolladas.



## Bibliografía

1. Arico M, Egeler RM. Clinical aspects of Langerhans cell histiocytosis. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1998; 12: 247-58.
2. Schmitz L, Favara BE. Nosology and pathology of Langerhans cell histiocytosis. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1998; 12 (2): 221-46.
3. Willman CL, Busque L, Griffith BB, et al. Langerhans' cell histiocytosis (histiocytosis X) - a clonal proliferative disease. *N Engl J Med.* 1994; 331 (3): 154-60.
4. Bernard F, Thomas C, Bertrand Y, et al. Multicentre pilot study of 2-chlorodeoxyadenosine and cytosine arabinoside combined chemotherapy in refractory Langerhans cell histiocytosis with hematological dysfunction. *Eur J Cancer.* 2005; 41: 2682-9.
5. Lahey ME. Histiocytosis X: an analysis of prognostic factors. *J Pediatr.* 1975; 87: 184-9.
6. Gadner H, Heiger A, Grois N, Gatterer-Menz I, Ladisch S. Treatment strategy for disseminated Langerhans cell histiocytosis. *Med Pediatr Oncol.* 1994; 23: 72-80.
7. Ceci A, de Terlizzi M, Colella R, et al. Langerhans cell histiocytosis in childhood: results from the Italian cooperative. *Med Pediatr Oncol.* 1993; 21: 259-64.
8. Morimoto A, Ikushima S, Kinugawa N, et al. Improved outcome in the treatment of pediatric multifocal Langerhans cell histiocytosis: results from the Japan Langerhans Cell Histiocytosis Study Group-96 protocol study. *Cancer.* 2006; 107: 613-9.
9. Ladisch S, Gadner H, Arico M, et al. LCH-I: a randomized trial of etoposide vs. vinblastine in disseminated Langerhans cell histiocytosis. *Med Pediatr Oncol.* 1994; 23: 107-10.
10. Gadner H, Grois N, Pötschger U, et al. Improved outcome in multisystem Langerhans cell histiocytosis is associated with therapy intensification. *Blood.* 2008; 111: 2556-62.
11. Womer RB, Anunciato KR, Chehrena M. Oral methotrexate and alternate-day prednisone for low-risk Langerhans cell histiocytosis. *Med Pediatr Oncol.* 1995; 25: 70-3.
12. Munn SE, Olliver L, Broadbent V, Pritchard J. Use of indomethacin in Langerhans cell histiocytosis. *Med Pediatr Oncol.* 1999; 32: 247-9.
13. Farrán RP, Zaretski E, Egeler RM. Treatment of Langerhans cell histiocytosis with pamidronate. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2001; 23: 54-6.
14. Rodríguez-Galindo C, Kelly P, Jeng M, Presbury GG, Rieinan M, Wang W. Treatment of children with Langerhans cell histiocytosis with 2-chlorodeoxyadenosine. *Am J Hematol.* 2002; 69: 179-84.
15. Steiner M, Mathes-Martin S, Attarbaschi A, et al. Improved outcome of treatment-resistant high-risk Langerhans cell histiocytosis after allogeneic stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning. *Bone Marrow Transplant.* 2005; 36: 215-25.
16. Santana VM, Mirro J, Kearns C, Schell M, Crom W, Blakley RL. 2-chlorodeoxyadenosine produces a high rate of complete hematologic remission in relapsed acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 1992; 10: 364-70.
17. Carrera CJ, Terai C, Lotz M, et al. Potent toxicity of 2-chlorodeoxyadenosine toward human monocytes in vitro and in vivo. *J Clin Invest.* 1990; 86: 1480-8.
18. Saven A, Burian C. Cladribine activity in adult Langerhans-cell histiocytosis. *Blood.* 1999; 93: 4125-30.
19. Weitzman S, Wayne AS, Arceci R, Lipton JM, Whitlock JA, De Rossi G. Nucleoside analogues in the therapy of Langerhans cell histiocytosis: a survey of members of the Histiocyte Society and review of the literature. *Med Pediatr Oncol.* 1999; 33: 476-81.
20. Büchler T, Cervinek L, Belohavek O, et al. Langerhans cell histiocytosis with central nervous system involvement: follow-up by FDG-PET during treatment with cladribine. *Pediatr Blood Cancer.* 2005; 44: 286-8.

## Hemoterapia

COORDINADORES: M. CORRAL. *Salamanca*  
J. CARMONA. *Sevilla*

### Resumen del simposio

Las cuatro ponencias seleccionadas para el simposio abordan temas de Medicina Transfusional que hemos considerado que siguen teniendo extraordinario interés para los hematólogos clínicos.

La búsqueda de la seguridad en el tratamiento con componentes sanguíneos (CS) alogénicos ha sido una constante desde el inicio de la era científica de la transfusión, porque siempre se tuvo una clara percepción de los riesgos asociados, y aunque la superación permanente de los mismos le han conferido una gran seguridad, no es menos cierto que persisten riesgos a evitar: la inmunomodulación asociada a transfusión, las enfermedades infecciosas “emergentes”, los asociados a errores administrativos, etc. Todo ello justifica que de forma recurrente actualicemos las estrategias de que disponemos para hacer del tratamiento transfusional un tratamiento seguro y eficaz. La Dra. Carpio *et al.* abordan el tema de la seguridad transfusional en el ámbito hospitalario; ponen énfasis en la necesidad de la prevención, detección y tratamiento precoz de los efectos adversos asociados graves y que, de manera más frecuente de lo que desearíamos, pasan inadvertidos. Inciden por otra parte en la necesidad del uso de tecnologías que faciliten la trazabilidad en todo el proceso de la transfusión hospitalaria, para evitar errores administrativos que, todavía ahora, constituyen la causa de elevada morbilidad e incluso mortalidad asociada a la transfusión.

También vinculada a la seguridad transfusional está la promoción del uso óptimo de los CS, y específicamente, y de forma importante para los hematólogos clínicos como principales prescriptores de plaquetas, el uso óptimo de los componentes plaquetarios.

La importancia del uso de las plaquetas en la profilaxis y tratamiento de un número importante de situaciones clínicas para mejorar el pronóstico del enfermo ha sido demostrada. Al igual que para otros componentes sanguíneos, el “uso óptimo” de los concentrados de plaquetas (CP) implica que el mismo se sustente en un correcto balance entre los beneficios esperados, los riesgos posibles y la posible “evidencia” de su eficacia. Lo más destacable en los estudios de práctica transfusional es la extraordinaria variabilidad de uso de CP en situaciones clínicas equiparables. Pese a que las guías de uso de plaquetas establecen claramente recomendaciones en el uso profiláctico en enfermos con hemopatía y trombopenia grave, hay numerosas situaciones clínicas en las que la decisión de usar plaquetas de forma profiláctica o terapéutica es difícil. Lo es también el tipo de componente a usar y las dosis óptimas en las diferentes situaciones clínicas. Son estos aspectos de controversia en transfusión de componentes plaquetarios los que tratarán en su ponencia los Dres. Lozano y Cid.

Son también numerosos los cambios en los últimos años en relación con la evidencia que sustenta el uso terapéutico de las aféresis. No todas las enfermedades tratadas mediante aféresis terapéuticas lo han sido porque disponíamos de evidencia científica de sus beneficios. La Dra. Arbona actualiza la evidencia disponible en el momento actual, para categorizar las enfermedades en las que el uso de aféresis terapéutica debe ser parte esencial del tratamiento del enfermo.

Por último, contamos con la extraordinaria experiencia de la Dra. Zamora, que centrará su ponencia en la revisión de dos aspectos claves de la anemia hemolítica autoinmune: su diagnóstico serológico y el siempre difícil y controvertido tratamiento transfusional del enfermo con anemia por hemólisis autoinmune.

## AFÉRESIS TERAPÉUTICAS: NUEVAS EVIDENCIAS PARA DEFINIR LAS INDICACIONES

C. ARBONA

*Servicio de Hematología y Oncología.  
Hospital Clínico Universitario. Valencia*

La era de la aféresis terapéutica comienza en 1959, cuando Skoog y Adams demostraron la eficacia de la plasmaféresis manual en el control de los síntomas de hiperviscosidad en un paciente con macroglobulinemia de Waldenström. Desde entonces, y fundamentalmente con el desarrollo de los separadores celulares automáticos, su uso se ha ido extendiendo para el tratamiento de muchas situaciones patológicas, ya que esta técnica terapéutica proporciona un método para mejorar la composición de la sangre, bien eliminando o reduciendo la carga de sustancias patológicas, administrando un componente deficitario, o una mezcla de ambos.

Para determinar que la aféresis terapéutica es beneficiosa para una enfermedad dada, se han propuesto tres tipos de evidencia:

1. **Mecanismo.** Se basa en la patogenia de la enfermedad, esto es, tener la seguridad de que la enfermedad o sus síntomas están relacionadas con una sustancia presente en la sangre.

2. **Corrección.** La premisa básica de la aféresis terapéutica es que la eliminación de células patológicas o sustancias de alto peso molecular, bien sean anticuerpos, inmunocomplejos, crioglobulinas, cadenas ligeras, endotoxinas o lipoproteínas, reduce el daño producido y puede revertir el proceso patológico.

Dicha sustancia debe ser lo suficientemente grande ( $P_m > 15.000$ ) como para no poder ser separada por técnicas de diálisis o hemofiltración, con una distribución intravascular suficiente y con una vida media prolongada, de forma que su eliminación extracorpórea sea mucho más rápida que la vía endógena natural.

Se han descrito otros posibles beneficios como el aumento de la actividad del sistema reticuloendotelial, estímulo de la actividad citotóxica de los linfocitos, eliminación de fragmentos del complemento, citocinas y otros mediadores de la inflamación, etc., en muchos casos, pendientes de definir.

3. **Mejoría del paciente.** Habitualmente, la evidencia en medicina hace referencia a los resultados de ensayos clínicos controlados centrados en la eficacia clínica; por ello, este tercer criterio debería demostrar una fuerte evidencia de que la aféresis terapéutica confiere un beneficio que clínicamente vale la pena para el paciente y no sólo es estadísticamente significativo. Igualmente debemos preguntarnos cuál es el riesgo/

beneficio, el coste/beneficio y la proporción perjuicio/beneficio de otros tratamientos disponibles.

No todas las enfermedades tratadas mediante aféresis terapéutica han sido estudiadas teniendo en cuenta estos parámetros. Y pocas de ellas se han estudiado mediante ensayos clínicos aleatorizados, y obviamente muchas menos comparadas con efecto placebo (falsa aféresis).

Como demuestran los diferentes registros nacionales e internacionales, las indicaciones de aféresis se han ido modificando en los últimos años, correlacionándose estos cambios con los resultados de diferentes estudios, como el descenso de su uso en ciertas enfermedades (como en la crisis miasténica o en el síndrome de Guillain-Barré [SGB]), al demostrarse una eficacia similar junto con una de menor toxicidad con el tratamiento con inmunoglobulinas intravenosas (IGIV), o con los resultados de ensayos aleatorizados controlados publicados a lo largo de los años noventa, que demostraron la ausencia de efecto terapéutico beneficioso en ciertas enfermedades, como la artritis reumatoide y el lupus eritematoso. En los últimos años, sin embargo, se observa un rebrote de su utilización con el desarrollo de nuevas técnicas, sobre todo la incorporación de la adsorción o inmunoabsorción y otros sistemas de purificación específicos, incluyéndose nuevas indicaciones sobre todo en las que la inmunidad humoral o celular juega un papel cardinal en la patogenia, como el rechazo humoral del injerto renal, la miocardiopatía dilatada o la colitis ulcerosa. En éstas, algunas series de casos y trabajos aleatorizados ya han demostrado su eficacia. Por tanto, diferentes son las evidencias existentes para las posibles enfermedades a tratar, la técnica de aféresis utilizada puede variar y en ciertos casos el número de procesos necesarios para conseguir la máxima eficacia está por determinar.

Las enfermedades neurológicas siguen constituyendo hoy día la principal indicación (32,5%) del tratamiento con aféresis terapéutica, en concreto mediante el recambio plasmático (RP). En las últimas décadas, diversos ensayos aleatorizados prueban la eficacia en ciertas neuropatías de mecanismo inmunitario: neuropatías de origen central como la esclerosis múltiple o polineuropatías agudas como el SGB, la polineuropatía inflamatoria desmielinizante crónica y algunas formas de neuropatía paraproteinémica, y neuropatías con fallo en la transmisión como la *miastenia gravis*.

Para algunas, como el SGB, existen metaanálisis (2002 y 2007) con estudios aleatorizados que incluyen a más 649 pacientes que demuestran la eficacia del RP sobre el tratamiento de soporte en su objetivo primario, tiempo para caminar y, por otro lado, no observan diferencias en la escala de grado de invalidez ni en otros objetivos secundarios entre pacientes tratados con RP o IGIV. Existe también evidencia de que el

número de recambios debe ajustarse a la gravedad de la enfermedad. En base a estos resultados, la Academia Estadounidense de Neurología recomienda, para pacientes no ambulatorios diagnosticados de SGB con menos de cuatro semanas de inicio de síntomas, el tratamiento con recambio plasmático o IGIV (grado 1A). La decisión entre una y otra opción terapéutica dependerá de la disponibilidad de cada una de ellas, los factores de riesgo y contraindicaciones de cada una y la preferencia del paciente.

La polineuropatía inflamatoria desmielinizante crónica es una enfermedad neurológica menos frecuente, en la que se detectan respuestas aberrantes de la inmunidad celular y autoanticuerpos contra varias proteínas neuronales y de la mielina, en grados variables que le confieren una gran heterogeneidad en los hallazgos clínicos y en su curso natural, así como en el manejo terapéutico de la misma, obligando en muchos casos a un tratamiento individualizado. La eficacia del RP ha sido documentada en ensayos aleatorizados, controlados y doble ciego, tanto para la recuperación clínica como de los parámetros electrofisiológicos. Las guías recomiendan usar el RP como primera línea tras el fracaso de los corticoides o las IGIV en esta patología.

Sin embargo, en la neuropatía central más frecuente, la esclerosis múltiple, los estudios han demostrado que la aféresis terapéutica es eficaz en un 70% de los episodios agudos en la forma crónica progresiva que no han respondido a los corticoides y en la neuromielitis óptica, en las que claramente se correlaciona con un mecanismo inmune humoral y con la clara mejoría de las lesiones histopatológicas, pero otras formas de la enfermedad no muestran respuestas significativas a esta terapia.

La *miastenia gravis* continúa siendo según el registro de 2005 la patología más frecuente tratada con RP no sólo en número de pacientes, también en el de procedimientos. No obstante, su uso se basa en el beneficio a corto plazo, especialmente en la crisis miasténica, demostrado en muchas series de casos, ya que no existen ensayos controlados aleatorios adecuados, y éstos tampoco son capaces de determinar si existe un beneficio en la evolución a largo plazo de la enfermedad.

La hipercolesterolemia familiar homocigota es una rara enfermedad con una mortalidad por enfermedad cardiovascular muy elevada a edades tempranas. Su único tratamiento curativo es el trasplante hepático. Es fundamental disminuir los niveles de c-LDL para evitar el daño vascular, y estos pacientes son resistentes al tratamiento con hipolipemiantes. El tratamiento con aféresis mediante depleción selectiva de c-LDL (apolipoproteínas B) semanal o quincenal es de elección en los mismos hasta disponer de un órgano compatible. La aplicación de esta indicación se basa en ensayos controlados aleatorizados en pacientes con la variante heterocigota de la enfermedad, en los que, sin em-

bargo, esta indicación no es el tratamiento de elección de primera línea, sino que se debe considerar como un tratamiento de segunda opción.

Para la realización de la misma se dispone de cuatro sistemas específicos: **inmunoabsorción**, **absorción directa con hemofiltración (DALI)**, **absorción por celulosa-dextrano (DSA)** y el sistema de **precipitación con heparina extracorpórea (HELP)**. Los diferentes sistemas de aféresis LDL consiguen reducciones rápidas de los niveles de c-LDL, que oscilan entre el 58-70%, y se reducen también otros lípidos plasmáticos (CT, Lp(a), TG, HDL).

El efecto beneficioso demostrado a largo plazo sobre la enfermedad coronaria y vascular periférica no se explica sólo por el descenso de los lípidos plasmáticos: se ha demostrado que se complementa por otros cambios también producidos con este tratamiento, en algunos casos variable según la técnica usada, como descensos del fibrinógeno y de otros factores de la coagulación, que disminuyen la viscosidad y mejoran las condiciones reológicas sanguíneas, descensos de ciertas moléculas de adhesión y otros mediadores de la inflamación: ICAM-1, VCAM-1, E-selectina..., que participan en la adhesión y migración de los leucocitos a la pared vascular y son fundamentales en la aterogénesis.

Dentro de las nuevas tecnologías aplicadas en aféresis, debemos comentar la creciente utilización de la fotoaféresis. La separación de células mononucleadas de sangre periférica y su subsiguiente exposición a 8-metoxipsoralen seguido de irradiación con luz ultravioleta A antes de la infusión de nuevo al paciente, daña el DNA celular e induce apoptosis. Al igual que en la hipercolesterolemia, este efecto principal no es el único. Así, la explicación para su beneficio en el tratamiento de la eritrodermia de los linfomas T cutáneos, la EICH crónica o el rechazo agudo al trasplante de órganos sólidos va más allá, y se demuestra la maduración de los monocitos, modificación del balance de las células dendríticas a favor de la población DC2, estimulación de los linfocitos T reguladores, e incremento en la producción de IL-10, entre otras. En estas enfermedades estudios, aleatorizados o no, y series de casos, han demostrado con mínimos efectos secundarios y toxicidad comparado con otros tratamientos inmunosupresores, su efecto beneficioso.

Ejemplo de indicaciones de aféresis en los que no existen trabajos aleatorizados, ni controlados y sólo se basa en series de casos o publicaciones aisladas, es la enfermedad de Refsum, donde por su escasísima frecuencia es difícil plantearlos. En esta enfermedad, el recambio plasmático se ha demostrado eficaz, mediante medición sérica, para reducir los niveles elevados de ácido fitánico no controlados completamente por la dieta y, en consecuencia, detiene el daño producido por su acúmulo.



Una de las cuatro áreas de aplicación de la medicina basada en la evidencia consiste en el desarrollo de guías prácticas que ayuden a los médicos en sus decisiones ante una situación dada. Una de estas guías, ampliamente difundida desde el año 1986, es la presentada por la American Society for Apheresis (ASFA), cuya cuarta edición se publicó en septiembre de 2007. Tres cambios clave se observan en esta edición respecto a las anteriores. Uno de ellos es la relación de las categorías ASFA (I-IV) con el análisis basado en la calidad de las pruebas y no únicamente el número de publicaciones; sólo 24 del total de 86 indicaciones de aféresis como categorías I-III y P se basan en evidencia tipo I, es decir, obtenida mediante al menos un ensayo controlado aleatorio correctamente diseñado. El segundo es la introducción del formato de folleto, diseñado para resumir y condensar la literatura médica disponible sobre el tratamiento de una enfermedad mediante aféresis en una revisión que se concentra en cuestiones prácticas para el especialista en la técnica. El último cambio es la introducción de una quinta categoría, llamada P (de "pendiente"), que incluye aquellas enfermedades que pueden ser tratadas mediante aféresis usando sistemas no aprobados todavía por la FDA.

En las situaciones en que la indicación está clara y también en aquellas en las que no lo está tanto, y ya que el procedimiento no está exento de riesgos, la solicitud desde la clínica del inicio de aféresis para un paciente en concreto siempre debe ser una decisión conjunta y ponderada entre el hematólogo y el médico encargado y, en la que el paciente o su familia conozcan los potenciales beneficios del procedimiento y acepten los posibles riesgos.

## Bibliografía

- Hughes RA, Swan AV, Raphaël JC, et al. Immunotherapy for Guillain-Barré syndrome: a systematic review. *Brain*. 2007; 130: 2245-57.
- Malchesky P, Koo AP, Roberson GA, et al. Apheresis technologies and clinical applications: the 2005 International Apheresis Registry. *Ther Apher Dial*. 2007; 11: 341-62.
- McLeod BC. An approach to evidence-based therapeutic apheresis. *J Clin Apher*. 2002; 17: 124-32.
- Raphaël JC, Chevret S, Hughes RA, Annane D. Plasma exchange for Guillain-Barré syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*. 2002; (2) CD2001798.
- Szczepiorkowski ZM, Bandarenko N, Kim HC, et al. Apheresis Applications Committee of the American Society for Apheresis. Guidelines on the use of therapeutic apheresis in clinical practice: evidence-based approach from the Apheresis Applications Committee of the American Society for Apheresis. *J Clin Apher*. 2007; 22: 106-75.
- Szczepiorkowski ZM, Shaz BH, Bandarenko N, Winters JL. The new approach to assignment of ASFA categories—introduction to the fourth special issue: clinical applications of therapeutic apheresis. *J Clin Apher*. 2007; 22: 96-105.
- Thompson GR; HEART-UK LDL Apheresis Working Group. Recommendations for the use of LDL apheresis. *Atherosclerosis*. 2008; 198: 247-55.

## ANEMIA HEMOLÍTICA AUTOINMUNE: DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO Y TRATAMIENTO TRANSFUSIONAL

C. ZAMORA DE PEDRO

*Servicio de Hematología y Hemoterapia.  
Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid*

### Introducción

La anemia hemolítica autoinmune (AHA) constituye un cuadro clínico caracterizado por la existencia de anticuerpos dirigidos contra los hematíes propios del paciente causando la destrucción de éstos. Su incidencia es de 1 a 3 casos por cada 100.000 habitantes y año, y puede aparecer como enfermedad idiopática, sin causa conocida, o como proceso secundario, en el seno de otras enfermedades, especialmente procesos linfoproliferativos, enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso diseminado, procesos infecciosos o, con menos frecuencia por la administración de ciertos fármacos como la alfa-metil-dopa<sup>1</sup>. Las características del autoanticuerpo (autoAc) detectado van a determinar los distintos tipos de AHA, condicionando asimismo el tratamiento.

La presencia de anemia en estos pacientes, a veces intensa, determina la necesidad de transfusión, lo que a veces puede ser complicado debido a la presencia del autoAc en suero, que causa incompatibilidad en las pruebas pretransfusionales.

El estudio de estos procesos puede ser largo y complejo, sobre todo cuando el paciente requiere transfusiones, ya que en estos casos puede ser necesario descartar la presencia de aloanticuerpos (aloAc), que pueden existir enmascarados por los autoanticuerpos (autoAc)<sup>2</sup>. También pueden presentar problemas en la determinación del grupo ABO y Rh. La transfusión en estos pacientes plantea problemas importantes de cara a la selección de la sangre adecuada, teniendo en cuenta las características del autoanticuerpo y la posible existencia de aloanticuerpos encubiertos.

### Diagnóstico de la AHA

El diagnóstico de AHA descansa fundamentalmente en dos aspectos: demostración de la existencia de autoAc y la presencia de datos de anemia hemolítica (reticulocitosis, policromatofilia, hiperbilirrubinemia indirecta, aumento de LDH, haptoglobina disminuida, hemoglobinemia y hemoglobinuria). La evidencia de autoAc se obtiene cuando se detecta una prueba de antiglobulina directa (PAD) positiva con reactivos poliespecíficos y la utilización de reactivos antiglobu-

lina mono-específicos determinará el tipo del mismo. Mediante los procedimientos de elución se puede estudiar el tipo de autoAc fijado a los hematíes del paciente. Es importante también hacer un escrutinio de anticuerpos en el suero del paciente, ya que hasta en un 80% de los casos se detectan autoAc libres en suero. La valoración conjunta de los resultados de todos estos estudios permiten la clasificación de distintos tipos de AHA<sup>3</sup>.

Las más frecuentes son las AHA por anticuerpos calientes, que suponen hasta el 70% de los casos y que presentan una PAD positiva por IgG, por IgG y C3 o sólo por C3<sup>4</sup>. En un 1% de los casos la PAD puede ser positiva por IgA o por IgM<sup>4</sup>. En el eluido se detectan anticuerpos capaces de reaccionar con los hematíes por la técnica de antiglobulina indirecta. En la mayoría de los casos se encuentran anticuerpos en suero, que reaccionarán con hematíes suspendidos en medio salino simplemente o bien tratados con enzimas o mediante técnicas como PEG o métodos en fase sólida. Hasta en un 30% de pacientes pueden detectarse además crioprecipitinas, con un título bajo y poca amplitud térmica.

Hay un grupo raro de AHA calientes en las que los anticuerpos detectados son de tipo IgM, y que se caracteriza por la presencia de un cuadro hemolítico grave, y con mal pronóstico. En estos casos la PAD suele ser positiva por C3 y, utilizando métodos no aglutinantes, como la citometría de flujo, se puede detectar la presencia de IgM en más del 80% de los pacientes<sup>5</sup>. Los hematíes de estos pacientes presentan con frecuencia fenómenos de aglutinación espontánea, que interfieren en la PAD, siendo necesario utilizar productos como el ditiotreitol (DTT) para eliminarla y poder realizar correctamente las pruebas. El eluido suele ser reactivo y en la mayoría de los casos contiene aglutininas IgM, que aglutinan directamente los hematíes o reaccionan mediante el test de antiglobulina. En el suero se encuentran autoAc con una temperatura óptima de reacción entre 20 y 30 °C, y un título a 4 °C inferior a 1/64, lo que la diferencia de la AHA por anticuerpos fríos. A veces la demostración de estos anticuerpos requiere la acidificación del suero.

En las AHA por anticuerpos fríos (16-32% de los casos) la PAD es positiva por C3 y los anticuerpos implicados son de tipo IgM, no recuperándose en el eluido. En el suero se encuentran autoaglutininas frías con un título mayor de 1/1000 a 4 °C, capaces de reaccionar a temperaturas de 30 °C o superiores, potenciándose la reacción con la adición de albúmina. Con frecuencia se observa autoaglutinación a temperatura ambiente, que puede interferir con la determinación del grupo ABO y Rh, lo que puede resolverse utilizando hematíes mantenidos a 37 °C y lavados con solución salina a esa misma temperatura.

Las AHA de tipo mixto (7-8%) se caracterizan porque presentan una PAD positiva por IgG y C3 y en el

eluido se detectan autoAc IgG calientes. En el suero, además de los autoAc calientes se encuentran aglutininas frías de alto título y gran amplitud térmica, o con título dentro de lo normal pero con amplitud térmica grande.

Un cuarto tipo de AHA está constituido por la hemoglobinuria paroxística *a frigore* (HPF), entidad rara en adultos, pero que en niños puede suponer hasta un 30% de los casos de AHA (la mayor parte de las veces, secundaria a un proceso vírico)<sup>6</sup>. El autoAc implicado en estos casos es de tipo IgG que fija C3, pero habitualmente en la PAD sólo se detectará el C3, a no ser que se utilicen hematíes lavados con salina fría y anti-IgG frío. En el eluido habitualmente no se recupera ningún anticuerpo. El autoAc detectado en suero se comporta como una hemolisina bifásica, llamada así porque es capaz de producir hemólisis a 37 °C, pero la fijación del anticuerpo tiene lugar previamente a bajas temperaturas. Para realizar el diagnóstico de esta entidad se utiliza el test de Donath Landsteiner.

Hasta un 5% de los pacientes con un cuadro compatible con AHA pueden cursar con una PAD negativa<sup>7</sup>. Esto puede deberse a que el autoAc se encuentra en niveles por debajo del umbral de detección en la PAD, o bien puede tratarse de autoAc de baja afinidad o de tipo IgA o IgM<sup>8</sup>. Algunos de estos casos se han podido resolver utilizando reactivos antiglobulina de tipo anti-IgA o anti-IgM, o con técnicas como citometría de flujo, test de ELISA, fase sólida, PEG, polibreno, concentración del eluido; pero, a pesar de todo, persisten una pequeña proporción de casos en los cuales no se puede poner de manifiesto la positividad de la PAD.

### Especificidad del autoanticuerpo

Si existe autoAc libre en suero será necesario proceder a la determinación de la especificidad del mismo. En el caso de las AHA calientes la especificidad del autoAc suele ser compleja, apareciendo la mayor parte de las veces como una panaglutinina, que reacciona por igual con los hematíes de prácticamente el 100% de los donantes. A veces, puede observarse menor reactividad o ninguna frente a células raras como D—o Rh<sub>null</sub>, o, en otras ocasiones, una aparente reactividad frente a antígenos específicos del sistema Rh, siendo anti-e la especificidad detectada más frecuentemente. Más raramente se han descrito autoAc con especificidades en otros sistemas de grupos sanguíneos, como LW, Kell, Kidd, Duffy.

En las AHA frías los autoAc suelen mostrar especificidad anti-I en la mayor parte de los casos y, en menos ocasiones, anti-i, asociada habitualmente a la mononucleosis infecciosa o menos frecuentemente, especificidad anti-Pr. Las reacciones pueden ser tan fuertes que, a veces, para determinar la especificidad es nece-

sario hacer titulaciones del suero y ver la fuerza con la que aglutinan frente a hematíes I(+) e I(-).

En la mayor parte de los casos de HPF el autoAc muestra especificidad dentro del sistema P. El suero reaccionará con todos los hematíes excepto con aquellos con el raro fenotipo p o P<sup>k</sup>. Excepcionalmente se han visto otras especificidades.

---

### Detección de aloanticuerpos

La presencia de autoAc en el suero de la mayor parte de los pacientes con AHA causa problemas en las pruebas pretransfusionales, siendo habitual que exista incompatibilidad con prácticamente el 100% de los donantes. En estos casos, además, existe el riesgo de que los autoAc enmascaren la posible presencia de aloAc, con el riesgo consiguiente en la transfusión.

Hay datos indicativos de que en esta enfermedad existe mayor incidencia de aloinmunización que en otras enfermedades, ya que hasta en un 30% de los pacientes con AHA pueden detectarse aloAc<sup>9</sup>. En los últimos años, sin embargo, se ha cuestionado esta incidencia, ya que se ha observado que en muchos casos se trata realmente de procesos de autoinmunización producida tras aloinmunización secundaria a la transfusión, en la que el autoAc aparece simultáneamente junto con el aloAc o inmediatamente antes o después<sup>10,11</sup>. Por ello, se considera hoy día que la verdadera incidencia de aloinmunización en pacientes diagnosticados previamente de AHA está todavía pendiente de determinar. En la práctica siempre será necesario descartar la presencia de aloAc, especialmente en aquellos pacientes que tengan historia de posible inmunización por transfusiones o embarazos previos.

En el caso de AHA por crioaglutininas la detección de aloAc puede resultar más fácil que en las calientes, ya que, utilizando una técnica de adsorción a 4 °C con hematíes del paciente tratados o no con enzimas, pueden adsorberse las crioaglutininas de forma que no interfieran en las pruebas realizadas a 37 °C.

En los pacientes con HPF no suelen existir problemas de incompatibilidad utilizando las técnicas de aglutinación habituales, ya que el autoAc rara vez reacciona por encima de 4 °C, lo que asimismo facilita la detección de aloAc si los hubiera.

Existen más dificultades en las AHA calientes, ya que el autoAc interfiere en todas las pruebas realizadas a 37 °C. Son varios los métodos utilizados en estos casos: autoadsorción, aloadsorción y método de dilución del suero<sup>12</sup>. De ellos, el método de dilución se considera más rápido pero menos seguro para la detección de aloAc en la mayor parte de los casos, aunque para algunos grupos de trabajo ha resultado eficaz<sup>13</sup> hasta en un 60% de los casos en los que lo han aplicado, siempre que la dilución utilizada sea la adecuada. Se considera

que la autoadsorción es el método ideal, pero tiene las limitaciones de no poder ser empleado en todos los casos, especialmente cuando el paciente ha sido transfundido recientemente o no se puede disponer de suficiente cantidad de hematíes del paciente.

Se han realizado estudios<sup>14</sup> que muestran que la existencia de pequeñas cantidades de hematíes incompatibles (2-6%) en pacientes transfundidos pueden ser suficientes para la adsorción completa del aloAc. Se considera que es necesario dejar pasar un plazo de al menos tres meses para poder hacer la autoadsorción con garantía de que no se adsorban posibles aloAc. En consecuencia, en aquellos pacientes en los que no se pueda realizar autoadsorción por haber sido transfundidos en los últimos tres meses se deben utilizar técnicas de aloadsorción, procedimiento más largo y complejo. Para ello se deberá disponer de hematíes con fenotipos adecuados, siendo más fácil la búsqueda si se conoce del fenotipo del paciente.

---

### Tratamiento transfusional en pacientes con AHA

Muchos pacientes con AHA son diagnosticados por primera vez en el banco de sangre al realizar los estudios de compatibilidad pretransfusional, ya que no es infrecuente que se presenten con un cuadro clínico grave de anemia hemolítica, que requiera la terapéutica transfusional. Lo habitual es encontrar incompatibilidad con el 100% de los donantes, debido a la presencia de autoAc y, a veces, aloAc. Dada la complejidad de las técnicas de estudio en estos casos y el tiempo que conllevan, estas situaciones pueden constituir un reto para el servicio transfusional, siendo deseable tener bien establecida ante estos pacientes una pauta de actuación que permita una transfusión lo más rápida y segura posible.

---

### Criterios clínicos

Un aspecto importante a tener en cuenta es que, aun utilizando todos los medios disponibles, en la mayoría de los casos no será posible encontrar unidades compatibles mediante las técnicas establecidas. Por ello, un aspecto muy importante será determinar la necesidad clínica de transfusión, para lo que es conveniente que exista una buena comunicación entre el clínico que lleva al paciente y el responsable del servicio transfusional, ya que en ocasiones será necesario tomar decisiones conjuntas. Siempre hay que tener en cuenta que puede tener más riesgos no transfundir que transfundir una unidad incompatible por la presencia de autoAc. Es muy importante conocer si el paciente tiene historia previa de transfusiones o em-

barazos<sup>15,16</sup>, ya que una persona sin antecedentes de inmunización es raro que tenga aloAc y, por tanto, sufrirá menor riesgo de reacción hemolítica. También hay que considerar que la incompatibilidad debida a autoAc es diferente de la producida por incompatibilidad ABO o por otros antígenos clínicamente significativos, ya que habitualmente la supervivencia de los hematíes transfundidos es al menos igual a la de los hematíes del paciente.

La decisión de transfundir debe basarse en factores individuales, ya que no existen criterios únicos a aplicar en todos los casos. Así, hay que tener en cuenta el nivel de Hb, la intensidad y velocidad de progresión de la hemólisis, la aparición de hemoglobinemia o hemoglobinuria, síntomas atribuibles a la hemólisis (fiebre, dolor lumbar), el estado general y la situación cardiovascular del paciente. Los pacientes con AHA y reticulocitopenia parecen estar en una situación de mayor riesgo, habiéndose descrito una elevada mortalidad en aquellos no transfundidos<sup>17</sup>. Los adultos jóvenes o niños pueden tolerar una anemia con Hb hasta de 4g/dL si se ha instaurado paulatinamente. En cambio, en adultos mayores de 50 años conviene transfundir si la Hb desciende por debajo de 6 g/dL, ya que las probabilidades de que exista alguna patología cardiovascular subyacente es mayor en estos pacientes.

Otro factor a considerar es el hecho de que alrededor de un 50% de los pacientes responden a los corticoides durante la primera semana de tratamiento, por lo que se puede valorar el tiempo de espera para la transfusión.

---

### Selección de las unidades “menos incompatibles”

Durante muchos años el método utilizado habitualmente para transfundir a los pacientes con AHA consistía en seleccionar aquellas unidades que aglutinaban con menor intensidad en las pruebas cruzadas, es decir, las que se consideraban “menos incompatibles”, basándose en la suposición de que las reacciones de aglutinación más fuertes pueden ser causadas por aloanticuerpos. Pero hoy día se dispone de nuevas técnicas, capaces de detectar aloAc, por lo que este sistema se considera obsoleto y no aceptable su utilización como método único, excepto en situaciones extremadamente urgentes en las que no se disponga de tiempo para realizar estudios serológicos más completos<sup>18</sup>. Únicamente se puede utilizar como método complementario, tras un estudio previo de detección de aloAc o una selección de unidades fenotipadas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que, aun habiendo hecho todos los estudios previos, la prueba cruzada será habitualmente incompatible, por lo que la utilización de este método quizá proporcione tranquilidad psicológi-

ca al responsable de la transfusión, pero será de poco beneficio para el paciente.

---

### Selección de unidades fenotipadas

Dadas las dificultades y lentitud de los métodos de adsorción se han ensayado otros procedimientos para la selección de sangre en estos pacientes. Uno de ellos consiste en transfundir sangre de acuerdo con el fenotipo del enfermo<sup>19</sup>. Hasta hace pocos años la determinación del fenotipo eritrocitario en pacientes con PAD positiva era complicada y, a veces, imposible, pero hoy día se puede disponer de antisueros monoclonales o de técnicas de biología molecular, lo que permite conocer ese fenotipo con suficiente fiabilidad. Shirey *et al.*<sup>19</sup> propusieron la selección de unidades con el mismo fenotipo que el paciente, siempre que se conozca el fenotipo completo del mismo (antígenos C, E, c, e, K, Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup>, Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, S y s). En este caso consideran que sólo sería necesario hacer estudios de adsorción en el momento inicial del diagnóstico, ya que en los sucesivos ingresos bastaría con la transfusión de unidades fenotipadas. Cuando sólo es posible conocer el fenotipo parcial del paciente o no se puede disponer de unidades completamente fenotipadas sí que sería necesario realizar técnicas de adsorción.

No siempre es aplicable este sistema, unas veces por las dificultades para determinar el fenotipo completo en algunos pacientes y otras por problemas para acceder a la sangre fenotipada. Algunos consideran que habría que hacer una valoración coste/beneficio, teniendo en cuenta que la selección de sangre fenotipada implica un gran coste en tiempo y dinero que no todos los servicios transfusionales pueden asumir<sup>20</sup>. Tampoco parece existir unanimidad entre los partidarios de utilizar sangre fenotipada acerca de si hay que considerar el fenotipo parcial (Rh y Kell) o el completo. La mayor parte de los aloAc detectados en estos pacientes tienen especificidades dentro del sistema Rh y Kell, por lo que la transfusión de sangre parcialmente fenotipada puede evitar una parte significativa de posibles reacciones hemolíticas, pero no todas. A pesar de todas estas limitaciones, la selección de sangre fenotipada, al menos parcialmente, es un procedimiento ampliamente utilizado<sup>21</sup>.

---

### Selección de sangre de acuerdo con la especificidad del autoanticuerpo

No existen datos concluyentes acerca de la diferencia de supervivencia de los hematíes transfundidos según porten o no el Ag correspondiente a la especificidad del autoAc. Aunque algunos recomiendan transfundir de acuerdo con la especificidad, otros no la tienen



en cuenta, basándose en varios factores. Por una parte, en algunos estudios no se ha encontrado mejor supervivencia cuando se transfunden hematíes compatibles con el autoAc o la diferencia ha sido mínima<sup>17</sup>. Por otra parte, tener en cuenta la especificidad del autoAc supone en muchos casos transfundir hematíes con antígenos diferentes a los del paciente, lo cual plantea la posibilidad de aloinmunización, creando el dilema de valorar cuál de las opciones es mejor. Si no existe este riesgo, hay autores que deciden transfundir sangre negativa para el autoAc; por ejemplo, en pacientes con auto anti-e se puede transfundir sangre e(-) si el paciente es Ee, ya que en este caso no existiría el riesgo de formación de anti-E. En situaciones urgentes hay autores<sup>15</sup> que consideran que la especificidad relativa del autoAc no debe ser considerada como un factor importante, ya que hay que enfocarse sobre todo en conseguir la estabilidad clínica del paciente.

Cuando la AHA es producida por anticuerpos fríos, se pueden utilizar técnicas de adsorción a 4 °C, que permiten descartar la presencia de aloAc más fácilmente que en las AHA calientes. La mayor parte de los autoAc en estos casos muestran especificidad anti-I. Dado que los donantes que carecen del antígeno I son extremadamente raros, las posibilidades de encontrar sangre I(-) son muy remotas, por lo que la transfusión se hace habitualmente con sangre I(+). Se recomienda la utilización de sistemas de calentamiento de la sangre durante la transfusión, aunque su utilidad no ha podido ser confirmada científicamente<sup>17</sup>.

En la HPF los autoAc no suelen interferir en las pruebas de compatibilidad, por lo que resulta más fácil descartar aloAc. Dado que el autoAc en estos casos suele tener especificidad frente al antígeno P, las posibilidades de poder disponer de sangre P-negativa para la transfusión son muy remotas. Parece que los hematíes P(-) tienen mejor supervivencia, pero las transfusiones de hematíes P(+) han sido también eficaces.

La incertidumbre sobre la eficacia de la transfusión de unidades seleccionadas según los métodos descritos ha llevado a la realización de estudios de compatibilidad in vivo con hematíes marcados radiactivamente con el fin de determinar su supervivencia, o también se han hecho pruebas mediante la infusión de unos 50 mL de la unidad previamente seleccionada en un tiempo de 20 a 30 minutos y observando después si aparece hemoglobinemia o hemoglobinuria. Estos métodos tienen el inconveniente de que no proporcionan ninguna ventaja ni sustituyen a los otros métodos, por lo que no resultan útiles en la práctica transfusional habitual.

Quizá en un futuro, el desarrollo de productos transportadores de oxígeno como alternativas a la transfusión pueda proporcionar un tratamiento adecuado para la anemia de estos pacientes y sin los problemas de la transfusión de sangre. Algunos de estos productos,

como la hemoglobina bovina polimerizada, han sido utilizado con éxito en un paciente con AHA sin respuesta al tratamiento y con grandes necesidades transfusionales<sup>22</sup>.

Un aspecto importante para tener en cuenta con estos pacientes, una vez tomada la decisión de transfundir, es evitar la infusión de grandes volúmenes de sangre, ya que el aumento de la masa eritrocitaria parece determinar un incremento de la hemólisis. Es aconsejable transfundir el mínimo volumen de sangre, que sea suficiente para corregir los síntomas de la anemia, evitando al mismo tiempo la sobrecarga circulatoria.

## Conclusión

En los pacientes con AHA es necesario realizar una serie de estudios con el fin de precisar las características del autoAc causante del cuadro de anemia hemolítica, y que va a determinar la elección del tratamiento. Otros métodos aún más complejos pueden ser necesarios para fenotipar los hematíes del paciente y para descartar la presencia de aloAc que pueden estar enmascarados entre los autoAc séricos que se encuentran en la mayor parte de estos enfermos.

A pesar de la utilización de los métodos actuales, no suele ser posible encontrar unidades de sangre que sean serológicamente compatibles con el suero del paciente. Por ello, la selección de sangre se hace en estos casos siguiendo una serie de criterios. Aunque no existe unanimidad en cómo seleccionar la sangre para la transfusión, la opinión mayoritaria es la siguiente:

1. Si los autoAc muestran clara especificidad, se considera necesario transfundir hematíes negativos para dicho Ac sólo si la sangre seleccionada no tiene el riesgo de producir aloinmunización, o en caso de hemólisis grave sin respuesta a las transfusiones no compatibles con el autoAc.

2. Si el autoAc no muestra especificidad definida, la transfusión se hará con unidades con el mismo fenotipo del paciente, bien teniendo en cuenta el fenotipo parcial (Rh y K) o, si es posible, el fenotipo completo.

3. Si existen aloAc, se seleccionará siempre sangre compatible con los mismos y del mismo fenotipo del paciente.

4. Las pruebas cruzadas con estas unidades seleccionadas no tienen más utilidad que el efecto psicológico tranquilizador, pero no aportan ningún beneficio al paciente.

Indudablemente, teniendo en cuenta todos estos problemas, se aconseja tener una política restrictiva de la transfusión, valorando individualmente los datos clínicos y analíticos del paciente, pero teniendo siempre en cuenta que es preferible transfundir sangre incompatible que arriesgarse a que un paciente pueda morir por un cuadro anémico agudo.

## Bibliografía

- Gehrs BC, Friedberg RC. Autoimmune hemolytic anemia. *Am J Hematol.* 2002; 69: 258-71.
- Petz LD. Diagnostic complexities in autoimmune hemolytic anemias. *Transfusion.* 2009; 49: 202-3.
- Sokol RJ, Booker DJ, Stamps R. Investigation of patients with autoimmune haemolytic anaemia and provision of blood for transfusion. *J Clin Pathol.* 1995; 48: 602-10.
- Packman CH. Hemolytic anemia due to warm autoantibodies. *Blood Rev.* 2008; 22: 17-31.
- Arndt PA, Leger RM, Garratty G. Serologic findings in autoimmune hemolytic anemia associated with immunoglobulin M warm autoantibodies. *Transfusion.* 2009; 49: 235-42.
- Vaglio S, Arista MC, Perrone MP, Tomei G, Testi AM, Coluzzi S, Girelli G. Autoimmune hemolytic anemia in childhood: serologic features in 100 cases. *Transfusion.* 2007; 47: 50-4.
- Sachs UJ, Róder L, Santoso S, Bein G. Does a negative direct antiglobulin test exclude warm autoimmune haemolytic anaemia? A prospective study of 504 cases. *Br J Haematol.* 2006; 132: 655-61.
- Garratty G. Immune hemolytic anemia associated with negative routine serology. *Semin Hematol.* 2005; 42: 156-64.
- Ahrens N, Pruss A, Kähne A, Kiesewetter H, Salama A. Coexistence of autoantibodies and alloantibodies to red blood cells due to blood transfusion. *Transfusion.* 2007; 47: 813-6.
- Backall D. Contemporaneous autoantibodies and alloantibodies. *Transfusion.* 2007; 47: 1332.
- Young PP, Uzieblo A, Trulock E, Lublin DM, Goodnough LT. Autoantibody formation after alloimmunization: are blood transfusions a risk factor for autoimmune hemolytic anemia? *Transfusion.* 2004; 44: 67-72.
- International Forum. The detection of alloantibodies against red cells in patients with warm-type autoimmune haemolytic anaemia. *Vox Sang.* 2000; 78: 200-7.
- Lee E, Redman M, Burgess G, Win N. Do patients with autoantibodies or clinically insignificant alloantibodies require an indirect antiglobulin test crossmatch? *Transfusion.* 2007; 47: 1290-5.
- Laine EP, Leger RM, Arndt P, Calhoun L, Garratty G, Petz LD. In vitro studies of the impact of transfusion on the detection of alloantibodies after autoadsorption. *Transfusion.* 2000; 40: 1384-7.
- Ness PM. How do I encourage clinicians to transfuse mismatched blood to patients with autoimmune hemolytic anemia in urgent situations? *Transfusion.* 2006; 46: 1859-62.
- Petz LD. A physician's guide to transfusion in autoimmune haemolytic anaemia. *Br J Haematol.* 2004; 124: 712-6.
- Petz LD, Garratty G. Blood transfusion in autoimmune hemolytic anemias. En: *Immune hemolytic anemias (2.ª ed.)*. Nueva York: Churchill Livingstone; 2004. p. 375-400.
- Petz LD. "Least incompatible" units for transfusion in autoimmune hemolytic anemia: should we eliminate this meaningless term? A commentary for clinicians and transfusion medicine professionals. *Transfusion.* 2003; 43: 1503-7.
- Shirey RS, Boyd JS, Parwani AV, Tanz WS, Ness PM, King KE. Prophylactic antigen-matched donor blood for patients with warm autoantibodies: an algorithm for transfusion management. *Transfusion.* 2002; 42: 1435-41.
- Garratty G, Petz LD. Approaches to selecting blood for transfusion to patients with autoimmune hemolytic anemia. *Transfusion.* 2002; 42: 1390-2.
- International Forum. Red cell transfusions and blood groups. *Vox Sang.* 2004; 87: 210-22.
- Mullon J, Giacoppe G, Clagett C, McCune D, Dillard T. Transfusion of polymerized bovine hemoglobin in a patient with severe autoimmune hemolytic anemia. *N Engl J Med.* 2000; 342: 1638-43.

## USO ÓPTIMO DE LA TRANSFUSIÓN DE PLAQUETAS

M. LOZANO MOLERO<sup>1</sup>, J. CID VIDAL<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Hemoterapia y Hemostasia.  
Hospital Clínic. Barcelona

<sup>2</sup>Servicio de Hematología.  
Hospital Universitario Joan XXIII. Tarragona

### Introducción

La introducción de los concentrados de plaquetas (CP) en terapéutica hace ahora 50 años supuso un enorme avance de la Medicina. Entre otras cosas permitió el desarrollo de regímenes de quimioterapia intensiva para el tratamiento de las hemopatías malignas y otras neoplasias, debido a que hasta entonces las complicaciones hemorrágicas habían limitado la intensidad de los tratamientos y su eficacia.

Se han realizado considerables avances en la transfusión de plaquetas en los últimos años: se han desarrollado nuevos métodos de preparación y se han añadido nuevas etapas en el proceso de producción que hacen que el producto actualmente disponible sea, probablemente, el más puro y el más seguro de los que hayamos dispuesto nunca. Sin embargo, hay aún muchos aspectos de uso de los CP que aún son objeto de debate, y desgraciadamente la falta de datos objetivos dificulta una práctica transfusional basada en la evidencia<sup>1</sup>. No obstante, se espera que los resultados de estudios en vías de realización o recientemente finalizados sobre aspectos básicos de la transfusión de plaquetas nos proporcionen nuevas evidencias en donde fundamentar nuestra práctica diaria. Este trabajo pretende resumir la evidencia disponible sobre dos aspectos importantes de la transfusión de plaquetas, la transfusión profiláctica y la dosis de plaquetas a administrar en cada transfusión.

### Transfusión de plaquetas profiláctica versus terapéutica

Las transfusiones de plaquetas se deberían administrar a todos aquellos pacientes con hemorragia significativa y trombocitopenia profunda. Sin embargo, es la estrategia profiláctica, en la que se indica la transfusión cuando el recuento plaquetario en el receptor cae por debajo de un cierto umbral para prevenir la aparición de hemorragias, la que más frecuentemente se sigue. Así, más de un 70% de las transfusiones de plaquetas que se administran se hacen con esa indicación<sup>2</sup>.

No obstante, la indicación de la transfusión profiláctica de plaquetas se basa en un número limitado de estudios ya antiguos. En 1966, Han *et al.* publicaron que el 63% de muertes por hemorragias obser-

vado en pacientes leucémicos el año anterior a la implantación de la transfusión profiláctica de plaquetas en su centro, cayó al 15% en el año siguiente de su implantación<sup>3</sup>. Una reducción similar se observó en un pequeño ensayo clínico, aleatorizado, doble ciego realizado por Higby *et al.* en 21 pacientes con leucemia aguda<sup>4</sup>.

En 1982, Murphy *et al.* publicaron un ensayo clínico aleatorizado prospectivo donde se comparaban políticas transfusionales profilácticas y terapéuticas en 56 pacientes pediátricos con leucemia. Aunque la supervivencia de los pacientes no fue significativamente diferente en los dos grupos, la política profiláctica se asoció con una significativa reducción en el número de días con hemorragia<sup>5</sup>.

Más recientemente, Wandt *et al.* publicaron su experiencia con una política terapéutica en 106 pacientes sometidos a un trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos<sup>6</sup>. Sólo se indicó la transfusión cuando una hemorragia clínicamente relevante (grado II o mayor según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud [OMS], esto es, epistaxis de más de una hora de duración, equimosis de más de 2,5 cm de diámetro, melena o hematoquecia, o hemorragias que requieran transfusión de concentrados de hemáties dentro de las 24 horas de su inicio). En pacientes clínicamente inestables (fiebre de más de 38,5 °C o sospecha de aspergilosis invasiva, sepsis o alteraciones de la coagulación plasmática clínicamente relevantes), se administró una transfusión de plaquetas profiláctica si el recuento plaquetario era inferior a  $10 \times 10^9/L$ . Respecto a controles históricos, dicha política dio lugar a una reducción del 50% del consumo de CP y un tercio de los trasplantes se realizaron sin transfundir plaquetas. No se observó ningún tipo de hemorragia grave. Se administraron 154 transfusiones de plaquetas profilácticas y 81 terapéuticas. La principal indicación para la transfusión profiláctica fue la fiebre de origen desconocido en un 46% y sepsis con o sin mucositis en el 20%.

En estos momentos hay en marcha en el Reino Unido un ensayo clínico controlado aleatorizado, el estudio TOPPS (*Transfusion of Prophylactic Platelets*), en que se comparan una política de transfusión de plaquetas profiláctica y otra terapéutica. El estudio intenta establecer si una política de no transfusión profiláctica de plaquetas es tan clínicamente efectiva y segura como una política de transfusión profiláctica utilizando un umbral transfusional de  $10 \times 10^9/L$ . La variable principal de estudio es el porcentaje de pacientes que presentan un sangrado significativo (grado 2 de la OMS o mayor) en los 30 días siguientes a la aleatorización. Variables secundarias que se estudiarán igualmente son el tiempo hasta el primer sangrado así como el análisis descriptivo de todos los sangrados significativos (Dr. Simón Stanworth, comunicación personal).

En tanto no se disponga de los resultados de los estudios actualmente en marcha, la política de transfusión profiláctica de plaquetas es actualmente la política estándar seguida por la inmensa mayoría de los centros y es la que recomiendan la mayoría de las guías clínicas publicadas<sup>7-9</sup>.

## Dosis de plaquetas a administrar

La cuestión de cuál es la dosis óptima de plaquetas a transfundir en una transfusión profiláctica de plaquetas permanece sin estar totalmente resuelta. Se han propuesto tres diferentes estrategias: administrar dosis bajas (por debajo de  $2 \times 10^{11}$ ), una dosis estándar (alrededor de  $3,5 \times 10^{11}$ ) o una dosis alta (por encima de  $4,5 \times 10^{11}$ ).

La idea detrás de una dosis baja de plaquetas se basa en datos que sugieren que sólo  $7,1 \times 10^9/L/día$  de plaquetas sería suficiente para mantener el endotelio vascular y prevenir hemorragias<sup>10</sup>. Así, los que defienden una dosis baja de plaquetas arguyen una disminución en los costes, un mayor número de unidades de reserva disponibles y una mayor seguridad. El aumento de la seguridad asociado al uso de dosis bajas de plaquetas vendría dado por una reducción en la exposición a donantes, una menor posibilidad de inmunomodulación y el potencial acortamiento del periodo de trombocitopenia al limitar el número de plaquetas disponibles en la circulación del paciente para absorber la trombopoyetina. Por el contrario, se defiende una dosis alta de plaquetas en base a un mayor número de recuentos plaquetarios postransfusionales que podría disminuir el riesgo de morbilidad y mortalidad por hemorragia, y porque hay datos que sugieren que una dosis elevada de plaquetas podría dar lugar a un intervalo entre transfusiones más largo y quizá disminuyendo el número de transfusiones de plaquetas a administrar.

Un metanálisis reanalizó los resultados de los estudios aleatorizados o cuasialeatorizados publicados hasta 2006 que habían investigado esta cuestión. Desgraciadamente, notables diferencias en el diseño y en la realización de estos estudios imposibilitaron que se pudiera extraer una clara conclusión de ellos<sup>11</sup>.

Con el ánimo de resolver esta cuestión, se han realizado dos estudios clínicos aleatorizados que han investigado la cuestión de la dosis de plaquetas a transfundir.

- Uno fue realizado por el grupo de trabajo colaborativo BEST: se trata de un ensayo de no inferioridad aleatorizado controlado que comparó dosis bajas de plaquetas ( $1,5-2,0 \times 10^{11}$ ) con dosis estándar ( $3,0-6,0 \times 10^{11}$ ). Este estudio fue detenido por el Comité de Seguimiento de Seguridad debido a la aparición de tres

episodios de sangrado graves en el grupo que había estado recibiendo dosis bajas de plaquetas<sup>12</sup>.

• El otro lo ha realizado la Red de Estudios Clínicos de Medicina Transfusional y Hemostasis de los NIH de Estados Unidos. Este estudio multicéntrico incluyó tanto a adultos como a niños con periodos prolongados de trombocitopenia y que fueron aleatorizados a recibir una dosis baja ( $1,1 \times 10^{11}/m^2$ ), una dosis estándar ( $2,2 \times 10^{11}/m^2$ ) o bien una dosis alta  $4,4 \times 10^{11}/m^2$ . En todos ellos el umbral transfusional fue un recuento matinal de plaquetas inferior a  $10 \times 10^9/L$ .

El objetivo principal del estudio es el porcentaje de pacientes en cada grupo de tratamiento con un sangrado mayor o igual al grado 2 de la OMS. El reclutamiento de los 1.350 pacientes se completó hace aproximadamente un año y los resultados se han difundido sólo como resumen en congresos. Se espera una pronta publicación de los resultados.

## Conclusiones

A pesar del tiempo transcurrido desde la introducción en terapéutica, aún existen diversos aspectos asociados al uso clínico de la transfusión de plaquetas que están pendientes de una definición clara. La falta de datos objetivos ha limitado el desarrollo de recomendaciones basadas en evidencias. Recientes estudios aleatorizados han proporcionado inestimable información y se espera que los resultados de otros actualmente en marcha nos permitan enriquecer nuestra práctica basada en evidencias; porque, ante la falta de evidencias, tenemos que conformarnos con las conferencias de consenso y las opiniones de expertos. Pero tenemos que ser muy cautos, dado que los consensos no cuentan con unos precedentes extraordinarios en la historia de la ciencia. En el siglo XVIII el consenso era que el Sol giraba alrededor de la Tierra.

## Bibliografía

1. Lozano M, Cid J. Consensus and controversies in platelet transfusion: trigger for indication, and platelet dose. *Transfus Clin Biol.* 2007; 14: 504-8.
2. Pisciotto PT, Benson K, Hume H, Glassman AB, Oberman H, Popovsky M et al. Prophylactic versus therapeutic platelet transfusion practices in hematology and/or oncology patients. *Transfusion.* 1995; 35: 498-502.
3. Han T, Stutzman L, Cohen E, Kim U. Effect of platelet transfusion on hemorrhage in patients with acute leukemia. An autopsy study. *Cancer.* 1966; 19: 1937-42.
4. Higby DJ, Cohen E, Holland JF, Sinks L. The prophylactic treatment of thrombocytopenic leukemic patients with platelets: a double blind study. *Transfusion.* 1974; 14: 440-6.
5. Murphy S, Litwin S, Herring LM, Koch P, Remischovsky J, Donaldson MH, et al. Indications for platelet transfusion in children with acute leukemia. *Am J Hematol.* 1982; 12: 347-56.

6. Wandt H, Schaefer-Eckart K, Frank M, Birkmann J, Wilhelm M. 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.
7. Development Task Force of the College of American Pathologists. Practice parameter for the use of fresh-frozen plasma, cryoprecipitate, and platelets. *JAMA.* 1994; 271: 777-81.
8. 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: 1519-38.
9. British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the use of platelet transfusions. *Br J Haematol.* 2003; 122: 10-23.
10. Hanson SR, Slichter SJ. Platelet kinetics in patients with bone marrow hypoplasia: evidence for a fixed platelet requirement. *Blood.* 1985; 66: 1105-9.
11. Cid J, Lozano M. Lower or higher doses for prophylactic platelet transfusions: results of a metaanalysis of randomized controlled trials. *Transfusion.* 2007; 47: 464-70.
12. Heddle NM, Cook RJ, Tinmouth A, Kouroukis CT, Hervig T, Klapper E, et al. A randomized controlled trial comparing standard- and low-dose strategies for transfusion of platelets (SToP) to patients with thrombocytopenia. *Blood.* 2009; 113: 1564-73.

## TRAZABILIDAD Y SEGURIDAD DE LA TRANSFUSIÓN EN EL HOSPITAL

N. CARPIO, F. MOSCARDÓ,  
F. ARRIAGA, M.A. SANZ

*Servicio de Hematología y Hemoterapia; Servicio de Transfusión. Hospital Universitario la Fe. Valencia*

## Introducción

Desde la creación de los bancos de sangre en la década de los años sesenta hasta el reciente decreto del Ministerio de Sanidad<sup>1</sup>, en el que se definen las competencias de los Centros y Servicios de Transfusión, la Medicina Transfusional en nuestro país ha seguido una trayectoria diferente a la de otros países de nuestro entorno.

En la década de los sesenta, la creación de grandes hospitales, con una orientación eminentemente quirúrgica, propició el desarrollo de bancos de sangre hospitalarios con un objetivo enfocado al autoabastecimiento. La necesidad de atender la demanda quirúrgica propició el fomento de la donación intrahospitalaria y la obtención de componentes para sus propias necesidades.

En estos años la seguridad transfusional se basaba en dos pilares: la prevención de la transmisión de enfermedades infecciosas por el donante y la realización de pruebas de compatibilidad para evitar la hemólisis. Para la prevención de la hepatitis postransfusional se utilizaban las pruebas serológicas disponibles y cri-



terios de exclusión basados en determinaciones analíticas de eficacia no contrastada. Para la prevención de la hemólisis se desarrolló una gran cantidad de técnicas serológicas enfocadas a la detección sistemática e identificación de anticuerpos, cada vez más complejas, que permitía identificar muchos anticuerpos, algunos sin trascendencia clínica. Pero el desarrollo de la Ley General de Sanidad y la aparición del sida en los años ochenta fueron factores que propiciaron un cambio en la estrategia sobre la seguridad transfusional. Por una parte, se potenció la creación de los centros de transfusión, en los que la unificación de las competencias en la promoción de la donación y en la obtención de componentes, junto con el gran desarrollo de la tecnología implicada en la detección precoz de patógenos en los donantes, propició un alto nivel de seguridad. Por otra parte, esta creación permitió que los servicios de transfusión en el hospital desarrollaran aspectos de la medicina transfusional más específicamente dedicados al cuidado de los pacientes. En este sentido, la creación de los registros de hemovigilancia en la década de los noventa ha permitido constatar que en estos momentos la seguridad transfusional va ligada principalmente no a la transmisión de agentes infecciosos sino a los problemas inmunológicos y no inmunológicos de la transfusión en el ámbito hospitalario.

Los problemas inmunológicos más relevantes se encuentran relacionados con la patología pulmonar aguda asociada a transfusión y la hemólisis originada por los errores de administración de componentes. La sepsis provocada por la transfusión de componentes sanguíneos contaminados se revela como el problema no inmunológico más relevante asociado a transfusión.

En estos momentos, la seguridad transfusional en el hospital pasa, pues, por la detección precoz de los efectos adversos de la misma y una revisión en profundidad de los procedimientos implicados en la transfusión, especialmente en aquellos en los que interviene el ser humano.

---

## Seguridad transfusional en el ámbito hospitalario

### Contaminación bacteriana

La contaminación bacteriana de los componentes sanguíneos, especialmente de las plaquetas, sigue provocando en los pacientes altas tasas de morbilidad y mortalidad. El riesgo de contaminación bacteriana de las plaquetas se ha estimado que es 50-250 veces más alto que el riesgo combinado de HIV, VHB, HCV y HTLV-1/2<sup>2</sup>; esto, unido a que la sepsis asociada a transfusión no está bien reconocida, hace que la prevalencia clínica se halle probablemente infravalorada.

Diversos mecanismos están implicados en esta contaminación; el más importante es posiblemente la contaminación de la flora de la piel en el momento de la donación, y por ello los patógenos más frecuentemente implicados son gérmenes grampositivos, aunque ya Wagner *et al.* en 2004 describieron cómo las bacterias gramnegativas, a pesar de su menor frecuencia, presentan tasas más altas de mortalidad<sup>3</sup>. Otra de las fuentes posibles de la contaminación bacteriana es la bacteriemia transitoria en el donante en el momento de la donación; a pesar de que este mecanismo parece infrecuente, hay autores que describen un porcentaje de hasta el 34,8% en el origen de complicaciones sépticas<sup>4</sup>.

Los métodos tradicionales de detección de la contaminación bacteriana (medida del pH, nivel de glucosa o tinción de Gram) han mostrado poca sensibilidad para este objetivo, por lo que se han desarrollado otros métodos como el BacT/ALERT (BioMérieux) y el eBDS (Pall). El primero está basado en la detección de CO<sub>2</sub> producido al proliferar los microorganismos y el segundo se basa en la medida del consumo de O<sub>2</sub> cuando existen bacterias en el medio. También se ha empleado la tecnología molecular para la detección de RNA de los ribosomas de una gran variedad de bacterias pero la principal problemática asociada a este método radica en la dificultad de estandarizar esta técnica en la rutina diaria. Finalmente se han desarrollado técnicas de inactivación de patógenos que permitirían inactivar los virus y bacterias presentes en los concentrados de plaquetas. Se han descrito dos métodos: el INTERCET (Cerus Corporation), que utiliza amotosaleno como psoraleno para impedir la replicación de los virus, y el sistema MIRASOL (Navigant Biotechnologies), que usa la riboflavina para este mismo propósito.

A pesar de todos estos avances, en la medicina transfusional la contaminación bacteriana constituye todavía un problema importante y posiblemente poco diagnosticado debido a la asociación frecuente de pacientes en tratamiento antibiótico que reciben simultáneamente plaquetas por su patología de base.

### Lesión pulmonar aguda asociada a transfusión (LPA-AT/TRALI)

La sobrecarga pulmonar de causa transfusional es una complicación poco frecuente y de reciente descripción. Hasta 1985 sólo se habían descrito 35 casos, pero a partir de entonces los casos de TRALI descritos en la literatura se han incrementado notablemente. Clínicamente se caracteriza por la aparición brusca de un cuadro agudo de insuficiencia respiratoria desarrollada dentro de las seis horas siguientes a la transfusión. Se acompaña de taquipnea, a veces con hipotensión, hi-

poxemia aguda con disminución de la  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  por debajo de 300 mmHg. Y radiológicamente aparecen infiltrados pulmonares compatibles con edema pulmonar indistinguibles de otras causas de edema agudo de pulmón. El tratamiento incluye en numerosas ocasiones un soporte respiratorio agresivo con oxigenoterapia y ventilación asistida y, como en otros casos de edema de pulmón y distrés respiratorio agudo, administración de corticoides y diuréticos.

La mortalidad varía desde el 5% hasta el 25%<sup>5</sup> y el diagnóstico diferencial hay que hacerlo con otras causas de sobrecarga pulmonar como son la insuficiencia cardiaca, reacción anafiláctica con distrés respiratorio y el causado por contaminación bacteriana de un producto transfundido.

Los componentes implicados con mayor frecuencia son los que contienen plasma, en primer lugar las plaquetas, seguido del plasma fresco y hematíes<sup>6</sup>; también se han descrito casos de LPA-AT debidos a la infusión de inmunoglobulinas<sup>7</sup>, pero el mecanismo fisiopatológico por el que se produce esta lesión pulmonar aún no está totalmente aclarado. Se habla de un doble mecanismo:

1. Por un lado, el paso de anticuerpos del donante frente a antígenos en la superficie de los leucocitos del receptor originarían un complejo antígeno-anticuerpos que provocaría la lesión pulmonar; es el mecanismo inmunológico<sup>8,9</sup>.

2. Otra hipótesis no inmunológica habla de situaciones especiales del paciente, como la sepsis o un traumatismo, que producirían una activación del endotelio pulmonar y un secuestro de neutrófilos con la consiguiente liberación de citocinas<sup>10</sup>.

Un mejor reconocimiento de este cuadro y los protocolos transfusionales cada vez más agresivos han hecho que, en los últimos años, sean una causa frecuente de mortalidad relacionada con la transfusión en los Estados Unidos<sup>11</sup>.

### **Hemólisis asociada a transfusión**

Tradicionalmente la hemólisis ha sido uno de los efectos adversos que más han preocupado a los profesionales de la transfusión. Para su prevención se ha desarrollado a lo largo de los años un sinnúmero de métodos de aglutinación, soluciones potenciadoras y fases térmicas con el fin de identificar y prevenir la incompatibilidad entre donante y receptor. Pero, veinte años después –en que ya disponemos de medios de aglutinación muy sensibles, se ha informatizado la gestión transfusional, se han automatizado las determinaciones y se ha reducido el impacto del error humano en el área del laboratorio–, la tasa de hemólisis asociada a errores humanos en la administración de componentes apenas ha cambiado.

El error humano, fuera del área de laboratorio, se origina en varios momentos clave del proceso transfusional como la prescripción del componente, la extracción de muestras de sangre para pruebas de compatibilidad, la búsqueda de registros anteriores y transfusión a pie de cama.

### **Prescripción de componentes sanguíneos**

Al analizar conjuntamente los errores que hemos detectado antes y después de la transfusión en nuestro centro, llama la atención que el 25% de los casos corresponden a errores de prescripción<sup>12</sup>. En este sentido, aunque el resto de los procedimientos se realicen correctamente, si no hay una discrepancia con el grupo histórico o no se valora el tipo de componente solicitado con el dato de laboratorio que avala la solicitud, se produce la administración errónea. Breannan *et al.* estudiaron una de las razones que llevaron al error de prescripción en la Clínica Mayo, de Estados Unidos, y observaron que, al retirar la obligación de doble identificación del paciente (tarjeta impresa adhesiva y registros escritos a mano), aumentaba el número de errores de prescripción, volviendo a los niveles anteriores cuando se reinstauraba la sistemática anterior<sup>13</sup>. Es de prever que el uso generalizado de las etiquetas adhesivas de identificación van a incidir en un aumento de los errores en esta fase de la transfusión. En este sentido, la implantación de la prescripción electrónica podría ser la solución al problema de la identificación de volantes.

### **Extracción de muestras de sangre para pruebas de compatibilidad**

Desde el punto de vista de la seguridad de los pacientes, la extracción correcta de la muestra de sangre para las pruebas de compatibilidad es un paso primordial para garantizar la seguridad transfusional. Los errores en esta fase pueden iniciar una cadena de eventos difíciles de detectar si el paciente no tiene registros anteriores en el banco de sangre, y que pueden terminar en la administración de sangre ABO incompatible. Dos son los errores más frecuentes detectados en esta fase: muestras correctamente etiquetadas que contienen la sangre de otro paciente y muestras etiquetadas de forma incorrecta.

Estudios previos han reportado hasta un 14% de errores en la extracción de muestras como causa de la administración de sangre ABO incompatible (Linden *et al.*<sup>14</sup>). Pero, a pesar de la trascendencia de los errores, pocos estudios han mostrado la frecuencia de los mismos. Para determinar la verdadera incidencia de este problema, la BEST Working Party de la Sociedad

Internacional de Transfusión realizó un estudio prospectivo multicéntrico en el que se analizaba los errores en la fase de extracción de muestras (Dzik *et al.*<sup>15</sup>). Este estudio recogió información de la extracción de aproximadamente 700.000 muestras en 10 países y concluyó que la frecuencia de muestras inaceptables para transfusión oscilaba entre 1 de cada 3 hasta 1 de cada 60.000.

Este amplio margen sugiere un bajo grado en la estandarización del protocolo de extracción de muestras. En este sentido es importante señalar cómo políticas estrictas en el etiquetado de los tubos que se van a utilizar para la extracción de muestras redundan en una disminución de los errores, tal y como demostraron Lamadue *et al.*<sup>16</sup>. Más recientemente, en un trabajo de nuestro grupo se refleja cómo el uso de pulseiras identificativas antes de la extracción de muestras, acompañado de una política estricta de recepción de éstas, permite que la tasa de errores en esta fase sea notablemente inferior a la que se produce en muestras de otras áreas, no implicadas en transfusión.

### *Búsqueda de registros anteriores*

Otra de las causas que pueden terminar en una administración incorrecta son los errores en los registros históricos. Nosotros hemos detectado pacientes con datos de filiación similares, salvo la fecha de nacimiento, lo que ocasionalmente se tradujo en un error transfusional. En este sentido se han publicado, al menos, dos trabajos donde la causa de la transfusión errónea se debió a la usurpación de identidad de un paciente por otro<sup>17,18</sup>. Este factor habrá que tenerlo muy en cuenta porque va asociado directamente a la inmigración y sólo podemos detectarlo cuando el grupo de la muestra actual no coincide con la histórica.

### *Administración de sangre en la cabecera del paciente*

Tradicionalmente, la identidad del paciente en el momento de la transfusión se realizaba comprobando, además de los datos de filiación, el grupo ABD en la cabecera del paciente. Este procedimiento, debido a la disparidad de personal que puede realizarlo, es complejo de estandarizar, y su cumplimiento, difícil de verificar. La escasa especificidad que presenta la realización de ABD en el momento de la transfusión ha sido analizada ya por varios autores. Migeot, en Francia, compara el entrenamiento del personal y dos dispositivos manuales de comprobación de ABD, y concluye que el factor predictivo más importante en la correcta identificación es la experiencia del personal en transfusión<sup>18</sup>. En esta misma línea, otros autores concluyen

que este tipo de pruebas no garantiza suficientemente la seguridad transfusional.

Parece, por tanto, que la identificación del paciente en la extracción de muestras para pruebas de compatibilidad y en el momento de la transfusión es clave en el proceso de seguridad transfusional. En principio cualquier sistema es adecuado, pero el incumplimiento de los procedimientos por errores humanos nos muestra que la estrategia de identificación de pacientes debe basarse en dos principios: los procedimientos de calidad y la tecnología apropiada que ayude a disminuir el error humano.

La implementación de un adecuado sistema de calidad que incluya la validación de los procedimientos de trabajo, la monitorización de su eficacia, un plan de formación continuada y una delimitación clara de las responsabilidades de todo el personal implicado en la transfusión son elementos imprescindibles para asegurar la calidad del proceso transfusional. Pero actualmente la tecnología ha permitido desarrollar dispositivos electrónicos que permiten la identificación de pacientes, de muestras y de componentes; en este sentido, en una reciente revisión de la utilización de estos dispositivos realizada por Pagliaro *et al.* se señala la necesidad de integrar estos dispositivos en los servicios de transfusión del hospital y se apunta cómo muchos de ellos tienen una relación coste/eficacia adecuada, para concluir en la necesidad de implementar estos dispositivos, a pesar de que el montante económico viene siendo la razón de su escasa implantación.

---

## **Conclusión**

- Los efectos adversos graves relacionados con la transfusión están hoy relacionados con los efectos inmunológicos y no inmunológicos que la transfusión provoca en los pacientes. Entre ellos destacan por su frecuencia y gravedad la contaminación bacteriana de los componentes y la patología aguda pulmonar relacionada con la transfusión.
- En el hospital poco podemos hacer para la prevención de tales efectos. La inactivación de componentes podría redundar en el control de la contaminación, y la puesta en práctica de políticas encaminadas a la selección del plasma para transfusión podría incidir en una disminución de los problemas pulmonares.
- Finalmente, el otro gran problema en la seguridad transfusional es la hemólisis relacionada con la transfusión, generalmente por errores en la administración de componentes. En este sentido, los protocolos de identificación de pacientes, muestras y componentes son la base para mejorar estos resultados y el camino por el que va a mejorar la seguridad transfusional en los próximos años.

## Bibliografía

1. Real Decreto 1343/2007, de 11 de octubre, por el que se establecen normas y especificaciones relativas al sistema de calidad de los centros y servicios de transfusión. Madrid: BOE. p. 44626-31.
2. Védy D, Robert D, Gasparini D, Canellini G, Waldvogel S, Tissot JD. Bacterial contamination of platelet concentrates: pathogen detection and inactivation methods. *Hematology Reviews*. 2009; 1 (e5): 22-8.
3. Wagner SJ. Transfusion transmitted bacterial infection: risks, sources and interventions. *Vox Sang*. 2004; 86: 157-63.
4. Ness P, Braine H, King K, et al. Single donor platelets reduce the risk of septic platelet transfusion reactions. *Transfusion*. 2001; 41: 857-61.
5. Silliman CC, Paterson AJ, Dickey WO, et al. The association of biologically active lipids with the development of transfusion-related acute lung injury: a retrospective study. *Transfusion*. 1997; 37: 719-25.
6. Silliman CC. Transfusion-related acute lung injury. *Transfus Med Rev*. 1999; 13: 177-86.
7. Ritz A, Gorson KC, Kenney L, et al. Transfusion-related acute lung injury after the infusion of IVIG. *Transfusion*. 2001; 41: 264-8.
8. Popovsky MA, Moore SB. Diagnostic and pathogenetic considerations in transfusion-related acute lung injury. *Transfusion*. 1985; 25: 573-7.
9. Kopko P, Popovsky MA, MacKenzie M, et al. HLA class II antibodies in transfusion-related acute lung injury. *Transfusion*. 2001; 41: 1244-8.
10. Silliman CC, Paterson AJ, Dickey WO, et al. The association of biologically active lipids with the development of transfusion-related acute lung injury: a retrospective study. *Transfusion*. 1997; 37: 719-25.
11. Holness L, Knippen MA, Simmons L, et al. Fatalities caused by TRALI. *Transfus Med Rev*. 2004; 18: 184-8.
12. Carpio N, Moscardó F, Vaquero I, Arriaga F, Sanz J, Sanz MA. Analysis of transfusion errors and near-miss events in a blood bank service: results of the Hemovigilance Program. XXXth International Congress of the ISBT. Macao (China), June 7-12 2008. Comunicación oral. Resumen número 573, code 2C-S06-04.
13. Breannan S, Foss ML. Ordering blood for the wrong patient. Getting inside the minds of ordering physicians. *Mayo Clin Proc*. 2003; 78: 1337-9.
14. Linden JV, Wagner K, Voytovich AE, Sheehan J. Transfusion errors in New York State: an analysis of 10 years' experience. *Transfusion*. 2000; 40: 1207-13.
15. Dzik WH, Murphy ME, Andreu G, et al. An international study of the performance of sample collection from patients. *Vox Sanguinis*. 2003; 85: 40-7.
16. Lamadue JA, Boyd JS, Ness PM. Adherence to a strict specimen-labelling policy decreases the incidence of erroneous blood grouping of blood bank specimens. *Transfusion*. 1997; 37: 1169-72.
17. Chiaroni J, Legrand D, Dettori I, et al. Analysis of ABO discrepancies occurring in 35 French hospitals. *Transfusion*. 2004; 44: 860-4.
18. Zimmermann R, Zingsem J, Weisbach V, et al. ABO discrepancy by usurpation of identity. *Transfusion*. 2005; 45: 454-5.
19. Migeot V, Ingrand I, Salmi LR, et al. Reliability of bedside ABO testing before transfusion. *Transfusion*. 2002; 42: 1348-55.
20. Pagliaro P, Rebullà P. Transfusion recipient identification. *Vox Sanguinis* 2006; 91: 97-101.



## **Aplicaciones terapéuticas de los nuevos anticoagulantes orales**

COORDINADORES: R. LECUMBERRI. *Pamplona*  
J. MATEO. *Barcelona*

## NUEVOS ANTICOAGULANTES ORALES

J. FONTCUBERTA

*Unitat d'Hemostàsia i Trombosi. Servei d'Hematologia. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona*

### Introducción

Los nuevos anticoagulantes desarrollados pueden tener como dianas terapéuticas distintos estadios de la cascada de la coagulación.

Se han desarrollado fármacos que inhiben la iniciación de la coagulación; su diana terapéutica es inhibir el complejo factor-tisular factor VII y entre ellos fármacos cabe destacar el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) recombinante y el factor VII recombinante activado con su centro activo bloqueado (FVII ai).

Otros anticoagulantes desarrollados inhiben la propagación de la coagulación; estos fármacos son capaces de inhibir el factor IXa, el factor Xa (FXa) o sus respectivos cofactores, el factor VIIIa y el factor Va.

Los inhibidores del FXa pueden ser directos o indirectos: los indirectos deben unirse a la antitrombina (AT) y catalizar la reacción de inhibición entre la AT y el factor Xa (fondaparinux, idraparinux, etc.); los directos del FXa se unen directamente a su centro activo (rivaroxaban, apixaban, etc.). Los inhibidores indirectos del FXa tienen poca capacidad para inhibir al FXa unido a la fibrina y al ligado al complejo protrombinasa.

Finalmente hay otro grupo de nuevos anticoagulantes que tienen como diana terapéutica la trombina y por tanto atenúan la generación de fibrina (ximelagatran, dabigatrán etexilato, etc.).

La trombina puede inhibirse de forma indirecta y de forma directa. Los inhibidores indirectos de la trombina actúan catalizando la reacción de inhibición entre el cofactor II de la heparina y la trombina. Sin embargo, los inhibidores directos de la trombina se unen directamente a la trombina y bloquean sus interacciones con los sustratos específicos<sup>1</sup>.

Los inhibidores indirectos de la trombina no tienen capacidad para inhibir la trombina unida a la fibrina; sin embargo, los inhibidores directos de la trombina bloquean la trombina libre y la trombina unida a la fibrina (Figura 1).

### Inhibidores indirectos del factor Xa

#### Idraparinux

El idraparinux es un derivado del fondaparinux hipermetilado que se une con una gran afinidad a la AT y tiene una vida media en plasma de unas 80 horas, muy similar a la de la AT.

Bajo el punto de vista farmacocinético, su acción es lineal con baja variabilidad inter e intraindividual, no requiere monitorización y, debido a su larga vida media, puede administrarse por vía subcutánea una vez a la semana; su eliminación es por vía renal.

La biodisponibilidad por vía subcutánea es, prácticamente, del 100%.

Tanto el fondaparinux como el idraparinux no son neutralizados por el sulfato de protamina, que, como es sabido, es el antídoto de la heparina convencional. En caso de complicación hemorrágica grave con el uso de idraparinux, se ha recomendado la utilización de factor VII activado recombinante.

Debido a su larga vida media, este producto no se ha investigado en la prevención de la ETEV postoperatoria.

Los estudios de fase III con idraparinux se han realizado con la dosis de 2,5 mg/semana por vía subcutánea en pacientes con función renal normal; en pacientes con función renal alterada, aclaramiento de creatinina < 30 mL/min, la segunda dosis de idraparinux y las subsiguientes fueron de 1,5 mg/semana.

En el estudio de TVP (estudio Van Gough) de fase III se incluyeron 2.904 pacientes que fueron aleatorizados en dos grupos: el grupo idraparinux recibió una dosis de 2,5 mg/semana por vía subcutánea y el grupo de tratamiento estándar recibió enoxaparina, tinzaparina o heparina convencional por vía endovenosa seguida de warfarina o acenocumarol (INR 2-3).

La incidencia de recurrencias de ETV en el día 92 del estudio fue de 2,9% para el grupo de idraparinux y de un 3% en el grupo de tratamiento habitual. El tratamiento con idraparinux mostró una no inferioridad respecto

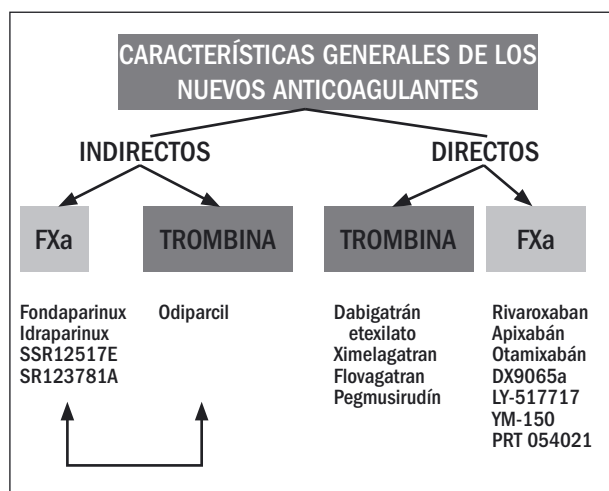


Figura 1. Características generales de los nuevos anticoagulantes.

al tratamiento habitual ( $p = 0,001$ ). En relación con las complicaciones hemorrágicas relevantes en el día 92 del estudio, el grupo de idraparinux presentó un 4,5% y el grupo de tratamiento habitual un 7% ( $p = 0,004$ ).

Después de 6 meses de tratamiento la incidencia de complicaciones hemorrágicas clínicamente relevantes fue de 8,3% en el grupo idraparinux y de un 8,1% en el grupo de tratamiento habitual.

Las complicaciones hemorrágicas mayores a los 3 meses de tratamiento fueron, en el grupo de idraparinux de un 0,8%, y en el grupo de tratamiento habitual, de un 1,2%; a los 6 meses de tratamiento fueron de un 1,9% y de un 1,5%, respectivamente.

No hubo diferencias en la mortalidad entre ambos grupos de tratamiento a los 3, 4 y 6 meses de los estudios.

En el estudio de EP se incluyeron 2.215 pacientes distribuidos en los grupos de tratamiento con pautas de tratamiento, criterios de eficacia y seguridad idénticos a los del estudio de TVP. Sin embargo, los resultados de eficacia fueron distintos: en el grupo de idraparinux, las recidivas de ETV fueron de un 3,4%, y en el grupo de tratamiento habitual, de un 1,6%. Las complicaciones hemorrágicas clínicamente relevantes, a los 3 meses de tratamiento, fueron de 5,8% en el grupo idraparinux y de un 8,2% en el grupo de tratamiento habitual<sup>4</sup>.

El idraparinux también se ha ensayado en la prevención de embolias cerebrales y periféricas en pacientes con fibrilación auricular mediante el estudio de fase III *Amadeus*<sup>2</sup>. Éste es un estudio aleatorizado, abierto y de no inferioridad frente al tratamiento convencional con antivitaminicos K.

En este estudio se incluyeron 4.596 pacientes con fibrilación auricular y al menos un factor de riesgo de embolismo cerebral o periférico. Estos pacientes se aleatorizaron en dos grupos: el grupo idraparinux recibió 2,5 mg/semana por vía subcutánea y el grupo de tratamiento convencional recibió antivitaminicos K para obtener un INR de 2,5<sup>2,3</sup>.

El criterio primario de eficacia fue el compuesto por: accidente vascular cerebral isquémico, hemorrágico o no definido y embolismo periférico sistémico sin afectación del sistema nervioso central.

El criterio principal de seguridad fue el sangrado mayor o el sangrado clínicamente relevante no considerado como mayor. El otro criterio de seguridad fue el de todas las causas de mortalidad.

El criterio primario de eficacia se presentó en un 0,9% en el grupo de idraparinux y en un 1,3% en el grupo de antivitaminicos K con una  $p = 0,007$  para el criterio de no inferioridad.

La incidencia de complicaciones hemorrágicas clínicamente relevantes fue significativamente mayor en el grupo de idraparinux que en el grupo de antivitaminicos K (19,7% vs. 11,3%  $p = 0,0001$ ). No se observaron diferencias en la mortalidad de ambos grupos de tratamiento<sup>2</sup>.

### **Idraparinux biotinados (SSR12517E)**

El idraparinux biotinado es estructuralmente similar al idraparinux sódico con la adición de un segmento de biotina y tiene, *in vivo*, sus mismas propiedades anticoagulantes y farmacológicas.

La biotina unida al idraparinux tiene una alta y específica afinidad por la avidina, una proteína que se encuentra en los huevos.

La avidina puede administrarse de forma intravenosa y rápidamente se une a la biotina del idraparinux, neutralizando la actividad anticoagulante de éste y eliminándolo por vía renal.

Al igual que el idraparinux sódico, el idraparinux biotinado se administra por vía subcutánea una vez a la semana.

Los estudios de idraparinux biotinado se han realizado en las mismas áreas que el idraparinux sódico.

### **SR123781A**

El SR123781A es un hexadecacárido sintético capaz de unirse a la AT y llevar a cabo simultáneamente una gran actividad anti-FXa y anti-FIIa. Este hexadecacárido está compuesto por el pentasacárido, capaz de unirse a la AT y llevar a cabo una importante actividad anti-FXa, y un tetrasacárido, altamente sulfatado y capaz de unirse a la AT y a la trombina; ambas estructuras están unidas a un heptasacárido central no sulfatado<sup>3</sup>.

El SR123781A tiene una alta afinidad por la AT por poseer el pentasacárido esencial para su unión y, como consecuencia de ello, cataliza la inhibición del FXa; el tetrasacárido altamente sulfatado tiene suficiente longitud de cadena como para poder unir la AT a la trombina, y por esta razón también es un potente inhibidor de la trombina. En síntesis, el SR123781A es un potente inhibidor del FXa y de la trombina activo por vía subcutánea muy parecido a la heparina convencional pero con algunas ventajas: no se une al factor plaquetario 4 (PF4) y por tanto es improbable que produzca trombocitopenias inducidas por heparina; por otro lado, tampoco se une a la fibrina, con lo cual este producto no facilita la formación del complejo ternario heparina-trombina-fibrina. Como es sabido, este complejo protege la inhibición de la trombina unida a la fibrina por el complejo heparina-AT. Así pues, al contrario que la heparina, el SR123781A es capaz de inhibir a la trombina unida a la fibrina<sup>3</sup>.

El SR123781A administrado por vía subcutánea tiene una biodisponibilidad próxima al 100% y produce una respuesta en dosis proporcional al tiempo parcial de tromboplastina activado y a los niveles de anti-FXa.

Este producto se elimina por vía renal sin producir metabolitos, su concentración máxima se alcanza a las 4 h y su vida media es de 11 a 16 h.

## Inhibidores directos del FXa activos por vía oral

### Rivaroxaban

El rivaroxaban químicamente es un derivado de la oxazolidinona y un inhibidor directo del FXa activo por vía oral. El rivaroxaban inhibe al FXa libre, al FXa unido a la fibrina y al FXa del complejo protrombinasa. En función de la dosis administrada prolonga el tiempo parcial de tromboplastina activada (TPTA) y el tiempo de protrombina (TP). La inhibición del FXa es muy selectiva ( $K_i = 0,4 \pm 0,02$ ) competitiva y reversible, su biodisponibilidad por vía oral es de un 80%, su concentración máxima se alcanza a las 3 h y su vida media varía de 4-9 h en un régimen de múltiples dosis a 7-17 h en un régimen de dosis única.

La eliminación del rivaroxaban se efectúa por un mecanismo dual: aproximadamente un 66% del fármaco se elimina directamente por el riñón sin sufrir cambios, y el resto, por vía intestinal con las heces (28%).

La eliminación intestinal del rivaroxaban puede estar influida por la glicoproteína P, una proteína transportadora. Así pues, los inhibidores potentes de la glicoproteína P pueden dar lugar a un incremento de los niveles de rivaroxaban.

El rivaroxaban es metabolizado en el hígado por citocromo P3A4, CYP 2J2 y por otros mecanismos independientes del citocromo P450.

En pacientes que tomen potentes inhibidores del citocromo 3A4 y de la glicoproteína P, debe tenerse precaución ya que la dosis de rivaroxaban puede verse incrementada.

La absorción intestinal de rivaroxaban no se halla afectada por cambios en el pH gástrico, por lo que los fármacos antiácidos o los inhibidores H2 no afectan a la absorción intestinal de rivaroxaban. Tampoco se han visto cambios en la absorción del rivaroxaban producidos por la ingesta de alimentos.

El rivaroxaban ha demostrado poca capacidad de interacción con fármacos habituales en pacientes mayores como: aspirina, antiinflamatorios de tipo naproxeno o digoxina. La administración conjunta de rivaroxaban y enoxaparina implica un moderado aumento de la actividad anti-FXa, aproximadamente un 43-48%. También el tiempo de protrombina (TP) se prolonga un 38% cuando se administran conjuntamente rivaroxaban y enoxaparina. Estas modificaciones se consideran de poca relevancia y sugieren que el rivaroxaban y la enoxaparina se pueden administrar conjuntamente durante la terapia puente.

Después de varios estudios de búsqueda de dosis en prótesis total de cadera y prótesis de rodilla, se consideró que la dosis de rivaroxaban de 10 mg al día era la que presentaba mejor perfil en cuanto a eficacia y seguridad respecto a la enoxaparina. Esta dosis fue la se-

leccionada para iniciar todos los estudios de fase III en la prevención de la ETV en cirugía ortopédica por prótesis de cadera o rodilla.

La eficacia y seguridad del rivaroxaban en profilaxis de ETV en cirugía ortopédica se ha demostrado en los estudios en fase III del programa *RECORD*. En estos estudios el rivaroxaban se ha comparado en dosis de 10 mg/día, con enoxaparina en dosis de 40 mg/día y en dosis de 30 mg dos veces al día (b.i.d.) tanto en cirugía de prótesis total de cadera como en cirugía por prótesis de rodilla.

El estudio *RECORD-1* es un estudio aleatorizado y doble ciego donde se incluyeron 4.541 pacientes sometidos a cirugía ortopédica por prótesis total de cadera. El grupo de rivaroxaban recibió una dosis de 10 mg/día 6-8 horas después de la cirugía. El grupo de enoxaparina recibió por vía subcutánea una dosis de 40 mg/día que se inició unas 12 h antes de la cirugía.

En conclusión, la dosis de 10 mg/día de rivaroxaban fue más efectiva que la dosis de 40 mg/día de enoxaparina para la prevención de eventos tromboembólicos en pacientes sometidos a cirugía por artroplastia total de cadera<sup>4</sup>.

En relación con la seguridad, ambos tratamientos fueron igual de seguros, presentándose cualquier tipo de complicación hemorrágica durante el tratamiento en un 6% en el grupo de rivaroxaban y en un 5,9% en el grupo de enoxaparina.

El estudio *RECORD-2* tiene como objetivo fundamental demostrar si la extensión de la tromboprofilaxis con rivaroxaban hasta los 31-39 días del postoperatorio de cirugía por prótesis total de cadera, es superior al tratamiento con enoxaparina en dosis de 40 mg/día durante 10-14 días.

La conclusión de este estudio fue que la extensión de la tromboprofilaxis con rivaroxaban fue significativamente más efectiva que la tromboprofilaxis a corto plazo (10-14 días) con enoxaparina, incluyendo los eventos sintomáticos, en pacientes sometidos a cirugía ortopédica por recambio total de prótesis de cadera<sup>5</sup>.

La incidencia de complicaciones hemorrágicas durante los periodos de tratamiento fue prácticamente igual en los dos tipos de tratamientos.

El rivaroxaban también se ha ensayado en un estudio de fase III (*RECORD-3*) en la prevención del tromboembolismo venoso en cirugía ortopédica por prótesis total de rodilla, con excelentes resultados en comparación con la profilaxis habitual con enoxaparina.

Este estudio fue aleatorizado y a doble ciego. Los pacientes se aleatorizaron antes de la cirugía en dos ramas: la rama de rivaroxaban recibió una dosis de 10 mg/día por vía oral a las 6-8 h después de haber finalizado la cirugía; la rama de enoxaparina recibió una dosis de 40 mg por vía subcutánea la tarde antes de la cirugía y otra dosis de 40 mg por vía subcutánea el día de la cirugía, 6-8 horas después de la misma. Am-



Los tratamientos se administraron hasta el día 13-17 de postoperatorio.

Los resultados de eficacia de este estudio demostraron que el rivaroxaban fue significativamente más efectivo que la enoxaparina en la prevención del tromboembolismo venoso en pacientes sometidos a cirugía ortopédica por recambio total de prótesis de rodilla.

El objetivo primario de eficacia (TVP diagnosticada por venografía, EP y cualquier causa de mortalidad) ocurrió en un 9,6% en el grupo de rivaroxaban y en un 18,9% en el grupo de enoxaparina (reducción de riesgo relativo [RRR] del 49%  $p < 0,001$ ).

El tromboembolismo mayor (TVP proximal, EP no mortal y mortalidad relacionada con tromboembolismo venoso) ocurrió en 1,0% en el grupo de rivaroxaban y en un 2,6% en el grupo de enoxaparina. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas con un RRR del 62% y una  $p = 0,01$ .

En relación con el tromboembolismo sintomático, éste ocurrió en el 1,0% en el grupo de rivaroxaban y en un 2,7% en el grupo de enoxaparina; esta diferencia fue estadísticamente significativa con un RRR del 64% y una  $p = 0,006$ .

En general en el grupo de rivaroxaban fueron menos frecuentes las muertes, las EP y las TVP tanto proximales como distales.

Las complicaciones hemorrágicas mayores fueron prácticamente iguales en ambos grupos: un 0,6% en el grupo de rivaroxaban frente a un 0,5% en el grupo de enoxaparina ( $p = 0,774$ ).

Las complicaciones hemorrágicas menores también fueron muy similares en ambos grupos de tratamiento: un 4,3% para el grupo de rivaroxaban y un 4,4% para el grupo de enoxaparina<sup>6</sup>.

En resumen, el programa *RECORD* demuestra que el rivaroxaban en dosis de 10 mg/día por vía oral es superior al tratamiento convencional con enoxaparina en dosis de 40 mg/día y en dosis de 30 mg b.i.d., en la prevención tromboembólica venosa después de cirugía ortopédica por prótesis total de cadera y de rodilla.

En la actualidad se están desarrollando estudios de fase III en tratamiento y prevención secundaria de la ETV, en la prevención del embolismo cerebral y sistémico en pacientes con fibrilación auricular y en pacientes con SCA.

## Apixaban

El apixaban es una pequeña molécula no peptídica, derivada del razaxabán, que inhibe de forma directa el centro activo del FXa. El apixaban es un inhibidor muy potente, selectivo y reversible del FXa ( $K_i = 0,08$  nM) tanto en forma libre como unido a las mallas de fibrina o al complejo protrombinasa.

Este producto es activo por vía oral, se absorbe en el tracto gastrointestinal, tiene una biodisponibilidad superior al 50%, su máxima absorción se produce alrededor de las 3 h y su vida media es entre 9-14 h.

Los alimentos no afectan a la absorción del apixaban, y se metaboliza en el hígado por la vía del citocromo CYP3A4 y por otras vías no dependientes del citocromo P450. El apixaban tiene una vía de excreción dual: un 25% se elimina por vía renal y el resto por vía fecal<sup>7</sup>.

El apixaban prolonga el INR y el APTT de acuerdo con la concentración plasmática del producto; no obstante, su efecto sobre estos tests es mínimo a concentraciones terapéuticas. Este producto se puede monitorizar con tests que miden la inhibición del FXa y con el tiempo de protrombina diluido.

Basándose en el estudio *Appropos*, la dosis de apixaban de 2,5 mg b.i.d. se ha utilizado en ensayos de fase III en recambio de prótesis total de rodilla y cadera en comparación con enoxaparina.

En el ámbito del tratamiento de la ETV el apixaban se ha ensayado en un estudio de fase II de búsqueda de dosis (estudio *Botticelli*). En este estudio se incluyeron 520 pacientes con TVP, confirmada objetivamente sin EP, que se aleatorizaron en cuatro grupos de tratamiento: tres recibieron apixaban en dosis de 5, 10 y 20 mg b.i.d., y el cuarto, tratamiento convencional con heparinas de bajo peso molecular más antivitamínicos K.

En los resultados de este estudio se vio una clara respuesta a la dosis en relación con el criterio de eficacia; sin embargo, en relación con el criterio de seguridad no se observó una relación positiva entre dosis y respuesta.

En los grupos tratados con apixaban el criterio primario de eficacia fue de un 7,3%, y en el grupo de control, de un 4,2%.

En relación con el criterio primario de seguridad, en los grupos tratados con apixaban fue de un 7,3%, y en el grupo control, de un 7,9%.

En base a este estudio, la dosis recomendada de apixaban para realizar estudios de fase III en pacientes con TVP y/o EP de fase aguda es de 10 mg b.i.d. durante la primera semana de tratamiento seguido de 5 mg b.i.d. Esta dosis se compara con el tratamiento convencional con enoxaparina y antivitamínicos K a un INR diana de 2,5<sup>2,3</sup> durante 6 meses de tratamiento.

## LY-517717

Este producto, licenciado por Lilly, es un inhibidor activo por vía oral del FXa ( $K_i$  5-7 nM). Tiene una biodisponibilidad del 25-82% administrado por vía oral y una vida media de unas 25 h, por lo que hace que pue-

da administrarse una vez al día. Su eliminación, básicamente, es por vía gastrointestinal<sup>8</sup>.

Este producto se ha ensayado en estudios de fase II en búsqueda de dosis en pacientes sometidos a cirugía ortopédica por recambio de prótesis total de cadera o rodilla.

### **YM 150**

El YM 150 constituye un potente inhibidor del FXa (Ki de 31 nM) activo por vía oral y licenciado por Astellas. Por sus características farmacocinéticas se administra una sola vez al día. En modelos animales ha demostrado un potente efecto antitrombótico sin incrementar sustancialmente las complicaciones hemorrágicas<sup>9</sup>.

### **DU-176b**

El DU-176b es un inhibidor potente activo por vía oral del FXa (Ki de 0,56 nM) licenciado por Daiichi San Kyō. En estudios en modelos animales ha mostrado una buena eficacia con un margen de seguridad óptimo. En dichos modelos animales se ha comprobado que este fármaco potencia el efecto del antiagregante plaquetario de la ticlopidina y del activador tisular del plasminógeno, lo que sugiere que la combinación de dichos productos con el DU-176b pueda ser clínicamente interesante.

En la actualidad están en marcha estudios de fase II de búsqueda de dosis en pacientes sometidos a cirugía por prótesis total de cadera<sup>9</sup>.

### **PRT 054021**

El PRT 054021 es un inhibidor del FXa (Ki de 0,12 nM) activo por vía oral, con una biodisponibilidad del 47%, una vida media de 19 h y una excreción prácticamente total por la bilis.

El PRT 054021 se ha ensayado en un estudio de fase II de búsqueda de dosis en pacientes candidatos a artroplastia total de rodilla<sup>8</sup>.

---

## **Inhibidores indirectos de la trombina**

### **Odiparcil**

El odiparcil es un inhibidor indirecto de la trombina activo por vía oral; se trata del β-D-Xiloside, constituido fundamentalmente por glicosaminoglicanos (GAG) del tipo sulfato de dermatán. Estos GAG, y concretamente

el sulfato de dermatán, inhiben indirectamente a la trombina catalizando la reacción de inhibición entre el cofactor II de la heparina y la trombina<sup>1</sup>.

Este producto se ha ensayado en animales y en un estudio de fase IIa, aleatorizado, controlado y con grupo placebo en pacientes sometidos a recambio total de prótesis de cadera. En realidad en el grupo placebo la profilaxis de ETV se realizó con botas de compresión neumática y posteriormente HBPM durante 7-10 días. El odiparcil se administró por vía oral en distintas dosis escalonadas desde 500 mg a 125 mg día. En los grupos tratados con odiparcil se observó una reducción de ETV, en el grupo con dosis de 125 mg/día la incidencia de ETV fue de un 5,26% (2/38) y en el grupo con dosis de 500 mg/día fue de 2,33% (1/43). En el grupo considerado placebo la incidencia fue de 7,41% (4/54).

No se observaron complicaciones hemorrágicas importantes ni incrementos de enzimas hepáticas superiores a tres veces los valores de referencia. No obstante un paciente tratado con odiparcil en dosis de 500 mg/día presentó una complicación hemorrágica mayor.

A la vista de estos resultados esperanzadores se están realizando estudios de búsqueda de dosis con un número suficiente de pacientes sometidos a cirugía ortopédica por prótesis total de rodilla.

---

## **Inhibidores directos de la trombina**

### **Flovagatran**

Se trata de una pequeña molécula sintética que inhibe el centro activo de la trombina de forma reversible, inicialmente se ha designado como TGN 255.

Este fármaco presenta un efecto inhibidor frente a la trombina, predecible y dependiente de la dosis después de ser administrado por vía endovenosa. Su vida media es corta. La eliminación de este producto es por vía no renal. Se ha administrado este fármaco a pacientes con insuficiencia renal y su farmacocinética ha sido idéntica a la de pacientes con función renal normal<sup>1</sup>. Debido a esta propiedad de no eliminarse por vía renal, puede ser una alternativa para pacientes que precisen hemodiálisis y a la vez presenten trombocitopenia inducida por heparina.

### **Pegmusirudín**

El pegmusirudín es una hirudina obtenida de forma recombinante y unida de forma covalente a dos moléculas de polietilenglicol (PEG) 5000. Esta modificación de la molécula de hirudina, denominada *PEG-hirudina* o *pegmusirudín*, tiene una vida media, administrada

por vía intravenosa, mucho más larga (unas 12 h) que la hirudina convencional (0,85-1,5 h) evaluada en sujetos con función renal normal. Cuando se administra por vía subcutánea, esta PEG-hirudina tiene una vida media de unas 20 h en personas con función renal normal<sup>1</sup>.

### **Ximelagatran**

Uno de los inhibidores directos de la trombina más ensayados en clínica ha sido el melagatran y el ximelagatran. El melagatran es un dipéptido modificado que reproduce la secuencia de aminoácidos que precede al punto de acción de la trombina sobre la cadena a del fibrinógeno. De esta manera, el melagatran inhibe el centro activo de la trombina de forma reversible e impide todas las funciones de la trombina.

El ximelagatran, un profármaco, es inactivo como inhibidor de la trombina, se absorbe rápidamente por vía oral y es metabolizado de forma rápida (1/2-1 hora) en melagatran, siendo predecible la concentración plasmática de melagatran. La biodisponibilidad del melagatran, después de haber sido administrado por vía oral en forma de ximelagatran, es de aproximadamente un 20%. La eliminación del melagatran tiene lugar por vía renal. La vida media de melagatran, administrado por vía oral en forma de ximelagatran, es de tres horas.

En la experiencia clínica, el ximelagatran se ha mostrado eficaz en la prevención de la enfermedad tromboembólica en cirugía ortopédica (recambio de prótesis de cadera y rodilla). También ha demostrado su eficacia en el tratamiento y la prevención secundaria de las recidivas tromboembólicas, después de un episodio agudo de TVP con o sin embolia pulmonar.

Se ha estudiado el ximelagatran en la profilaxis de embolismos cerebrales y periféricos en pacientes con fibrilación auricular. El estudio se realizó comparándolo con la warfarina (INR 2-3). También se ha estudiado en el SCA.

En los estudios donde se ha utilizado el ximelagatran a largo plazo (6-18 meses) se ha observado, en aproximadamente un 6% de los casos, un incremento de las transaminasas (ALT) tres veces por encima de los valores considerados normales. Dicho incremento de transaminasas suele presentarse a los 2-3 meses de tomar el ximelagatran; en la mayoría de casos vuelven a la normalidad a los 6 meses y en los casos en que se ha efectuado biopsia hepática no se ha observado ningún tipo de alteración específica.

No obstante, este fármaco no fue aprobado en Estados Unidos y fue retirado eventualmente del mercado por una potencial toxicidad hepática después de haberse ensayado en más de 30.000 pacientes sometidos a distintos ensayos clínicos.

### **Dabigatran etexilato**

El dabigatran etexilato es un inhibidor directo y reversible de la trombina que se presenta en forma de profármaco activo por vía oral y que, en el tracto gastrointestinal y por acción de diferentes esterasas, se transforma en su forma activa, el dabigatran.

Como hemos indicado, la bioconversión del dabigatran etexilato en dabigatran activo tiene lugar en el tracto gastrointestinal; el producto entra en la vena porta en una combinación del profármaco y fármaco activo; en el hígado la bioconversión en fármaco activo se completa, y aproximadamente un 20% del producto se conjuga y se elimina por vía biliar. El sistema del P450 no interviene en el metabolismo del dabigatran etexilato, con lo que el riesgo de interacción fármaco-fármaco es baja.

Después de ser administrado por vía oral, el dabigatran etexilato tiene una biodisponibilidad del 6,5%.

El dabigatran es un potente inhibidor directo y competitivo de la trombina, no de estructura de pequeño péptido, que específicamente y de forma reversible inhibe a la trombina libre y la trombina unida a la fibrina del coágulo. Su acción sobre la trombina es altamente selectiva y superior a los inhibidores de serinproteasas (serpinas) fisiológicas.

Bajo el punto de vista farmacocinético, después de su administración oral, el dabigatran etexilato se absorbe rápidamente alcanzándose una concentración máxima a las 2-4 horas de su administración. La vida media de fármaco es aproximadamente de 8 h después de una administración única y de 14-17 h después de múltiples administraciones. La vida media del dabigatran es independiente de la dosis.

Alrededor del 80% del fármaco es eliminado de forma inalterada por vía renal; el resto se excreta por vía biliar. Debido a esta alta eliminación por vía renal, está contraindicado en pacientes con insuficiencia renal grave (aclaramiento de creatinina < 30 mL/minuto).

La concentración máxima de dabigatran y el área bajo la curva son proporcionales a las dosis administradas, con lo que su perfil farmacocinético es lineal, y su efecto anticoagulante, predecible.

Como se ha especificado anteriormente, el dabigatran y sus metabolitos no son metabolizados ni interaccionan con el citocromo P450; por ello, el dabigatran tiene un bajo potencial de interacciones farmacológicas.

Por lo que hace referencia a la amiodarona, antiarrítmico potente, es un inhibidor potente de la proteína transportadora, glicoproteína P, que a su vez es un transportador del dabigatran etexilato.

Al administrar conjuntamente amiodarona con dabigatran etexilato, el grado y la velocidad de absorción de la amiodarona y sus metabolitos no se vieron alterados. No obstante, el área bajo la curva y la concentración máxima de dabigatran aumentaron en un

60% y un 50% respectivamente. No se ha establecido claramente el mecanismo de acción.

La dosis de dabigatran debe reducirse a 150 mg/día cuando se administra conjuntamente con amiodarona.

El dabigatran etexilato se ha evaluado para tromboprolifaxis en pacientes candidatos a prótesis total de cadera y rodilla en estudios de fase II y fase III. También se ha evaluado el dabigatran en estudios de fase II, para la prevención del embolismo cerebral y periférico en pacientes con fibrilación auricular.

El estudio *BISTRO II* es un estudio extenso, multicéntrico, doble ciego, con grupos paralelos y de fase IIb. En este estudio se aleatorizaron 1.973 pacientes candidatos a una prótesis total de cadera o rodilla. Los pacientes en el brazo de dabigatran etexilato recibieron una de las cuatro dosis ensayadas (50 o 150 mg b.i.d., 300 mg/una vez al día y 225 mg b.i.d.); estas dosis se administraron entre 1 y 4 horas después del postoperatorio. Como grupo de control se administró enoxaparina 40 mg/día, iniciándose la dosis 12 h antes de la cirugía, y la duración del tratamiento fue de 6-10 días. Después de la realización de este estudio las dosis de dabigatran recomendada fueron de 150 y 220 mg/1 vez al día, empezando el primer día de postoperatorio (1-4 h después de cirugía) con la mitad de dosis de dabigatran (75 o 110 mg/día)<sup>9</sup>.

El estudio de fase III *RE-MODEL* incluyó a 2.076 pacientes candidatos a un recambio total de prótesis de rodilla.

Los resultados con relación a la eficacia mostraron un 37,7% (193/512) de eventos en el grupo de enoxaparina frente a un 36,4% (183/503) en el grupo de dabigatran de 220 mg/día, y de un 40,5% (213/503) en el grupo de dabigatran en dosis de 150 mg/día. Estas dos dosis de dabigatran etexilato fueron no inferiores a la enoxaparina, según el diseño del estudio de no inferioridad.

La incidencia de complicaciones hemorrágicas mayores no fueron diferentes significativamente en los tres grupos: 1,3% en el grupo de enoxaparina, 1,5% en el grupo de dabigatran de 220 mg/día y 1,3% en el grupo de dabigatran de 150 mg/día. Considerando las complicaciones mayores de sangrado más las complicaciones hemorrágicas clínicamente relevantes, las diferencias entre los grupos tampoco fueron significativas: 7,4% para el grupo de dabigatran 220 mg/día, 7,1% para el grupo de dabigatran de 150 mg/d y de 6,6% para el grupo de enoxaparina.

Los niveles de alanina-aminotransferasa (ALT) tres veces por encima de los valores considerados normales fueron de 2,8% para el grupo de dabigatran 220 mg/día, 3,7% para el grupo de dabigatran 150 mg/día y de un 4,0% para el grupo de enoxaparina<sup>10</sup>.

El dabigatran etexilato también se ha evaluado en pacientes candidatos a un reemplazo total de prótesis de cadera en el estudio *RE-NOVATE*. Éste es un estudio de fase III aleatorizado, doble ciego, multicéntri-

co y de no inferioridad frente al tratamiento habitual con enoxaparina.

En este estudio se incluyeron 3.494 pacientes candidatos a un recambio total de prótesis de cadera.

La conclusión de este estudio fue que el dabigatran etexilato administrado por vía oral fue igual de efectivo que la enoxaparina en la reducción del riesgo de ETV después de cirugía ortopédica por prótesis total de cadera con similar grado de seguridad<sup>11</sup>.

El dabigatran etexilato, en la actualidad se está estudiando en estudios de fase III en la prevención del embolismo cerebral y sistémico en fibrilación auricular y en el tratamiento y prevención secundaria de la ETV.

## Conclusiones

En general, los datos aportados de estudios realizados con inhibidores orales del FXa y con inhibidores de la trombina sugieren que tanto el FXa como la alfatrombina son dos excelentes dianas terapéuticas para diseñar fármacos con potente acción anticoagulante.

Así pues, en la actualidad no hay datos disponibles que demuestren que los inhibidores orales del FXa o los inhibidores orales de la trombina sean superiores los unos sobre los otros en términos de eficacia y seguridad. Es preciso estudios que comparen unos inhibidores frente a los otros en una misma entidad clínica y en distintas situaciones (prevención posquirúrgica, en cáncer, en tratamiento de fase aguda de ETV, etc.) para poder extraer conclusiones firmes en relación con su eficacia y seguridad.

Es probable que tales estudios no se realicen nunca, o se lleven a cabo después de muchos años tras la comercialización de estos productos.

Mientras se realizan estos estudios, es muy importante desarrollar programas paralelos, con buen diseño de estudios clínicos, con inhibidores del FXa e inhibidores de la trombina para prevenir y tratar la enfermedad tromboembólica venosa y arterial.

En relación con el problema de los antídotos para estos nuevos fármacos antitrombóticos, el tema permanece abierto, sin que se hayan encontrado, por el momento, antídotos específicos. La falta de antídotos es particularmente problemática para los fármacos con una vida media larga como el idraparinux. En esta dirección, el desarrollo de idraparinux biotinados abre una posibilidad de neutralizar su efecto con la avidina administrada por vía endovenosa. No obstante, hacen falta estudios que confirmen la efectividad y seguridad de la avidina para neutralizar al idraparinux biotinado.

Por lo que hace referencia a la posibilidad de aparición de nuevos efectos adversos, de forma tardía o en tratamientos de larga duración, la experiencia del ximelagatran en relación con su probable toxicidad he-



pática nos debe hacer tomar una postura muy cautelosa ante estos nuevos fármacos antitrombóticos.

## Bibliografía

1. Weitz JI, Hirsh J, Samama MM. New antithrombotic drugs. *Chest* 2008; 133: 234S-256S.
2. Buller HR, Cohen AT, Davidson B, et al. Extended prophylaxis of venous thromboembolism with idraparin. *N Engl J Med* 2007; 357: 1105-12.
3. Hérault JP, Cappelle M, Bemat A, et al. Effect of SanOrg 123781A, a synthetic hexadecasaccharide, on clot-bound thrombin an factor Xa in vitro and in vivo. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1959-65.
4. Eriksson BI, Borris LC, Friedman RJ, Haas S, Huisman MV, Kakkar AK, Bandel TJ, Beckmann H, Muehlhofer E, Misse-lwitz F, Geerts W; RECORD1 Study Group. Rivaroxaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after hip arthroplasty. *N Engl J Med* 2008; 358: 2765-75.
5. Kakkar AK, Brenner B, Dahl OE, Eriksson BI, et al. Extended duration rivaroxaban versus short-term enoxaparin for the prevention of venous thromboembolism after total hip arthroplasty: a double-blind, randomised controlled trial. [www.thelancet.com](http://www.thelancet.com). Published online June 25, 2008 DOI: 10.1016/S0140-6736(08)60880-6.
6. Lassen MR, Ageno W, Borris LC, Lieberman JR, et al. Rivaroxaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after total knee arthroplasty. *N Engl J Med* 2008; 358: 2776-86.
7. Gross PL, Weitz JI. New anticoagulants for treatment of venous thromboembolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 380-6.
8. Turpie AG. Oral direct factor Xa inhibitors in development for the prevention and treatment of thromboembolic diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 1238-47.
9. Eriksson BJ, Dahl OE, Buller HR. A new oral direct thrombin inhibitor, dabigatran etexilate, compared with enoxaparin for prevention of thromboembolic events following total hip or knee replacement: the BISTRO II randomized trial. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 103-11.
10. Eriksson BI, Dahl OE, Rosencher N, Kurth A, Van Dijk CN, Frostick SP, Kalebo P, Christiansen AV, Hantel S, Hettiarachchi R, Schnee J, Buller HR, for the RE-MODEL study group. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 2178-85.
11. Eriksson BI, Dahl OE, Rosencher N, Kurth A, Van Dijk CN, Frostick SP, Prins MH, Hettiarachchi R, Hantel S, Schnee J, Buller HR for the RE-NOVATE study group. *Lancet* 2007; 370: 949-56.

## PROFILAXIS DEL TROMBOEMBOLISMO VENOSO CON INHIBIDORES ORALES DE LA TROMBINA Y DEL FACTOR Xa

M. MONREAL

*Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Badalona (Barcelona)*

## Introducción

Los nuevos anticoagulantes orales aprobados por la European Medicines Agency (EMA) o en desarro-

llo clínico (como dabigatrán, rivaroxabán o apixabán) han demostrado una eficacia y seguridad no inferiores a las de enoxaparina en la prevención de la enfermedad tromboembólica venosa (ETV) tras artroplastia de cadera o de rodilla, y cuentan con la ventaja de su administración por vía oral. En la prevención de la ETV posquirúrgica, un anticoagulante oral puede no suponer una ventaja clara durante los primeros días (mientras el paciente está ingresado) respecto a las heparinas de bajo peso molecular (HBPM). Pero, una vez que el paciente es dado de alta hospitalaria, puede permitir mayor adherencia a la prolongación de la profilaxis durante 3 o 4 semanas. Además, los nuevos anticoagulantes no precisan ajustes en base al peso corporal, no interfieren con los alimentos ni con la mayoría de otros fármacos y no precisan ajustes de dosis en función de ninguna prueba biológica.

## Farmacología

Los nuevos anticoagulantes actúan sobre el factor X activado (Xa) o sobre la trombina (IIa). Los inhibidores del factor Xa pueden actuar de forma indirecta (a través de la antitrombina), como fondaparinux, idraparinix y SSR126517; o directa, como rivaroxabán y apixabán. Por otra parte, dabigatrán inhibe de forma directa y reversible a la trombina<sup>1</sup>.

El dabigatrán tiene un peso molecular de 471 dáltons, y es un inhibidor directo y reversible de la trombina<sup>2</sup>. Se administra como profármaco (dabigatrán etexilato), que es rápidamente convertido por las esterasas intestinales en su metabolito activo, el dabigatrán. Esta conversión finaliza en el hígado, y aproximadamente el 20% del fármaco es metabolizado y excretado por el sistema biliar, mientras que el resto es eliminado intacto por el riñón. Su metabolización no depende del sistema del citocromo P450 y, por tanto, el riesgo de interacciones farmacológicas es bajo<sup>3</sup>. El pico plasmático se alcanza dos horas después de su administración, y su vida media es de 8 horas cuando se administra una dosis única, y de 14 a 17 horas después de varias dosis<sup>4</sup>. Su administración prolonga el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa), pero su efecto no es dependiente de la dosis ni afecta al tiempo de protrombina (TP), pero sí prolonga el tiempo de coagulación de ecarina en función de la dosis.

El rivaroxabán, por su parte, es un derivado de la oxazolidinona con un peso molecular de 436 dáltons, que inhibe de forma directa y selectiva al factor Xa<sup>5</sup>. Se absorbe en el tracto gastrointestinal con una biodisponibilidad del 80% y no interacciona con la ingesta de alimentos. El pico plasmático de rivaroxabán se alcanza a las 3 horas, y su vida media es de 5 a 9 horas en jóvenes, y de 11 a 13 horas en ancia-

nos<sup>6</sup>. Su excreción es dual, ya que un tercio de la molécula se elimina intacta por el riñón con la orina y los dos tercios restantes se metabolizan en el hígado, eliminándose la mitad por la vía biliar al intestino y la otra mitad de la molécula metabolizada con la orina. Se metaboliza mediante el CYP3A4, el CYP2J2 y mecanismos independientes del CYP. El rivaroxabán prolonga el TP y el TTPA de forma dependiente de la dosis, aunque la inhibición del factor Xa es la mejor prueba de laboratorio para la monitorización de su actividad.

### Experiencia clínica

Tanto el dabigatrán etexilato como el rivaroxabán han sido evaluados para la profilaxis tromboembólica en pacientes sometidos a artroplastia total de cadera o de rodilla, y han sido los resultados de estos ensayos clínicos fundamentales los que han determinado la reciente aprobación de ambos productos para las indicaciones mencionadas por la EMEA.

#### Dabigatrán frente a enoxaparina en cirugía ortopédica mayor

En el ensayo clínico *RENOVATE* se aleatorizaron 3.494 pacientes sometidos a artroplastia total primaria de cadera para recibir 150 mg o 220 mg diarios (con una primera dosis de 75 o 110 mg respectivamente, administrada entre las 1 y 4 horas tras la finalización de la cirugía) de dabigatrán etexilato, o bien 40 mg de enoxaparina iniciada 12 horas antes de la cirugía y después diariamente durante 28-35 días<sup>9</sup>. La variable principal de eficacia se definió como la combinación de trombosis venosa profunda en la flebografía bilateral sistemática, embolia pulmonar y muerte por cualquier causa. No hubo diferencias significativas en la incidencia de dicha variable, como muestra la Tabla 1. Tampoco hubo diferencias en cuanto a la variable secundaria (la suma de embolia pulmonar no fatal, trombosis venosa proximal y muerte relacionada con la ETV), ni en la incidencia de hemorragias graves.

En el ensayo clínico *RE-MODEL* se aleatorizaron 2.076 pacientes sometidos a artroplastia total de rodilla para recibir también 150 o 220 mg diarios de dabigatrán etexilato (con la misma posología que en el estudio anterior), o 40 mg de enoxaparina también desde 12 horas antes de la cirugía, durante 6-10 días<sup>9</sup>. No hubo diferencias significativas en la variable principal de eficacia ni en la secundaria (cuyas definiciones coinciden con las del estudio *RENOVATE*), ni en las hemorragias graves, como muestra la Tabla 1.

Las dos dosis estudiadas de dabigatrán (220 y 150 mg) han probado una eficacia y seguridad similar a

Tabla 1. Principales resultados de los ensayos que comparan dabigatrán con enoxaparina

Estudios	Variable principal de eficacia	Variable secundaria de eficacia	Hemorragias graves
<b>RE-NOVATE</b> (prótesis de cadera)			
· Dabigatrán 220 mg	6,0% (0,96%)	3,1%	2,0%
· Dabigatrán 150 mg	8,6% (0,86%)	4,3%	1,3%
· Enoxaparina 40 mg	6,7% (0,35%)	3,9%	1,6%
<b>RE-MODEL</b> (prótesis de rodilla)			
· Dabigatrán 220 mg	36,4% (0,14%)	2,6%	1,5%
· Dabigatrán 150 mg	40,5% (0,57%)	3,8%	1,3%
· Enoxaparina 40 mg	37,7% (1,3%)	3,5%	1,3%

Entre paréntesis: porcentaje de trombosis sintomáticas.

'Variable principal de eficacia': combinación de trombosis venosa profunda en la flebografía sistemática, embolia pulmonar y muerte por cualquier causa.

'Variable secundaria de eficacia': suma de embolia pulmonar no fatal, trombosis venosa proximal y muerte relacionada con la ETV.

'Hemorragias graves': hemorragia clínicamente relevante asociada con: 1) descenso de más de 2 g/dL de hemoglobina; 2) hemorragia que requiere transfusión de, al menos, dos unidades de sangre o concentrados de hemáties; 3) hemorragia mortal, retroperitoneal, intracaneal, ocular o del canal medular; o 4) que requiera suspender el tratamiento, o que precise de una reintervención.

enoxaparina, lo cual permite una flexibilidad de dosis utilizando la dosis inferior (75 mg al inicio y 150 mg en la dosis total diaria) en aquellos pacientes que puedan muestran mayor tendencia a incrementar los niveles plasmáticos.

#### Rivaroxabán frente a enoxaparina en cirugía ortopédica mayor

En el ensayo clínico *RECORD-1* se aleatorizaron 4.541 pacientes intervenidos de artroplastia primaria de cadera para recibir 10 mg de rivaroxabán por vía oral una vez al día, entre las 6 y las 8 horas después del final del acto operatorio, o bien 40 mg de enoxaparina subcutánea, iniciada 12 horas antes de la intervención y con la siguiente dosis administrada entre 6 y 8 horas tras el cierre de la herida, continuando con las mismas dosis cada 24 horas, durante una media de 35 días<sup>10</sup>. El rivaroxabán redujo significativamente tanto la variable principal de eficacia (compuesta de trombosis venosa profunda en la flebografía bilateral sistemática, embolia pulmonar no mortal o muerte por cualquier causa) respecto de enoxaparina: del 3,7% al 1,1% (p < 0,001), como la secundaria (misma variable que en los ensayos de dabigatrán): del 2,0% al 0,2% (p < 0,001), tal como muestra la Tabla 2. La incidencia de hemorragia grave en ambos grupos no fue estadísticamente distinta.

En el ensayo clínico *RECORD-3* se aleatorizaron 2.531 pacientes intervenidos de artroplastia total de rodilla para recibir 10 mg al día de rivaroxabán oral administrado a las 6-8 horas tras la finalización de la

**Tabla 2. Principales resultados de los ensayos que comparan rivaroxaban con enoxaparina**

Estudios	Variable principal de eficacia	Variable secundaria de eficacia	Hemorragias graves
<b>RECORD-1 (prótesis de cadera)</b>			
· Rivaroxaban 10 mg	1,1%* (0,3%)	0,2%†	0,3%
· Enoxaparina 40 mg	3,7% (0,5%)	2,0%	0,1%
<b>RECORD-3 (prótesis de rodilla)</b>			
· Rivaroxaban 10 mg	9,6%* (0,7%)	1,0%‡	0,6%
· Enoxaparina 40 mg	18,9% (2,0%)	2,6%	0,5%

Entre paréntesis: porcentaje de trombosis sintomáticas.

Comparaciones entre pacientes: \*  $p < 0,05$ ; †  $p < 0,01$ ; ‡  $p < 0,001$ .

'Variable principal de eficacia': combinación de trombosis venosa profunda en la flebografía sistemática, embolia pulmonar y muerte por cualquier causa.

'Variable secundaria de eficacia': la suma de embolia pulmonar no fatal, trombosis venosa proximal y muerte relacionada con la ETV.

'Hemorragias graves': hemorragias mortales, que afecten un órgano crítico o que requiriesen reintervención, así como hemorragias clínicamente evidentes fuera de la zona quirúrgica y asociadas con un descenso de más de 2 g/dL de hemoglobina, o que requirieran transfusión de, al menos, dos unidades de sangre.

cirugía o 40 mg de enoxaparina subcutánea, iniciada 12 horas antes de la cirugía y con la siguiente dosis administrada entre 6 y 8 horas tras el cierre de la herida, continuando con una dosis diaria entre 10 y 14 días<sup>11</sup>. La variable principal de eficacia ocurrió en el 9,6% y el 18,9%, respectivamente (Tabla 2), con una reducción relativa del riesgo del 49% ( $p < 0,001$ ). La variable secundaria de eficacia ocurrió en el 1,0% y el 2,6%, respectivamente ( $p = 0,01$ ). Nuevamente, la incidencia de hemorragia grave no fue estadísticamente diferente (0,6% frente a 0,5%).

Por último, ambos fármacos son seguros también para el conjunto de efectos adversos, tanto en cuanto a la posible afectación hepática como a posibles efectos adversos cardiovasculares de otro tipo.

## Limitaciones

**1. Anestesia regional.** La administración de fármacos anticoagulantes puede entrar en conflicto con la realización de técnicas anestésicas regionales, en las que es imprescindible el mantenimiento de la integridad hemostática. Por ello, se han desarrollado protocolos de seguridad que permiten la tromboprofilaxis con máxima eficacia y la realización de las técnicas anestésicas regionales con la máxima seguridad, basados tanto en el fármaco empleado como en la dosis y el momento en que se realiza su administración<sup>12</sup>. En el momento actual, ni el dabigatrán ni el rivaroxabán poseen suficiente evidencia como para poder establecer unas recomendaciones óptimas en la realización concomitante de las técnicas de anestesia regional con seguridad. Pero es necesario distinguir las siguientes situaciones:

a. **Anestesia subaracnoidea de punción única:** Es posible el empleo de cualquiera de ellos en el protocolo habitual, tras la realización de una punción subaracnoidea única, sin catéter permanente, no traumática ni repetida.

b. **Anestesia peridural con catéter permanente:** Se desaconseja el empleo de dabigatrán si la técnica empleada conlleva la colocación de catéter permanente para analgesia en el postoperatorio. Para la administración de rivaroxabán, se establecen unos tiempos de seguridad teóricos descritos en su ficha técnica de 18 horas para la retirada del catéter desde la administración de la última dosis del fármaco, y al menos 6 horas desde esta maniobra hasta la siguiente dosis.

**2. Pesos extremos y edad avanzada.** No es necesario el ajuste de dosis de dabigatrán en pacientes con pesos corporales extremos ( $< 50$  kg o  $> 110$  kg), pero se recomienda una monitorización clínica estrecha (en busca de signos de sangrado o anemia) durante el tratamiento. En personas mayores de 75 años se recomienda reducir la dosis a 150 mg, ya que esta dosis ha demostrado también eficacia y seguridad. El rivaroxabán no requiere ajuste de dosis en pacientes ancianos o con pesos corporales extremos.

**3. Insuficiencia renal.** Cerca del 80% del dabigatrán circulante se excreta por los riñones. En pacientes con insuficiencia renal moderada (aclaramiento de creatinina 30-50 mL/min), la experiencia clínica es limitada. Estos pacientes deben tratarse con precaución. Por ello, se recomienda disminuir la dosis de dabigatrán en estos pacientes a 150 mg una vez al día, tomados en 2 cápsulas de 75 mg, y está contraindicado en pacientes con insuficiencia renal grave. No es necesario un ajuste de dosis de rivaroxabán en los pacientes con insuficiencia renal leve o moderada. En los pacientes con insuficiencia renal grave debe usarse con precaución, y no se recomienda su uso en los pacientes con un aclaramiento de creatinina por debajo de 15 mL/min.

**4. Administración concomitante de alimentos o fármacos.** El consumo de alcohol y el hábito tabáquico no modifican la farmacocinética del dabigatrán. Debe utilizarse la dosis de 150 mg de dabigatrán en pacientes que reciben amiodarona. Debe determinarse el valor de las ALT antes de una intervención quirúrgica, y está contraindicado el uso de dabigatrán en caso de enfermedad hepática que pueda afectar a la supervivencia. También está contraindicado el uso concomitante de quinidina, y debe darse con precaución si se administra verapamilo, claritromicina o rifampicina. No se recomienda el uso concomitante de dabigatrán con clopidogrel y antagonistas de los receptores GPIIb/IIIa. No se observaron interacciones con diclofenaco, pero al usar antiinflamatorios no esteroideos de semivida



de eliminación de más de 12 horas se recomienda una estrecha vigilancia en busca de signos de hemorragia.

El rivaroxabán puede usarse (con precaución) en pacientes cirróticos con insuficiencia hepática moderada (*Child Pugh B*), pero está contraindicado en pacientes con hepatopatía asociada a coagulopatía y con riesgo clínicamente relevante de hemorragia. Tampoco se aconseja su uso en pacientes tratados con inhibidores del citocromo CYP 3A4 o la glicoproteína P, como los antimicóticos azólicos (ketozonazol) y los inhibidores de la proteasa del VIH (ritonavir). También debe tenerse precaución al administrar rivaroxabán con naproxeno, ácido acetilsalicílico o clopidogrel.

## Bibliografía

- Weitz JI, Bates SM. New anticoagulants. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1843-53.
- Sanford M, Plosker GL. Dabigatran etexilate. *Drugs* 2008; 68: 1699-709.
- Blech S, Ebner T, Ludwig-Schwellinger E, Stangier J, Roth W. The metabolism and disposition of the oral direct thrombin inhibitor, dabigatran, in humans. *Drug Metab Dispos* 2008; 36: 386-99.
- Stangier J. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of the oral direct thrombin inhibitor dabigatran etexilate. *Clin Pharmacokinet* 2008; 47: 285-95.
- Roehrig S, Straub A, Pohlmann J, et al. Discovery of the novel antithrombotic agent 5-chloro-N-(((5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxomorpholin-4-yl)phenyl]-1,3-oxazolidin-5-yl)methyl)thiophene-2-carboxamide (BAY 59-7939): an oral, direct factor Xa inhibitor. *J Med Chem* 2005; 48: 5900-8.
- Kubitza D, Becka M, Wensing G, Voith B, Zuehisdorf M. Safety, pharmacodynamics and pharmacokinetics of BAY 59-7939: an oral, direct, factor Xa inhibitor—after multiple dosing in healthy male subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 2005; 61: 873-80.
- Pinto DJ, Orwat MJ, Koch S, 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.
- Eriksson BI, Dahl OE, Rosencher N, et al. Dabigatran etexilate versus enoxaparin for prevention of venous thromboembolism after total hip replacement: a randomized, double-blind, non-inferiority trial. *Lancet*, 2007; 370: 949-56.
- Eriksson BI, Dahl OE, Rosencher N, et al. Oral dabigatran etexilate versus subcutaneous enoxaparin for the prevention of venous thromboembolism after total knee replacement: the RE-MODEL randomized trial. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 2178-85.
- Eriksson BI, Borris LC, Friedman RJ, et al. Rivaroxaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after hip arthroplasty. *New Engl J Med*, 2008; 358: 2765-75.
- Lassen MR, Ageno W, Borris LC et al. Rivaroxaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after total knee arthroplasty. *New Engl J Med* 2008; 358: 2776-86.
- Llau JV, De Andrés J, Gomar C, Gómez-Luque A, Hidalgo F, Torres LM. Anticlotting drugs and anaesthetic and analgesic techniques: an update of the safety recommendations. *Eur J Anaesth* 2007; 24: 287-98.

## PREVENCIÓN DE LA EMBOLIA DE ORIGEN CARDIACO CON LOS NUEVOS ANTICOAGULANTES ORALES

P. DOMÈNECH, E. PINA, J. PERIS, E. ROSSELLÓ

*Unidad de Trombosis y Hemostasia.*

*Hospital Universitario de Bellvitge.*

*L'Hospitalet de Llobregat (Barcelona)*

La incidencia anual de accidente vascular cerebral (AVC) debido a embolismo de origen cardiaco oscila entre un 1,9% y un 18,2% de los pacientes afectos de fibrilación auricular que no están anticoagulados, en función de los factores de riesgo de embolismo asociados. Presentar insuficiencia cardiaca congestiva, diabetes mellitus, hipertensión arterial y/o edad superior a 74 años aumenta el riesgo de tromboembolismo. El factor más determinante de embolismo en estos pacientes son los antecedentes de accidente vascular cerebral isquémico establecido (ICTUS) o transitorio (AIT).

La anticoagulación con fármacos antivitaminas K (AVK) a dosis ajustada es capaz de reducir en un 68% (IC 95% 50-79) la incidencia de embolismos<sup>1</sup>. Este beneficio es netamente superior al de administrar aspirina, que solo previene un 21% de los accidentes (IC 95% 0-38). La superioridad de los AVK frente a aspirina está claramente establecida; un metanálisis concluye que los AVK reducen el riesgo de embolismo en los pacientes afectos de fibrilación auricular en un 52% (IC 95% 37-63) frente a aspirina. La ACCP<sup>1</sup> recomienda, en la 8ª edición de las guías de tratamiento anti-trombótico, la anticoagulación con AVK (INR 2-3) en los pacientes con fibrilación no valvular y  $\geq 2$  factores de riesgo de embolismo o con antecedentes cardioembólicos (riesgo de embolismo  $\geq 4\%$  pacientes-años); *sugiere* la anticoagulación en los que presentan un solo factor de riesgo (riesgo de embolismo 2,8% pacientes-años; IC 95% 2,0-3,8), y *recomienda* la aspirina en aquellos que no presentan factores de riesgo asociados (riesgo de embolismo 1,9% pacientes años; IC 95% 1,2-3,0). Esta última recomendación se basa en el hecho de que el riesgo hemorrágico derivado del tratamiento con AVK en este grupo de pacientes excedería el beneficio en reducción de eventos cardioembólicos. El incremento del riesgo de hemorragia mayor<sup>2</sup> debido a la anticoagulación con AVK en pacientes afectos de fibrilación es pequeño aunque no despreciable (0,3-0,5% anual). El incremento en hemorragia cerebral, el evento hemorrágico grave que con mayor frecuencia se asocia a muerte o secuela invalidante, es de un 0.2% anual. Mucho más frecuentes son las hemorragias menores. Aunque a menudo menospreciadas por diversos autores, con frecuencia tienen una



repercusión importante en la calidad de vida del paciente. Otros aspectos que también repercuten en ésta, y derivados de la poca predictabilidad, de la variabilidad intra e interindividual y de la lentitud en el inicio y en la finalización de la actividad de los AVK, son la necesidad de monitorización periódica, la necesidad de realizar terapias “puente” ante la indicación de procedimientos cruentos, la necesidad de recurrir a tratamientos combinados con fármacos de inicio de actividad rápido (fundamentalmente heparinas de bajo peso molecular) en la fase inicial del tratamiento, o la necesidad de practicar controles muy frecuentes durante el periodo de “tanteo” en esta fase.

Con el objetivo de aumentar la eficacia, aumentar la seguridad y mejorar la calidad de vida de los pacientes en riesgo de embolismo cardiogénico debido a fibrilación auricular se están estudiando nuevas estrategias antitrombóticas.

Nuevos esquemas terapéuticos basados en antiagregación plaquetar no han demostrado hasta ahora ser una buena alternativa a los AVK. La eficacia del clopidogrel<sup>3</sup> (75 mg/d) en pacientes con fibrilación auricular y  $\geq 2$  factores de riesgo, y con imposibilidad de administrar AVK, es limitada (RR de AVC frente a placebo 0,72; IC 95% 0,62-0,83) y asociada a un incremento del riesgo de hemorragia mayor (RR 1,57; IC 95% 1,29-1,92). La asociación de aspirina (75-100 mg) al clopidogrel<sup>4</sup> ha demostrado ser menos eficaz que los AVK (INR 2-3) en pacientes con  $\geq 1$  factores de riesgo. La incidencia anual de embolia, infarto agudo de miocardio (IAM) o muerte vascular en pacientes con terapia antiagregante combinada es de 5,6%, netamente superior a la observada en pacientes en tratamiento con AVK (3,93%;  $p = 0,0003$ ).

Otra opción probada es la basada en fármacos de administración parenteral, de vida media prolongada y sin necesidad de monitorización. Idraparinux, un pentasacárido sintético de vida media prolongada, administrado a 2,5 mg semanales fue comparado a AVK (INR 2-3) en el estudio randomizado y abierto AMA-DEUS<sup>5</sup>. Fueron incluidos pacientes con fibrilación auricular y riesgo elevado de embolismo. El estudio hubo de ser interrumpido antes de la finalización y tras el reclutamiento de 4.576 pacientes por exceso de hemorragias clínicamente relevantes (CR). Tras un seguimiento medio de 10,7 meses, se evidenció una leve reducción en la incidencia de embolismos (0,9% vs. 1,3% pacientes-años;  $p = 0,007$ ) a costa de un incremento importante de las hemorragias CR (19,7% vs. 11,3% pacientes-años;  $p < 0,0001$ ) y de la hemorragia cerebral (1,15 vs. 0,4%;  $p = 0,007$ ). Los factores asociados a hemorragia más determinantes fueron la insuficiencia renal y la edad avanzada. Actualmente está en desarrollo el estudio BOREALIS, con un diseño doble ciego y usando una modificación de la molécula, el idraparinux biotinilado. Éste se desarrolló con la finalidad de dispo-

ner de un antídoto de acción completa e inmediata, la avidina. Sin embargo datos recientes evidencian que a medida que aumenta el periodo de tratamiento, la duración de la actividad del fármaco aumenta y la capacidad de reversión de la anticoagulación mediante avidina disminuye.

Los nuevos fármacos anticoagulantes, de administración oral y sin necesidad de monitorización parecen las opciones más prometedoras.

La molécula de la que hasta hace poco se poseía más información es el ximelagatran. Tras ser absorbido es rápidamente transformado en la forma activa melagatran. Se trata de un inhibidor específico de la trombina, con una vida media de 5 h. Se realizaron dos estudios fase III, los SPORTIF III y SPORTIF V, en pacientes afectos de fibrilación auricular y  $\geq 1$  factor de riesgo. El ximelagatran fue administrado a dosis fija, y como comparador se administraron AVK a dosis ajustada (INR 2-3). Mientras que el SPORTIF III se realizó en abierto, el SPORTIF V tenía un esquema doble ciego. La valoración acumulada de ambos estudios<sup>6</sup>, incluyendo un total de 7.329 pacientes con un seguimiento medio de 18,5 meses, reportó los siguientes datos: sin diferencia en la incidencia de embolismos (1,62% vs. 1,65% pacientes-años en los grupos ximelagatran y AVK respectivamente;  $p=0,94$ ), leve y no significativa menor incidencia de hemorragias mayores en el grupo ximelagatran (1,88% vs. 2,46% pacientes-años;  $p = 0,054$ ), y leve aunque significativa reducción de las hemorragias totales en este grupo (31,7% vs. 38,7% pacientes-años;  $p < 0,0001$ ). Evidencias de hepatotoxicidad grave provocaron el rechazo de este fármaco por parte de organismos competentes.

Otro anticoagulante del que se posee información publicada es el dabigatran etexilato. Al igual que el ximelagatran, se trata del profármaco de administración oral cuya forma activa, el dabigatran, posee una actividad antitrombínica directa. Tras ser absorbido y rápidamente transformado en dabigatran, alcanza en breve el efecto máximo ( $T_{max}$ : 2 h). Posee una vida media de 14-17 horas, siendo eliminado por vía renal el 80%. Su biodisponibilidad tras la administración oral es baja (6,5%) aunque muy estable y poco interferible por fármacos o alimentos. Actualmente dabigatran está comercializado en Europa con el nombre de Pradaxa y con la indicación de profilaxis tromboembólica venosa (TEV) en cirugía ortopédica de cadera y de rodilla, en base a evidencia de no-inferioridad frente a enoxaparina. Se ha detectado un efecto potenciador por parte de la amiodarona indicándose, en los pacientes tratados con dabigatran como profilaxis TEV, reducciones en la dosis del mismo. En fibrilación auricular el estudio fase II PETRO<sup>7</sup> fue realizado sobre 502 pacientes. Las ramas de dabigatran recibieron 50 mg, 150 mg o 300 mg dos veces al día (bid) en asociación o no a aspirina. El comparador fue AVK a dosis ajustada (INR 2-3). Se de-

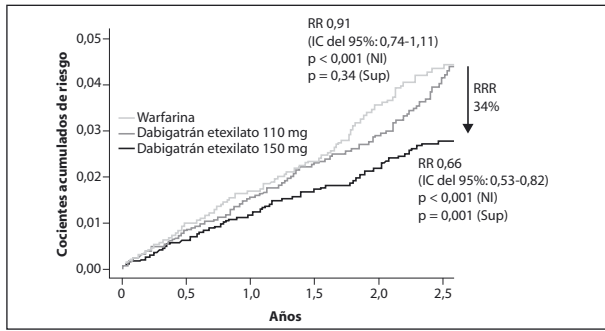


Figura 1. Estudio RE-LY: Riesgo acumulado de accidente embólico (ICTUS y embolismo sistémico).

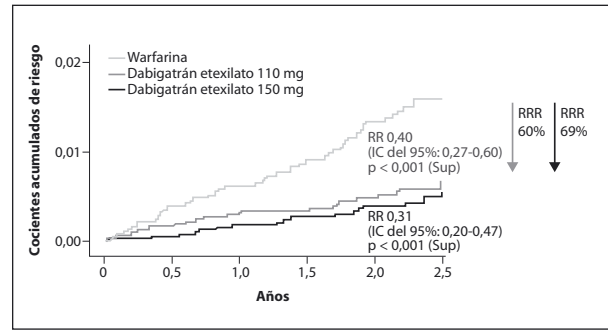


Figura 2. Estudio RE-LY: Riesgo acumulado de hemorragia cerebral.

tectaron accidentes tromboembólicos únicamente en la rama de 50mg bid de dabigatran. La incidencia de eventos hemorrágicos también fue dosis-dependiente. Únicamente se observaron hemorragias mayores en los pacientes que recibieron la dosis máxima y asociada a aspirina. Los accidentes clínicamente relevantes aumentaron gradualmente a medida que se incrementaba la dosis y si se asociaba aspirina. No se observaron signos de hepatotoxicidad severa debidos a dabigatran tras un seguimiento de 3 meses. En agosto de 2009 acaban de comunicarse los resultados del estudio fase III RE-LY<sup>8</sup>. Se trata de un estudio parcialmente abierto desarrollado sobre dos ramas de dabigatran (110 mg o 150 mg bid) frente a AVK (INR 2-3). Se reclutaron 18.113 pacientes afectados de fibrilación auricular que presentaban como mínimo un factor de riesgo tromboembólico añadido y fueron seguidos una media de dos años. El criterio primario de eficacia, embolia sistémica + ICTUS, ocurrió en un 1,69% en el grupo warfarina, en un 1,53% en el grupo dabigatran 110 mg bid y en un 1,11% en el 150 mg bid. Este último grupo evidenciaba superioridad significativa en eficacia respecto al grupo warfarina (RR 0,66; IC95% 0,53-0,82) (Figura 1). Las cifras de hemorragia mayor para los grupos warfarina, dabigatran 110 mg bid y dabigatran 150mg bid fueron las siguientes: 3,36%, 2,71% y 3,11%. El grupo dabigatran 110 mg bid era significativamente más seguro que el warfarina (RR 0,80; IC 95% 0,69-0,93). Extraordinariamente llamativa fue la reducción de la incidencia de hemorragia cerebral en las dos ramas de dabigatran (0,12% 110 mg bid; p < 0,001 y 0,10% 150 mg bid; p < 0,001) respecto de la rama warfarina (0,38%) (Figura 2).

Otras 2 moléculas poseen estudios fase III en desarrollo en fibrilación auricular. Se trata de los inhibidores directos y específicos del factor Xa rivaroxaban y apixaban, ambos de administración oral. En ambos casos las dosis elegidas lo han estado en base a resultados de estudios fase II en el ámbito del tratamiento del tromboembolismo venoso.

Rivaroxaban, presenta la  $T_{max}$  a las 2-4 h y una vida media de 9 h, siendo algo mayor en pacientes de edad avanzada (12 h). La biodisponibilidad es muy elevada, detectándose escasas interacciones con fármacos o alimentos. Se elimina como compuesto activo por vía renal en un 30%, siendo dos terceras partes metabolizadas por el hígado. Rivaroxaban está comercializado en Europa con el nombre de Xarelto y con la indicación de profilaxis tromboembólica venosa (TEV) en cirugía ortopédica de cadera y de rodilla en base a cuatro estudios fase III que evidencian superioridad frente a enoxaparina. En fibrilación auricular el estudio fase III ROCKET (NCT004403767) tiene previsto reclutar 14.000 pacientes con  $\geq 1$  factor de riesgo tromboembólico. Se trata de un doble ciego de rivaroxaban 20mg una vez al día (qd) frente a AVK (INR 2-3). En el estudio EINSTEIN<sup>9</sup>, un fase II en pacientes afectados de trombosis venosa profunda, no se evidenció una relación dosis-eficacia entre las ramas de tratamiento de 20 md, 30 mg y 40 mg qd. Tampoco se detectó aumento del riesgo hemorrágico con el incremento de la dosis del fármaco.

Apixaban, también de inicio rápido de actividad ( $T_{max}$  3h), presenta una vida media cercana a 12 h. Es eliminado en un 70% por vía hepatobiliar, siendo la eliminación renal de un 25%. La biodisponibilidad es aproximadamente del 50%. El estudio fase III, doble ciego, ARISTOTLE (NCT 00412984) se desarrolla también en pacientes con fibrilación auricular y factores de riesgo. Compara apixaban 5 mg bid frente a AVK y está planificado para reclutar 15.000 pacientes. En el estudio fase II en tratamiento del TEV para elegir dosis<sup>10</sup>, no se demostró relación dosis-eficacia ni dosis-riesgo hemorrágico entre 5 mg y 10 mg bid.

El panorama de futuro en la profilaxis tromboembólica en pacientes afectados de fibrilación auricular es esperanzador. Dabigatran ha demostrado ser más seguro que warfarina a 110 mg bid, más eficaz que warfarina a 150 mg bid y ambas dosis se han acompañado de una reducción drástica de hemorragias cerebrales.

Las expectativas sobre los otros compuestos son interesantes, con la apuesta de rivaroxaban por una dosis diaria única, y con apixaban, fármaco que se ve menos afectado que otros por la insuficiencia renal. Además la calidad de vida de los pacientes, pudiéndose desvincular de la necesidad de monitorización, con escasos problemas de variabilidad por interacciones con fármacos o con alimentos, y con resolución mucho más sencilla de los inicios o las reversiones, mejorará notablemente. Quizá algunos de los problemas “nuevos” a los que deberemos enfrentarnos son como garantizar una buena adherencia de los pacientes al tratamiento o como minimizar el riesgo de error medicamentoso.

### Bibliografía

1. Singer DE, Albers GW, Dalen JE, Fang MC, Go AS, Halperin JL, Lip GYH, Manning WJ. Antithrombotic Therapy in Atrial Fibrillation. *Chest* 2008 133:546S-592S
2. Schulman S, Beyth RJ, Kearon C, Levine MN. Hemorrhagic Complications of Anticoagulant and Thrombolytic Treatment. *Chest* 2008 133:257S-298S
3. ACTIVE Writing Group of the ACTIVE Investigators, Connolly S, Pogue J, Hart R, Pfeffer M, Hohnloser S, Chrolavicius S, Pfeffer M, Hohnloser S, Yusuf S. Clopidogrel plus aspirin versus oral anticoagulation for atrial fibrillation in the Atrial fibrillation Clopidogrel Trial with Irbesartan for prevention of Vascular Events (ACTIVE W): a randomised controlled trial. *Lancet* 2006; 367: 1903-12
4. The ACTIVE Investigators. Effect of Clopidogrel Added to Aspirin in Patients with Atrial Fibrillation. *N Engl J Med*. 2009; 360
5. Amadeus Investigators, Bousser MG, Bouthier J, Buller HR, Cohen AT, Crijns H, Davidson BL, Halperin J, Hankey G, Levy S, Pengo V, Prandoni P, Prins MH, Tomkowski W, Torp-Pedersen C, Wyse DG. 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
6. Diener HC; Executive Steering Committee of the SPORTIF III and V Investigators. Stroke prevention using the oral direct thrombin inhibitor ximelagatran in patients with nonvalvular atrial fibrillation. Pooled analysis from the SPORTIF III and V studies. *Cerebrovasc Dis* 2006;21:279-93
7. Ezekowitz MD, Reilly PA, Nehmiz G, Simmers TA, Nagarakanti R, Parcham-Azad K, Pedersen KE, Lionetti DA, Stangier J, Wallentin L. 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.
8. Connolly SJ, Ezekowitz MD, Yusuf S, Eikelboom J, Oldgren J, Parekh A, Pogue J, Reilly PA, Themeles E, Varrone J, Wang S, Alings M, Xavier D, Zhu J, Diaz R, Lewis BS, Darius H, Diener HC, Joyner CD, Wallentin L; RE-LY Steering Committee and Investigators. Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med*. 2009; 361: 1139-51.
9. Buller HR, Lensing AW, Prins MH, Agnelli G, Cohen A, Gallus AS, Misselwitz F, Raskob G, Schellong S, Segers A; Einstein-DVT Dose-Ranging Study Investigators. A dose-ranging study evaluating once-daily oral administration of the factor Xa inhibitor rivaroxaban in the treatment of patients with acute symptomatic deep vein thrombosis: the Einstein-DVT Dose-Ranging Study. *Blood*. 2008 Sep 15;112:2242-7
10. Buller HR. A dose finding study of the oral direct factor Xa inhibitor apixaban in the treatment of patients with acute symptomatic deep vein thrombosis—The Botticelli Investigators. *J Thromb Haemost* 2007;5(Suppl):abstract O-S-003

# Nuevos métodos de diagnóstico en hemostasia y trombosis

COORDINADORES: M.<sup>ª</sup>F. LÓPEZ FERNÁNDEZ. *A Coruña*  
P. LLAMAS. *Madrid*

## Resumen del simposio

Desde que se conoce la complejidad del sistema hemostático y las múltiples alteraciones del mismo, ha constituido una verdadera quimera el lograr una prueba de hemostasia global que permitiera el diagnóstico de cada patología, así como la monitorización de su tratamiento y de las complicaciones posibles. Hoy día parece evidente que estamos lejos de alcanzar tan atractivo objetivo. En la mayoría de los casos nos vemos obligados a emplear un conjunto de pruebas de laboratorio, complementarias entre sí, cuyo mejor conocimiento en la práctica asistencial nos permite llevar a cabo con rigor el diagnóstico correcto y, hasta cierto punto, poder aplicar unos rangos de niveles a la hora de establecer el tratamiento más adecuado. Somos conscientes de que se nos escapan aspectos muy importantes, como por ejemplo el riesgo trombótico al que sometemos a un paciente dado cuando con el tratamiento sustitutivo corregimos una deficiencia de un factor concreto. Pero también existen situaciones en las que para corregir un problema hemostático necesitamos emplear productos que no siguen un objetivo de restauración del defecto puntual sino de corregir por vías, no siempre bien conocidas, productos alternativos. Este último caso es el del tratamiento de la hemofilia con inhibidor empleando agentes baipasantes. Como ejemplos de la problemática mencionada, los tres primeros ponentes de este simposio abordan temas de interés en el campo del diagnóstico y tratamiento de alteraciones de la hemostasia.

Precisamente el doctor Víctor Jiménez Yuste, del Hospital Universitario La Paz de Madrid, expone en su ponencia el posible valor de las nuevas pruebas globales de hemostasia, con especial atención al test de generación de trombina (TGT). Esta prueba se está intentando introducir en la práctica clínica, con el objeto de proporcionar información sobre el grado de éxito que logramos con el tratamiento de la difícil situación que supone un inhibidor en hemofilia, así como del posible riesgo de desencadenar complicaciones trombóticas. No obstante, todavía presenta una serie de circunstancias y aspectos poco conocidos que se deben tener muy en cuenta a la hora de la interpretación de sus resultados.

El doctor Javier García Frade, del Hospital Universitario Río Hortega de Valladolid, expone las controversias en el diagnóstico del síndrome antifosfolípido (SAF), dado que en esta entidad tampoco existe una prueba de hemostasia global que permita su diagnóstico. El diagnóstico de SAF depende de la detección de los anticuerpos antifosfolípido (aFL), que se estudian mediante pruebas inmunológicas y coagulométricas, aunque, en ambos casos, faltan métodos reproducibles y estandarizados para determinarlos. La determinación de estos autoanticuerpos, que incluyen anticardiolipina (aCL), anti- $\beta$ 2-GP-I, antiprotrombina y otros aFL, se realiza mediante procedimientos inmunológicos en fase sólida (ELISA), en muchos casos en laboratorios de Inmunología, y mediante procedimientos de coagulación en laboratorios de Hematología. Esta división condiciona que el estudio con frecuencia sea incompleto. Por último, el doctor García Frade comenta los criterios diagnóstico clínicos y de laboratorio del síndrome antifosfolípido y hace referencia a los aspectos controvertidos. Concluye que quedan temas pendientes, como investigar nuevas pruebas que diferencien subpoblaciones específicas de aFL y establecer estudios cooperativos para diagnosticar el SAF.

En el campo de la enfermedad de von Willebrand (EVW) tampoco existe una prueba global específica de esta entidad y por ello se necesitan diversas pruebas complementarias para permitir un diagnóstico más preciso. El doctor Javier Batlle del Complejo Hospitalario Universitario Juan Canalejo, en A Coruña, nos expone en su presentación los aspectos más relevantes del diagnóstico de esta enfermedad, en ocasiones motivo de clara controversia. Algunas de estas pruebas son engorrosas y/o poco sensibles y se viene intentando su sustitución por otras más sensibles y reproducibles. Sin embargo, en muchos casos las nuevas pruebas no han dado resultados consistentes a nivel internacional y todavía no se aconseja su uso generalizado. Al mis-



mo tiempo están surgiendo nuevas metodologías, muy prometedoras, que aportan nueva información práctica que puede explicar fenómenos observados en pacientes que hasta ahora no se entendían bien. Es el caso de la determinación del propéptido del VWF (VWFpp), en forma de razón VWFpp/antígeno del VWF (VWF:Ag), que suministra información sobre la vida media del factor von Willebrand liberado a partir de los depósitos tisulares. Su investigación viene demostrando la breve o escasa respuesta al acetato de desmopresina en pacientes con EVW en las que el VWF mutado presenta una razón VWFpp/VWF:Ag alterada. De ahí su posible empleo para conocer mejor la fisiopatología de las diferentes mutaciones del VWF y su valor a la hora de predecir la respuesta o utilidad del DDAVP en cada paciente. No obstante, la prudencia parece recomendar que se estudien más ampliamente este tipo de nuevas metodologías antes de su generalización rutinaria. De otro lado, el papel de la medicina molecular en la EVW viene demostrando su utilidad a la hora de confirmar una determinada anomalía, si bien esta metodología no se encuentra todavía al alcance de todos los laboratorios. Ante la complejidad que ha adquirido el diagnóstico de la EVW, resulta de interés recordar el panel de pruebas recomendable a emplear y la estrategia a seguir en esta dirección.

Por último, este simposio finaliza con la presentación de la doctora Raquel Mata, de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid, que nos habla del “Día a día en el laboratorio de hemostasia: automatización y modelos de gestión informatizada”. En los últimos años, los laboratorios se han convertido en centros generadores de un gasto importante, por lo que el control de dicho gasto se ha convertido en uno de los objetivos prioritarios de los gestores sanitarios. Ello ha sido debido al aumento continuo de la demanda asistencial producida por el incremento en el número de pruebas a realizar, el envejecimiento de la población o el desarrollo de actividades de investigación. Los sistemas de automatización en el laboratorio se han desarrollado de forma importante en las últimas décadas, lo que ha permitido una mejoría en la calidad y seguridad del proceso, junto con una disminución significativa en los costes y en los tiempos de ejecución. Sin embargo, en la actualidad, aún no se ha generalizado su uso en los laboratorios de hemostasia, aunque probablemente en los próximos años vayan implantándose de forma gradual. Asimismo, es de gran importancia el desarrollo de los sistemas informáticos, que han permitido añadir funcionalidad a los sistemas de información del laboratorio y facilitar la realización de múltiples tareas garantizando una integración de la información dentro del laboratorio, y de éste con el hospital y las áreas de atención extrahospitalaria (atención primaria y especializada).

## UTILIDAD DE LOS TEST DE GENERACIÓN DE TROMBINA EN LA HEMOFILIA

V. JIMÉNEZ YUSTE, I. FERNÁNDEZ, M.T. ÁLVAREZ, M. MARTÍN-SALCES, I. RIVAS, N. BUTTA, A. RODRÍGUEZ DE LA RÚA

*Unidad de Trombosis y Hemostasia.*

*Servicio de Hematología y Hemoterapia.*

*Hospital Universitario La Paz. Madrid*

### Introducción

Los diferentes métodos de laboratorio utilizados de forma habitual juegan un papel importante en el manejo clínico de los pacientes con hemofilia. Como se ha preconizado en los últimos años, el conocimiento de los niveles precisos de factor VIII (FVIII) y del factor IX (FIX) tiene importantes implicaciones en el diagnóstico de la hemofilia, en la determinación de la gravedad de la enfermedad, en la valoración del riesgo de desarrollo de inhibidores, así como en el manejo del tratamiento, tanto en esquemas de profilaxis o si éste se realiza a la demanda<sup>1</sup>. Además, como se ha observado, existe una discrepancia muy variable entre los niveles de FVIII/FIX (condicionados por la alteración molecular –genotipo–) y la clínica de los pacientes –fenotipo–, que acentúa aún más, si cabe, la necesidad de conocer un método más preciso que determine de forma real cuál es el nivel efectivo de FVIII/FIX de los pacientes con hemofilia<sup>2</sup>.

Pero es sin duda en el campo del manejo de los pacientes con hemofilia e inhibidor donde la existencia de métodos adecuados para la monitorización se hace más relevante<sup>3</sup>. Hasta la actualidad los agentes que sortean el efecto del inhibidor (agentes *bypass*) han sido utilizados siguiendo pautas de dosificación empíricas, sin un apoyo definitivo para su monitorización de laboratorio. Sin embargo, estos agentes son potencialmente trombóticos y su respuesta no es igual de predecible que la existente tras la administración del factor deficitario.

A partir del conocimiento del funcionamiento del sistema hemostático a partir de los años cincuenta, se desarrollaron métodos de laboratorio que permitían conocer las diferentes deficiencias de los factores de la coagulación, abandonándose técnicas menos específicas que evaluaban la coagulación desde un punto global<sup>4</sup>. Se reconocieron trece factores de la coagulación, la mayoría de ellos mediante ingeniosas combinaciones de medición de la formación del coágulo. En esta época, quien mejor definió la percepción de los investigadores dedicados al descubrimiento de los diferentes factores fue Rosemary Biggs, cuando dijo que

realmente los experimentos “se parecían a algo similar a cocinar, enriqueciendo el campo de la investigación con un hallazgo tras otro”<sup>5</sup>.

En los últimos años se han reintroducido métodos que evalúan de forma global la función hemostática, pudiendo analizar ambos extremos del equilibrio hemostático, los estados de hipercoagulabilidad y los trastornos con tendencia hemorrágica<sup>6</sup>. De manera particular, el test de generación de trombina (TGT), la tromboelastometría rotacional (roTEG), la fuerza contráctil de las plaquetas, y el denominado Clot Signature Analyzer<sup>®</sup>. La mayor limitación que ofrecen estos métodos es que no existe un punto final que demuestre de forma clara su correlación con el objetivo clínico y que la mayoría de ellos aún no han sido validados. De todos ellos se analizará in extenso el que parece que en la actualidad puede ofrecer una mayor utilidad en el campo de la hemofilia el TGT, no sólo en los pacientes con inhibidor sino también en el análisis y monitorización de los niveles de FVIII/FIX en los pacientes con hemofilia sin inhibidor.

### Principio del test de generación de trombina

Los TGT fueron desarrollados por Hemker con el objeto de medir la cinética global de formación de trombina incluso después de que la formación del coágulo comenzara y, por tanto, medir todos los sistemas de activación e inactivación de la coagulación<sup>7</sup>. Este método determina, de forma general, la situación de la coagulación en plasma y, de forma específica, el proceso dinámico de generación y degradación de la trombina. La curva de generación de trombina (Figura 1) nos aporta información acerca de la fase de latencia, también denominada *lag-time* (LT), que equivale al tiempo de formación del coágulo. Otro parámetro interesante es la pendiente de la curva que corresponde a la tasa de formación de trombina por unidad de tiempo. En esta misma curva podemos analizar dos variables más: el pico máximo de trombina (PH) y el tiempo hasta la obtención de este pico (TTP). De estos parámetros se puede deducir la velocidad de formación de trombina expresada en nM/s (índice de velocidad = pico de trombina / TTP-LT). Asimismo, se puede determinar el área bajo la curva o el potencial endógeno de trombina (ETP), que mide la cantidad de acción que potencialmente puede ser realizada por la trombina, es decir, cuánto de trombina existe y cuánto tiempo está activa.

La generación de trombina es esencial en el proceso hemostático. Los actuales métodos, como el tiempo de protrombina (TP) y el tiempo de cefalina (TC), sólo ofrecen una imagen fija y estática del estado de la coagulación, dado que miden el tiempo en el cual suficiente cantidad de trombina (aproximadamente 10 nM o

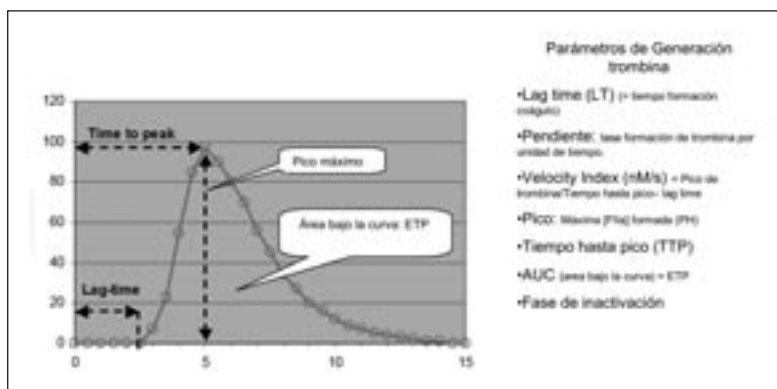


Figura 1. Representación gráfica de la curva de generación de trombina.

el 1% de su potencial real) es suficiente para la formación del coágulo en plasma, sin tener en cuenta el dinamismo de las diferentes vías de formación del mismo (Figura 2).

Además, la determinación de los niveles de los diferentes factores de la coagulación de forma individual no siempre explica de forma precisa la tendencia trombotica o hemorrágica y los síntomas de algunos de estos trastornos. Con la intención de ganar más información detallada del proceso hemostático, especialmente en relación con la dinámica, se desarrollaron los TGT.

Existen diferentes técnicas para la determinación de la generación de trombina. De forma general se pueden dividir en dos grandes grupos: determinación en muestras subdivididas o en muestras de monitorización continua. Las técnicas de muestras subdivididas se dividen a su vez en aquellas que utilizan tecnologías basadas en la formación de coágulo o en métodos amiloidóticos, mientras que la tecnología de evaluación continua utiliza sustratos cromogénicos<sup>8</sup> o métodos fluorogénicos<sup>7</sup>.

Para cada uno de estos métodos, la tasa y el proceso de generación de trombina pueden ser manipulados a través del proceso de inicio de la coagulación (por vía de activación de la fase de contacto o a través de la vía del factor tisular), la concentración y tipo de fosfolípidos, lo que produce que el test sea más o menos sensible a las deficiencias o aumentos de los niveles de los diferentes factores de la coagulación que se hallan en las diferentes vías de la coagulación, la utilización de factor IX activado para potenciar la reacción, la utilización de agentes que potencien la acción de la proteína C y la utilización de inhi-

bidores de la activación de la fase de contacto<sup>9</sup>. Por esto es muy importante, a la hora de interpretar los resultados de TGT, conocer en detalle el tipo y concentración de los reactivos utilizados.

En la actualidad los TGT han sido utilizados de forma más importante en la valoración de los estados de hipercoagulabilidad, como la predicción del riesgo trombotico en mujeres con anticonceptivos orales<sup>10</sup>, para valorar el efecto de diferentes anticoagulantes orales<sup>11</sup> y en la detección de estados de hipercoagulabilidad<sup>12</sup>. En el campo de la hemofilia es más reciente su implantación, especialmente

en dos campos: en el de los pacientes con hemofilia sin inhibidor y en el del control de los agentes *bypass* en pacientes con hemofilia e inhibidor.

### TGT en los pacientes con hemofilia e inhibidor

Existen dos objetivos diferentes a la hora de monitorizar los agentes *bypass* utilizados en el tratamiento de los pacientes con hemofilia e inhibidor<sup>13</sup>. El primero es la capacidad de poder predecir qué pacientes responden y cuáles no a las dosis recomendadas de los fármacos utilizados. El segundo objetivo es tratar de identificar una variable cuantificable y continua que de forma ideal se correlacionase tanto con la eficacia clínica desde el punto de vista hemostático como con el riesgo de trombosis. Actualmente no existe un método único que reúna estas condiciones y sea capaz de un modo fiable y preciso reflejar los efectos procoagulantes o anticoagulantes de los agentes *bypass*<sup>14</sup>.

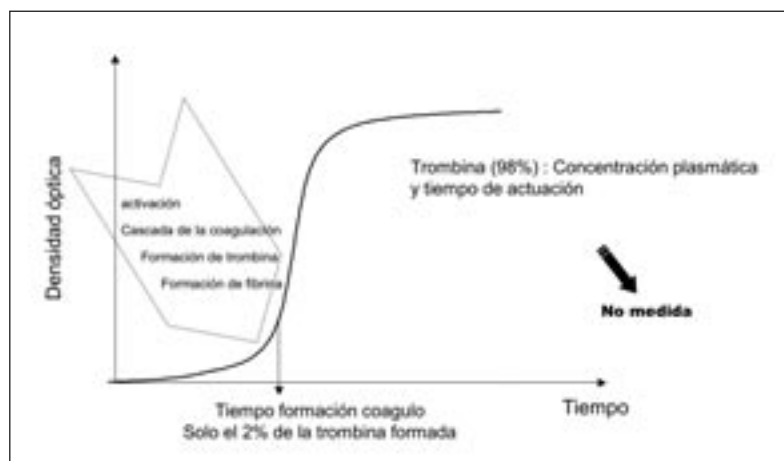


Figura 2. Gráfica de la cantidad de trombina medida por métodos clásicos.

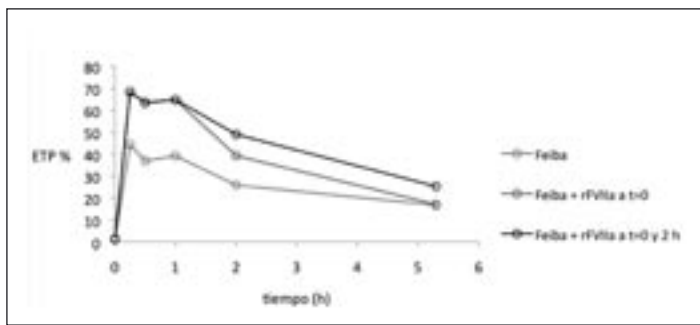


Figura 3. Representación gráfica con FEIBA a 50 unid/kg más una dosis de rFVIIa (90 µg/kg) a los 15 minutos y a las 2 horas de FEIBA.

Las primeras experiencias de Varadi<sup>15</sup> evaluaban la cinética de la generación de trombina en plasma de pacientes con inhibidor tras la administración in vitro de los concentrados del complejo protrombínico activado, FEIBA® (CPPA), o tras la administración de CCPA. A pesar de que no existía generación de trombina en plasma de pacientes con hemofilia e inhibidor, la tasa y el pico de generación de trombina aumentaba de modo dependiente de la dosis tras la administración de CCPA. En pacientes tratados con una sola dosis de CCPA, se observaba un incremento en la generación de trombina a la hora del tratamiento; posteriormente la tasa y el pico de generación de trombina retornaban gradualmente a niveles basales previos con una vida media de 4-7 h<sup>15</sup>. El efecto de CCPA en la generación de trombina varía de forma interindividual en cada paciente. Igualmente, la capacidad de los pacientes con hemofilia e inhibidor de aumentar la generación de trombina tras la administración in vitro de factor VII activado recombinante NovoSeven® (rFVIIa) es dependiente de la dosis<sup>16</sup>. Resultados similares se consiguieron en plasmas ex vivo tras la administración de rFVIIa. Tanto in vitro como ex vivo de las determinaciones en plasma, la tasa de generación de trombina varía en relación con cada paciente estudiado. Cuando se comparan los resultados in vitro y ex vivo, éstos sugieren que los resultados in vitro pueden ser útiles para predecir la dosis mínima efectiva de rFVIIa en cada paciente. En concordancia con el papel jugado por las plaquetas en el mecanismo de acción del rFVIIa, el uso de plasma pobre en plaquetas infraestima en un 30% el efecto del rFVIIa en comparación con el plasma rico en plaquetas<sup>17</sup>. Los TGT han demostrado ser una herramienta útil a la hora de tomar decisiones terapéuticas en pacientes con hemofilia tratados con agentes *bypass*<sup>18</sup>, pero la variabilidad en los resultados obtenidos enfatiza la necesidad de una optimización del método y mayores investigaciones en su relación con su utilidad clínica. A este respecto, en nuestro centro hemos tratado

de evaluar la posibilidad de utilización de TGT en dos pacientes, como modelo para poder predecir la utilización conjunta de forma secuencial de ambos agentes *bypass*, pudiendo establecer así una herramienta de laboratorio, en caso de necesidad, por la gravedad extrema, de utilizar ambos agentes (Figura 3). Nuestros resultados parecen confirmar la utilidad de los TGT en este campo (datos aún sin publicar).

### TGT en los pacientes con hemofilia sin inhibidor

Como se ha indicado, la determinación precisa de los niveles de FVIII y FIX es muy importante en el manejo integral del paciente con hemofilia. Diferentes estudios han observado que entre el 3-10% de los pacientes con hemofilia grave no padecen hemartros o tienen una mínima artropatía<sup>2</sup>. Por otro lado, es interesante destacar que algunos pacientes con hemofilia moderada presentan sangrados similares a los de los pacientes con fenotipo grave. Parece claro, por tanto, que los niveles de FVIII no son el único determinante a la hora de valorar el fenotipo de los pacientes con hemofilia A, y que otros factores diferentes de las concentraciones del factor deficitario influyen en la situación clínica, como es la tendencia hemorrágica y el estado articular.

Diferentes estudios han evaluado el papel de los TGT en la hemofilia. Salvagno *et al.* estudiaron la influencia de los niveles de FVIII:C en TGT tanto in vivo como ex vivo tras la infusión de diferentes concentrados de FVIII<sup>19</sup>. Según los autores los parámetros de TGT podrían ser una herramienta útil para tratar de forma individualizada a los pacientes en función de su patrón hemostático.

Varios trabajos han observado la correlación entre el FVIII:C / FIX:C, determinados de forma basal y ETP, y el pico de trombina<sup>20-22</sup>. En otros trabajos parece observarse una discriminación entre el ETP y el pico de trombina entre sujetos normales y pacientes con diferentes niveles de gravedad de hemofilia<sup>23,24</sup>. Estos estudios también demuestran el importante grado de variabilidad en la generación de trombina entre pacientes con niveles similares de FVIII:C / FIX:C. Del mismo modo, se observa el efecto del tratamiento sustitutivo y en muestras in vitro a las que se les añade el factor en la generación de trombina<sup>21-23</sup>. Estos estudios demuestran un efecto del factor adicionado, pero con diferentes respuestas en pacientes con similares niveles de FVIII:C. Algunos estudios en los que se añade el FVIII exógenamente a las muestras de plasma, sugieren que el ETP y el pico de trombina alcanza un máximo a niveles de FVIII:



C de 0,5-1 UI/mL<sup>21,25</sup> y que el FVIII:C no es ya una limitación en la tasa de trombina por encima de estos niveles. De forma general se puede observar que existe un patrón heterogéneo importante en la generación de trombina a niveles similares de FVIII:C, por lo cual algunos pacientes con hemofilia grave pueden tener niveles de ETP normales de forma basal, mientras que otros presentan valores anormales aun cuando han sido tratados para obtener niveles normales en plasma de FVIII:C. Sin embargo, cada paciente parece tener un patrón típico y una respuesta predecible. Similares observaciones han sido apreciadas por nuestro grupo en pacientes con hemofilia tras ser tratados con FVIII y en estudios de farmacocinética (resultados sin publicar).

### Consideraciones finales

Los TGT y su aplicación al campo de la hemofilia, tanto en pacientes con inhibidor como sin él, ofrecen una herramienta de laboratorio con posibilidades prometedoras. Sin embargo, existen varias consideraciones a tener en cuenta: unas, derivadas de la técnica utilizada y los reactivos aplicados, que pueden hacer que la interpretación de los mismos sea errónea; y otras, relativas a la necesidad de individualización que ha de observarse en la interpretación de los resultados, dado que cada paciente presenta, en las diversas condiciones, un patrón de respuesta diferente a los test de TGT.

### Bibliografía

1. Jiménez Yuste V, Villar A, Quintana M, Hernández Navarro F. Monitorización del factor VIII:C: técnicas coagulativas frente a cromogénicas. *Rev Iberoamer Tromb Hemostasia*. 2001; 14: 3-11.
2. van den Berg HM, De Groot PH, Fischer K. Phenotypic heterogeneity in severe hemophilia. *J Thromb Haemost*. 2007; 5 (Suppl. 1): 151-6.
3. Jiménez-Yuste V, Rodríguez-Merchán EC, Álvarez MT, Quintana M, Fernández I, Hernández-Navarro F. Controversies and challenges in elective orthopedic surgery in patients with hemophilia and inhibitors. *Semin Hematol*. 2008; 45 (2 Suppl. 1): S64-7.
4. Barrowcliffe TW, Cattaneo M, Podda GM, Bucciarelli P, Lusana F, Lecchi A, et al. New approaches for measuring coagulation. *Haemophilia*. 2006; 12 (Suppl. 3): 76-81.
5. Hemker HC. Recollections on thrombin generation. *J Thromb Haemost*. 2008; 6 (2): 219-26.
6. Shima M, Matsumoto T, Ogiwara K. New assays for monitoring haemophilia treatment. *Haemophilia*. 2008; 14 (Suppl. 3): 83-92.
7. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoord R, et al. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2003; 33 (1): 4-15.
8. Hemker HC, Beguin S. Thrombin generation in plasma: its assessment via the endogenous thrombin potential. *Thromb Haemost*. 1995; 74 (1): 134-8.
9. van Veen JJ, Gatt A, Makris M. Thrombin generation testing in routine clinical practice: are we there yet? *Br J Haematol*. 2008; 142 (6): 889-903.
10. Tans G, Curvers J, Middeldorp S, Thomassen 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 (1): 15-21.
11. Lawrie AS, Gray E, Leeming D, Davidson SJ, Purdy G, Iampietro R, et al. A multicentre assessment of the endogenous thrombin potential using a continuous monitoring amidolytic technique. *Br J Haematol*. 2003; 123 (2): 335-41.
12. Faber CG, Lodder J, Kessels F, Troost J. Thrombin generation in platelet-rich plasma as a tool for the detection of hypercoagulability in young stroke patients. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2003; 33 (1): 52-8.
13. Key NS, Nelsestuen GL. Views on methods for monitoring recombinant factor VIIa in inhibitor patients. *Semin Hematol*. 2004; 41 (1 Suppl. 1): 51-4.
14. Sorensen B, Ingerslev J. Tailoring haemostatic treatment to patient requirements: an update on monitoring haemostatic response using thrombelastography. *Haemophilia*. 2005; 11 (Suppl. 1): 1-6.
15. Varadi K, Negrier C, Berntorp E, Astermark J, Bordet JC, Morfini M, et al. Monitoring the bioavailability of FEIBA with a thrombin generation assay. *J Thromb Haemost*. 2003; 1 (11): 2374-80.
16. Dargaud Y, Lienhart A, Negrier C. Monitoring of rFVIIa by thrombin generation test. *J Thromb Haemost*. 2007; 5 (Suppl. 2): abstract P-M-176.
17. Dargaud Y, Lambert T, Trossaert M. New advances in the therapeutic and laboratory management of patients with haemophilia and inhibitors. *Haemophilia*. 2008; 14 (Suppl. 4): 20-7.
18. Dargaud Y, Lienhart A, Meunier S, Hequet O, Chavanne H, Chamourard V, et al. Major surgery in a severe haemophilia A patient with high titre inhibitor: use of the thrombin generation test in the therapeutic decision. *Haemophilia*. 2005; 11(5): 552-8.
19. Salvagno GL, Astermark J, Lippi G, Ekman M, Franchini M, Guidi GC, et al. Thrombin generation assay: a useful routine check-up tool in the management of patients with haemophilia? *Haemophilia*. 2009; 15 (1): 290-6.
20. Chantarangkul V, Clerici M, Bressi C, Giesen PL, Tripodi A. Thrombin generation assessed as endogenous thrombin potential in patients with hyper- or hypo-coagulability. *Haematologica*. 2003; 88 (5): 547-54.
21. Beltrán-Miranda CP, Khan A, Jaloma-Cruz AR, Laffan MA. Thrombin generation and phenotypic correlation in haemophilia A. *Haemophilia*. 2005; 11 (4): 326-34.
22. Dargaud Y, Beguin S, Lienhart A, Al Dieri R, Trzeciak C, Bordet JC, et al. Evaluation of thrombin generating capacity in plasma from patients with haemophilia A and B. *Thromb Haemost*. 2005; 93 (3): 475-80.
23. Siegemund T, Petros S, Siegemund A, Scholz U, Engelmann L. Thrombin generation in severe haemophilia A and B: the endogenous thrombin potential in platelet-rich plasma. *Thromb Haemost*. 2003; 90 (5): 781-6.
24. Luddington R, Baglin T. Clinical measurement of thrombin generation by calibrated automated thrombography requires contact factor inhibition. *J Thromb Haemost*. 2004; 2 (11): 1954-9.
25. McIntosh JH, Owens D, Lee CA, Raut S, Barrowcliffe TW. A modified thrombin generation test for the measurement of factor VIII concentrates. *J Thromb Haemost*. 2003; 1 (5): 1005-11.

## CONTROVERSIAS EN EL DIAGNÓSTICO DEL SÍNDROME ANTIFOSFOLÍPIDO

L.J. GARCÍA FRADE, J.M. MARTÍN ANTORÁN, E. FERNÁNDEZ FONTECHA

Servicio de Hematología. Hospital Universitario Río Hortega. Valladolid

### Introducción

En 1985, Graham Hughes introdujo el término *síndrome antifosfolípido* (SAF) para caracterizar a un grupo de pacientes con trombosis y/o complicaciones recurrentes del embarazo que tenían anticuerpos antifosfolípido (aFL) en plasma<sup>1</sup>. Desde entonces, la detección de aFL se ha considerado un factor de alto riesgo para el desarrollo de tromboembolismo, que puede condicionar una modificación del tratamiento de este proceso<sup>2</sup>.

Las manifestaciones clínicas del síndrome, trombosis y morbilidad en el embarazo, son relativamente frecuentes y en la mayoría de los casos no tienen relación con aFL. El diagnóstico de SAF depende de la detección de aFL. Éstos se estudian mediante pruebas inmunológicas y coagulométricas; en ambos casos faltan métodos reproducibles y estandarizados para determinarlos<sup>3</sup>.

El nombre *síndrome antifosfolípido* es un motivo de confusión, pues los autoanticuerpos generalmente no están dirigidos contra fosfolípidos sino contra proteínas plasmáticas ( $\beta$ 2-GP-I, protrombina) unidas a fosfolípidos aniónicos. La determinación de estos autoanticuerpos, que incluyen anticardiolipina (aCL), anti- $\beta$ 2-GP-I, antiprotrombina y otros aFL (Tabla 1), se realiza mediante procedimientos inmunológicos en fase sólida (ELISA), en muchos casos en laboratorios de inmunología, y mediante procedimientos de coagulación en laboratorios de hematología; esta división condiciona que el estudio con frecuencia sea incom-

pleto. El hecho de que un paciente presente autoanticuerpos con diferentes especificidades ( $\beta$ 2-GP-I, dominio I, fosfolípidos, protrombina, anexina V, etc.) determina que se precisen múltiples ensayos para su detección.

### Criterios diagnósticos

El diagnóstico de SAF se basa en criterios clínicos y de laboratorio. Hasta 1999 se utilizaron los criterios propuestos por Harris<sup>4</sup>, que incluían anticuerpos aCL, IgG e IgM, en títulos moderados/altos y la detección de anticoagulante lúpico (AL), confirmados tras un intervalo de al menos 6 semanas.

En la conferencia de consenso internacional desarrollada en Sapporo en 1999 se establecieron nuevos criterios clínicos y de laboratorio para definir una población de pacientes homogénea con fines de investigación<sup>5</sup>. Sin embargo, no se considera preciso cumplir todos los criterios para el diagnóstico clínico. La propuesta de Sapporo fue sometida a validación en 243 pacientes<sup>6</sup>, demostrando una sensibilidad de 0,71, especificidad de 0,98, valor predictivo positivo de 0,95 y negativo de 0,88, confirmándose su utilidad para ensayos clínicos.

Los criterios de Sydney en 2006<sup>7</sup> constituyen una puesta al día de Sapporo, con incorporación de la determinación de  $\beta$ 2-GP-I, IgG e IgM, mejor definición del título y extensión del tiempo mínimo entre dosificaciones a 12 semanas (Tabla 2). Se ha eliminado la condición de que aCL deba realizarse con un test dependiente de  $\beta$ 2-GP-I. En los criterios de Sydney se recomienda estratificar a los pacientes en *tipo I* si presentan más de un criterio de laboratorio; en *Ila* si tienen AL; en *Ilb* si aCL; y en *Ilc* si anti- $\beta$ 2-GP-I.

Como señala Galli<sup>8</sup>, la decisión de incluir estas tres determinaciones presenta el riesgo de diagnosticar como SAF a pacientes que no tienen el síndrome y someterlos así a un tratamiento innecesario.

Tabla 1. Clasificación de anticuerpos antifosfolípidos

aFL	Término general para anticuerpos antifosfolípidos (aCL, anti- $\beta$ 2-GP-I, aPT, AL, etc.)
aCL	Anticuerpos contra cardiolipina detectados por ELISA
Anti- $\beta$ 2-GP-I	Anticuerpos contra $\beta$ 2-GP-I detectados por ELISA
aPT	Anticuerpos contra protrombina detectados por ELISA
aFS/PT	Anticuerpos contra complejo fosfatidilserina-protrombina detectados por ELISA
AL	Anticuerpos anticoagulante lúpico, detectados por pruebas de coagulación, con especificidad para $\beta$ 2-GP-I o protrombina
aFE, aFS	Anticuerpos contra fosfolípidos diferentes de cardiolipina (fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina) detectados por ELISA
aAnA5	Anticuerpos contra anexina A5 detectados por ELISA

Tabla 2. Criterios de clasificación del SAF\*

<b>Criterios clínicos</b>	1. Trombosis vascular	Uno o más episodios de trombosis arterial o venosa en cualquier tejido u órgano. Cualquier evento trombotico debe ser confirmado con métodos objetivos y validados
	2. Morbilidad del embarazo	Una o más muertes fetales inexplicables (fetos morfológicamente normales) con más de 10 semanas de gestación o uno o más partos prematuros de recién nacidos normales antes de las 34 semanas de gestación por eclampsia, preeclampsia severa o insuficiencia placentaria o tres o más abortos consecutivos antes de las 10 semanas de gestación sin anomalías anatómicas u hormonales maternas ni anomalías cromosómicas de ambos progenitores
<b>Criterios de laboratorio</b>	1. Anticoagulante lúpico	Presente en más de dos ocasiones (con un intervalo de 12 semanas), detectado con las guías de la ISTH
	2. Anticuerpos anticardiolipina, IgG o IgM en títulos medios o altos (> 40 GPL o MPL)	Presentes en dos o más ocasiones con un intervalo de 12 semanas, determinado con ELISA estandarizado
	3. Anticuerpos anti-β2-GP-I, IgG o IgM en títulos > percentil 99%	Presentes en dos o más ocasiones con un intervalo de 12 semanas, determinado con ELISA estandarizado

\*Se obtiene el diagnóstico de SAF si al menos se dan un criterio clínico y uno de laboratorio. FUENTE: International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost.* 2006; 4: 295-306.

### Determinación de anticardiolipina, anti-β2-GP-I y nuevos aFL

Es posible diferenciar anticuerpos dirigidos contra cardiolipina y otros fosfolípidos, anticuerpos anticardiolipina que precisan β2-GP-I y anti-β2-GP-I independientes de fosfolípido.

La determinación de aCL constituye un método sensible para el diagnóstico pero falto de especificidad. Los anticuerpos aCL de isotipo IgG o IgM se expresan en unidades GPL y MPL, respectivamente. Existe una gran variabilidad de resultados para aCL entre diferentes laboratorios. La concordancia mejora añadiendo medidas semicuantitativas a los resultados en unidades (positivo alto ≥ 80 U, medio 20-80 U); por encima de 80 U y por debajo de 20 U los resultados no son fiables. Existe discusión sobre la utilización de anticuerpos policlonales o monoclonales en la calibración de aCL. Los policlonales derivan de pacientes y son poliespecíficos, fueron preparados con una mezcla de sueros de pacientes con diferentes concentraciones y especificidades de autoanticuerpos y se establecieron como calibradores primarios. Los monoclonales permiten utilizar un componente de forma indefinida pero tienen afinidad única. Se precisa establecer el rango de normalidad y los valores de corte en cada laboratorio con una muestra de plasmas normales superior a 50. La aplicación de tecnologías cada vez más automatizadas puede incrementar los problemas de estandarización.

Se ha descrito hasta un 10% de donantes sanos con aCL positivos, habitualmente en título bajo; tan sólo un 1,5% se mantienen positivos en un segundo estudio<sup>9</sup>. Aumentos transitorios de aCL se pueden observar en infecciones, generalmente víricas y en trata-

miento con fenotiacinas, hidralacina, procainamida y fenitoína.

La determinación de aCL es útil, pero debe realizarse conjuntamente con AL en aquellos pacientes con sospecha de SAF. Su determinación debe completarse con la determinación de anticuerpos anti-β2-GP-I.

La unión de aFL a fosfolípidos se realiza por medio de proteínas plasmáticas, siendo β2-GP-I el antígeno principal. β2-GP-I es un antígeno relativamente específico para autoanticuerpos presentes en el plasma de pacientes con SAF, carece de calibrador establecido aunque la adopción de calibradores monoclonales por su estabilidad y disponibilidad puede paliar este problema. Respecto a la estandarización de su determinación, pueden influir factores como tipo de placa utilizada, fuente y pureza de β2-GP-I y concentración que se utiliza al cubrir la placa<sup>10</sup>.

Los numerosos ensayos comerciales para aCL y β2-GP-I no identifican el mismo tipo de muestras como positivas. La reproducibilidad entre diferentes laboratorios es pobre. Algunos pacientes con clínica de SAF presentan determinaciones negativas de aCL, anti-β2-GP-I y AL; en tales casos se deben determinar otros anticuerpos aFL, una vez que se haya descartado la deficiencia de factores de coagulación o la presencia de inhibidores específicos.

En el SAF se han demostrado anticuerpos de las tres principales clases de inmunoglobulinas, IgA, IgG e IgM, capaces de reaccionar con proteínas unidas a fosfolípidos. Existe evidencia de IgA aCL y anti-β2-GP-I, siendo la utilidad de IgA aCL similar a IgG en cuanto a trombogenicidad. Debido a su baja prevalencia de forma aislada, sólo se recomienda su determinación cuando son negativos IgG e IgM aCL y existe un alto grado de sospecha de SAF.

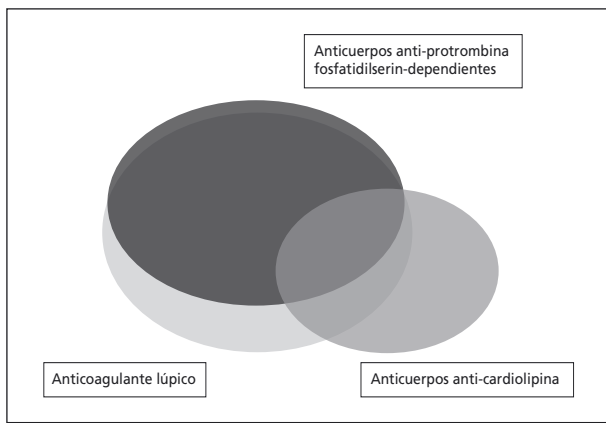


Figura 1. Distribución de aFL (aCL, aPS/PT, AL) en pacientes con síndrome antifosfolípido. FUENTE: Atsumi. *Arthritis Rheum.* 2000; 43: 1982.

Los nuevos test para anticuerpos específicos contra el dominio I de  $\beta 2$ -GP-I, protrombina, complejo fosfatidilserina-protrombina (PS/PT), fosfolípidos con carga negativa, anexina A5, no son tan sensibles como aCL y su significación clínica no está establecida. Los anticuerpos contra el dominio I de  $\beta 2$ -GP-I parecen correlacionarse con la aparición de trombosis, y aún no está claro que sean los únicos anticuerpos patogénicos<sup>11</sup>.

Los anticuerpos antiprotrombina constituyen una población heterogénea que comprende anticuerpos dirigidos sólo contra protrombina y anticuerpos contra PS/PT. Estos últimos se correlacionan con la presencia de AL y se ha sugerido que podrían utilizarse como prueba confirmatoria (Figura 1). Su determinación en 441 pacientes con enfermedades autoinmunes, incluyendo 152 pacientes con SAF (84 primario y 68 secundario a LES), demuestra su alta prevalencia en este síndrome en relación con otras enfermedades autoinmunes, y su determinación se ha propuesto como candidata a criterio de laboratorio para la clasificación de SAF<sup>12</sup>.

Se hace evidente la necesidad de realizar estudios prospectivos que permitan determinar el valor predictivo de los diferentes ensayos disponibles.

### Determinación de anticoagulante lúpico

La detección del anticoagulante lúpico se remonta a 1952, cuando Conley y Hartmann<sup>13</sup> demostraron en el plasma de pacientes con LES la existencia de una actividad anticoagulante in vitro que posteriormente se comprobó asociada a tendencia trombótica. El diagnóstico de AL comienza cuando se detecta alargado un tiempo de coagulación dependiente de fosfolípidos. Debido a la heterogeneidad de los aFL, no existe actualmente ninguna prueba que tenga sensibilidad o especificidad del 100%. Se recomienda el uso de dos

metodologías con distintos principios analíticos y cada una con distintas concentraciones de fosfolípidos. Los métodos más utilizados han sido: tiempo de trombo-plastina parcial activada (TTPa), tiempo de trombo-plastina parcial activada sensibilizada (TTPad), tiempo de protrombina diluida (TPd), tiempo de veneno de víbora de Russell diluido (TVVRd), tiempo de coagulación de kaolín (TCK), tiempo de coagulación de sílica (TCS) y tiempo de textarina.

La aplicación de pruebas de coagulación para diagnosticar AL se basa aún en los criterios establecidos en 1995 por el ISTH-SCC<sup>14</sup>: utilización de plasma con un recuento residual de plaquetas  $< 10 \times 10^9/L$ , prolongación de al menos un test de coagulación dependiente de fosfolípidos, falta de corrección tras mezcla con plasma normal, corrección del test prolongado tras la adición de fosfolípidos y exclusión de otra posible coagulopatía. No hay acuerdo sobre cómo expresar los resultados ni sobre el grado de corrección a alcanzar con la adición de fosfolípidos. También falta por establecer el tipo y combinación de test que proporcionen suficiente sensibilidad y especificidad para el diagnóstico y la forma de estudio en pacientes tratados con anticoagulantes<sup>8</sup>.

Las pruebas de laboratorio para demostrar AL no están estandarizadas, se pueden utilizar diferentes combinaciones de pruebas de escrutinio y pruebas confirmatorias (Figura 2). Los test más utilizados, TTPa y TVVR diluido, no son suficientemente sensibles, y por ello es preciso realizar al menos dos pruebas diferentes antes de descartar un AL, ningún test aislado es positivo para todos los AL. El TTPa puede ser negativo en aproximadamente la mitad de las muestras. Por otra parte, encontrar un TTPa prolongado y demostrar un efecto inhibitorio en una prueba de mezclas no es suficiente para el diagnóstico de AL, la presencia de heparina o de inhibidores específicos contra un factor pueden producir el mismo efecto.

En la prueba de mezclas la proporción de plasma de paciente y plasma normal varía: la más común es 1:1. La sensibilidad de la prueba depende en gran medida de la valoración de los resultados. Se puede aplicar a la prueba de mezclas un porcentaje de corrección del 70% o el índice de Rosner; cuanto mayor sea ( $>15$ ), más probabilidad de AL. Este índice tiene sensibilidad del 93% y especificidad del 82%. Ambos pueden ser útiles para estandarizar los resultados y evitar diagnósticos incorrectos<sup>15</sup>. La normalización de las pruebas de escrutinio al añadir fosfolípidos en exceso al plasma es la base para demostrar la dependencia de fosfolípidos. La neutralización se puede realizar a partir de plaquetas humanas, con fosfolípidos en fase hexagonal o con reactivos con alto contenido en fosfolípidos. No se dispone de plasma de calibración homologado; como control de calidad se puede utilizar plasma al que se ha incorporado un anticuerpo monoclonal con actividad AL, y es muy aconsejable utilizar cocientes normali-



zados en las pruebas de escrutinio y confirmatorio.

Cuando nos encontramos ante un paciente en tratamiento anticoagulante, hay que recordar que no se debe realizar la determinación en pacientes tratados con dicumarínicos y suspender el tratamiento una o dos semanas antes del estudio. No obstante, en pacientes con riesgo elevado de recurrencia podría hacerse con INR inferior a 3,5<sup>7</sup>; en este caso el plasma del paciente se diluye 1:2 con plasma normal. Probablemente es preferible utilizar HBPM, con la que es posible la medición siempre que la actividad anti-Xa esté en rango terapéutico<sup>16</sup>. En pacientes con heparina no fraccionada no se puede detectar AL. El efecto de inhibidores de Xa como fondaparinux y rivaroxabán y de los inhibidores directos de trombina necesitará ser estudiado en muestras de pacientes.

Es preciso definir la menor combinación de pruebas que alcance suficiente sensibilidad y especificidad para el diagnóstico. Todos los autores están de acuerdo en la necesidad de actualizar los criterios de la ISTH de 1995. Temas pendientes son el procesamiento de las muestras, elección de pruebas y procedimientos (mezcla, test confirmatorio), expresión de los resultados, interpretación de la prueba de mezclas y del grado de corrección que inducen los fosfolípidos en exceso.

### Práctica actual

El estudio realizado por Moffat *et al.*<sup>17</sup> sobre las prácticas actuales en 113 laboratorios de Norteamérica (NASCOLA) y 96 europeos (ECAT) demuestra que para la determinación de AL los test más utilizados son TTPa sensibilizado y TVVR diluido, con corrección por fosfolípidos hexagonales. La mayoría utiliza un mínimo de dos pruebas, siendo una de ellas con concentración baja de fosfolípidos. El índice de Rosner para la prueba de mezclas se aplicó en el 53% de los laboratorios europeos pero sólo por un 17% de los norteamericanos. La presentación de los resultados de TVVRd escrutinio/confirmatorio en forma nor-

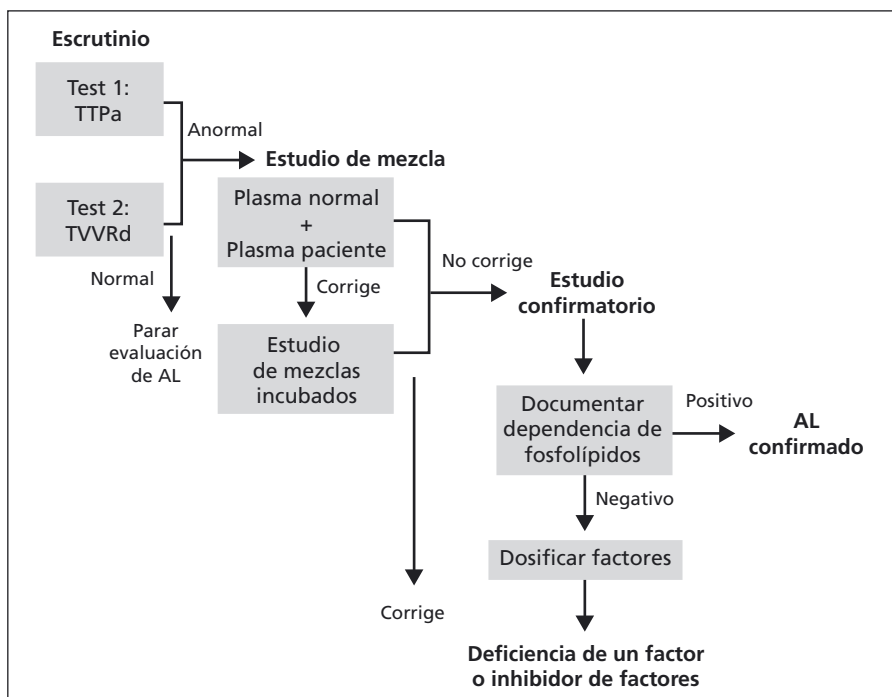


Figura 2. Algoritmo diagnóstico de anticoagulante lúpico. Se deben realizar dos pruebas de escrutinio basadas en diferentes propiedades para descartar la presencia de AL. Si cualquiera de ellas es anormal, realizar prueba de mezclas y, si no corrige, test confirmatorio. Se han de dosificar factores si la prueba de mezclas corrige, el confirmatorio es negativo o hay sospecha de inhibidor específico. Fuente: Brandt: *Thromb Haemost.* 1995; 74: 1185.

malizada fue más frecuente en laboratorios europeos (39%) que norteamericanos (17%). Tan sólo una minoría (35%) siguió la recomendación de excluir deficiencia de factor o un inhibidor específico. La mayoría (78%) determinaron aCL, mientras que un número menor (46%) valoró anti-β2-GP-I.

### Significado clínico

Es esencial establecer el perfil de riesgo de cada paciente para guiar la terapia antitrombótica. El valor clínico de los diversos anticuerpos no está bien definido. Diferentes estudios han señalado que la actividad AL presenta mayor riesgo de trombosis que aCL. Otros estudios responsabilizan a anti-β2-GP-I de la patogenicidad de aFL (Figura 3). El riesgo de tromboembolismo puede aumentar con el título de aFL y con el número de diferentes especificidades presentes. En un estudio de casos y controles con 208 pacientes con sospecha de SAF<sup>18</sup>, el aumento del título de IgG aCL se asoció con un aumento en el riesgo de tromboembolismo, incluso tras el ajuste de los factores de riesgo cardiovascular. Además, cada especificidad adicional de aFL (aCL+ vs. aCL+AL+ vs. aCL+AL+anti-β2-GP-I+) aumentó la probabilidad de tromboembolismo entre el 50-70%.

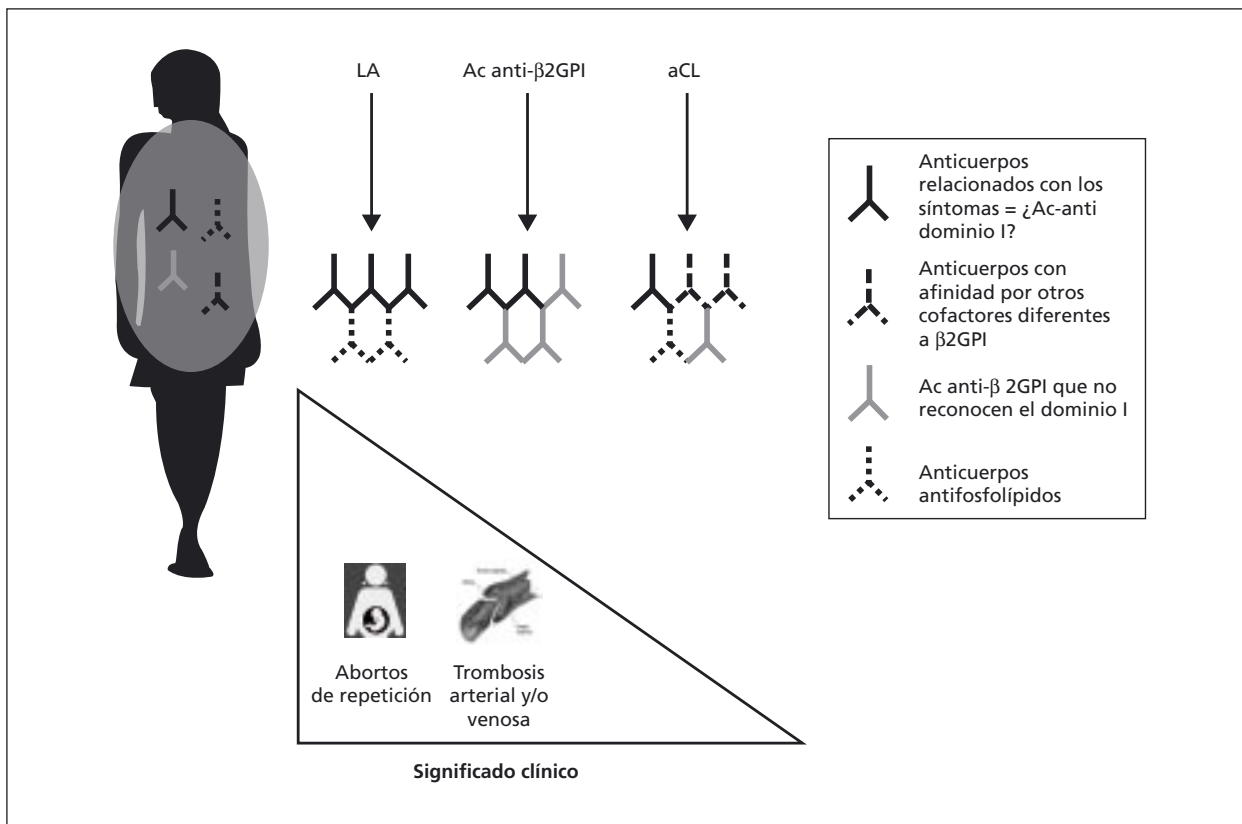


Figura 3. Significación clínica de las pruebas para detectar aFL. FUENTE: Oku. *Semin Thromb Hemost.* 2008; 34 (4): 335.

En el mismo sentido, el estudio retrospectivo realizado por Pengo *et al.*<sup>19</sup> sobre 100 pacientes con aFL demostró que la triple positividad para AL, aCL y anti-β2-GP-I se asoció con el mayor riesgo de trombosis con una OR superior a 33. Cuando se analizaron de forma individualizada, sólo AL y anti-β2-GP-I se asociaron con trombosis (OR: 4,4 y 2,9). El estudio prospectivo de Forastiero *et al.*<sup>20</sup>, con 194 pacientes, demostró que la triple positividad para AL, IgG anti β2-GP-I e IgG aPT presentó la mayor incidencia anual de trombosis (8,4%) (OR: 2,6). La positividad combinada de AL e IgG anti-β2-GP-I fue marginalmente significativa (OR 1,62; IC 95%: 1,00-2,39; p = 0,008); este estudio no demostró ninguna asociación significativa para los anticuerpos de isotipo IgM.

La evidencia señala que los pacientes que registran más de un test positivo tienen mayor riesgo y, por ello, es necesario realizar un panel de aFL. Queda por resolver el significado de los pacientes con una sola prueba positiva.

### Conclusiones

- Los criterios de valoración de anticoagulante lúpico se remontan al año 1995 y están pendientes de ac-

tualizarse. Los criterios clínicos y de laboratorio del síndrome antifosfolípido fueron revisados en el año 2006.

- En la práctica diaria el estudio de estos pacientes en muchas ocasiones no se adapta a las guías internacionales. El hecho de que las pruebas biológicas sean solicitadas de forma independiente a laboratorios de hematología e inmunología condiciona que el estudio sea heterogéneo.

- La diversidad de antígenos y anticuerpos involucrados en el síndrome antifosfolípido es la causa de que existan múltiples dificultades aún por resolver en la estandarización de las pruebas biológicas, procesamiento de las muestras, tipo y combinación de pruebas a realizar, aplicación de estándares de referencia y expresión de resultados.

- En el momento presente, se hace necesario unificar criterios, controlar las solicitudes incompletas, seguir las guías internacionales y realizar tanto inmunoensayos (aCL, anti-β2-GP-I) como pruebas de coagulación (TTPa, TVVRd), establecer valores de corte del laboratorio y poner en común la expresión de los resultados. Queda pendiente investigar nuevas pruebas que diferencien subpoblaciones específicas de aFL y establecer estudios cooperativos para diagnosticar SAF.

## Bibliografía

- Hughes GR. The anticardiolipin syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1985; 3: 285-286.
- Levine JS, Branch DW, Rauch J. The antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med* 2002; 346: 752-763.
- De Groot PG, Derksen RHW, De Laat B. Twenty-two years of failure to set up undisputed assays to detect patients with the antiphospholipid syndrome. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 2008; 34 (4): 347-355.
- Harris EN. Antiphospholipid antibodies. *Br J Haematol*. 1990; 74: 1-9.
- Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1309-1311.
- Lockshin MD, Samartano LR, Schwartzman S. Validation of the Sapporo criteria for antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 440-443.
- Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4: 295-306.
- Galli M, Reber G, De Moerloose P, De Groot G Invitation to a debate on the serological criteria that define the antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 399-401.
- Vila P, Hernández MC, Lopez-Fernández MF, Battle J. Prevalence, follow-up and clinical significance of the anticardiolipin antibodies in normal subjects. *Thromb Haemost* 1994; 72: 20; 209-213.
- Reber G, Boehlen F, De Moerloose P. Technical aspects in laboratory testing for antiphospholipid antibodies: is standardization an impossible dream? *Sem Thromb Hemost* 2008; 34(4): 340-346.
- De Laat B, Derksen RHW, Urbanus RT, De Groot PG. IgG antibodies that recognize epitope Gly40-Arg43 in domain I of  $\beta$ 2-Glycoprotein causes LAC and their presence correlate strongly with thrombosis. *Blood* 2005; 105: 1540-1545.
- Atsumi T, Ieko M, Bertolaccini ML, Ichikawa K, Tsutsumi A, Matsuura A et al. Association of autoantibodies against the phosphatidylserine-prothrombin complex with manifestations of the antiphospholipid syndrome and with the presence of lupus anticoagulant. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1982-1993.
- Conley CL, Hartmann RC. A hemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1952; 31: 621-622.
- Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1185-1190.
- Devreese KMJ. Interpretation of normal plasma mixing studies in the laboratory diagnosis of lupus anticoagulant. *Thromb Res* 2007; 119: 369-376.
- Liestol S, Wisloff F. Effect of subcutaneous administration of dalteparin on lupus anticoagulant assays. *Thromb Res* 2005; 115: 509-517.
- Moffat KA, Ledford-Kraemer MR, Plumhoff E, McKay H, Nichols WL, Meijer P et al. Are laboratories following published recommendations for lupus anticoagulant testing? An international evaluation of practices. *Thromb Haemost* 2009; 101: 178-184.
- Neville C, Rauch J, Kassis J, Chang ER, Joseph L, Le Comte M et al. Thromboembolic risk in patients with high titre anticardiolipin and multiple antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 2003; 90: 108-115.
- Pengo V, Biasiolo A, Pegoraro C, Cucchini U, Noventa F. Antibody profiles for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 2005; 93: 1147-1152.
- Forastiero R, Martinuzzo M, Pombo G, Puente D, Rossi A, Celebrin L et al. A prospective study of antibodies to B2-GPI and prothrombin and risk of thrombosis. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1231-1238.

## MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EN LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND

J. BATLLE, A. PÉREZ-RODRÍGUEZ, E. LOURÉS FRAGA, Á. RODRÍGUEZ TRILLO, M.F. LÓPEZ-FERNÁNDEZ

*Servicio de Hematología y Hemoterapia e INIBIC. Complejo Hospitalario Universitario. A Coruña. Departamento de Medicina. Universidad de Santiago de Compostela (A Coruña)*

### Introducción

La enfermedad de von Willebrand (EVW) es un trastorno hemorrágico de herencia autosómica, debido a una alteración cualitativa o cuantitativa de la proteína del factor de von Willebrand (FVW). A pesar de ser el trastorno hemorrágico hereditario más frecuente, su identificación y diagnóstico es difícil debido a la variabilidad en su expresión clínica así como por las limitaciones de los métodos de laboratorio disponibles<sup>1-4</sup>. Por ello, con frecuencia no es fácil la clasificación de un paciente determinado en una de las categorías concretas aceptadas.

Se han descrito tipos y subtipos diferentes basados en las características fenotípicas de la proteína y del genotipo del FVW. En la Tabla 1 se especifica la nomenclatura recomendada internacionalmente de cada una de las propiedades del FVW<sup>5</sup>. La clasificación actualizada recientemente por el Subcomité del FVW de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (ISTH-SCC VWF) es la más admitida<sup>6</sup>. En ella se considera que la EVW no se limita a mutaciones exclusivamente localizadas en el locus genético del FVW, y establece tres niveles jerárquicos: en el primero distingue los trastornos cuantitativos parciales (tipo 1) o totales (tipo 3), de las formas moleculares

Tabla 1. FVW y sus propiedades. Nomenclatura recomendada

Atributo	Nomenclatura
Proteína madura	FVW
Antígeno	FVW: Ag
Actividad como cofactor de la ristocetina	FVW:RCo
Capacidad de unión al colágeno	FVW:CB
Capacidad de unión al FVIII	FVW:FVIII B
Propéptido	FVWpp

Tabla 2. Clasificación revisada y actualizada de la EVW

Tipo	Descripción
1	Deficiencia cuantitativa parcial del FVW
3	Deficiencia completa del FVW
2	Deficiencia cualitativa del FVW
2A	Disminución de la adhesión plaquetaria dependiente del FVW con deficiencia selectiva de los MAPM
2B	Aumento de la afinidad del FVW por la glicoproteína Ib.
2M	Disminución de la adhesión plaquetaria dependiente del FVW sin deficiencia selectiva de los MAPM
2N	Marcada disminución de la afinidad del FVW por el FVIII.

MAPM: multímeros de alto peso molecular del FVW. FUENTE: Sadler. *J Thromb Haemost* 2006.

res anormales (tipo 2). En el segundo nivel se diferencian cuatro tipos diferentes: A, B, M y N. En el tercer nivel se tienen en cuenta aspectos fenotípicos particulares que no se reflejan en los niveles anteriores, como es el subtipo Vicenza, u otras formas con ca-

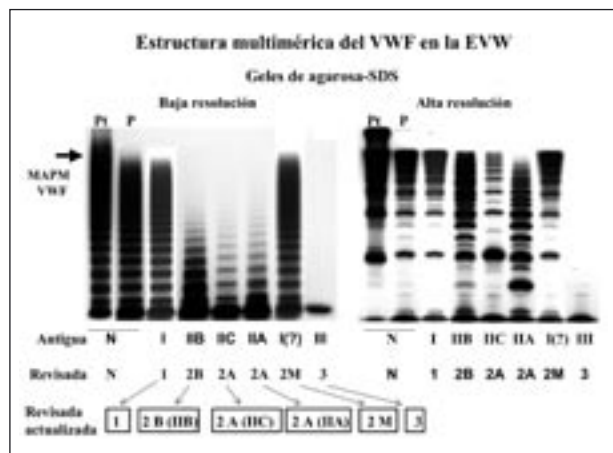


Figura 1. Análisis multimérico del FVW en la EVW mediante electroforesis en geles de agarosa SDS. Lisado plaquetario (Pt) y plasmas de sujeto normal (N) y plasmas de pacientes con EVW tipos 1, 2A (IIA), 2A (IIC), 2B (IIB), 2M y 3. Puede verse la equivalencia entre las nomenclaturas previas, antigua y la revisada, así como la revisada actualizada empleada en la actualidad. Empleando geles de baja resolución el plasma normal (N) presenta una serie lineal de multímeros del FVW de distinto tamaño molecular. En el lisado plaquetario (Pt) normal existen multímeros supranormales (flecha gruesa) en comparación con el plasma correspondiente. En el tipo 1 se aprecia una disminución global de todos los multímeros, El tipo 2A se caracteriza por una ausencia de los multímeros de alto peso molecular (MAPM), lo que también ocurre en algunas formas 2B [2B(IIB)]. El tipo 3 muestra una carencia prácticamente total del FVW. En geles de alta resolución, cada multímero presenta un complejo patrón de bandas satélites, cuya proporción relativa varía de acuerdo con el tipo de EVW. Por ejemplo, en el tipo 2A (IIA) la proporción relativa de las bandas satélites se encuentra muy aumentada comparativamente con la del sujeto normal; por el contrario, en la forma 2A (IIC) se aprecia un patrón aberrante de bandas.

racterísticas peculiares tales como los antiguos subtipos IIA, IIB, IIC, y muchos otros. En la Tabla 2 se indican las características de los tipos y subtipos dentro de los dos primeros niveles jerárquicos. En la Figura 1 se presenta una comparación entre la clasificación actual (revisada y actualizada) y las previas (antigua y la revisada).

El interés de un correcto diagnóstico y clasificación de la EVW no es puramente académico o científico, sino que conlleva importantes implicaciones terapéuticas y sociolaborales que son clave para efectuar un adecuado consejo genético.

### Diagnóstico de la EVW

Requiere tanto de la evaluación clínica como de laboratorio. La primera es crítica ya que constituye el primer paso en la identificación de aquellas personas que puedan beneficiarse o no de una evaluación analítica posterior. La evaluación clínica incluye una historia personal y familiar de diátesis hemorrágica detallada<sup>1,2</sup>. El estudio de laboratorio es crítico también, pero en numerosas ocasiones se realiza pobremente o no se interpreta de manera adecuada<sup>3</sup>.

Diversos estudios han puesto en evidencia inconsistencias en el diagnóstico de la EVW entre laboratorios considerados como “expertos”, como es el caso de la caracterización inicial como tipo 1 de pacientes que, tras un nuevo análisis, deben encuadrarse en el tipo 2<sup>3,7-10</sup>.

### Evaluación clínica

Debe enfocarse a la historia personal de tendencia hemorrágica patológica, sopesando su intensidad o gravedad y duración del episodio, así como de las actuaciones médicas acontecidas con anterioridad para controlar las hemorragias. Cualquier dato relevante de diátesis hemorrágica en la historia familiar debe ser también considerado. Además, deben tenerse en cuenta medicaciones recientes recibidas por el paciente. Es muy aconsejable realizar una anamnesis sistemática, empleando un cuestionario que incluya la sintomatología hemorrágica más frecuente en la EVW, con el fin de obtener la información más objetiva posible. En esta dirección se han propuesto diferentes sistemas estandarizados de puntuación de síntomas en base a un baremo hemorrágico, uno de los cuales queda reflejado en la Tabla 3<sup>11,12</sup>.

Esta estrategia ha sido evaluada dentro del Proyecto de la Unión Europea MCMMDM-1VWD en pacientes con EVW tipo 1; no obstante, puede ser de utilidad en otros tipos y subtipos<sup>11</sup>. Se han propuesto otros baremos con algunos enfoques especiales, tal



Tabla 3. Baremo y puntuación hemorrágica en EVW

Puntuación hemorrágica						
Síntoma	-1	0	1	2	3	4
Epistaxis	–	No o trivial (menos de 5)	> 5 o más de 10 min	Solamente consulta	Presión local o cauterización o antifibrinolítico	Transfusión sanguínea o terapia sustitutiva o desmopresina
Cutáneo	–	No o trivial (< 1 cm)	> 1 cm y no trauma	Solamente consulta	–	–
Sangrado de heridas menores	–	No o trivial (menos de 5)	> 5 o más de 5 min	Solamente consulta	Hemostasia quirúrgica	Transf. sang. o terapia sustitut., desmopresina
Cavidad oral	–	No	Referido al menos 1	Solamente consulta	Hemostasis quirúrgica o antifibrinolítica	Transf. sang. o terapia sustitut., desmopresina
Sangrado gastrointestinal	–	No	Asociada con úlcera, hipertensión portal, hemorroides, angiodisplasia	Espontáneo	Hemostasis quirúrgica, transf. sang., terapia sustitut., desmopresina antifibrinolítico	–
Extracción de dientes	No sangrado en al menos dos extracciones	Ningún hecho o ningún sangrado en 1 extrac.	Referido en < 25% de todos los procesos	Referido en > 25% de todos los procesos, no intervención	Resutura o presión local	Transfusión sanguínea o terapia sustitutiva o desmopresina
Cirugía	No sangrado en al menos dos cirugías	Ningún hecho o sangrado en una cirugía	Referido en < 25% de todas las cirugías	Referido en > 25% de todos los procesos, no intervención	Hemostasia quirúrgica o antifibrinolítico	Transfusión sanguínea o terapia sustitutiva o desmopresina
Menorragia	–	No	Solamente consulta	Antifibrinolítico, uso de píldora	Legrado, terapia férrica	Transf. sang. o terapia sustitut., desmopresina o histerectomía
Hemorragia posparto	No sangrado en al menos dos partos	No partos o no sangrado en un parto	Solamente consulta	Legrado, terapia férrica o antifibrinolíticos	Transfusión sanguínea o terapia sustitutiva o desmopresina	Histerectomía
Hematomas musculares	–	Nunca	No terapia postrauma	Espontáneo, no terapia	Espontáneo o traumático, requiere desmopresina o terapia sustitutiva	Espontáneo o traumático, requiere intervención quirúrgica o transfusión sang.
Hemartrosis	–	Nunca	No terapia postrauma	Espontáneo, no terapia	Espontáneo o traumático, requiere desmopresina o terapia sustitutiva	Espontáneo o traumático, requiere intervención quirúrgica o transfusión sang.
Sangrado SNC	–	Nunca	–	–	Subdural, ninguna intervención	Intracerebral, ninguna intervención

FUENTE: Tosseto. *J Thromb Haemost* 2007.

como es la puntuación en pacientes pediátricos. En la actualidad se trabaja con la intención de unificar estos diferentes baremos hemorrágicos. Es justo reconocer la dificultad de esta evaluación desde el momento en que algunos sujetos normales pueden referir también cierta sintomatología hemorrágica. Finalmente debe realizarse un examen físico dirigido tanto a confirmar la evidencia de diátesis hemorrágica como para descartar la existencia de problemas hemorrágicos adquiridos, como enfermedad hepática, entre otros.

### Evaluación de laboratorio

Sería ideal disponer de un único método de laboratorio capaz de detectar la presencia de la EVW. Ello requeriría una prueba sensible a la mayoría de los tipos existentes, y que además tuviera un bajo nivel de falsos positivos. Desafortunadamente no existe una prueba de tales características, lo que obliga al empleo de un panel de determinaciones que puedan identificar todas las formas diferentes de EVW. Hay

que resaltar que tampoco existe un único panel empleado uniformemente a nivel internacional<sup>1-3</sup>. Precisamente este hecho propició un estudio multicéntrico internacional del ISTH-SCC VWF cuyo objetivo era averiguar cuál es el panel de pruebas diagnósticas más recomendable (<http://www.vwfassays-in-vwd.com/>). En él se remitieron de forma ciega a los centros participantes muestras de plasmas liofilizados de pacientes con diferentes tipos de EVW perfectamente caracterizados. Los resultados preliminares demostraron que algunos de los subtipos incluidos no fueron identificados correctamente por un número significativo de laboratorios participantes. Aunque no se conocen los resultados finales de este proyecto, el estudio demuestra la enorme dificultad a la hora de averiguar no sólo el tipo de pruebas a emplear sino también su adecuada estandarización.

Además, otros estudios ponen en evidencia la necesidad de incorporar nuevos métodos de estudio del FVW para mejorar el diagnóstico y el conocimiento de cada uno de los tipos y subtipos de la EVW<sup>2,3</sup>.

En la Tabla 4 se señalan las pruebas de diagnóstico de laboratorio disponibles cuya combinación y tipo de metodología a emplear vienen condicionados en bastantes casos por las preferencias locales, lo que explica la gran variabilidad del panel empleado por cada laboratorio individual<sup>1-3</sup>. En general, cuanto más extenso es el panel de pruebas empleado, y más cuidadosa la investigación en cada caso, mayor es la proporción de identificación correcta de la EVW y su subtipo. Las diferentes pruebas deben irse empleando en etapas sucesivas en base a los resultados obtenidos. En la práctica, en bastantes ocasiones, y sobre todo cuando existe una fuerte sospecha de EVW, se realizan simultáneamente.

### Pruebas de evaluación inicial

#### Recuento globular en sangre

Este recuento, que incluirá cifras de plaquetas y frotis de sangre periférica, se precisa para descartar otras causas de diátesis hemorrágica. No debe olvidarse que una trombopenia/pseudotrombopenia puede observarse en el tipo 2B de EVW.

#### Tiempo de hemorragia de Ivy (TH)

Tradicionalmente fue una prueba elemental en el diagnóstico de la EVW, siendo la única realizada in vivo. Sin embargo, en la actualidad se utiliza con mucha menor frecuencia por su problema de estandarización en la labor de rutina, además de su escaso valor predictivo con respecto al evento hemorrágico. Por otra

Tabla 4. Métodos diagnósticos de la EVW y sus niveles

#### 1. Marcadores clínicos

Baremo y puntuación hemorrágica  
Historia familiar de hemorragia o de EW

#### 2. Marcadores de laboratorio

PRIMER NIVEL  
FVW:RCo  
FVW:Ag  
FVIII  
FVW:CB (?)  
Cocientes FVW:RCo/FVW:Ag y FVIII/FVW:Ag  
Aglutinación plaquetaria inducida por ristocetina

SEGUNDO NIVEL  
Análisis multimérico del FVW (baja y alta resolución)  
Prueba respuesta a la desmopresina (DDAVP)  
FVW: FVIIIb  
Propéptido del FVW (FVWpp)  
→ FVWpp/FVW:Ag

#### 3. Marcadores moleculares para confirmación diagnóstica

Investigación de mutaciones

parte, no es específico de la EVW. Además, en algunos pacientes la incisión evoluciona hacia un queloide, o cicatriz persistente<sup>2</sup>.

#### Análisis de función plaquetaria global en sangre total (PFA100®)

Su objetivo ha sido el de sustituir al TH, y en la práctica se utiliza ampliamente<sup>1,3</sup>. A diferencia de este último, no detecta anomalías de la pared vascular. Emplea dos tipos de cartuchos: colágeno/ADP y colágeno/epinefrina. El tiempo de obturación (TO) es el parámetro que se mide en esta prueba, y diversos estudios han demostrado una buena correlación entre el TO y el nivel de FVW en el tipo 1 de EVW, siendo útil en la monitorización de la respuesta al acetato de desmopresina (DDAVP: 1-deamino-8-D-arginina vasopresina) en este tipo de EVW. Se encuentra muy prolongado en las formas 2A, 2B y 2M, siendo normal en el tipo 2N. No es útil en la monitorización del tratamiento sustitutivo de la EVW empleando concentrados de FVIII/FVW, muy probablemente por las condiciones reológicas particularmente intensas que emplea, que por otra parte no se pueden modificar. Por este hecho, se considera que es más sensible al FVW del compartimento plaquetario que al del propio plasma.

Existen nuevos instrumentos de este tipo, como el Multiplate®, muy prometedores, pero pendientes de estudios amplios que avalen su uso generalizado.

### *Tiempo de tromboplastina activado (TTPA)*

Su valor radica en la detección de la deficiencia de FVIII:C.

### **Pruebas diagnósticas iniciales**

#### *Factor VIII procoagulante (FVIII:C)*

Mide la actividad procoagulante del factor VIII. En el contexto de la EVW tiene interés para valorar la deficiencia secundaria de esta proteína, bien debida a la disminución del FVW, su proteína transportadora y protectora, o por anomalía molecular de esta última que le impide unirse adecuadamente a la primera, como sucede en el tipo 2N. Por ello, realmente desde un punto de vista teórico debería realizarse si el TTPA se encuentra prolongado.

#### *Antígeno del FVW (FVW:Ag)*

Mide la concentración de la proteína del FVW independientemente de su actividad funcional. Existen diversos métodos disponibles, siendo los más frecuentes en la actualidad los ELISA y los basados en turbidimetría automatizados, empleando partículas de látex (LIA). La técnica de Laurell, empleada hace unos años, se encuentra en desuso en la actualidad. El empleo de un plasma estándar calibrado frente al estándar internacional de la OMS es crucial en esta técnica.

#### *Actividad del FVW como cofactor de la ristocetina (FVW:RCO)*

Representa la actividad funcional del FVW midiendo su capacidad de interacción con el receptor Ib de plaquetas normales inducida por el antibiótico ristocetina. En realidad in vivo el papel de la ristocetina lo ejerce el estrés circulatorio en la microcirculación, que es el que causa los cambios conformacionales del FVW que conducen a su interacción con la plaqueta. Se dispone de diversos métodos de medición de este parámetro<sup>2,3</sup>:

1. Tiempo de aglutinación visible, o bien pendiente de la curva de agregación de plaquetas normales (frescas o formalinizadas) lavadas y diluciones del plasma en presencia de ristocetina. Posee una menor sensibilidad detectando niveles entre 6-12 UI/dL. La variabilidad intra e interlaboratorios es muy notable y no representa la función fisiológica real. El coeficiente de variación es alto, alcanzando un 30%, e incluso mayor, ante niveles inferiores a 12-15 UI/dL.

2. Ensayos ELISA, que valoran la capacidad de unión del FVW plasmático a la glicoproteína Ib (GPIb) plaquetaria, también en presencia de ristocetina. Se han descrito varias modificaciones en las que se emplean fragmentos de GPIb, que incrementan su sensibilidad (detectando niveles < 1 UI/dL); sin embargo, no se encuentran disponibles comercialmente, limitándose su uso al campo de la investigación.

3. Cuantificación de unión de un anticuerpo específico de epítipo conformacional del FVW (en su dominio A1), ya sea por técnica de ELISA o de turbidimetría empleando partículas de látex. Se han empleado diversos anticuerpos monoclonales diferentes. Estos procedimientos no dependen de la presencia de ristocetina. La propiedad valorada mediante estas técnicas se ha denominado también FVW:Actividad (FVW:ACT), y, a pesar de su mayor sensibilidad y comodidad, por el momento no debe reemplazar al FVW:RCO obtenido por técnicas convencionales, aunque pueden ser útiles como método de cribado, debiendo confirmarse un descenso obtenido mediante una técnica convencional.

A pesar de las diversas limitaciones del método del FVW:RCO, éste sigue siendo el método más universalmente aceptado a la hora de valorar la actividad del FVW. Su resultado se expresa en UI/dL. Es muy importante que se emplee el mismo estándar plasmático internacional en la medición tanto del FVW:RCO como del FVW:Ag, además de que cada laboratorio local establezca su propio rango de normalidad.

### *Determinación del grupo sanguíneo ABO*

Los pacientes del grupo sanguíneo O presentan una concentración plasmática de FVW incluso un 25% menor que los de los otros grupos ABO. Si bien se ha recomendado establecer rangos de normalidad del FVW:RCO y del FVW:Ag tanto para el grupo O como para el no O, la experiencia parece señalar que, independientemente de la relación entre el grupo sanguíneo ABO y el rango del FVW, el mayor determinante de síntomas hemorrágicos lo constituye un FVW bajo en el plasma. De ahí que el empleo de rango poblacional normal puede ser más útil clínicamente<sup>2</sup>.

#### *Capacidad de unión del FVW al colágeno (FVW:CB)*

Para su determinación, se utiliza la técnica de ELISA. Aunque se esperaba que este método, por su mayor reproducibilidad y sensibilidad, sustituyera a la técnica del FVW:RCO, diversos estudios han demostrado que no son equiparables y no debe sustituir a esta última propiedad, desde el momento en que es sensible a

la presencia de multímeros de gran tamaño, aun cuando no sean funcionales, como sucede en la EVW de tipo 2M. Por ello se recomienda que, de emplearse, se haga como prueba complementaria a la del FVW:RCo. El mayor problema del FVW:CB es la falta de estandarización del tipo de colágeno a emplear (de tipo 1 o 3, mezcla, o incluso otros tipos). Su valor especial iría dirigido a los trastornos selectivos del dominio del FVW para su unión al colágeno, en los que el FVW:RCo y la estructura multimérica pueden ser normales. Sin embargo, se han identificado muy pocos pacientes con este tipo de problema, e incluso algunos se detectaron por casualidad (incluso sin historia hemorrágica). Por todo ello, su lugar en el diagnóstico de la EVW no está claro todavía<sup>2,3</sup>.

#### *Cocientes FVW:RCo/FVW:Ag; FVW:CB/FVW:Ag; FVIII:C/FVW:Ag*

Si los resultados aislados de cada uno de estos parámetros son importantes, los valores de estos cocientes pueden ser de ayuda a la hora de orientar una forma variante<sup>1,3,8</sup>. Por ejemplo, ante un FVW:RCo/FVW:Ag < 0,5-0,7 orienta a la existencia de una forma variante 2A, 2B o 2M; y ante un FVIII:C/FVW:Ag descendido puede orientar a una forma 2N, precisando la comprobación con otras pruebas adicionales, incluso el estudio genético. Sin embargo, los puntos de corte de estos cocientes todavía están siendo motivo de estudio.

#### **Pruebas diagnósticas de confirmación**

##### *Agglutinación plaquetaria de plasma rico en plaquetas en presencia de ristocetina (RIPA)*

Analiza la interacción FVW plasmático y las propias plaquetas del paciente en presencia de concentraciones diferentes de ristocetina. Es poco sensible pero de gran utilidad a la hora de detectar la EVW de tipo 2B cuando se evidencia aglutinación con ristocetina en concentraciones bajas (0,3-0,5 mg/mL), la cual es negativa en condiciones normales.

Una modificación de esta técnica, útil en casos con RIPA presente en concentraciones bajas de ristocetina, consiste en el empleo de plaquetas lavadas ya sean normales o del paciente y plasma pobre en plaquetas (PPP) del paciente o normal, y también concentraciones bajas de ristocetina. En base a la mezcla que muestre aglutinación permitirá diferenciar el problema de una EVW 2B (plaquetas normales y PPP del paciente) o, por el contrario, a un defecto plaquetario de tipo pseudoenfermedad de von Willebrand, también llamada EVW de tipo plaquetario (en el caso de plaquetas del paciente y PPP normal).

#### *Análisis multimérico del FVW*

Consiste en el análisis electroforético cualitativo del FVW en geles con el detergente dodecilsulfato sódico (SDS), que permiten la separación de esta proteína en forma de una serie lineal de multímeros en base a su diferente tamaño molecular cuando se emplean geles de tamaño de poro grande (baja resolución) (Figura 1)<sup>1-4</sup>. Los multímeros de mayor tamaño son los más eficientes desde un punto de vista hemostático, y se encuentran ausentes en las formas 2A y en algunas 2B. Empleando geles de tamaño de poro menor (alta resolución) se visualizan diferentes bandas integrantes de cada multímero (tripletes o quintupletes, dependiendo del tamaño del poro), las cuales varían ostensiblemente en función del tipo o subtipo de EVW. Esta metodología es sumamente laboriosa, y requiere mucho tiempo en su elaboración. Además, parece evidente que exige notable destreza y experiencia, limitándose su uso a centros con gran actividad de estudio de la EVW o dedicados a la investigación en este tema. Es por esta razón por lo que resulta muy difícil incorporarla rutinariamente de una forma generalizada, entre otros motivos por la política de reducción de costes. Existen al menos dos tipos de opinión en relación con su empleo:

- a) No es necesaria, ya que pueden descartarse las formas variantes mediante el uso de cocientes FVW:RCo/FVW:Ag y FVW:CB/FVW:Ag antes comentadas<sup>3</sup>; o
- b) Parece claro que este método descubre alteraciones relevantes, y de ahí su utilidad, siendo aconsejable referir muestras a un laboratorio experimentado en esta metodología<sup>1,2</sup>.

##### *Capacidad de unión del FVW al FVIII (FVW:FVIII:B)*

Mide la normalidad del FVW en su dominio a través del cual se une al FVIII normal. Su objetivo es confirmar el tipo 2N de EVW, que es recesiva. Se realiza mediante método ELISA inmovilizando el FVW de la muestra problema o normal y ofreciendo una fuente de FVIII exógeno normal purificado. El FVIII unido se detecta mediante un anticuerpo específico del FVIII conjugado con una enzima. Esta estrategia ha ido desbancando a otra realizada previamente en la que se detectaba el FVIII por método cromogénico en vez de por ELISA. Algunos laboratorios emplean esta misma técnica pero utilizando un anticuerpo marcado isotópicamente. Empleando diluciones seriadas de la muestra de control y de la muestra problema se obtienen curvas integrando la relación FVW inmovilizado y FVIII unido, cuya pendiente indica el grado de normalidad de esta propiedad. No todos los tipos 2N presentan el mismo grado de defecto, y los pacientes 2N heterocigóticos



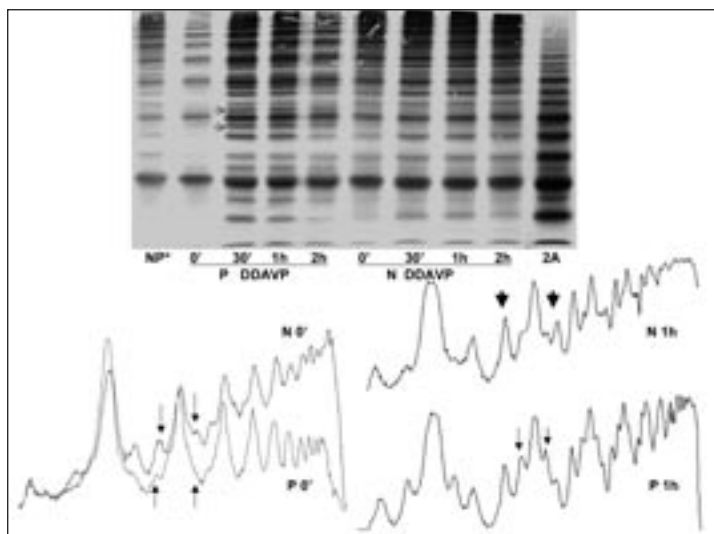


Figura 2. Respuesta al DDAVP en paciente con EVW 2A (IIE) por la mutación C1149R y en un sujeto normal. Panel superior: Patrón multimérico del FVW en gel de alta resolución (agarosa 2%-SDS) en plasmas de un individuo normal (N) y de un paciente (P) antes (0') y a los 30 minutos, una, dos y cuatro horas (30', 1h, 2h) después de la administración de DDAVP). Panel inferior: Análisis densitométrico de los perfiles electroforéticos del panel superior. Antes del DDAVP se observa en el paciente (a la izquierda) una clara disminución de la proporción relativa de las bandas satélite de cada multimero en comparación con el sujeto normal. Tras el DDAVP se aprecia un claro incremento de la proporción relativa de las bandas satélite internas (indicado por flechas finas) en claro contraste con el incremento de las bandas satélite externas observado en el sujeto normal. Este hecho parece indicar una proteólisis anormal del FVW mutante. FUENTE: Reproducido con autorización de *Haematologica* 2009<sup>(14)</sup>.

son más difícilmente detectados, y ello ocurre más frecuentemente al realizar un estudio familiar. En nuestra experiencia todos los pacientes con deficiencia de FVIII < 1-4 UI/dL son hemofílicos (comprobados al demostrar su mutación en el gen del FVIII). Por el contrario, en todos los pacientes que hemos estudiado en los que se ha detectado un FVW:FVIII B alterado el estudio molecular ha confirmado la existencia de una mutación en el gen del FVW.

Es preferible realizar este ensayo en laboratorios con experiencia, no ya por la dificultad técnica sino porque su interpretación no es siempre fácil<sup>3</sup>.

### Respuesta basal al acetato de desmopresina (DDAVP)

El interés principal de su administración es el terapéutico, al inducir una liberación del FVW tisular al plasma elevando su nivel 3-5 veces el valor basal dentro de los 30-60 minutos después de su administración, y en general su efecto se mantiene por lo menos de 6-8 horas. Se emplea en dosis de 0,3 µg/kg diluida en 50 mL de suero salino a infundir por vía intravenosa en unos 30 minutos. Dado que la respuesta a este agente es bastante estable en cada individuo, se recomienda realizar una prueba basal (sin hemorragia activa) en el paciente con el objeto de valorar la intensidad y patrón de su respuesta individual y, de ahí, su posible utilidad futura ante eventos hemorrágicos<sup>2</sup>.

Además, su estudio es de utilidad a la hora de caracterizar mejor el tipo de EVW, por lo que se debe incluir en la exploración diagnóstica de la enfermedad. Por ejemplo, puede indicar una vida media acortada del FVW liberado, o inducir un patrón multimérico anormal no observado en condiciones basales<sup>1-3,13,14</sup> (Figura 2).

### Detección de anticuerpos anti FVW

Su utilidad es de interés en los pacientes con EVW que han desarrollado aloanticuerpos anti-FVW después de recibir tratamiento sustitutivo mediante concentrados de FVW. Estos anticuerpos, además de neutralizar el efecto del FVW exógeno administrado, pueden desencadenar reacciones anafilactoides graves con este tratamiento. También puede permitir el detectar autoanticuerpos en el seno del síndrome de von Willebrand (también denominado EVW adquirida)<sup>2,3</sup>. No existe un método bien estandarizado, ya que existe mucha interferencia con anticuerpos naturales dirigidos frente a determinantes de grupos sanguíneos y que reaccionan con los carbohidratos del FVW (ya que es una glicoproteína). Se intuye que la producción de un FVW recombinante sin la presencia de estos últimos puede permitir en el futuro elaborar una prueba fiable. En nuestra experiencia este tipo de anticuerpos se detectan en plasma por ELISA cuando se encuentran presentes en título muy alto. Por el momento, el método de neutralización del FVW:RCo del plasma normal mezclado con el plasma del paciente descubre también este tipo de complicación, si bien no es excesivamente sensible.

### Estudio molecular del gen del FVW

Indicado en pacientes seleccionados, las primeras mutaciones descritas se localizaban en los dominios A1, A2 y A3 del FVW en pacientes con EVW de los tipos 2A y 2B. En la actualidad se conocen las mutaciones de todos los tipos y subtipos de EVW<sup>1-3,5,9</sup>. En la Figura 3 se señala la localización de estas mutaciones de acuerdo con el tipo de EVW. Mientras que las mutaciones del tipo 2B se agrupan en la zona concre-

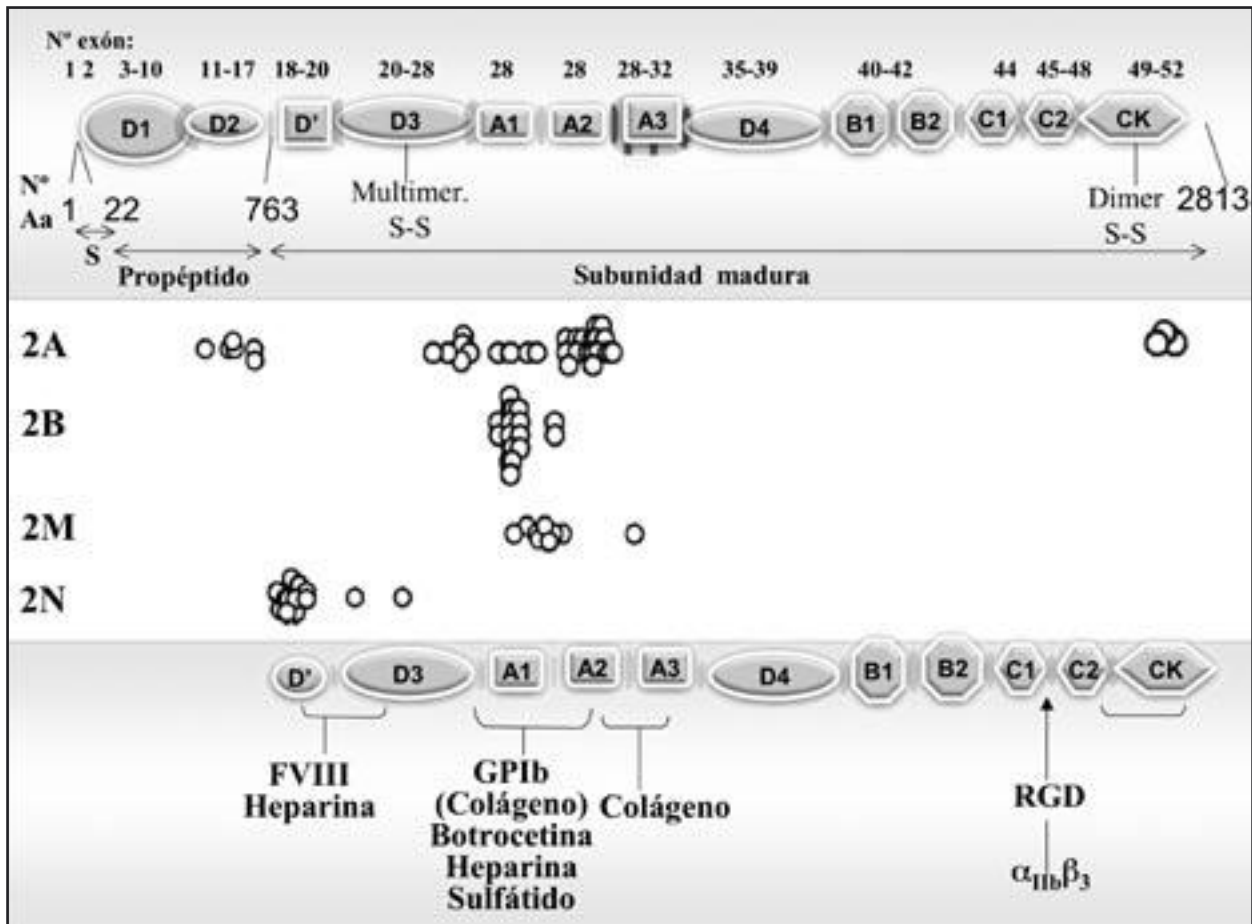


Figura 3. Estructura de la molécula precursora del FVW y localización de las mutaciones en la EVW. La molécula precursora consta de un péptido señal (S), propéptido y subunidad madura. Se indican los dominios estructurales A, B, C, CK y los sitios de unión al factor VIII, glicoproteína Ib, colágeno e integrina plaquetaria  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Se muestra la localización de las mutaciones en los tipos 2 de EVW. En los tipos 1 y 3 las mutaciones se localizan a lo largo de toda la molécula del FVW.

ta del dominio A1, las de los tipos 1 y 3 se encuentran dispersas a lo largo de toda la proteína. Los defectos genéticos de algunos tipos, especialmente los del tipo 1 leve (con niveles superiores a 30 U/dL), permanecen todavía ocultos<sup>2,3,9</sup>.

Es muy posible que defectos en otros genes que podrían modular la regulación funcional del gen del FVW (genes moduladores) puedan ser responsables de descendos del FVW en sangre. Así, en algunas familias compatibles con EVW de tipo 1 se ha visto la ausencia de ligamiento entre el defecto del FVW y el estudio haplotípico realizado mediante marcadores genéticos de su gen<sup>15</sup>. Por ello, en la actualización de la clasificación revisada de la EVW el diagnóstico no se restringe a anomalías del locus genético del FVW. La prevalencia de estas mutaciones varía mucho con el país y el área geográfica. En el norte de Italia es relativamente frecuente la mutación Vicenza (R1205H)<sup>1-3</sup>; por el contrario, en Galicia la mutación R1374C causante de EVW tipo 2A/2M es muy frecuente<sup>10</sup>. En relación con la forma 2N, en España, y según nuestro conoci-

miento, las dos únicas mutaciones detectadas son: 1) la R816W (en el exón 19), que en su estado homocigótico es la más severa; y 2) la R854Q, en el exón 20, cuyo defecto es moderado.

En el tipo 3 inicialmente se describieron deleciones grandes o pequeñas del gen, las cuales en estado de homocigosis se asocian a un alto riesgo de desarrollo de aloanticuerpos tras el tratamiento sustitutivo<sup>1-3</sup>.

### Otras pruebas diagnósticas

#### FVW en lisado plaquetario

Se basa en la cuantificación o cualificación del FVW existente en las plaquetas. Ha permitido comprobar la existencia de algunos tipos particulares de EVW como es el caso de la EVW plaquetaria baja (con normalidad en el plasma). A su vez permite la observación de defectos no visibles en el plasma complementando la información obtenida en este último<sup>2,14</sup>. Es también una

técnica engorrosa, lo que explica que su uso no se haya generalizado.

### Propérido del FVW (FVWpp)

Es el fragmento de la molécula precursora que se escinde para generar la subunidad madura del FVW, hecho necesario para que se logre la debida multimerización del FVW. El FVWpp y la proteína del FVW permanecen unidas no covalentemente en los gránulos alfa de los megacariocitos y plaquetas y en los corpúsculos de Weibel-Palade de la célula endotelial hasta su liberación al plasma. Aquí se disocian y circulan independientemente con vidas medias diferentes (de 2 a 3 h el FVWpp, y de 8 a 12 h el FVW)<sup>1-4,14,16</sup>.

El nivel plasmático de este fragmento es normalmente proporcional al del FVW: Ag, y la medición del cociente FVWpp/FVW:Ag puede orientar a la existencia de un aclaramiento anormal del FVW del paciente. Así, se ha observado la existencia de correlación entre este cociente y la vida media del FVW tanto en pacientes como en sujetos normales. Al comparar este coeficiente en sujetos normales del grupo O con respecto a los no O, se ha podido deducir una vida media del FVW algo más corta en los primeros, lo que puede a su vez explicar su menor nivel plasmático. En este sentido, puede predecir una respuesta reducida a la administración del DDAVP, o la existencia de aloanticuerpos anti-FVW, entre otros aspectos. Aunque todavía precisará estudios más extensos, es muy probable que en un futuro próximo se incorpore al panel diagnóstico de rutina de la EVW.

### Establecimiento del diagnóstico de la EVW y su tipo

En la Figura 4 se resume el diagrama del proceso diagnóstico de la EVW en función de los resultados obtenidos en las pruebas de laboratorio anteriormente comentadas. El diagnóstico de los tipos 2A, 2B, 2M, 2N (en su forma homocigótica o doble heterocigótica) así como el tipo 3 no suelen presentar problema a la hora del diagnóstico; sin embargo, no es así en el tipo 1, tal y como se ha confirmado en estudios internacionales

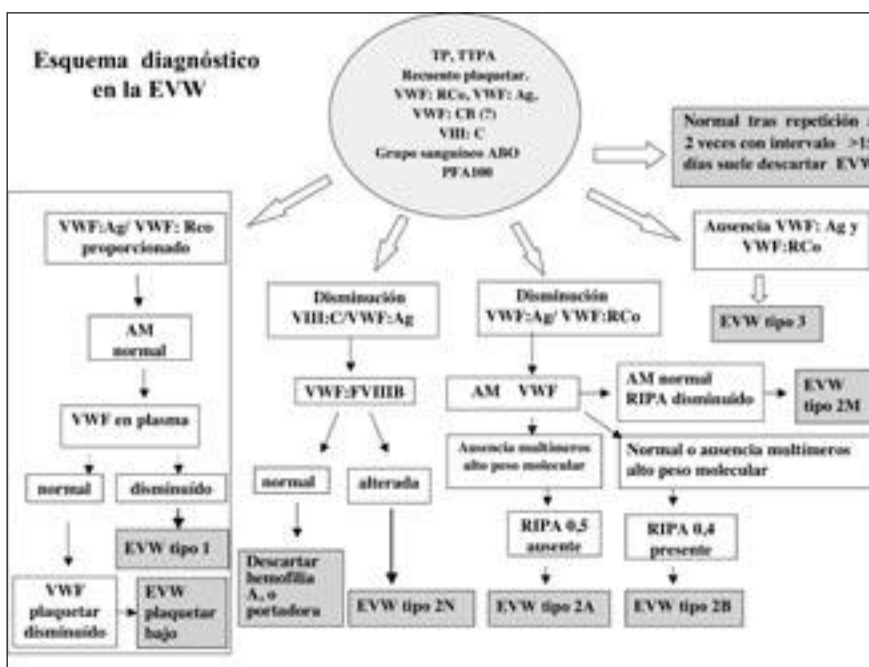


Figura 4. Esquema diagnóstico de laboratorio de la EVW en base a los resultados de las diferentes pruebas de laboratorio. AM: análisis multimérico; EFV: enfermedad de Von Willebrand; VWF: factor de Von Willebrand.

como el MCMDM-1VWD, el estudio Canadiense o el del Reino Unido<sup>17</sup>.

### Consideraciones adicionales

1. Es imprescindible repetir las pruebas diagnósticas al menos en dos ocasiones para confirmar o descartar la EVW. El estudio familiar puede ser de utilidad en este sentido.
2. El empleo de un adecuado estándar internacional en el estudio de laboratorio es crítico. El estándar local debe ser calibrado frente a este estándar internacional, que es el recomendado por la OMS.
3. Debe tenerse en cuenta que la clasificación de la EVW es un proceso evolutivo y complejo en el que la incorporación de nuevas pruebas diagnósticas, o bien la obtención de mayor información sobre las actuales, obligará en un futuro a ir modificando el planteamiento actual<sup>4,5</sup>. De hecho, la distinción entre los tipos 2A y 2M parece un tanto artificial y redundante, de ahí que nuestro equipo haya propuesto al ISTH-SCC VWF (Reunión de Viena 2008) fundir ambas en un único tipo, en un nivel jerárquico de segundo nivel<sup>10,18</sup>.
4. Heterocigosis y fenotipos combinados: el fenotipo de los pacientes heterocigóticos puede depender de la interacción entre subunidades codificadas por ambos alelos. Cuando ello ocurre, la clasificación del paciente dado incluye la designación de ambos

(1/2N, por ejemplo). Una combinación de un alelo nulo y otro afectado por una forma recesiva de EVW (tal como el 2N) conduce a una forma grave a pesar de no ser homocigótica para este último defecto. Estos hechos tienen importancia, por ejemplo, a la hora del consejo genético<sup>4,5</sup>.

5. Mutaciones puntuales pueden motivar fenotipos causados por diversos mecanismos (síntesis, liberación, proteolización y aclaramiento). Es, por ejemplo, el caso de la mutación C1149R (Figura 4)<sup>14</sup>.

6. **Controversia** entre EVW tipo 1 leve o factor de riesgo hemorrágico. El diagnóstico de la EVW tipo 1 puede ser difícil de establecer con confianza, ya que el criterio mayor diagnóstico es un descenso del FVW en plasma, pero el nivel de esta proteína varía ampliamente en un mismo sujeto. Asimismo, el riesgo hemorrágico varía también en función del nivel del FVW sin que haya un claro umbral que distinga ambas situaciones<sup>4,5,19</sup>. Como consecuencia, muchos pacientes diagnosticados de EVW de tipo 1 no presentan clínica hemorrágica relevante, lo cual limita la utilidad de este diagnóstico.

Parece sumamente acertada la recomendación de Sadler de considerar los descensos leves de FVW como factor de riesgo hemorrágico más que como enfermedad propiamente dicha, siguiendo el ejemplo de la dinámica empleada con otros factores de riesgo como, por ejemplo, los trombofílicos<sup>19</sup>. Esta estrategia no impide en absoluto que a un paciente con descenso leve pueda diagnosticarse EVW de tipo 1 cuando por ejemplo tenga una historia familiar en este sentido confirmada. Por el contrario, tampoco impide el uso de agentes terapéuticos, como el DDAVP, en aquellos considerados simplemente como factor de riesgo hemorrágico. A la espera de obtener mayor información se recomienda que el nivel de 30 UI/dL se emplee como punto de corte en esta distinción<sup>2</sup>.

7. Conscientes de la complejidad diagnóstica de esta enfermedad, y de la necesidad de lograr una mayor homogeneidad o armonización, se ha iniciado un Proyecto del Registro de la EVW en España<sup>20</sup> con un objetivo múltiple:

- a) Conocer la realidad diagnóstica y terapéutica de la EVW en España en la práctica clínica habitual actual.
- b) Elaboración de una plataforma de pacientes españoles con esta enfermedad lo mejor caracterizados posible.
- c) Creación de un grupo de trabajo en EVW que asuma este objetivo inicial, así como el desarrollo de proyectos propios posteriores, aprovechando la plataforma de pacientes con EVW y estableciendo colaboraciones con proyectos internacionales (European Union VWD Group, Proyecto Norteamericano Zimmerman, entre otros).
- d) Elaboración de guías de consenso en el diagnóstico y tratamiento de la EVW. Siguiendo modelos empleados previamente a nivel internacional la novedad de este proyecto radica en la inclusión de un diagnóstico estandarizado que permita una unificación de determinaciones y criterios.

Creemos que es una iniciativa de gran interés en la que deseamos participen el mayor número posible de centros de España.

## Conclusiones

- El diagnóstico de la EVW requiere la adecuada valoración clínica del paciente, su historia familiar y el empleo secuencial de diversas pruebas de laboratorio.
- A nivel clínico se aconseja una anamnesis sistematizada, y su valoración cuantitativa empleando un baremo hemorrágico puede ser de gran ayuda.
- A lo largo de estos años hay que reconocer que este diagnóstico sigue globalmente distante de un nivel óptimo.
- La correcta estandarización de los métodos de laboratorio es crucial y debe incluir un estándar internacional reconocido.
- Diversas pruebas nuevas o que mejoran la sensibilidad y reproducibilidad de las actuales están siendo fruto de intensa valoración en el campo de la EVW. Este hecho mejorará la perspectiva diagnóstica, pero desde un punto de vista rutinario no se recomienda su uso generalizado hasta que se confirme su utilidad.
- Dada la complejidad o dificultad de algunas de las pruebas empleadas en el diagnóstico de la EVW, es aconsejable su realización en centros con experiencia en las mismas.

## Agradecimientos

*Este trabajo ha sido realizado merced al Proyecto del Fondo de Investigación Sanitaria, FIS Carlos III, Ministerio de Sanidad, Spain (FIS PI# 07/0229) y de la Consellería de Innovación e Industria, Xunta de Galicia (INCITE08ENA916109ES). Expresamos también nuestra gratitud a Bayer Healthcare, Baxter Biosciences, Wyeth y Novo Nordisk por su patrocinio.*

## Bibliografía

1. Federici AB, Canciani MT. Clinical and laboratory versus molecular markers for a correct classification of von Willebrand disease. *Haematologica*. 2009; 94: 610-5.
2. Nichols WL, Hultin MB, James AH, Manco-Johnson MJ, Montgomery RR, Ortel TL, Rick ME, Sadler JE, Weinstein M, Yawn BP. von Willebrand disease (VWD): evidence-based diagnosis and management guidelines. The National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel Report (USA). *Haemophilia*. 2008; 14 (2): 171-232.
3. Favalaro EJ. Toward a new paradigm for the identification and functional characterization of von Willebrand disease. *Semin Thromb Hemost*. 2009; 35 (1): 60-75.
4. Batlle J, Pérez Rodríguez A, López Fernández MF. Classification of VWD. En: Federici A, Lee C, Berntorp E, Lil-



- licrap D, Montgomery B (eds.). Von Willebrand disease: basic and clinical aspects. Oxford: Blackwell Publishing; 2009 (en prensa).
5. Mazurier C, Rodeghiero F; von Willebrand Factor Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Recommended abbreviations for von Willebrand factor and its activities. *Thromb Haemost.* 2001; 86 (2): 712.
  6. Sadler JE, Budde U, Eikenboom JC, Favaloro EJ, Hill FG, Holmberg L, et al.; Working Party on von Willebrand Disease Classification. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand factor. *J Thromb Haemost.* 2006; 4 (10): 2103-14.
  7. Budde U, Schnepfenheim R, Eikenboom J, Goodeve A, Will K, Drewke E, et al. Detailed von Willebrand factor multimer analysis in patients with von Willebrand disease in the European study, molecular and clinical markers for the diagnosis and management of type 1 von Willebrand disease (MCMDM-1VWD). *J Thromb Haemost.* 2008; 6 (5): 762-71.
  8. Tosetto A, Rodeghiero F, Castaman G, Bernardi M, Bertocello K, Goodeve A, et al. Impact of plasma von Willebrand factor levels in the diagnosis of type 1 von Willebrand disease: results from a multicenter European study (MCMDM-1VWD). *J Thromb Haemost.* 2007; 5 (4): 715-21.
  9. Goodeve A, Eikenboom J, Castaman G, Rodeghiero F, Federici AB, Batlle J, et al. Phenotype and genotype of a cohort of families historically diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European study, Molecular and Clinical Markers for the Diagnosis and Management of Type 1 von Willebrand Disease (MCMDM-1VWD). *Blood.* 2007; 109 (1): 112-21.
  10. Penas N, Pérez-Rodríguez A, Torea JH, Lourés E, Noya MS, López-Fernández MF, Batlle J. Von Willebrand disease R1374C: type 2A or 2M? A challenge to the revised classification. High frequency in the northwest of Spain (Galicia). *Am J Hematol.* 2005; 80 (3): 188-96.
  11. Tosetto A, Rodeghiero F, Castaman G, Goodeve A, Federici AB, Batlle J, et al. A quantitative analysis of bleeding symptoms in type 1 von Willebrand disease: results from a multicenter European study (MCMDM-1 VWD). *J Thromb Haemost.* 2006; 4 (4): 766-73.
  12. Rodeghiero F, Castaman G, Tosetto A, Batlle J, Baudo F, Cappelletti A, et al. The discriminant power of bleeding history for the diagnosis of type 1 von Willebrand disease: an international, multicenter study. *J Thromb Haemost.* 2005; 3 (12): 2619-26.
  13. Castaman G, Lethagen S, Federici AB, Tosetto A, Goodeve A, Budde U, et al. Response to desmopressin is influenced by the genotype and phenotype in type 1 von Willebrand disease (VWD): results from the European Study MCMDM-1VWD. *Blood.* 2008; 111 (7): 3531-9.
  14. Pérez-Rodríguez A, García-Rivero A, Lourés E, López-Fernández MF, Rodríguez-Trillo A, Batlle J. Autosomal dominant C1149R von Willebrand disease: phenotypic findings and their implications. *Haematologica.* 2009; 94 (5): 679-86.
  15. Eikenboom J, Van Marion V, Putter H, Goodeve A, Rodeghiero F, Castaman G, et al. Linkage analysis in families diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European study, molecular and clinical markers for the diagnosis and management of type 1 VWD. *J Thromb Haemost.* 2006; 4 (4): 774-82.
  16. Haberichter SL, Castaman G, Budde U, Peake I, Goodeve A, Rodeghiero F, et al. Identification of type 1 von Willebrand disease patients with reduced von Willebrand factor survival by assay of the VWF propeptide in the European study: molecular and clinical markers for the diagnosis and management of type 1 VWD (MCMDM-1VWD). *Blood.* 2008; 111 (10): 4979-85.
  17. Peake I, Goodeve A. Type 1 von Willebrand disease. *J Thromb Haemost.* 2007; 5 Suppl 1: 7-11.
  18. Batlle J, Pérez-Rodríguez A, Franqueira MD, López-Fernández MF. Type 2M von Willebrand disease: a variant of type 2A? *J Thromb Haemost.* 2008; 6 (2): 388-90.
  19. Sadler JE. (2003). Von Willebrand disease type 1: a diagnosis in search of a disease. *Blood;* 101: 2089-93.
  20. Batlle J, Aznar JA. Proyecto de estudio epidemiológico de la enfermedad de von Willebrand en España. *Haematologica* (edición española) 2009; Suplemento (en prensa).

## DÍA A DÍA EN EL LABORATORIO DE HEMOSTASIA: AUTOMATIZACIÓN Y MODELOS DE GESTIÓN INFORMATIZADA

R. MATA SERNA, P. LLAMAS SILLERO

*Servicio de Hematología y Hemoterapia.  
Fundación Jiménez Díaz. Madrid*

### Introducción

El origen de los primeros estudios de coagulación data de hace más de 200 años, cuando se comenzó a medir el tiempo que tardaba en coagular la sangre extraída de personas sanas o aquejadas de determinadas enfermedades. A finales del siglo XIX y principios del XX se publicaron numerosos métodos para medir el tiempo de coagulación, apareciendo posteriormente las primeras técnicas instrumentales. Es ya en la década de los ochenta cuando se produce un gran avance en este sentido, iniciándose la automatización de dichas técnicas debido al aumento en el número de pruebas. Fundamentalmente en Japón, comenzaron a desarrollarse sistemas de transporte de muestras, robots para carga y descarga de los analizadores y aplicaciones informáticas que controlaban todo el proceso. Con este concepto de automatización, se intentaba reducir la carga de trabajo y mejorar la precisión y calidad del mismo.

A mediados de los noventa, algunas compañías empezaron a ofrecer sistemas que incluían estas tecnologías para su instalación en grandes laboratorios, aunque inicialmente su coste era elevado y su funcionalidad limitada. Posteriormente, su implantación en laboratorios de referencia de Japón y Estados Unidos demostró una disminución significativa en los costes y en los tiempos de ejecución, junto con una mayor calidad y seguridad del proceso. Todo ello llevó a un aumento en el desarrollo de estas tecnologías hasta la actualidad, en la que la mayoría de las casas comerciales de este sector poseen opciones de automatización de sus equipos.

Este desarrollo tecnológico ha dado paso a la formación de grandes laboratorios debido al aumento

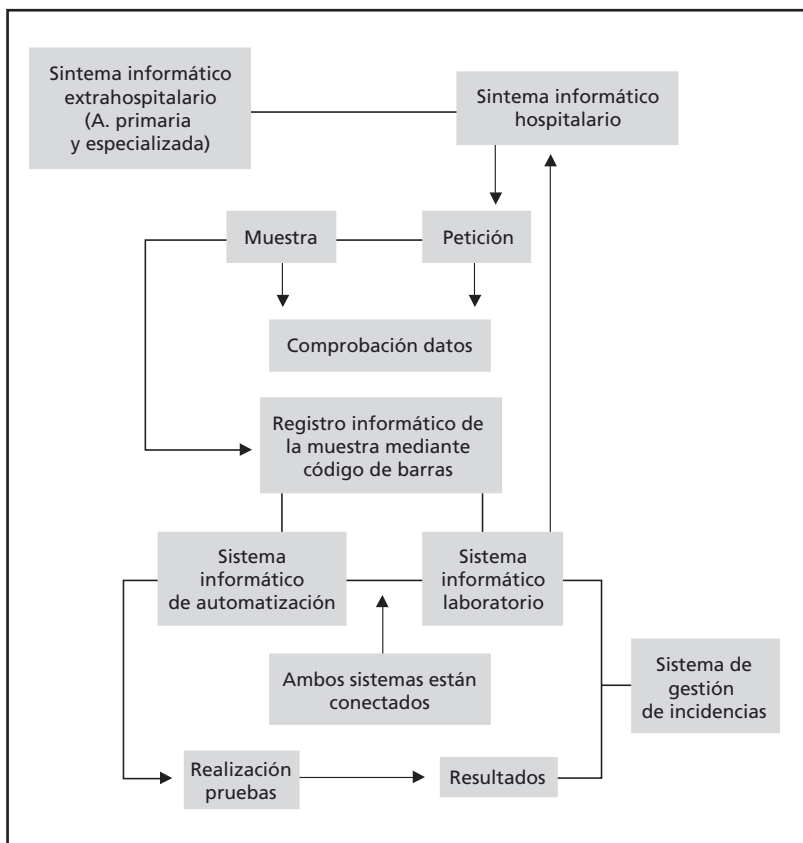


Figura 1. Modelo simplificado de gestión informatizada.

continuo de la demanda asistencial producida por el incremento en el número de pruebas a realizar, el envejecimiento de la población o el desarrollo de actividades de investigación. Además, la tendencia actual se dirige hacia la centralización de todas las pruebas analíticas incluyendo tanto los pacientes hospitalizados como los de atención primaria o especializada extrahospitalaria. Todo ello ha convertido a los laboratorios en centros generadores de un gasto importante cuyo control constituye uno de los objetivos prioritarios de los gestores sanitarios. Además, estos centros intentan seguir un modelo de gestión de la calidad total (TQM) que pretende garantizar con la gestión de procesos el cumplimiento de los requisitos de los clientes (clínicos y pacientes), de los requisitos legales y los propios que la organización establezca, teniendo como estrategia general la mejora continua.

### Procesos del laboratorio de hemostasia

La infraestructura personal e instrumental de un laboratorio de hemostasia se debe adecuar al tipo de pacientes que se atienden y al grado de especialización que se quiere abarcar. Así, un laboratorio de hemostasia de alto nivel será muy especializado y com-

plejo, pudiendo abarcar diversos aspectos de un laboratorio clínico y de investigación. Dentro de la organización del laboratorio distinguimos varias fases:

1. Fase preanalítica. Es fundamental, ya que en ella ocurren el 80% del total de los errores del laboratorio. Los objetivos del control de calidad en esta etapa incluyen la correcta identificación de la muestra, la introducción precisa de las peticiones en el sistema informático, y evitar el deterioro de la muestra en los procesos de obtención, manipulación, transporte y conservación, así como asegurar su adecuada centrifugación. Según el laboratorio, el origen de las muestras puede ser heterogéneo, por lo que esta etapa es la más difícil de controlar.

2. Fase analítica. En ella se realizan las diversas pruebas solicitadas por el servicio peticionario. Estas mediciones siempre están sujetas a un mayor o menor grado de variabilidad, la cual puede reducirse con un buen control de calidad de los instrumentos, metodología y reactivos, con una buena formación de

los técnicos y con un programa adecuado de control de calidad (interno y externo). El control interno nos indicará nuestra variabilidad interna (existen controles comerciales normales y patológicos), y el control externo nos permitirá compararnos con otros laboratorios, y entre distintos métodos o instrumentos. Analizando los resultados del control de calidad, se pueden detectar e identificar problemas y proponer soluciones para mejorar los resultados, corrigiendo las desviaciones que puedan surgir por múltiples causas.

3. Fase postanalítica. En esta fase se validan los resultados en el analizador y, posteriormente, el facultativo procede a la validación de los mismos en el sistema informático. Es frecuente la falta de comunicación con los facultativos solicitantes y la escasa información del paciente, lo que dificulta a veces la valoración correcta de los resultados obtenidos. En este sentido, puede ocurrir que se realice un diagnóstico erróneo de un parámetro hemostático, por ejemplo si no existe información de que el paciente está recibiendo tratamiento anticoagulante. Es importante también realizar en esta etapa la valoración global de los resultados, observando si un parámetro tiene tendencia a desviarse en un sentido. Asimismo, valorando de forma individual los resultados, podemos detectar incoherencias que nos hagan reevaluar la fase preanalítica o analítica.

**Tabla 1. Componentes de un sistema de automatización en un laboratorio clínico**

---

- Área de entrada de muestras: Se realiza la clasificación de las muestras, separación de pruebas ordinarias/especiales, si requieren centrifugación o retirada de tapón, alícuotas
- Área de lectura de código de barras
- Sistema de transporte: Trasladan las muestras a los destinos apropiados
- Centrifugación automática (refrigerada para muestras de coagulación), tras la cual las muestras regresan al sistema de transporte
- Sistemas que comprueban la integridad de la muestra (volumen, presencia de coágulos, fibrina, hemólisis, lipemia o bilirrubina). Pocos sistemas incorporan este paso porque en muchos casos los propios analizadores tienen esta función
- Retirada de tapones de las muestras
- Preparación de alícuotas si necesario
- Sistema de transporte al analizador que permite la aspiración de la muestra y realización de las pruebas solicitadas
- Re-taponamiento de los tubos
- Módulo de conservación temporal de las muestras: Donde permanecen hasta que se verifican los resultados por si hay que realizar repeticiones o pruebas adicionales
- Zonas de almacenamiento de las muestras ya procesadas donde permanecen el tiempo estipulado por cada laboratorio hasta su eliminación. Pueden estar refrigeradas

---

Un aspecto a tener en cuenta en esta fase es el control de los plazos de respuesta fijados para cada prueba.

### Automatización del laboratorio de hemostasia

La automatización en el laboratorio de hemostasia, al igual que en el resto de los laboratorios clínicos, ha conllevado el uso combinado y conjunto de la informática, de la robótica y de los analizadores para manipular las muestras antes, durante y después de las mediciones. Surge en un intento de mejorar el flujo de trabajo, disminuir los tiempos de ejecución, la tasa de errores en el proceso analítico o de informe de resultados, y por la dificultad de disponer de personal cualificado y por la existencia de un aumento en la demanda asistencial. Todo ello se traduce en una disminución de los costes y una mejora de la calidad.

Cualquier laboratorio que considere implantar un sistema de automatización debe comenzar por establecer cuál es su estado actual, y cuáles son sus necesidades y expectativas. Además, es importante un buen conocimiento de todo el proceso de trabajo, desde la entrada de la muestra, su distribución, análisis y almacenamiento, así como la validación e informe de los resultados.

El grado de automatización puede ser parcial o total, lo que vendrá determinado por el tamaño y complejidad del laboratorio (Tabla 1). En ocasiones, la automa-

tización es parcial incluyendo únicamente algunos de los pasos del proceso de trabajo que son más susceptibles de mejora. La automatización total "ideal" incluye todo el proceso desde la fase preanalítica a la postanalítica, englobando todas las especialidades del laboratorio. Esto ha permitido que en la actualidad los laboratorios clínicos se estén organizando de acuerdo con criterios tecnológicos, consolidando en el mismo espacio mediciones de diversas especialidades y dando lugar a laboratorios pluridisciplinares. Este tipo de organización no excluye que la responsabilidad sobre cada proceso recaiga sobre el especialista correspondiente.

El laboratorio de hemostasia ha estado casi siempre unido al de hematimetría, constituyendo el laboratorio de hematología bajo la responsabilidad de un médico especialista en hematología y hemoterapia. Este hecho es importante, ya que este especialista es el único que durante su formación adquiere una visión global capaz de integrar datos clínicos y analíticos, y, por tanto, con una capacidad mayor de interpretación de los resultados analíticos. No todas las casas comerciales tienen sistemas compatibles con la automatización total del laboratorio de hematología, y son escasos los ejemplos que podemos ver en este sentido (A&T Corporation, Integrated Laboratory Automation Solutions, Roche Diagnostics, Siemens Medical Solutions Diagnostics, Thermo Fisher Scientific, etc.). Además, el laboratorio de hematología y, en concreto, el de hemostasia presentan unas condiciones propias de clasificación y manejo de las muestras diferentes a las del resto. Dado que en la fase preanalítica tienen lugar la mayoría de los errores del laboratorio, es uno de los procesos que más se puede beneficiar de la automatización.

Es interesante, una vez conseguida la automatización del laboratorio realizar una evaluación antes y después del proceso, que incluya parámetros de tiempo, productividad, control de calidad, satisfacción de los clínicos o incluso seguridad de los empleados, al disminuir la manipulación de las muestras y, por tanto, el riesgo de accidentes biológicos.

Recientemente, se han ido implantando modelos de automatización del laboratorio que proponen una descentralización parcial mediante la realización de pruebas en el lugar de asistencia al paciente (pruebas a la cabecera del paciente o POC [*point of care*]). Esto ha sido posible por el desarrollo de analizadores portátiles, de pequeño tamaño, que pueden utilizarse en el lugar de asistencia (ambulancias, centros periféricos o domicilio del paciente). En lo referente a la hemostasia, han ido cobrando importancia los coagulómetros portátiles capaces de determinar el INR en sangre capilar en pacientes en tratamiento con antivitaminas K. Las ventajas asociadas a este tipo de analizadores incluyen la punción capilar (no venosa), el no requerir centrifugación de la muestra, el menor tiempo de espera hasta la obtención del resultado y la realización de la analítica en

el propio domicilio del paciente o en centros periféricos (sin requerir envío de muestras al laboratorio). Los inconvenientes incluirían un posible mayor coste por medición (cuestionable), la variación respecto a los resultados obtenidos en muestra venosa, el desarrollo de un programa de calidad adecuado y la incorrecta formación del personal encargado de hacer las mediciones (aspecto fundamental). Generalmente, el propio fabricante del coagulómetro portátil suministra una aplicación informática que puede conectarse con el sistema de información del laboratorio o historia clínica electrónica para realizar la transferencia de datos y que permite, además, añadir un calendario con la pauta adecuada y validar el resultado de acuerdo con el nivel de anticoagulación definido para el paciente.

### **Tecnologías de la información y automatización**

Los sistemas informáticos son un elemento clave en cualquier proceso de automatización, ya que se necesita que exista una comunicación entre el sistema informático del laboratorio (LIS) y los sistemas integrados automatizados. La comunicación entre todos los sistemas implicados debe permitir un flujo de información rápido y preciso. También permite identificar en qué analizador se ha procesado una determinada muestra, así como poder realizar comparaciones de los controles de calidad para una misma prueba que se realiza en varios equipos.

El sistema informático debería incluir la entrada de datos e información sobre la fase preanalítica (lectura del ID del código de barras de la muestra y volante de petición, información de la procedencia de la misma...), el proceso de la muestra (cuáles son las pruebas que hay que realizar, programar pruebas complementarias, transmisión de resultados...), y el proceso de validación y reporte de resultados, aunque éste es difícil de automatizar dada la importancia del factor humano en la interpretación de los resultados. Aun así, puede incluir un proceso de autoverificación, permitiendo realizar repeticiones, diluciones o posibilidad de validar los resultados según condiciones preestablecidas.

El LIS nos va a permitir, además, asignar las pruebas a los equipos en el momento de su introducción, eliminando la necesidad de listas de trabajo, ya que la asignación de pruebas se realiza de forma continua, enviando la información a los analizadores que realizan una consulta *host-query* en modo local, y respondiendo a los analizadores que efectúan la pregunta directamente al sistema de información del laboratorio. En el caso de técnicas manuales o realizadas en equipos que no están *on-line*, permite imprimir la lista de trabajo en cualquier momento.

Es habitual que existan registros para el control de incidencias relacionadas con la muestra o su procesa-

miento, para que puedan reclamarse lo antes posible si ha habido problemas en la realización del estudio solicitado, y programas de gestión de almacenes que nos permitan llevar a cabo un control preciso sobre las existencias de reactivos y posibles caducidades.

---

### **Gestión informatizada en el laboratorio**

La mejora en los sistemas de información y la automatización ha permitido avanzar hacia la creación de redes integradas de laboratorios en un área de salud que incluye atención primaria y especializada, y su conexión con la red de sistemas de información de los hospitales. Todo esto requiere una reestructuración de los servicios de diagnóstico con la conexión entre un laboratorio central dotado con la robotización adecuada y que sirve de referencia, que asume las pruebas complejas y que es responsable de la calidad de sus resultados. Al mismo tiempo, dicho laboratorio debe ser responsable de la eficacia de todas sus áreas, laboratorios satélites y de los análisis realizados por POC mediante la conexión de los sistemas de información y el adecuado diseño del flujo de muestras. Un objetivo primordial es la integración de la información de las tres fases del proceso analítico (preanalítica, analítica y postanalítica) en una sola aplicación informática. Así se consigue que exista un único punto de entrada, un solo informe y una sola historia clínica de laboratorio, para que también durante el proceso de validación puedan consultarse todas las analíticas realizadas. Asimismo, existen distintos niveles de acceso en el laboratorio para que un facultativo pueda solo modificar o validar pruebas realizadas en su departamento, o para que el personal técnico no pueda validar resultados que requieran la interpretación de un facultativo (Tabla 2). Todo ello, siguiendo las directrices de la Ley de Protección de Datos.

Es importante que el sistema de peticiones esté conectado al programa de historia clínica electrónica, siendo deseable que la información generada en cada uno de los laboratorios se integre en la historia clínica electrónica y se conozca a tiempo real. Otra de las características que debe tener un sistema de información es la posibilidad de realizar búsquedas específicas y exportar de forma fácil estos datos a Microsoft Excel u otras aplicaciones similares para su tratamiento posterior y realización de estadísticas.

### **Comunicación clínico-laboratorio**

Por otro lado, los sistemas informáticos y la comunicación por vía web son instrumentos muy eficaces ya que facilitan la conexión entre el clínico y el laboratorio.

Los sistemas informáticos permiten a los clínicos consultar los resultados en tiempo real del análisis ac-



Tabla 2. Áreas de acceso a los datos

Entrada de datos. Fase preanalítica	Personal administrativo/enfermería
Proceso de muestras (fase analítica)	Personal técnico/facultativo
Validación de resultados/Informes	Personal facultativo
Área de mantenimiento (ficheros maestros)	Personal encargado de la actualización y mantenimiento de ficheros maestros

tual y de todos los históricos del paciente, sin tener que depender de un informe en papel. El hecho de poder interpretar el resultado de un estudio de coagulación teniendo en cuenta los estudios históricos del paciente aumenta la eficacia, evita errores en la interpretación de los resultados y mejora la calidad del proceso analítico. Además, puede ayudar a disminuir el número de repeticiones y la demanda de nuevas pruebas. Un punto a destacar es la posibilidad de establecer los niveles de acceso de la aplicación, permitiendo que el facultativo pueda acceder sólo a sus pacientes, a los de su servicio o a todos. La búsqueda de datos de paciente se puede realizar desde diferentes ítems: apellido y nombre, número de historia clínica, número de documento, dirección de paciente, etc.

Otra utilidad de la informática aplicada al laboratorio es que permite acceder al catálogo de pruebas del laboratorio para informarse del tipo de muestra que se precisa, condiciones de extracción y conservación, rangos de normalidad, costes, interacciones, o incluso la existencia de avisos que cuestionen las repeticiones basándose en resultados previos, diagnóstico o medicación.

Existen soluciones informáticas que actúan conectando al clínico con el sistema de información del laboratorio, conocidos como los *sistemas expertos*. Permiten guiar a los clínicos en el momento de realizar una petición y combinar la información aportada por el clínico con los resultados obtenidos del laboratorio, para dar una interpretación específica o incluso generar otras magnitudes a realizar sobre la misma muestra. Con estos sistemas se disminuye el número de determinaciones, el número de muestras extraídas, el tiempo de respuesta y los costes. Incluso pueden contener protocolos de petición y algoritmos de decisión con pruebas encadenadas que ayuden a los clínicos a solicitar las peticiones correctas para un determinado paciente, o contener hiperenlaces de interés a bibliografía o guías relevantes existentes en la web.

### **Elaboración de un cuadro de mando integral en el laboratorio clínico y elaboración de indicadores**

El cuadro de mando es un instrumento de control de gestión de calidad total que empezó a definirse en la década de los noventa por Norton y Kaplan. Consiste en

establecer una serie de objetivos desarrollando un sistema de medida basado en indicadores para monitorizar los resultados. Este modelo se fue ampliando hasta lo que se denominó “cuadro de mando integral” o BSC (*balanced scorecard*), estructurado en torno a cuatro perspectivas: la financiación (¿cómo son nuestros resultados financieros?), el proceso interno (¿en qué procesos debemos lograr la excelencia para garantizar el éxito?), el factor humano (¿cómo podemos mejorar nuestros recursos humanos y tecnologías de información?) y el cliente (¿cómo nos ven nuestros clientes?), llegando a convertirse en un sistema de gestión estratégico aplicable también al laboratorio clínico. Se trata de una herramienta valiosa ya que proporciona una estrategia en la que se definen y comunican los objetivos, promoviendo un alineamiento estratégico de toda la organización y un trabajo coordinado en equipo.

Para la elaboración de un BSC en el laboratorio se requiere la selección de una serie de indicadores según los objetivos estratégicos de las distintas perspectivas (mapa estratégico), estableciendo metas definidas para ellos. Así podrán aplicarse acciones de mejora para cumplir con dichas metas retroalimentando el sistema, ya que es fundamental la adaptación ante un entorno permanentemente en cambio. Esta monitorización de los indicadores es una herramienta de evaluación que asegura que los recursos sean utilizados con el máximo de eficiencia para responder a los objetivos fijados. Los indicadores son útiles para procesar y comparar a través del tiempo la eficiencia de una organización, y evaluar el éxito o fracaso de la implementación de cualquier modelo de gestión.

El BCS nos permite la realización de estadísticas preprogramadas de los diferentes sectores que integran el sistema: estadísticas de pacientes, de médicos o de órdenes de prácticas con cálculo de las unidades de laboratorio (UL), etc. Además de las estadísticas programadas es factible realizar las que requiera cada usuario de acuerdo con los datos existentes en las diferentes bases del sistema. Este modelo ya se ha aplicado con éxito en algunas instituciones sanitarias públicas.

### **Análisis de coste-beneficio**

La decisión de automatizar el laboratorio conlleva una inversión económica considerable, siendo importante establecer cuál va a ser el periodo necesario para analizar la inversión realizada. Es conveniente efectuar un estudio exhaustivo del impacto del proyecto en el coste por medición, y ver si ello puede justificar la puesta en marcha del proyecto. A esto hay que añadir que existe muy poca información publicada al respecto, por lo que se generan dudas sobre su viabilidad real. Es importante tener en cuenta numerosos factores que a veces se olvidan o son di-

fíciles de cuantificar (disminución de tasa de errores, aumento de la seguridad, el cambio cualitativo de la labor del personal...).

El área económico-financiera es una de las más difíciles de valorar y comparar, debido a que muchas veces no se encuentran los indicadores idóneos que reflejen la buena marcha financiera del laboratorio. La automatización puede facilitar el análisis de los costes directos del laboratorio de hemostasia y disminuir los costes directos de personal.

### 'Benchmarking'

La evaluación de los procesos, de la práctica clínica y de los resultados puede llevarse a cabo mediante una herramienta de mejora continua denominada *benchmarking*. Se trata de un proceso sistemático por el que una organización compara sus procesos y resultados frente a otras similares en una materia determinada, en un intento de disminuir la tasa de errores, los costes debidos a las reclamaciones, y producir una mejora en el cumplimiento de la normativa vigente. Es una herramienta de aprendizaje continuo que nos permite tomar medidas de mejora adaptando a la organización los conocimientos aprendidos en busca de la excelencia en su rendimiento. Este método es fundamental aplicado al laboratorio u organizaciones sanitarias, ya que permite que la empresa sobreviva con recursos económicos limitados. Para que los datos entre distintas organizaciones sean comparables, es imprescindible consensuar las formas de medir y de evaluar la actividad estableciendo indicadores apropiados. Los requisitos que debe cumplir un indicador son: que sea relevante, fiable, discriminatorio, objetivo, exento de riesgos, válido y adecuado para medir el objetivo marcado. La misma importancia tiene el establecimiento de buenos indicadores como la selección del objetivo a medir (que sean procesos críticos para el resultado y susceptibles de mejora).

Un ejemplo de *benchmarking* en el laboratorio de hemostasia podría ser el control de calidad externo, que, además de comprobar la calidad de nuestros resultados, nos permite compararnos con otros laboratorios que utilizan los mismos autoanalizadores. También podría existir la posibilidad de *benchmarking* interno si, por ejemplo, establecemos indicadores en la fase preanalítica (muestras rechazadas por problemas en el transporte, extracción, anticoagulante inadecuado...). Así, tras su posterior análisis, podemos implantar me-

didias de mejora que nos permitan corregir los errores cometidos en esta fase.

---

### Consideraciones finales

Los sistemas de automatización se han desarrollado de forma importante en las últimas décadas, lo que ha permitido una mejora en la calidad del proceso, ahorro de tiempo de trabajo y una mayor seguridad para el personal implicado, disminuyendo las intervenciones manuales. Sin embargo, en la actualidad, aún no se ha generalizado su uso en los laboratorios de hemostasia, aunque probablemente en los próximos años vayan implantándose de forma gradual. Asimismo, es de gran importancia el desarrollo de los sistemas informáticos que han permitido añadir funcionalidad a los sistemas de información del laboratorio, y facilitar la realización de múltiples tareas garantizando una integración de la información dentro del laboratorio, y de éste con el hospital y las áreas de atención extrahospitalaria (atención primaria y especializada).

---

### Bibliografía

- Asociación Española de Normalización y Certificación. Sistemas de Gestión de Calidad. Requisitos ISO 9001; 2008.
- Benítez AJ, Caballé I, García A, Hornos JI, Sarrión D. Los costes de la calidad y no calidad en el laboratorio clínico. *Química Clínica*. 2005; 24 (3): 164-71.
- Benítez AJ, Caballé I, Torra M. Recomendaciones para la elaboración de un cuadro de mando integral en el laboratorio clínico. *Rev Lab Clin*. 2008; 1 (3): 122-32.
- Caballé I. Gestión del laboratorio clínico. Barcelona: Masson; 2007. p. 189-221.
- García A, Batista J. Recomendaciones para la recogida de datos estadísticos y evaluación de la actividad del laboratorio clínico. *Química Clínica*. 2003; 22 (1): 19-28.
- García A, Caballé I, Giménez A. Uso adecuado del laboratorio clínico: necesidad y tendencias. *Rev Lab Clin*. 2008; 1 (2): 75-82.
- Hawker CD. Laboratory automation: total and subtotal. *Clin Lab Med*. 2007; 27 (4): 749-70.
- Jou JM, Reverter JC, Villarrubia J. IV Curso de actualización en automatización y sistemas de calidad en los laboratorios de hematología y hemostasia. Septiembre de 2008.
- Markin RS, Whalen SA. Laboratory automation: trajectory, technology and tactics. *Clin Chem*. 2000; 46: 764-71.
- Owen CA. A history of blood coagulation. *Foundation for Medical Education and Research*. p 189-221.
- Rodrigues S. Guidelines for implementing automation in a hospital laboratory setting, part II. *Clin Leadersh Manag Rev*. 2007; 2 1 (2): E3.
- Rodrigues S. Guidelines for implementing automation in a hospital laboratory setting, part I. *Clin Leadersh Manag Rev*. 2007; 21 (1): E2.

## Síndromes mieloproliferativos crónicos

COORDINADORES: C. BESSES. *Barcelona*  
L. HERNÁNDEZ-NIETO. *Tenerife*

### Resumen del simposio

Las neoplasias mieloproliferativas, término actual acuñado por la OMS y que sustituye al anterior de enfermedades mieloproliferativas crónicas, son trastornos de la célula madre hematopoyética caracterizados por un aumento en la producción de elementos hematopoyéticos maduros, hiper celularidad en médula ósea, alteraciones citogenéticas variables, presencia de esplenomegalia, aparición de complicaciones trombóticas y/o hemorrágicas y potencial transformación clonal evolutiva. La clasificación de la OMS incluye bajo esta denominación la leucemia mieloide crónica BCR-ABL-positiva, la leucemia neutrofílica y la leucemia eosinofílica crónica, las mastocitosis, la mielofibrosis primaria, la policitemia vera (PV) y la trombocitemia esencial (TE), estas dos últimas, objetivos del presente simposio.

El descubrimiento de la mutación JAK2V617F en 2005 supuso un cambio radical en la aproximación diagnóstica y en la comprensión de la patogenia de este grupo de enfermedades. Su impacto ha determinado una nueva estrategia diagnóstica de las eritrocitosis y de las trombocitosis en la práctica clínica diaria. De este papel, y de sus diversas connotaciones, trata la ponencia del Dr. Joaquín Martínez del Hospital 12 de Octubre, experto en técnicas moleculares.

Si bien las complicaciones trombóticas representan la causa más importante de morbilidad y mortalidad en PV y TE, los mecanismos que conducen a la trombosis no se conocen con exactitud y, en la actualidad, el riesgo trombótico en PV y TE todavía se estima en función de datos clínicos, tales como la edad y la historia previa de trombosis, sin haberse identificado cuáles son los parámetros biológicos potencialmente predictivos de la aparición de este tipo de complicación clínica. El Dr. Álvarez-Larrán del Hospital del Mar presentará en su ponencia cuál es el *state of the art* del papel de los leucocitos, las plaquetas, el endotelio y las proteínas plasmáticas en los mecanismos de trombofilia en PV y en TE.

Dado que la PV y la TE son enfermedades crónicas con una supervivencia muy prolongada y, en ocasiones, normal, la estrategia terapéutica debe contemplar un riguroso análisis en cada paciente de las ventajas e inconvenientes que supone la administración de un tratamiento citorreductor y/o antiagregante indefinido. La Dra. Carmen Burgaleta del Hospital Príncipe de Asturias revisará el manejo terapéutico actual de la PV y de la TE, mostrando las posibles opciones, indicaciones y recomendaciones internacionales, así como el manejo de las pacientes embarazadas afectas de estas enfermedades.

La existencia de casos familiares en pacientes con neoplasias mieloproliferativas es, evidentemente, muy infrecuente, pero no tan excepcional como anteriormente se consideraba. El Dr. Holger Cario, del Hospital Universitario de Ulm, gran experto en el estudio de casos familiares, efectuará una detallada puesta al día de los diversos aspectos clínicos y genéticos que rodean a este grupo tan específico de pacientes.

Los coordinadores del simposio están seguros de que la calidad y experiencia de los ponentes cumplirá sobradamente las expectativas de la audiencia y que contribuirá a una excelente actualización en el campo de las neoplasias mieloproliferativas.

## IMPACTO DE LAS MUTACIONES DE *JAK2* EN EL DIAGNÓSTICO Y CLASIFICACIÓN DE LAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS NO LEUCÉMICAS

J. MARTÍNEZ-LÓPEZ, E. ALBIZUA, I. RAPADO, M. GALLARDO, S. BARRIOS, R. AYALA

*Servicio de Hematología.*

*Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid*

El descubrimiento en 2005 de la mutación *JAK2 V617F* como un evento fisiopatogénico relevante en las neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMP) ha supuesto adicionalmente una revolución en el diagnóstico y clasificación de este grupo de enfermedades, y especialmente de la policitemia vera (PV). Gracias a este hallazgo se han simplificado considerablemente los criterios diagnósticos y disponemos de criterios positivos y no sólo de exclusión. Estos últimos cuatro años han supuesto una avalancha de publicaciones y de nuevos de conocimientos que tenemos que asimilar.

### Aspectos metodológicos del estudio de las mutaciones del gen *JAK2*

En cuanto al tipo de muestra, la mayoría de los trabajos publicados se han realizado estudiando sangre periférica; los resultados son similares a los obtenidos en médula ósea, y la disponibilidad de la muestra, mucho mayor.

En qué tipo celular se deben estudiar las mutaciones de *JAK2* (linaje celular afecto): la mayoría de los trabajos estudian granulocitos purificados, ya que la mutación *JAK2 V617F* se detecta preferentemente en la serie mieloide, y los linfocitos sin embargo no suelen presentar la mutación. En los primeros trabajos tenía sentido, ya que se empleaban técnicas poco sensibles y, si se estudiaban también los linfocitos, podía disminuir la sensibilidad (es una mutación somática) de ésta. La técnica de purificación de neutrófilos complica metodológicamente la detección de las mutaciones de *JAK2*. Desde el empleo de técnicas más sensibles y con la publicación de algunos trabajos en que se muestra una sensibilidad igual cuando se estudia sangre total vs. sólo neutrófilos, actualmente está totalmente justificado el estudio diagnóstico de las mutaciones de *JAK2* en ADN genómico de células de sangre total<sup>1</sup>.

### Detección de *JAK2 V617F*

Al ser una mutación adquirida, pueden encontrarse diferencias de carga tumoral, enfermos con la mutación

en homocigosis, con pérdida de heterocigosis, enfermos heterocigotos, con toda la población mutada o con una pequeña cantidad de células mutadas y con mezclas celulares de células con la mutación en homocigosis, en heterocigosis o no mutadas. Por este motivo, la detección de la mutación debe ser informada como presente o ausente, nunca se debe afirmar que un enfermo es heterocigoto u homocigoto. Podremos informar sobre la carga tumoral si usamos métodos cuantitativos basados en PCR en tiempo real o pirosecuenciación.

En los cuatro últimos años se han desarrollado numerosos métodos para la detección de *JAK2 V617F* (Tabla 1), pero la interpretación de los resultados debe realizarse en el contexto de la sensibilidad del test. En este sentido, la frecuencia de esta mutación en PV se eleva de 73% a 97% si se utiliza PCR-aleoespecífica (sensibilidad: 5-0,1%), en lugar de secuenciación directa (sensibilidad: 20%). Por otro lado, los falsos positivos aumentan si se utilizan métodos ultrasensibles (sensibilidad: 0,01%) capaces de detectar niveles bajos de *JAK2V617F* incluso en individuos sanos. En general, se prefieren los métodos cuantitativos porque son capaces de medir la carga del alelo mutado y monitorizar la respuesta al tratamiento.

Las técnicas más frecuentemente empleadas para detectar esta mutación son las siguientes:

*Secuenciación de ADN* (sensibilidad alrededor del 20%)<sup>2-4</sup>.

*Pirosecuenciación* (sensibilidad estimada del 5%).

*PCR en tiempo real con curva de fusión* (método semicuantitativo con una sensibilidad entre 1 y 10%).

*PCR aleoespecífica*, método cuantitativo o cualitativo (con el sistema ARMS se obtiene una sensibilidad de 1-2%, y con PCR en tiempo real, 0,1%)<sup>5</sup>.

*Análisis de restricción BsaXI* (distingue entre mutaciones en homocigosis y heterocigosis)<sup>2</sup>.

Desde un punto de vista práctico, se recomienda inicialmente como procedimiento de cribado (*screening*) un método de PCR en tiempo real o PCR aleoespecífica de sensibilidad intermedia. Las muestras positivas con esta técnica para la mutación *V617F* serían reanalizadas posteriormente, empleando una PCR a tiempo real aleoespecífica, con el objetivo de cuantificar la cantidad de células mutadas, ya que –como se comenta posteriormente– puede constituir un factor pronóstico que determine decisiones terapéuticas y permita, además, evaluar la respuesta a un posible tratamiento<sup>5</sup>.

### Detección de mutaciones en el exón 12 de *JAK2*

Las mutaciones en el exón 12 de *JAK2* pueden ser variadas: mutaciones puntuales, inserciones y deleciones. En el momento actual hay más de quince descri-



Tabla 1. Frecuencias y métodos de detección de la mutación *JAK2 V617F* en las NMP clásicas

	Método de detección	PV mutación <i>JAK2 V617F</i> (homocigotos)	TE mutación <i>JAK2 V617F</i> (homocigotos)	MFP mutación <i>JAK2 V617F</i> (homocigotos)
James <i>et al.</i> (2005)	Secuenciación	89 (30)	43	43
Levine <i>et al.</i> (2005)	Secuenciación	74 (25)	32 (3)	35 (9)
Kralovics <i>et al.</i> (2005)	Secuenciación	65 (27)	23 (3)	57 (22)
Baxter <i>et al.</i> (2005)	Secuenciación/PCR aleloespecífica	97 (26)	57 (0)	50 (19)
Jones <i>et al.</i> (2005)	ARMS/pirosecuenciación	81 (33)	41 (7)	43 (29)
Levine <i>et al.</i> (2006)	Taqman aleloespecífica	99	72	39
Rapado <i>et al.</i> (2008)	Sondas de hibridación	87	61	50

PV: policitemia vera; TE: trombocitemia esencial; MFP: mielofibrosis primaria.

tas y no suelen repetirse. Su estudio se ha realizado utilizando DNA de granulocitos o de sangre periférica total por secuenciación directa. Últimamente se ha publicado un nuevo método de cribado basado en PCR y curvas de alta resolución (*high resolution melting*) para su detección<sup>6</sup>.

### Impacto diagnóstico de las mutaciones de *JAK2*

El descubrimiento de la mutación *JAK2 V617F* en policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (TE) y mielofibrosis primaria (MFP) y de las mutaciones en el exón 12 en PV ha ocasionado tal impacto en el diagnóstico de estas entidades que, no sólo se ha impuesto como prueba diagnóstica esencial en la práctica clínica cotidiana, sino que ha obligado a efectuar la revisión de los criterios diagnósticos de la OMS vigentes desde 2001 y ha llevado al grupo de expertos en estas enfermedades a publicar una nueva propuesta para las tres NMP Ph-negativas clásicas en 2007<sup>7</sup>. Entre los nuevos criterios diagnósticos destacan varios puntos: 1) la mutación *JAK2 V617F*, las mutaciones en el exón 12, y *MPLW515L/K* pasan a formar parte de los criterios mayores, hecho que permite simplificar el diagnóstico, sobre todo en PV; 2) los criterios de exclusión desaparecen en PV ante la potencia de *JAK2 V617F* presente en el 95% de los casos y en las mutaciones del exón 12 en el 3%; y 3) se ratifica la importancia de la biopsia de médula ósea (BMO) como criterio mayor en TE y MFP, de modo que su realización al diagnóstico resulta indispensable<sup>8</sup>.

Casi todos los pacientes con PV presentan la mutación *JAK2 V617F*, que, empleando técnicas lo suficientemente sensibles, se detecta en más del 95% de los enfermos. Por este motivo, el estudio de esta mutación ha modificado sustancialmente la evaluación y los criterios diagnósticos de esta enfermedad. El estudio de la mutación *JAK2V617F* debe incluirse como prueba inicial en el estudio de enfermos con poliglobulia. Tefferi propone un algoritmo para el diagnóstico diferen-

cial cuyos primeros pasos son el estudio de la mutación y la determinación de los niveles de EPO sérica. El estudio de las mutaciones del exón 12 estaría indicado en aquellos casos en que no se detectara la mutación *JAK2 V617F* y los niveles de EPO fueran normales o bajos. La BMO se recomienda en todos los casos para confirmación<sup>9</sup> (Figura 1).

La utilidad y rentabilidad diagnóstica de la mutación de *JAK2 V617F* (y *MPLW515L/K*) en TE y MFP es mucho menor puesto que, al estar presente sólo en el 50% de los casos, su valor predictivo negativo es subóptimo en estas dos enfermedades.

En TE cabe destacar, además de lo referido previamente, que el dintel de trombocitosis baja a  $\geq 450 \times 10^9/L$ , y que, en presencia de marcador clonal (*JAK2 V617F*, *MPLW515L/K* u otros), datos de trombocitosis reactiva asociada no excluyen el diagnóstico de TE si se cumplen los tres criterios mayores. En el algoritmo diagnóstico propuesto por Tefferi para TE, el estudio de la mutación *JAK2 V617F*, *bcr/abl* y la BMO con citogenética son esenciales<sup>9</sup> (Figura 2).

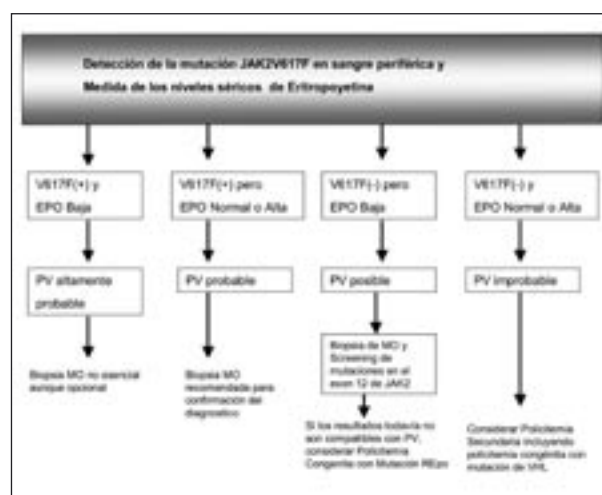


Figura 1. Algoritmo diagnóstico ante sospecha de policitemia vera. Modificado de Tefferi 2007<sup>9</sup>.

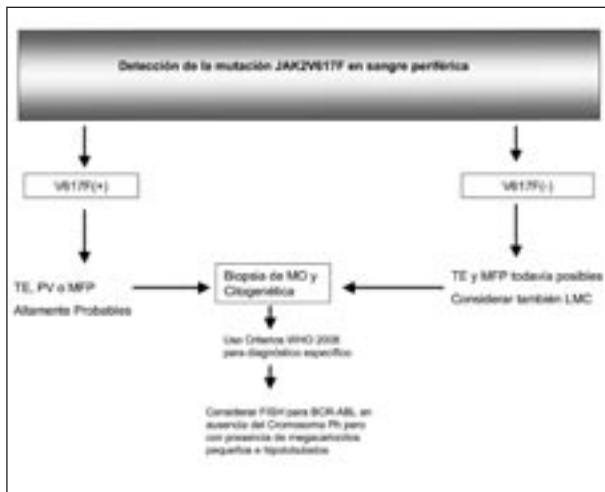


Figura 2. Algoritmo diagnóstico ante la sospecha de trombocitemia esencial. Modificado de Tefferi 2007<sup>9</sup>.

Es importante recordar que la mutación *JAK2 V617F*, aunque muy característica, no es específica de las NMP Phi-negativas clásicas, ya que se puede detectar también en otras patologías mieloides: en el 50% de las anemias refractarias con sideroblastos en anillo y trombocitosis (ARSA-T), en el 20% de los síndromes mielodisplásicos (SMD) atípicos y en el 3% de los SMD o leucemias agudas mieloblásticas (LAM) *de novo*. De modo que, ante la sospecha de TE, la detección de la mutación *JAK2 V617F* no descartaría un SMD o MFP, si bien conviene resaltar que no se detecta en patología tumoral no mieloides ni en LMC.

La mutación *JAK2 V617F* también puede aparecer en sujetos sanos. En varios trabajos se ha encontrado que entre el 1-3% de la población podría tener células mutadas con un nivel de carga muy bajo (< 5%)<sup>6,10</sup>.

En MFP las mutaciones *JAK2 V617F* (presente en el 50%) y *MPLW515L/K* (en el 5%) se incluyen como criterios mayores, así como la BMO; y desaparece la subdivisión entre fase pre-fibrótica y fibrótica<sup>7</sup>. En cuanto al algoritmo diagnóstico propuesto por Tefferi ante la sospecha de MFP, al igual que en TE, el estudio de la mutación *JAK2V617F*, y la BMO con citogenética son esenciales, además de la tinción para reticulina<sup>9</sup> (Figura 4).

No queremos acabar sin resaltar dos consideraciones de interés, contenidas en la nueva revisión de la WHO: 1) a propósito de los casos descritos recientemente de trombosis venosas abdominales idiopáticas (TVAI) con *JAK2V617F* positivo, que no cumplen criterios convencionales de PV ni TE, por el momento deben considerarse “NMP no clasificables”; y existe un claro consenso en incluir la mutación *JAK2 V617F* en el estudio de cribado de trombofilia ante estas TVAI; 2) por otro lado, los casos de ARSA-T con la mutación *JAK2V617F* (50%) podrían tratarse en realidad de verdaderos casos de NMP (TE o MFP) con sideroblastos en anillo.

Otras mutaciones diferentes a *JAK2 V617F* (más de cuatro) en el exón 14 se han descrito en cuadros mieloproliferativos (Ej: *JAK2 C616Y*, *JAK2 L611S*, *JAK2 K607N* y *JAK2 D620E*).

### Mutaciones de *JAK2* y su importancia pronóstica

Al ser la trombosis una presentación habitual en TE y PV, y una de las principales complicaciones en el curso de ambas enfermedades, su relación con la mutación *JAK2 V617F* ha sido objeto de múltiples estudios.

El trabajo del grupo de Cambridge encontró mayores complicaciones trombóticas venosas en las TE *JAK2V617F* positivas, junto con niveles de hemoglobina (Hb) y leucocitos más altos<sup>11</sup>. También se ha descrito un mayor riesgo trombótico en TE homocigotas, frente a las heterocigotas o las carentes de la mutación. No obstante, publicaciones posteriores presentan resultados discordantes, que podrían justificarse porque los estudios iniciales eran cualitativos, en función del estado mutacional (mutado *vs.* no mutado), y retrospectivos. Sin embargo en los últimos trabajos, los estudios publicados establecen la comparación en términos cuantitativos, en función de la carga tumoral. De este modo, dos series de pacientes con TE, aunque también retrospectivas, muestran que tanto la presencia de la mutación *JAK2 V617F* como su carga alélica se asocian con mayor riesgo trombótico<sup>12,13</sup>.

En cuanto a PV, aunque no existe evidencia de diferencias entre pacientes homocigotos y heterocigotos, el riesgo trombótico aumenta significativamente cuando se analiza respecto a la carga tumoral: mayor cuando ésta al diagnóstico es superior al 75-80%, de acuerdo con los trabajos de Vannucchi y de Silva<sup>14</sup>; no obstante, el grupo de Tefferi no corrobora estos resultados.

En resumen, los estudios publicados en estos tres últimos años parecen identificar a *JAK2 V617F* como un posible marcador pronóstico de trombosis en PV y TE. Sin embargo, no se pueden establecer todavía conclusiones definitivas y se requieren estudios prospectivos, realizados con la misma metodología. En relación con la posible asociación entre *JAK2 V617F* y la supervivencia o transformación a leucemia aguda –en PV y TE–, no hay datos concluyentes.

En MFP, por ahora los resultados son divergentes en términos de supervivencia y evolución a leucemia aguda. Por otro lado, la evaluación del tratamiento mediante la cuantificación de la mutación *JAK2 V617F* por PCR aleloespecífica ha demostrado su utilidad cuando estos enfermos se someten a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

Respecto a la evaluación de la respuesta al tratamiento, los enfermos tratados con interferón alfa muestran

una disminución de la carga tumoral de *JAK2 V617F*, y en un tanto por ciento pequeño se describen respuestas moleculares completas. El empleo de hidroxiaurea parece tener un efecto modesto sobre la disminución de la carga tumoral de *JAK2 V617F*.

## Conclusiones

El estudio de la mutación *JAK2 V617F* ha tenido un gran impacto en la aproximación diagnóstica a las NMP, en especial a la PV, y constituye un gran avance en el conocimiento fisiopatogénico de las NMP. *JAK2 V617F* se ha convertido en el primer marcador biológico pronóstico independiente, junto a los factores pronósticos convencionales, para PV, TE y MFP. Es, además, una diana terapéutica para la que se están desarrollando fármacos específicos, aunque, por ahora, con resultados son muy limitados.

## Bibliografía

- Hermouet S, Dobo I, Lippert E, Boursier MC, Ergand L, Perrault-Hu F, et al. Comparison of whole blood vs purified blood granulocytes for the detection and quantitation of *JAK2(V617F)*. *Leukemia*. 2007; 21 (5): 1128-30.
- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase *JAK2* in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005; 365 (9464): 1054-61.
- James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal *JAK2* mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005; 434 (7037): 1144-8.
- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, et al. A gain-of-function mutation of *JAK2* in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005; 352 (17): 1779-90.
- Rapado I, Albizua E, Ayala R, Hernández JA, García-Alonso L, Grande S, et al. Validity test study of *JAK2 V617F* and allele burden quantification in the diagnosis of myeloproliferative diseases. *Ann Hematol*. 2008; 87 (9): 741-9.
- Rapado I, Grande S, Albizua E, Ayala R, Hernández JA, Gallardo M, et al. High resolution melting analysis for *JAK2* exon 14 and exon 12 mutations: a diagnostic tool for myeloproliferative neoplasms. *J Mol Diagn*. 2009; 11 (2): 155-61.
- Tefferi A, Thiele J, Orazi A, Kvasnicka HM, Barbui T, Hanson CA, et al. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood*. 2007; 8: 8.
- Patnaik MM, Tefferi A. The complete evaluation of erythrocytosis: congenital and acquired. *Leukemia*. 2009 May; 23(5): 834-44.
- 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 (1): 14-22.
- Inmaculada Rapado, Silvia Grande, Enriqueta Albizua, Rosa Ayala, José-Ángel Hernández, Miguel Gallardo, Florinda Gilsanz, J. Martínez-López. High resolution melting analysis for *JAK2* exon 14 and exon 12 mutations: a diagnostic tool for myeloproliferative neoplasms. *J Mol Diagn*. 2009 Mar; 11 (2): 155-61.

- Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT, et al. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on *JAK2 V617F* mutation status: a prospective study. *Lancet*. 2005; 366 (9501): 1945-53.
- Kittur J, Knudson RA, Lasho TL, Finke CM, Gangat N, Wolanskyj AP, et al. Clinical correlates of *JAK2V617F* allele burden in essential thrombocythemia. *Cancer*. 2007; 109 (11): 2279-84.
- Antonioli E, Guglielmelli P, Poli G, Bogani C, Pancrazzi A, Longo G, et al. Influence of *JAK2V617F* allele burden on phenotype in essential thrombocythemia. *Haematologica*. 2008; 93 (1): 41-8.
- Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Longo G, Pancrazzi A, Ponziani V, et al. Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on *JAK2V617F* allele burden. *Leukemia*. 2007; 21 (9): 1952-9.

## SÍNDROMES MIELOPROLIFERATIVOS CRÓNICOS: PAPEL DE LOS LEUCOCITOS Y MECANISMOS DE TROMBOFILIA EN POLICITEMIA Y TROMBOCITEMIA

A. ÁLVAREZ LARRÁN<sup>1</sup>, E. ARELLANO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Hematología. Hospital del Mar. Barcelona

<sup>2</sup>Servicio de Hemostasia y Trombosis.

Hospital Universitario Vall d'Hebron. Barcelona

## Introducción

Las interacciones que se producen entre los leucocitos y las plaquetas con el endotelio están sometidas a una compleja regulación en la que intervienen múltiples moléculas cuya disregulación puede dar lugar a una inflamación patológica e intervenir en la patogenia de la trombosis (Tablas 1 y 2). En los síndromes mieloproliferativos crónicos (SMPC) se ha descrito la sobreexpresión de determinadas moléculas que intervienen en dichas interacciones. El efecto neto de estas alteraciones es una mayor adhesividad de leucocitos y plaquetas al endotelio así como una mayor activación basal de los mismos. Se cree que dichas alteraciones pueden jugar un importante papel en la patogenia de la trombosis en estas enfermedades. En la presente comunicación se revisan los principales mecanismos involucrados en la interacción entre leucocitos y plaquetas con el endotelio haciendo especial énfasis en las alteraciones demostradas en la policitemia vera (PV) y la trombocitemia esencial (TE).

## Activación plaquetaria y leucocitaria en la TE y la PV

La existencia de un fenotipo activado en los neutrófilos y los monocitos de los pacientes con PV y

**Tabla 1. Principales proteínas involucradas en los diferentes pasos de la interacción entre los leucocitos y endotelio**

	<i>Marginación y rolling</i>	<i>Enlentecimiento del rolling</i>	<i>Activación y polarización</i>	<i>Adhesión firme</i>	<i>Transmigración</i>
Leucocito	PSGL-1 ESL-1	CD44 ESL-1 CD11b	CD44 GPCR	CD11b	CD11b CD99 JAMs
Endotelio	P-selectina E-Selectina	E-selectina ICAM-1	E-selectina Chemoquinas	ICAM-1	ICAM-1 PECAM-1 CD99 ESAM JAMs

PSGL-1: ligando de la P-selectina; ESL-1: ligando de la E-selectina; GPCR: receptores ligados a proteínas G; ICAM-1: molécula de adhesión intercelular; JAMs: moléculas de adhesión de confluencia; PECAM: molécula de adhesión de célula endotelial y plaqueta; ESAM: molécula de adhesión de célula endotelial selectiva.

**Tabla 2. Proteínas de adhesión que intervienen en la interacción entre plaquetas y endotelio y en la formación de complejos leucocito-plaqueta**

Pasos	<i>Captura inicial y rolling</i>	<i>Adhesión firme</i>	<i>Reclutamiento de leucocitos</i>
Plaquetas en reposo	GPIb $\alpha$ PSGL-1		
Plaquetas activadas		GPIIb/IIIa	P-selectina
Plasma		Fibrinógeno	
Endotelio	FvW P-selectina E-selectina	ICAM1	
Leucocitos			PSGL-1

GPIb $\alpha$ : glucoproteína plaquetaria Ib; PSGL-1: ligando de la P-selectina; GPIIb/IIIa: glucoproteína plaquetaria IIb/IIIa; FvW: factor de von Willebrand. ICAM-1: molécula de adhesión intercelular.

TE fue descrita por diferentes investigadores, quienes demostraron un incremento en la capacidad de fagocitosis y la producción de radicales de oxígeno, un aumento en la expresión del antígeno CD11b de membrana y de la fosfatasa alcalina granulocitaria, así como en el contenido de elastasa celular y plasmática<sup>1-7</sup>. Es importante destacar que en la mayoría de los estudios previamente citados no se determinó si existían diferencias en dichos parámetros de activación entre los pacientes con y sin antecedente de trombosis.

Arellano-Rodrigo *et al.* estudiaron la activación plaquetaria, la activación leucocitaria y los complejos leucocito-plaqueta en dos cohortes de pacientes con TE, con y sin antecedente de trombosis, y en un grupo control constituido por donantes de sangre<sup>8</sup>. En dicho estudio, los pacientes con TE presentaron un aumento en todos los parámetros estudiados de activación, así como en el porcentaje de complejos leucocito-plaqueta circulantes cuando se comparaban con los valores obtenidos en donantes sanos<sup>8</sup>. Pero, además, los pacientes con TE y trombosis presentaron un mayor porcentaje de plaquetas que expresaban P-selectina, tanto en condiciones basales como tras

estimulación con ácido araquidónico, así como una mayor expresión de CD11b monocitario que los pacientes con TE sin trombosis<sup>8</sup>. Dichos hallazgos sugieren que en la TE tanto la activación plaquetaria como la leucocitaria, fundamentalmente la monocitaria, están involucradas en la génesis de la trombosis (Tabla 3).

El síndrome de Budd-Chiari (SBC) o la trombosis portal (TP) constituyen un tipo de trombosis característico de los SMPC, siendo la PV la causa más frecuente de SBC. Es posible, por ello, que de existir alguna alteración protrombótica, característica de la PV, ésta sea más evidente en este tipo de trombosis que en la cardiopatía isquémica, la vasculopatía periférica o el ictus, en las cuales el papel de la edad y de los factores de riesgo cardiovascular están bien establecidos. Con la finalidad de dilucidar los mecanismos involucrados en la génesis de la trombosis en la PV se estudió la expresión del CD11b granulocitario, el metabolismo oxidativo de los neutrófilos y el porcentaje de complejos leucocito-plaqueta circulantes en pacientes afectados de PV que habían presentado SBC o TP<sup>9</sup>. Los resultados obtenidos en dicho estudio mostraron que la expresión del antígeno CD11b granulocitario, el metabolismo oxidativo de los neutrófilos y el porcentaje de complejos leucocito-plaqueta circulantes eran significativamente más altos en los pacientes con PV que en los pacientes sin SMPC o los controles sanos. Además, la expresión de CD11b granulocitario, tanto basal como tras estímulo con f-MLP, fue significativamente más elevada en los pacientes con PV y trombosis que en los pacientes con PV sin trombosis. Estos resultados sugieren que la activación leucocitaria, y en concreto la sobreexpresión del antígeno CD11b, puede desempeñar un papel en la patogenia del SBC y la TP en la PV.

Recientemente, se ha demostrado que la presencia de leucocitosis al diagnóstico de la TE constituye un factor independiente de riesgo trombótico<sup>10</sup>. A pesar de que este hallazgo se relaciona frecuentemente con un hipotético aumento de la activación leucocitaria, todavía nadie lo ha demostrado.



**Tabla 3. Parámetros de activación celular y de la coagulación asociados con trombosis en la policitemia vera y la trombocitemia esencial**

Localización	Parámetros
Coagulación	↑ Factor V en TE <sup>16</sup> Resistencia a la proteína C activada adquirida en TE <sup>16</sup> ↑ Generación de trombina en PV/TE <sup>18</sup>
Neutrófilo	↑ CD11b en PV con SBC <sup>9</sup> ↑ Complejos neutrófilo-plaqueta en SMPC <sup>14</sup>
Monocito	↑ CD11b y expresión de FT tras estímulo con LPS en TE <sup>8</sup>
Plaqueta	↑ P-selectina basal y tras estímulo con AA en TE <sup>8</sup> ↑ Plaquetas reticuladas en TE <sup>16</sup>

PV: policitemia vera; TE: trombocitemia esencial; SBC: síndrome de Budd-Chiari; SMPC: síndrome mieloproliferativo crónico; FT: factor tisular; LPS: lipopolisacárido; AA: ácido araquidónico.

### Complejos leucocito-plaqueta en los SMPC

En la PV se ha registrado que el 40-50% de los leucocitos circulan unidos a las plaquetas, mientras que en la TE dicho porcentaje es todavía mayor, alcanzando el 50-60% de los neutrófilos y hasta el 80% de los monocitos<sup>8,9,11</sup>. Maugeri *et al.*, en un estudio realizado en pacientes con PV y TE, demostraron que la expresión de P-selectina y los complejos leucocito-plaqueta circulantes se correlacionaban con la desgranulación de los neutrófilos y la presencia de fibrinógeno ligado de forma estable a la superficie leucocitaria, así como con un mayor contenido y expresión extracelular de factor tisular. Además, dichas alteraciones se normalizaron tras tratamiento con hidroxiurea, fármaco capaz de bloquear la unión entre P-selectina y PSGL-1<sup>12</sup>. Jensen *et al.* observaron que los pacientes con PV y TE tienen un incremento del porcentaje de complejos leucocito-plaqueta circulantes y que la presencia de estos agregados se correlacionaba con el antecedente de trombosis<sup>13,14</sup>. Por su parte, Falanga *et al.* reportaron recientemente la existencia de un elevado porcentaje de complejos leucocito-plaqueta en los pacientes con TE y PV, así como que la presencia de dichos agregados mixtos se correlacionaba con parámetros de activación leucocitaria tales como una mayor expresión de CD11b de membrana. Además, el tratamiento con aspirina disminuía la formación de dichos agregados<sup>11</sup>.

Todos estos resultados apoyarían la hipótesis de que los agregados mixtos formados por leucocitos y plaquetas que circulan en un porcentaje incrementado en la sangre de los pacientes con PV y TE desempeñarían un papel en la etiopatogenia de la trombosis de la PV, si bien la utilidad de este marcador como factor de riesgo de trombosis no ha podido establecerse hasta el momento.

### Correlación de los parámetros de activación leucocitaria y de la coagulación

Diferentes autores han demostrado que los parámetros de activación leucocitaria y plaquetaria en la PV y la TE se asocian a una mayor activación de la coagulación, sugiriendo, por tanto, una asociación causal<sup>6,15-17</sup>. Falanga *et al.* demostraron que en la PV existe un aumento en la concentración del fragmento 1+2 de la protrombina, de dímero D y de los complejos trombina-antitrombina con respecto a controles sanos<sup>6</sup>. Resultados similares se documentaron en la TE, a excepción del dímero D, por el mismo grupo<sup>6</sup>. Otros autores han confirmado la presencia de una elevación de dichos marcadores de activación de la coagulación<sup>15-17</sup>.

Además, recientemente se ha demostrado que en la PV y la TE existe una resistencia adquirida a la proteína C activada (RPCA)<sup>16,18</sup>. Dicha resistencia se ha correlacionado con una concentración plasmática reducida del factor V de la coagulación y de la proteína S libre<sup>16,18</sup>. Se ha especulado que, como resultado de la activación leucocitaria y la liberación continuada del contenido de sus gránulos, se produciría un consumo de los factores V y de la proteína S que darían lugar a la RPCA. Cabe destacar que en un estudio la presencia de RPCA se asoció de forma independiente con un mayor riesgo de trombosis en pacientes con TE<sup>16</sup>.

El factor tisular (FT) es el principal iniciador de la cascada de la coagulación *in vivo*, por lo que dicha molécula ha centrado la atención en diferentes estudios. En comparación con controles sanos, no se han encontrado diferencias en la concentración plasmática basal de FT en la TE y la PV, respectivamente<sup>16,17</sup>. Sin embargo, sí se ha demostrado una mayor capacidad de producción de FT por parte de los monocitos activados en pacientes con PV<sup>17</sup> así como una mayor concentración de moléculas de FT en la membrana de los monocitos de pacientes con TE, correlacionándose dicha expresión de FT en los monocitos con una mayor frecuencia de trombosis<sup>8</sup>. Por último, se ha estudiado el contenido de FT plaquetario en la TE con resultados contradictorios<sup>16,19</sup>.

### Correlación entre la activación plaquetaria y leucocitaria y la mutación V617F de JAK2

Tras el descubrimiento de la mutación V617F del gen *JAK2*, diferentes autores han estudiado si la presencia de dicha mutación influye en la activación leucocitaria y plaquetaria (Tabla 4). Arellano-Rodrigo *et al.* demostraron que los pacientes con TE y mutación de *JAK2* tenían una mayor expresión de P-selectina plaquetaria basal y tras estimulación con ácido araquidónico, un hallazgo que sugiere que la activación

**Tabla 4. Parámetros de activación celular y de la coagulación asociados con la presencia de la mutación V617F del gen JAK2 o su carga alélica**

Localización	Parámetros
Coagulación	↑ FT en TE <sup>16</sup> ↓ Proteína S libre en PV/TE <sup>16,18</sup> ↑ Resistencia a la proteína C activada adquirida en PV/TE <sup>18</sup>
Endotelio	↑ Trombomodulina <sup>16,19</sup>
Neutrófilo	↑ FAG y ↑ CD14 en SMPC <sup>19,20</sup> ↑ Complejos neutrófilo-plaqueta en TE <sup>19</sup>
Monocito	↑ CD11b y expresión de FT tras estímulo con LPS en TE <sup>8</sup>
Plaqueta	↑ P-selectina basal y tras estímulo con AA en TE <sup>8</sup> sP-selectina y sCD40L en TE/SMPC <sup>15,16</sup> ↑ FT basal y tras estímulo en TE <sup>19</sup>

PV: policitemia vera; TE: trombocitemia esencial; FT: factor tisular; FAG: fosfatasa alcalina granulocitaria; LPS: lipopolisacárido; AA: ácido araquidónico.

plaquetaria en la TE depende de la presencia de la mutación V617F de JAK2<sup>8</sup>. Dado que la P-selectina plaquetaria interviene en el reclutamiento y activación de los leucocitos en los lugares de daño endotelial así como en la formación de los complejos leucocito-plaqueta, la presencia de la mutación V617F de JAK2 podría comportarse como una alteración protrombótica en la TE gracias al aumento en la expresión de P-selectina plaquetaria. De acuerdo con estos hallazgos, se ha demostrado un efecto dosis de la carga alélica de JAK2 sobre diferentes parámetros de activación plaquetaria como son la P-selectina soluble y el CD40 ligando soluble<sup>15,16,19</sup> así como un mayor porcentaje de complejos leucocito-plaqueta en los pacientes con TE JAK2 positiva<sup>19</sup>.

Por otra parte, los pacientes con SMPC y mutación V617F del gen JAK2 tienen una expresión aumentada de la fosfatasa alcalina granulocitaria y CD14<sup>20</sup>. Además, en la TE, cuando se estimulan los monocitos con lipopolisacárido (LPS), los pacientes portadores de la mutación son capaces de presentar en la superficie un mayor número de moléculas de CD11b y FT que los pacientes sin la mutación. Estos datos sugieren que la presencia de la mutación V617F del gen JAK2 confiere un aumento de la activación leucocitaria, tanto en condiciones basales como en respuesta a determinados estímulos que podría resultar en una mayor capacidad coagulativa, adhesiva o de daño endotelial.

Por último la RPCA observada en la TE y la PV también se ha correlacionado con la presencia de la mutación de JAK2, especialmente en los pacientes homocigotos, apoyando por tanto el papel protrombótico de la mutación<sup>18</sup>; esta hipótesis que se vería avalada por la reciente demostración de una mayor concentración plasmática de FT y una menor concentración de proteína S, factor II, factor V e inhibidor de FT en los pacientes con TE o PV portadores de la mutación V617F de JAK2<sup>16,18</sup>.

## Bibliografía

- Samuelsson J, Berg A. Further studies of the defective stimulus-response coupling for the oxidative burst in neutrophils in polycythemia vera. *Eur J Haematol* 1991; 47 (4): 239-45.
- Westwood NB, Copson ER, Page LA, Mire-Sluis AR, Brown KA, Pearson TC. Activated phenotype in neutrophils and monocytes from patients with primary proliferative polycythemia. *J Clin Pathol* 1995; 48 (6): 525-30.
- Carulli G, Minnucci S, Azzara A, Gianfaldoni ML, Angiolini C, Sagripanti A, et al. Neutrophil functions in essential thrombocythemia. *Hematol Pathol* 1995; 9 (1): 37-47.
- Iki S, Yuo A, Yagisawa M, Inuo EK, Inoue Y, Usuki K, et al. Increased neutrophil respiratory burst in myeloproliferative disorders: selective enhancement of superoxide release triggered by receptor-mediated agonists and low responsiveness to in vitro cytokine stimulation. *Exp Hematol* 1997; 25 (1): 26-33.
- Wolach B, Gavrieli R, Manor Y, Lishner M. Leukocyte function in chronic myeloproliferative disorders. *Blood Cells Mol Dis* 1998; 24 (4): 544-51.
- 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 (13): 4261-6.
- Burgaleta C, González N, César J. Increased CD11/CD18 expression and altered metabolic activity on polymorphonuclear leukocytes from patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Acta Haematol* 2002; 108 (1): 23-8.
- Arellano-Rodrigo E, Álvarez-Larrán A, Reverter JC, Villamor N, Colomer D, Cervantes F. Increased platelet and leukocyte activation as contributing mechanisms for thrombosis in essential thrombocythemia and correlation with the JAK2 mutational status. *Haematologica* 2006; 91 (2): 169-75.
- Álvarez-Larrán A, García-Pagán JC, Abroades JG, Arellano E, Reverter JC, Bosch J, et al. Increased CD11b neutrophil expression in Budd-Chiari syndrome or portal vein thrombosis secondary to polycythemia vera. *Br J Haematol* 2004; 124 (3): 329-35.
- Carobbio A, Antonioli E, Guglielmelli P, Vannucchi AM, Delaini F, Guerini V, et al. Leukocytosis and risk stratification assessment in essential thrombocythemia. *J Clin Oncol* 2008; 26 (16): 2732-6.
- Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, Balducci D, Barbui T. Leukocyte-platelet interaction in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Exp Hematol* 2005; 33 (5): 523-30.
- 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 (12): 2593-8.
- Jensen MK, de Nully BP, Lund BV, Nielsen OJ, Hasselbalch HC. Increased platelet activation and abnormal membrane glycoprotein content and redistribution in myeloproliferative disorders. *Br J Haematol* 2000; 110 (1): 116-24.
- Jensen MK, de Nully BP, Lund BV, Nielsen OJ, Hasselbalch HC. Increased circulating platelet-leukocyte aggregates in myeloproliferative disorders is correlated to previous thrombosis, platelet activation and platelet count. *Eur J Haematol* 2001; 66 (3): 143-51.
- Robertson B, Urquhart C, Ford I, Townend J, Watson HG, Vickers MA, et al. Platelet and coagulation activation markers in myeloproliferative diseases: relationships with JAK2 V617F status, clonality, and antiphospholipid antibodies. *J Thromb Haemost* 2007; 5 (8): 1679-85.
- Arellano-Rodrigo E, Álvarez-Larrán A, Reverter JC, Colomer D, Villamor N, Bellosillo B, et al. Platelet turnover, coagulation factors, and soluble markers of platelet and endothelial activation in essential thrombocythemia: relationship with thrombosis occurrence and JAK2 V617F allele burden. *Am J Hematol* 2009; 84 (2): 102-8.

17. Kornberg A, Rahimi-Levene N, Yona R, Mor A, Rachmilewitz EA. Enhanced generation of monocyte tissue factor and increased plasma prothrombin fragment1+2 levels in patients with polycythemia vera: mechanism of activation of blood coagulation. *Am J Hematol* 1997; 56 (1): 5-11.
18. Marchetti M, Castoldi E, Spronk HM, van Oerle R, Balducci D, Barbui T, et al. Thrombin generation and activated protein C resistance in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* 2008; 112 (10): 4061-8.
19. Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, Balducci D, Russo L, Guerin V, et al. V617F JAK-2 mutation in patients with essential thrombocythemia: relation to platelet, granulocyte, and plasma hemostatic and inflammatory molecules. *Exp Hematol* 2007; 35 (5): 702-11.
20. Passamonti F, Rumi E, Pietra D, la Porta MG, Boveri E, Pascutto C, et al. Relation between JAK2 (V617F) mutation status, granulocyte activation, and constitutive mobilization of CD34+ cells into peripheral blood in myeloproliferative disorders. *Blood* 2006; 107 (9): 3676-82.

## TRATAMIENTO ADAPTADO A RIESGO EN POLICITEMIA VERA Y TROMBOCITEMIA ESENCIAL

C. BURGALETA, A. DE OZALLA,  
J.J. GIL-FERNÁNDEZ

*Servicio de Hematología y Hemoterapia.  
Hospital Universitario Príncipe de Asturias.  
Departamento de Medicina. Universidad de Alcalá.  
Alcalá de Henares (Madrid)*

### Introducción

La policitemia vera (PV) y trombocitemia esencial (TE) son enfermedades mieloproliferativas crónicas (EMPC) que se caracterizan por la expansión clonal de una célula progenitora hematopoyética anormal, con predominio de la proliferación de los elementos hematopoyéticos, sin alteraciones significativas de la maduración; están incluidas entre las EMPC Filadelfia-negativas (Ph-) reconocidas por el Polycythemia Vera Study Group (PVSG) y por la Organización Mundial de la Salud. Estos trastornos presentan hiperplasticidad de la médula ósea (MO) con elevaciones variables de las cifras de granulocitos, hematíes o plaquetas en sangre periférica (SP) y tienden a presentar una evolución clonal y una progresión de la enfermedad que conduce a un fallo medular con mielofibrosis o transformación leucémica.

La comprensión de la fisiopatología de estas entidades ha experimentado un gran progreso a partir de la identificación en 2005 de la mutación *V617F*, en el exón 14 del *JAK2*, en más del 90% de los pacientes con PV y en torno al 50% de los pacientes con TE o mielofibrosis primaria (MFP)<sup>1,2</sup>. Ello ha dado lugar al cambio de denominación de estas entidades, reconociéndose como neoplasias mieloproliferativas crónicas

(NMPC), dentro de la clasificación de las neoplasias mieloides de la OMS 2008<sup>3</sup> (Tabla 1), así como a modificar los criterios diagnósticos, siendo en la actualidad la identificación de la mutación *JAK2* un criterio mayor, e incluyéndose a los pacientes con cifras de plaquetas superiores a 450.000 por mm<sup>3</sup> en el diagnóstico diferencial de TE<sup>3</sup> (Tabla 2 y Figuras 1 y 2).

La epidemiología de estas entidades es compleja por cursar inicialmente de manera asintomática y no incluirse habitualmente en los registros de cáncer, lo que ha contribuido a subestimar la frecuencia de estos trastornos. Los estudios a partir del registro sueco muestran una incidencia anual en torno a 2-3 casos/100.000, con una prevalencia de 22 a 24 casos/100.000<sup>4</sup>. Estas cifras epidemiológicas pueden ser claramente superiores empleando los nuevos criterios de diagnóstico, lo que pone aún más de relieve la importancia de sistematizar las indicaciones de tratamiento por grupos de riesgo.

La principal causa de morbilidad y mortalidad de los pacientes con PV y TE la constituyen las complicaciones trombóticas, 40 y 30 % respectivamente, que pueden ser la primera manifestación de la enfermedad, seguidas a distancia de las complicaciones hemorrágicas y de su potencial evolución a mielofibrosis o leucemia aguda<sup>5-7</sup>. En la PV, las complicaciones trombóticas anteceden al diagnóstico en el 15% de los casos. Una forma de presentación la constituye el síndrome de Budd-Chiari o trombosis de las venas suprahepáticas; por orden de frecuencia destacan las trombosis venosas profundas (TVP), el tromboembolismo pulmonar (TEP), las trombosis de las venas de la retina y las trombosis venosas superficiales<sup>7</sup>. Comparado el riesgo de trombosis en la TE con el de una población control del mismo sexo, edad y con similares factores de riesgo cardiovascular (FRCV), existe un riesgo significativamente mayor de trombosis en la TE (7% vs. 1%, por paciente y año). Las manifestaciones que predominan son las trombosis arteriales y cabe destacar la presentación en forma de accidentes isquémicos transitorios (AIT), accidentes cerebrovasculares agudos (ACV), isquemia retiniana o infarto agudo de miocardio (IAM).

Tabla 1. Neoplasias mieloproliferativas crónicas, según la clasificación de la OMS (2008)

Leucemia mielóide crónica
Policitemia vera
Trombocitemia esencial
Mielofibrosis primaria
Leucemia neutrofílica crónica
Síndrome hipereosinofílico
Enfermedad por mastocitos
NMP crónicas inclasificables

Tabla 2. Criterios diagnósticos de PV y TE según la OMS (2008)

	<i>Policitemia vera</i>	<i>Trombocitemia esencial</i>
<b>Criterios Mayores</b>	Hb > 18,5 g/dL (varones), > 16,5 g/dL (mujeres) o Hb/Hto. > percentil 99 del rango de referencia según edad, sexo y altitud de residencia, o Hb > 17 g/dL (varones) o > 15 g/dL (mujeres), si se asocia a un incremento sostenido de $\geq 2$ g/dL desde el valor basal que no puede ser atribuido a la corrección de déficit hierro, o elevación de la masa de células rojas > 25% por encima de lo normal	Plaquetas $\geq 450 \times 10^9/L$
	Presencia <i>JAK2V617F</i> o mutación similar	Proliferación de megacariocitos grandes y aspecto maduro con escasa proliferación de granulocitos y hematíes
		No criterios LMC, PV, MFP, SMD u otra neoplasia mielóide
		<i>JAK2 V617F</i> u otro marcador de clonalidad.
		No evidencia de trombocitosis reactiva
<b>Criterios menores</b>	Proliferación trilineal MO	
	Niveles bajos EPO	
	Crecimiento CEE	

LMC: leucemia mielóide crónica; PV: policitemia vera; MFP: mielofibrosis primaria; SMD: síndrome mielodisplásico; MO: médula ósea; EPO: eritropoyetina; CEE: colonias eritroides endógenas.

Además de estos eventos trombóticos mayores, estos enfermos pueden presentar eritromelalgia, vértigo, cefalea y parestesias, que están en relación con trombosis microvasculares.

En la actualidad el tratamiento se basa en medidas que tienen como objetivo prevenir las complicaciones, en base al nivel de riesgo previsto con criterios previamente definidos<sup>8</sup>. Las recomendaciones para el tratamiento de los enfermos con PV y TE se basan en

conclusiones de un número muy limitado de ensayos clínicos aleatorizados realizados por distintos grupos cooperativos: ECLAP, PVSG, EORTC, GISP<sup>9-12</sup>, estudios observacionales, registros retrospectivos y acuerdos de grupos de consenso, a pesar de lo cual muchos pacientes son tratados de una forma individualizada, basándose en la experiencia clínica personal del facultativo. Dada la capital importancia de las complicaciones trombohemorrágicas, el primer paso previo al tratamiento debe ser identificar los potenciales factores de riesgo individual, por lo que es de la mayor importancia conocer los mecanismos implicados en la patogenia de las complicaciones trombohemorrágicas de la PV y TE.

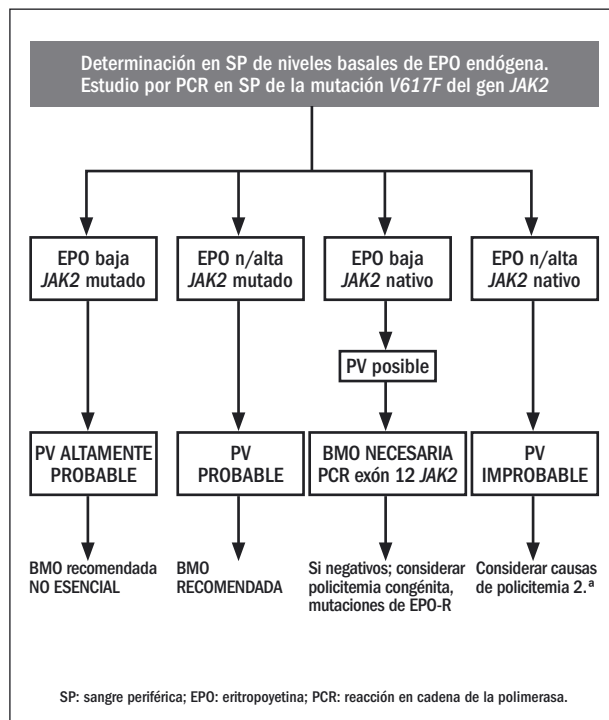


Figura 1. Algoritmo diagnóstico de policitemia.

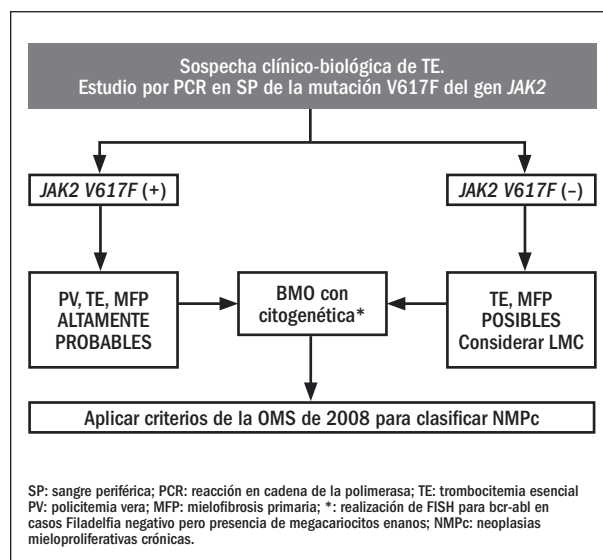


Figura 2. Algoritmo diagnóstico de trombocitemia esencial.



## Mecanismos implicados en la patogenia de la trombosis en PV y TE

Las situaciones de hipercoagulabilidad o trombofilia reflejan un exceso de actividad hemostática, que sobrepasan la fibrinólisis fisiológica<sup>7</sup>. En los pacientes con TE y PV, la edad avanzada, la hiperviscosidad y el enlentecimiento del flujo sanguíneo, son tres factores decisivos que predisponen al desarrollo de complicaciones trombóticas y hemorrágicas. Dado que el valor del hematocrito (Hto.) es el principal determinante de la viscosidad sanguínea y que contribuye de forma directa a la agregación de los hematíes<sup>5</sup>, una reducción del tanto por ciento del Hto. como de la cifra de plaquetas parecen contribuir de forma decisiva en prevenir la aparición de complicaciones tromboembólicas<sup>12</sup>.

Los FRCV y las situaciones de trombofilia constitucional o adquirida no forman parte de los mecanismos patogénicos de trombosis, específicos de las NMPC, aunque tienen importancia en la valoración del riesgo trombótico y en el manejo terapéutico de los pacientes con TE y PV<sup>13</sup>.

Los pacientes con NMPC portadores de mutaciones asociadas a trombofilia (factor V Leiden, la mutación en el gen del factor II (protrombina G20210) y mutación del gen de la 5 metil-tetra-hidro-folato-reductasa (MTHFR) presentan mayor riesgo trombótico, estando indicado emplear tratamiento citorreductor en pacientes considerados de riesgo intermedio, ante la presencia de historia trombótica familiar o genotipos trombofílicos<sup>13</sup>. Por el contrario, la presencia de otras alteraciones de coagulación en estos pacientes (déficit de proteína S o de proteína C o de trombomodulina o de antitrombina III y elevación de los niveles de los factores VIII, IX y XI) no se ha confirmado como causa determinante de trombosis en estos pacientes<sup>13</sup>.

Por otra parte, las alteraciones plaquetarias existentes en estos pacientes muestran un doble efecto paradójico. Las alteraciones microvasculares presentes en TE y PV, incluidas la eritromelalgia, accidentes isquémicos cerebrales u oculares y accidentes coronarios transitorios, son causados por trombos plaquetarios, que son consecuencia de una activación plaquetaria por diversos mecanismos: aumento de los niveles de betatromboglobulina (beta-TG), factor plaquetario 4 y trombomodulina (TM) y aumento de la eliminación en orina de beta-2-tromboxano (B2TX). El tratamiento con ácido acetilsalicílico (AAS), que inhibe la ciclooxigenasa de tipo 1 plaquetaria, corrige las alteraciones descritas y controla las manifestaciones clínicas microvasculares, además de prevenir las complicaciones trombóticas mayores. Estudios recientes han confirmado un papel trombogénico en las plaquetas activadas, al demostrar la formación de agregados leucoplaquetarios (ALP) y a su acción sobre las células endoteliales<sup>14,15</sup>.

La expresión de las proteínas P-selectina y trombospondina, de los gránulos- $\alpha$ , en la membrana plaquetaria, da lugar a que la CD62P (P-selectina), se una a la membrana de los leucocitos, formando ALP. La interacción de los ALP con el endotelio vascular contribuye a explicar su papel en la patogenia de los eventos trombóticos y a la disminución de trombosis en aquellos pacientes que mantienen un estricto control de los recuentos plaquetarios ( $< 400 \times 10^9/L$ ).

La relación de los leucocitos con la trombogénesis y el daño endotelial ha sido objeto de estudio en distintos procesos. Los neutrófilos activados pueden afectar a los mecanismos de la hemostasia de diversos modos: producción de sustancias oxidantes; liberación al torrente sanguíneo de proteasas desde sus gránulos; e interacción con plaquetas, monocitos y células endoteliales. En los pacientes con TE y PV se ha demostrado la existencia de una activación de los leucocitos con un aumento en la expresión de sus moléculas de adhesión CD11, CD18 y de la L-selectina<sup>16,17</sup>. Aunque el papel de los leucocitos en la patogénesis de la trombosis en TE se discute en otro tema de este simposio, queremos resaltar que en el momento actual la leucocitosis se puede considerar como un factor de riesgo independiente tanto para el desarrollo de trombosis como para la supervivencia global<sup>18,19</sup>, tanto en TE como en PV. De hecho, los pacientes con PV incluidos en el estudio *ECLAP* con leucocitosis superiores a  $15 \times 10^9/L$ , tenían más probabilidad de presentar IAM<sup>11</sup>.

El reciente descubrimiento de la mutación *JAK2* (*V617F*) en la mayoría de los pacientes con PV y alrededor del 50% de las TE ha contribuido a explicar el origen de la proliferación eritropoyética y megacariocítica en estos enfermos y ha llevado a estudiar el papel de esta mutación en el desarrollo de las trombosis. La mutación hace que las células escapen al mecanismo regulador de su proliferación, en el dominio de las cinasas, como consecuencia, los pacientes con TE que presentan la mutación *JAK2* presentan cifras de hemoglobina y recuentos leucocitarios superiores al resto<sup>20</sup>.

En relación con el significado de la mutación *V617F* del gen *JAK2* se ha valorado la influencia de la carga mutacional *JAK2*. En un estudio de 173 pacientes con PV, el riesgo relativo de complicaciones cardiovasculares era 7,1 veces superior en aquellos pacientes con mayor carga alélica ( $> 75\%$  de alelos mutados) frente a los que tenían menor carga alélica ( $< 25\%$  alelos *JAK2*)<sup>20</sup>. El mayor estudio prospectivo en TE realizado hasta la fecha incluyó 809 pacientes y encontró una asociación entre la presencia de la mutación de *JAK2* y un incremento del riesgo de trombosis venosa<sup>21</sup>. En relación con la carga alélica del mutante *V7167F* de *JAK2*, el estudio de Antonioli *et al.* realizado sobre un subgrupo de 165 pacientes con TE *JAK2*-positiva, observó que la presencia de  $> 25\%$  de alelos *JAK2* muta-

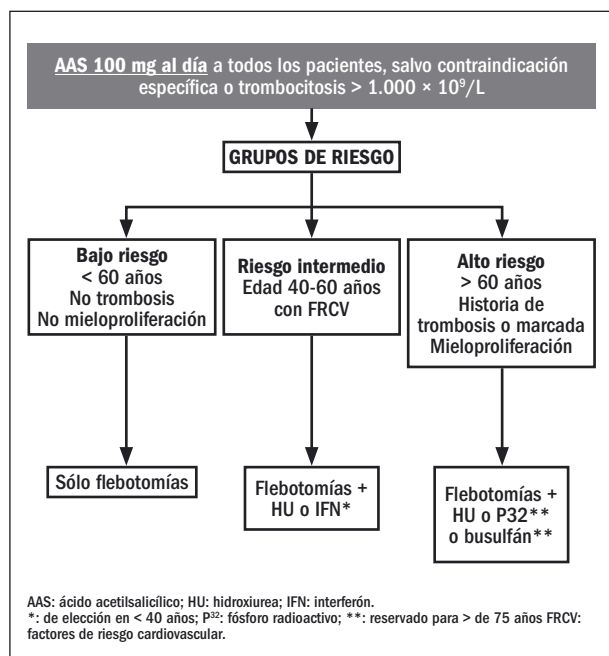


Figura 3. Algoritmo de tratamiento adaptado en policitemia.

dos se asociaba a un incremento del riesgo relativo de trombosis arterial de tres veces<sup>22</sup>.

Los pacientes deben estratificarse en grupos de alto, medio y bajo riesgo de acuerdo con la edad, los antecedentes de trombosis y presencia o no de trombocitosis extrema. Los FRVC y la historia familiar de trombofilia deben ser considerados en el grupo de pacientes jóvenes de riesgo intermedio<sup>8</sup>. Las nuevas variables como son la leucocitosis o la carga alélica del *JAK2 V617F* deber ser valoradas en estudios prospectivos.

### Manejo terapéutico de la PV

Los objetivos fundamentales del tratamiento son minimizar o eliminar el riesgo de trombosis mediante la reducción de la viscosidad sanguínea y reducir al máximo la toxicidad del tratamiento. En base a ello, se recomienda considerar como pacientes de bajo riesgo a aquellos de edad inferior a 60 años, sin antecedentes de trombosis y sin FRCV. El tratamiento en estos pacientes consiste en la realización de flebotomías para controlar el Hto. junto con dosis bajas de AAS (Figura 3). El PVSG demostró mayor efectividad de las flebotomías que el tratamiento citorreductor en supervivencia, aunque era menos eficaz en la prevención de la enfermedad tromboembólica (ETE) en los tres primeros años. Para evitarlo, es necesario mantener el Hto. por debajo de 45% en varones y por debajo del 43% en mujeres<sup>23</sup>. El estudio *ECLAP*, realizado de forma prospectiva en 532 pacientes con PV, con un seguimiento de tres años, demostró una reducción signifi-

cativa de muerte por complicaciones cardiovasculares, IAM y ETE venosa en el grupo de pacientes que recibían 100 mg diarios de AAS<sup>9</sup>.

En los pacientes de alto riesgo (edad superior a 60 años o historia de ETE) y en aquellos con intolerancia a las flebotomías o con signos marcados de mieloproliferación (leucocitosis, esplenomegalia, trombocitosis), se requiere asociar tratamiento citorreductor (Figura 3). La hidroxiurea (HU) es el fármaco citorreductor de elección. En pacientes mayores de 75 años puede sustituirse la HU por P32 o busulfán, y en pacientes menores de 40 años debe valorarse el uso de interferón alfa (IFN- $\alpha$ ).

En este sentido diferentes estudios han demostrado que el tratamiento a largo plazo con HU utilizada como único agente citorreductor no incrementa de manera significativa el riesgo de desarrollar leucemias secundarias, mientras que se incrementa cuando la HU se usa en pacientes que reciben otros agentes citotóxicos<sup>24,25</sup>.

El IFN- $\alpha$ , debido a su amplia gama de efectos biológicos: mielosupresión y antagonismo de los efectos de las citocinas como PDGF o el TGF- $\beta$ , ha sido considerado por algunos autores como la opción ideal de tratamiento para las NMPc. Lengfelder *et al.* revisaron la experiencia obtenida con 279 pacientes procedentes de 16 estudios en los que se empleo el IFN- $\alpha$  para el tratamiento de la PV, observándose un 50% de respuestas hematológicas definidas por un Hto. < 45% sin necesidad de flebotomías<sup>26</sup>. De forma similar, Silver observó respuestas hematológicas completas definidas por un Hto. < 45% sin necesidad de flebotomías, cifras de plaquetas < 600 x 10<sup>9</sup>/L y ausencia de complicaciones trombohemorrágicas, en la gran mayoría de los pacientes tratados con tratamiento con IFN- $\alpha$ , con un seguimiento a largo plazo (mediana de 13 años)<sup>27</sup>.

Actualmente el IFN- $\alpha$  está indicado en pacientes jóvenes (<40 años) o en situaciones especiales como durante el embarazo, debido a la ausencia de teratogenia. Las formas pegiladas del IFN- $\alpha$  permiten mejorar el cumplimiento terapéutico gracias a su administración en una sola dosis semanal obteniéndose respuestas moleculares con reducciones de la carga alélica del *JAK2* mutado en un 89% de pacientes<sup>28</sup>.

Otros agentes citorreductores como son el busulfán o el fósforo radioactivo (P32) pueden tener un papel importante en pacientes mayores de 75 años aunque su uso está muy restringido, por su potencial leucemógeno.

### Manejo terapéutico de la TE

El objetivo terapéutico en la TE consiste en prevenir las complicaciones trombóticas o hemorrágicas

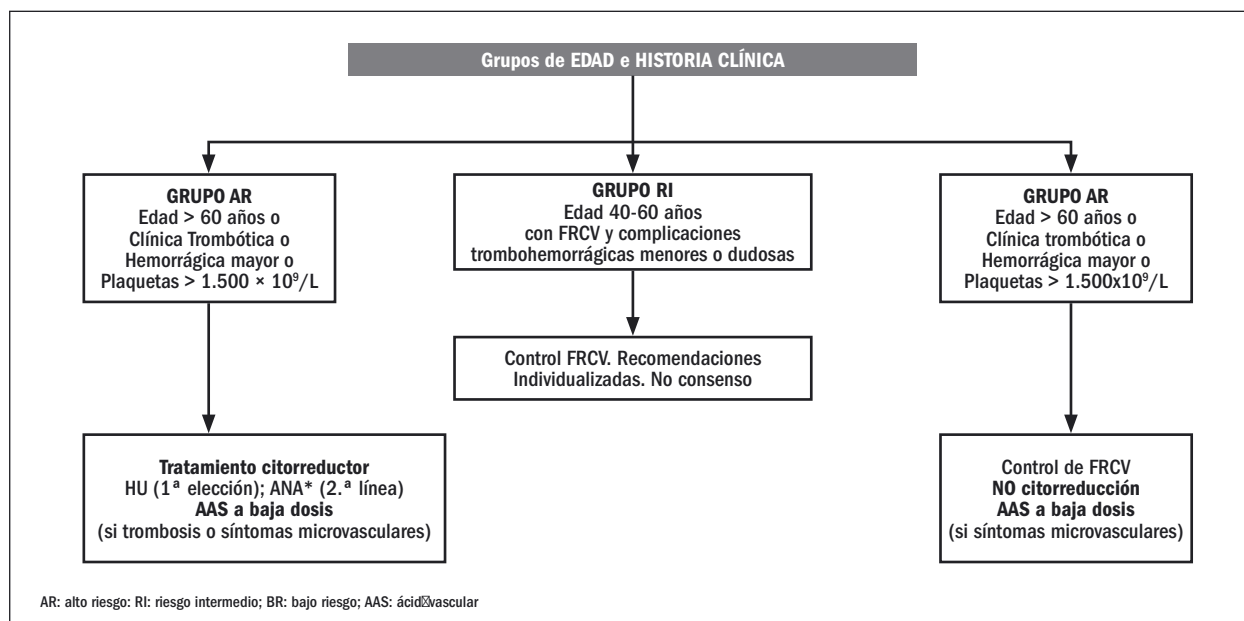


Figura 4. Algoritmo de tratamiento adaptado en trombocitemia esencial.

y evitar los efectos secundarios derivados del tratamiento. En los pacientes de bajo riesgo (edad inferior a 40 años sin historia trombótica y con recuentos plaquetarios inferiores a  $1.500 \times 10^9/L$  y en ausencia de FRCV) no existen estudios prospectivos que evalúen el efecto del AAS a dosis bajas como profilaxis primaria, aunque sí se ha documentado su eficacia en el control de los síntomas microvasculares (eritromelalgia, disturbios oculares, escotomas, amaurosis fugaz, etc.). Una extrapolación de la eficacia del AAS en el estudio ECLAG en los pacientes con PV es la base para recomendar AAS en los pacientes con TE de bajo riesgo. Los pacientes con TE de alto riesgo (edad superior a 60 años o con historia trombótica o hemorrágica mayor o con plaquetas  $> 1.500 \times 10^9/L$ ) tienen indicación de tratamiento citorreductor, siendo el fármaco de elección la HU sola o asociada a AAS en dosis bajas. El tratamiento combinado de HU y AAS se comparó de forma prospectivo con anagrelida (ANA) y AAS en el mayor estudio prospectivo realizado hasta la fecha en pacientes con TE de alto riesgo, demostrándose que presentaban mayor número de trombosis arteriales y más complicaciones hemorrágicas el grupo ANA + AAS debido a un doble efecto antiagregante<sup>21</sup>. Este amplísimo estudio confirma el uso de HU como tratamiento de primera línea en TE de alto riesgo<sup>21</sup>.

La anagrelida, un miembro de las imidazoquinazolinonas con potente actividad reductora de los recuentos plaquetarios y carente de riesgo leucemógeno, constituye una alternativa razonable a la HU en pacientes jóvenes con TE y alto riesgo trombótico. Fru-

chtman *et al.* comunicaron los resultados del ANA a largo plazo en 2.251 pacientes con TE (máximo seguimiento de 7 años) objetivándose control plaquetario en el 75% de casos, sin objetivar un incremento del riesgo de leucemia aguda<sup>29</sup>. Los resultados preliminares del estudio ANAHYDRET indican que ANA no es inferior a HU en pacientes con TE de alto riesgo<sup>30</sup>. Los principales efectos secundarios relacionados con ANA son: palpitaciones, cefaleas, problemas cardiovasculares, incluida insuficiencia cardíaca congestiva, problemas gastrointestinales, síntomas constitucionales, por lo que se recomienda realizar una evaluación cardíaca basal y un seguimiento periódico, mediante ecocardiografía anual. ANA puede usarse en monoterapia y combinado con bajas dosis de HU, dado que ambos fármacos tienen diferente mecanismo de acción.

Recientemente el Grupo Europeo de Consenso<sup>31</sup> ha definido los criterios de resistencia e intolerancia la HU en pacientes con TE: 1) plaquetas superiores a  $600 \times 10^9/L$  después de tres meses con una dosis mínima de HU de 2 g/día o 2,5 g/día si peso  $> 80$  kg; 2) plaquetas superiores a  $400 \times 10^9/L$  con cifras de leucocitos  $< 2.500/\mu L$  o Hb  $< 10$  g/dL, con cualquier dosis de HU; 3) fiebre relacionada con HU; 4) úlceras en piernas o cualquier manifestación mucoso-cutánea inaceptable con cualquier dosis de HU.

También se ha empleado con éxito en pacientes con TE el IFN- $\alpha$ , pudiéndose lograr una reducción de los recuentos de plaquetas por debajo de  $600 \times 10^9/L$  en el 90% de los enfermos después de tres meses de tratamiento con una dosis media de 3 MU/día<sup>34</sup>. El

empleo del IFN- $\alpha$  debe restringirse a pacientes jóvenes y a embarazadas<sup>32</sup>.

La mayor dificultad en la selección de la pauta a seguir la constituyen los pacientes del grupo de riesgo intermedio (RI): edad entre 40 y 60 años y/o FRCV presentes y/o historial trombohemorrágico menor o dudoso. Se recomienda tratar a pacientes del RI que presenten historia familiar de trombofilia.

La modificación de los FRCV, con especial énfasis en la hipercolesterolemia y el tabaquismo, así como la hipertensión arterial o la obesidad, es primordial en todos los grupos de riesgo. En cuanto a otros factores de riesgo señalados más recientemente, como son la leucocitosis o la carga alélica de la mutación *V617F* del *JAK2*, se requieren más estudios, debiéndose valorar de forma individualizada, por el momento, pendientes de la disponibilidad de nuevos fármacos inhibidores de *JAK2*.

### Manejo de la PV y de la TE durante el embarazo

Las pacientes afectadas de TE o PV tienen un incremento del riesgo de sufrir complicaciones tromboembólicas durante el embarazo y el puerperio en comparación con gestantes de su misma edad<sup>33</sup>. En pacientes con TE se han descrito entre un 25-40% de abortos en el primer trimestre y un 10% de abortos tardíos. En el caso de la PV, el número de embarazos comunicados es escaso, al tratarse de una enfermedad que predomina en varones de edad media

o avanzada; sin embargo, se han descrito interrupciones del embarazo en el primer trimestre y a término en un 22% y 14%, respectivamente, en mujeres con PV.

El creciente número de NMPC diagnosticadas en mujeres jóvenes ha llevado a plantear la necesidad de disponer de esquemas de tratamiento adaptado al riesgo para las NMPC, durante el periodo gestacional, con el objetivo de optimizar el curso del embarazo, prevenir complicaciones durante el parto y puerperio y mantener un adecuado control de la NMPC evitando el uso de fármacos teratógenos<sup>34</sup>.

Como norma general, se requiere realizar una historia detallada sobre antecedentes de trombosis o pérdidas fetales previas y establecer el riesgo en estos pacientes (Tabla 3). El uso de AAS en dosis bajas debe recomendarse en las pacientes con síntomas de oclusión microvascular o antecedentes de complicaciones obstétricas en relación con ETE previa.

Recientemente Griesshammer *et al.* han revisado la literatura, recomendándose una dosis de entre 75 a 100 mg diarios de AAS a todas las gestantes con TE o PV a lo largo del embarazo y durante las seis semanas siguientes al parto. El uso de heparinas de bajo peso molecular (HBPM) debe recomendarse en las pacientes de alto riesgo durante la gestación y hasta seis semanas después del parto, debiendo suprimirse 12 horas antes del parto y reiniciarse 24 horas después del mismo<sup>34,35</sup>. Como tratamiento citorrreductor, debe evitarse el uso de HU y de ANA, pudiéndose continuar el tratamiento con IFN- $\alpha$  durante todo el embarazo (Tabla 3).

Dada la dificultad de obtener experiencia en este grupo de pacientes, se ha planteado la necesidad de llevar a cabo un registro para estudio observacional en Europa, con la finalidad de obtener más información del curso y evolución de este grupo de pacientes<sup>36</sup>. El registro puede hacerse en la web [www.uni-ulm.de/onkologie/pages/studienzentrlrle.html/formulare](http://www.uni-ulm.de/onkologie/pages/studienzentrlrle.html/formulare) (contraseña: *CPMPS-pregnant*).

En las pacientes que planean quedarse embarazadas es fundamental advertir de los riesgos y complicaciones que pueden presentarse, y se debe realizar un estudio detallado de los factores de riesgo individual, estudio de factores congénitos y adquiridos de trombofilia (anticoagulante lúpico, anticuerpos anti-cardiolipina, factor V Leiden, protrombina G20210A, MTHFR, proteína C, proteína S y antitrombina III). Se deben suprimir fármacos teratógenos, desde 3 a 6 meses antes, pudiéndose utilizar el IFN.

Tabla 3. Recomendaciones del tratamiento adaptado a riesgo en gestantes con PV y TE

1. Estratificación del riesgo. Definición de gestación de ALTO RIESGO
<b>Al menos uno de los siguientes:</b>
· Antecedente de evento trombótico mayor o complicación hemorrágica
· Antecedentes de complicación severa en embarazo previo
2. Tratamiento adaptado al riesgo
<b>a) Embarazo de BAJO RIESGO</b>
· Mantener el Hto. por debajo del 45%
· AAS 100 mg/día en PV y TE si hay síntomas microcirculatorios
· HBPM profiláctica, diaria, desde el parto hasta 6 semanas después
<b>b) Embarazo de ALTO RIESGO</b>
<i>Las mismas recomendaciones que en bajo riesgo y, además:</i>
· En caso de trombosis o complicaciones severas en embarazo previo, administrar
· HBPM durante todo el embarazo
· Suspender AAS si hay hemorragia o antecedentes de ello
· Considerar IFN- $\alpha$ para controlar la trombocitosis

Hto.: hematócrito; AAS: ácido acetilsalicílico; HBPM: heparina de bajo peso molecular; IFN- $\alpha$ : interferón alfa.

### Bibliografía

1. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase *JAK2* in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005; 365: 1054-61.



2. Kralovics R, Passamonti F, Busser AS, et al. A gain of function mutation in JAK2 is frequently found in patients with myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005; 352: 1779-90.
3. 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.
4. Johansson P. Epidemiology of the myeloproliferative disorders polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Semin Thromb Hemost* 2006; 32: 171-3.
5. Pearson TC, Wetherley-Ain G. Vascular occlusive episodes and venous hematocrit in primary proliferative polycythemia. *Lancet* 1978; 2: 1219-22.
6. Cortelazzo S, Viero P, Finazzi G, D'Emilio A, Rodeghiero F, Barbui T. Incidence and risk factors for thrombotic complications in a historical cohort of 100 patients with essential thrombocythemia. *J Clin Oncol* 1990; 8: 556-62.
7. Pearson TC. The risk of thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Semin Oncol* 2002; 29: 1621.
8. Finazzi G, Barbui T. Evidence and expertise in the management of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Leukemia* 2008; 1494-502.
9. Haanen C, Mathe G, Hayat M. Treatment of polycythemia vera by radiophosphorus or busulphan. A randomized clinical trial. *Br J Cancer* 1981; 44: 75.
10. Gruppo Italiano Studio Policitemia (GISP). Polycythemia vera: the natural history of 1213 patients followed over 20 years. *Ann Int Med* 1995; 123: 656-64.
11. Landolfi R, Marchioli R, Kutti J, Gisslinger H, Tognoni G, Patrono C et al. Efficacy and safety of low-dose aspirin in polycythemia vera. *N Engl J Med* 2004; 350: 114-24.
12. Barbui T, Barosi G, Grossi A, et al. Practice guidelines for the therapy of essential thrombocythemia. A statement from the Italian Society of Haematology, the Italian Society of Experimental Haematology and Italian Group of Bone Marrow Transplantation. *Haematologica* 2004; 89: 215-32.
13. Ruggeri M, Gisslinger H, Tosetto A, Rintelen C, Mannhalter CH, Pabinger I, Heis N, Castaman G, Missiaglia E, Lechner K, Rodeghiero F. Factor V Leiden mutation carriership and venous thromboembolism in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am J Hematol* 2002; 71: 1-6.
14. Raszejka-Specht A, Skibowska A, Bieniaszewska M, Sztutowicz A. Relationship between thrombohemorrhagic complications and platelet function in patients with essential thrombocythaemia. *Am J Hematol* 2001; 68: 32-6.
15. Michiels JJ, Berneman Z, Van Bockstaele D, van der Planken M, De Raeye H, Cchroyens 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. *Semin Thromb Hemost* 2006; 32: 589-604.
16. Falanga A, Marchetti M, Barbui T, Smith CW. Pathogenesis of thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera. The role of neutrophils. *Seminars Hematol* 2005; 42: 239-47.
17. Burgaleta C, González N, César J. Increased CD11/CD18 expression and altered metabolic activity on polymorphonuclear leukocytes from patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Acta Haematologica* 2002; 108: 23-8.
18. Carobbio A, Finazzi G, Guerini V, Spinelli O, Delaini F, Marchioli R, Borrelli G, Rambaldi A, Barbui T. Leukocytosis is a risk factor for thrombosis in essential thrombocythemia: interaction with treatment, standard risk factors, and Jak2 mutation status. *Blood* 2007; 109: 231-3.
19. Arellano-Rodrigo E, Álvarez-Larrán A, Reverter JC, Villamor N, Colomer D, Cervantes F. Increased platelet and leukocyte activation as contributing mechanisms for thrombosis in essential thrombocythemia and correlation with the JAK2 mutational status. *Haematologica* 2006; 91: 169-75.
20. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Longo G, Pancrazzi A, Ponziani V, Bogani C, Ferrini PR, Rambaldi A, Guerini V, Bosi A, Barbui T; MPD Research Consortium. Prospective identification of high risk polycythemia vera patients based on JAK2(V617F) allele burden. *Leukemia* 2007; 21: 1952-9.
21. Harrison CN, Campbell PJ, Buck G, et al. Hidroxiurea compared with anagrelide in high risk essential thrombocythemia. *N Engl J Med* 2005; 353 (1): 85-6.
22. Antonioli E, Guglielmelli P, Poli G, Bogani C, Pancrazzi A, Longo G, et al. Influence of JAK2 allele burden on phenotype in essential thrombocythemia. *Haematologica* 2008; 93: 41-8.
23. Finazzi G, Barbui T. The treatment of polycythaemia vera: an update in the JAK2 era. *Intern Emerg Med* 2007; 2: 13-8.
24. Gangat N, Strand J, Li CY, Wu W, Pardanani A, Tefferi A. Leucocytosis in polycythemia vera predicts both inferior survival and leukaemic transformation. *Br J Haematol* 2007; 138: 354-8.
25. Finazzi G, Caruso V, Marchioli R, Capnist G, Chisesi T, Finelli C, et al. Acute leukemia in polycythemia vera. An analysis of 1638 patients enrolled in a prospective observational study. *Blood* 2005; 105: 2664-70.
26. Lengfelder E, Berger U, Hehlmann R. Interferon alpha in the treatment of polycythemia vera. *Ann Hematol* 2000; 79: 103-9.
27. Silver RT. Long-term effects of the treatment of polycythemia vera with recombinant interferon-alpha. *Cancer* 2006; 107: 451-8.
28. Kiladjian JJ, Cassinat B, Turlure P, Cambier N, Roussel M, Bellucci S, et al. High molecular response rate of polycythemia vera patients treated with pegylated interferon alpha-2a. *Blood* 2006; 108: 2037-40.
29. Fruchtman SM, Pettitt RM, Gilbert HS, Fiddler G, Lyne A. Anagrelide: analysis of long term efficacy, safety and leukemogenic potential in myeloproliferative diseases. *Leuk Res* 2005; 5: 481-91.
30. Gisslinger H, Kralovics R, Gotic M, Holowiecki J, Penka M, Widmann R et al. Non-inferiority of anagrelide compared to hydroxyurea in newly diagnosed patients with essential thrombocythemia. The ANAHDRET-Study. *Blood* 2007; 110: 3547 (abstr.).
31. Barosi G, Besses C, Birgegard G, Briere J, Cervantes F, Finazzi G, et al. A unified definition of clinical resistance/intolerance to hydroxyurea in essential thrombocythemia: results of a consensus process by an international working group. *Leukemia* 2007; 21: 277-80.
32. Lengfelder E, Griesshammer M, Hehlmann R. Interferon-alpha in the treatment of essential thrombocythemia. *Leuk Lymphoma* 1996; 22 (Suppl 1): 135-42.
33. Harrison C. Pregnancy and its management in the Philadelphia negative myeloproliferative diseases. *Br J Haematol* 2005; 129: 293-306.
34. Griesshammer M. Risk factors for thrombosis and bleeding and their influence on therapeutic decisions in patients with essential thrombocythemia. *Semin Thromb Hemost* 2006; 32: 372-80.
35. Griesshammer M, Struve S, Barbui T. Management of Philadelphia negative chronic myeloproliferative disorders in pregnancy. *Blood Reviews* 2008; 22: 235-45.
36. Griesshammer M, Struve S, Harrison CM. Essential thrombocythemia/polycythemia vera and pregnancy: the need for an observational study in Europe. *Semin Thromb Hemost* 2006; 32: 422-9.

## FAMILIAL CHRONIC MYELOPROLIFERATIVE DISORDERS –FROM A CURIOSITY TO A MODEL FOR PATHOGENESIS AND DISEASE EVOLUTION

H. CARIO

*Department of Pediatrics and Adolescent Medicine,  
University Hospital of Ulm, Germany*

---

### Introduction

The group of Ph-negative chronic myeloproliferative disorders (cMPD) comprises three entities: polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF). The occurrence of familial cMPD was probably reported for the first time more than hundred years ago<sup>1</sup>. Since then, several case reports and small series of affected families have been published. Due to the lack of strict diagnostic criteria for these disorders until the mid-1970s many reports on apparent familial cMPD actually include other conditions such as congenital erythrocytosis. Few well defined familial cases were published thereafter. A first systematic approach to examine the prevalence of familial cMPD was made in 1984 when PV patients included in the Polycythemia Vera Study Group (PVSG) trials were analyzed for the presence of PV in their relatives. This survey revealed five out of 652 patients as having affected parents<sup>2</sup>. A large series of 42 families with familial cMPD was published in 1998 and suggested that familial cMPD might not be as extremely rare as assumed before<sup>3</sup>. Now, about ten years later, the situation has changed fundamentally. First, since meanwhile larges series of affected families were published. Second, since epidemiologic studies in cMPD patient cohorts but at last also in large national registries revealed a much higher incidence of familial cMPDs and a higher risk of developing an cMPD for relatives of affected patients than ever expected. Third, the discovery of somatic *JAK2* mutations and their importance for the development of cMPDs led to an enormous interest in cMPD in general but also in the investigation of cMPD families. These studies had, have and will have a great impact on the understanding of the cMPD's etiology and pathogenesis.

---

### “True” cMPDs and other MPD-like diseases

As mentioned above, particularly early publications on apparent familial cMPDs may actually report on other diseases which might be called “MPD-like disorders”. In contrast to “true” cMPDs these disorders

are characterized by the proliferation of only a single hematopoietic lineage resulting either in erythrocytosis or thrombocytosis. In fact, with few exceptions, inherited molecular defects underlying the rare conditions of congenital erythrocytosis or thrombocytosis were not known until very recently.

In 1966, the first hemoglobinopathy with increased hemoglobin oxygen affinity was reported<sup>4</sup>. Since that time many structural hemoglobin anomalies leading to secondary erythrocytosis have been described. A similar pathogenic mechanism explains erythrocytosis due to rare 2,3-BPG deficiency<sup>5</sup>. In 1993, the first *EPOR* mutation leading to an increased *EPOR* sensitivity as the cause of Primary Congenital and Familial Polycythemia was detected<sup>6</sup>. Nine years later, the first inherited molecular change leading to an oxygen sensing defect, the point mutation *VHL* 598C>T, was characterized in patients with Chuvash polycythemia (VHL-dependent polycythemia)<sup>7</sup>. This and other mutations within the *VHL* gene were later detected in additional patients of different ethnic origin suffering from congenital erythrocytosis<sup>8-10</sup>. Subsequently, congenital defects within two additional genes involved in the oxygen sensing process (*HIF2* and *EGLN1*) were reported<sup>11,12</sup>. To distinguish these disorders from each other but also from cMPD the mode of inheritance within a family, the analysis of serum erythropoietin levels, and the *JAK2* mutation analysis are of central importance (Table 1).

Congenital thrombocytosis is even less frequently observed. The first genetic cause underlying familial thrombocytosis, an activating splice donor mutation within the *THPO* gene encoding for thrombopoietin was detected in 1998<sup>13</sup>. A second genetic cause of congenital thrombocytosis was identified a few years later. The *MPL* S505N mutation confers a constitutive activation of the *MPL* protein, the thrombopoietin receptor<sup>14</sup>. Interestingly, another amino acid exchange at codon 515 (W515L) which is also leading to constitutive *MPL* activation has been detected as somatic mutation in a number of patients with ET and PMF<sup>15</sup>. Due to the nature of the underlying defect, the presence of congenital thrombocytosis rather than ET is probable if thrombocytosis in a family shows an autosomal-dominant inheritance pattern with complete penetrance.

---

### Epidemiology of familial cMPD

As mentioned above, until very recently only single cMPD families, small series, and only one study systematically looking for the presence of these disorders in relatives of cMPD patients were reported. The first large series of families with cMPD was published by Dr. Gilbert about ten years ago<sup>3</sup>. Forty-two families were reported with cMPD occurring in a single gener-

**Table 1. Inheritance and serum erythropoietin (Epo) in "MPD-like disorders" and familial PV**

	Gene	Inheritance	Serum Epo
Familial Erythrocytosis Type 1 (OMIM #133100) = Primary Familial and Congenital Polycythemia (PFCP)	<i>EPOR</i>	dominant	Low
Familial Erythrocytosis Type 2 (OMIM #263400) = Chuvash Polycythemia, VHL-dependent Polycythemia	<i>VHL</i>	recessive	High
Familial Erythrocytosis Type 3 (OMIM #609820)	<i>EGLN1</i> (PHD2)	dominant	Normal
Familial Erythrocytosis Type 4 (OMIM #611783)	<i>HIF2</i>	dominant	High
Hemoglobin with increased O <sub>2</sub> -affinity	<i>HBB, HBA1</i>	dominant	High (normal)
2,3 BPG deficiency	<i>BPGM</i>	dominant	High (normal)
Polycythemia vera	<i>JAK2</i> (somatic)	dominant with variable penetrance	Low (normal)

ation in 10 families, two generations in 30 families and three generations in two families. This study for the first time indicated that familial cMPD might be more frequent than assumed before. After the discovery of *JAK2* mutations in cMPD, intensive studies in families with cMPD were performed to characterize the mutation and to identify possible factors predisposing to the acquisition of *JAK2* mutations. In addition, new attempts to determine the prevalence of familial cMPD and the risk for relatives of cMPD patients to develop such disorder were made. A systematic investigation of the family history in 458 Italian patients revealed a prevalence of 7.6 percent of familial cases (35 pedigrees, 75 patients)<sup>16</sup>. In agreement with previous reports, incomplete penetrance of the condition was demonstrated. In addition, important observations with regard to the clinical presentation were made. Finally, a large population-based study including 11039 patients with cMPD and 24577 first-degree relatives in Sweden revealed a significantly 5-to 7-fold risk of cMPDs among first-degree relatives of cMPD patients<sup>17</sup>. This observation supported the hypothesis of a common susceptibility gene predisposing to PV, ET, and PMF. Thus, the formerly "exotic" familial cMPDs became an important model for the pathogenesis and evolution of cMPDs.

### Clinical features of familial cMPD

The clinical presentation of patients with familial cMPD does not differ from that of patients with sporadic

cMPD<sup>18</sup>. Thrombotic and hemorrhagic complications occur with the same frequency as observed in sporadic cases. In addition, familial cMPD patients have a comparable risk for disease evolution into myelofibrosis or leukemia. Therefore, treatment approaches do not differ from those applied to sporadic patients.

An important observation with regard to the clinical presentation is the occurrence of multiple cMPD types within many affected families. This was impressively demonstrated by Dr. Gilbert and later confirmed by other surveys<sup>3,16,19,20</sup>. This observation confirmed the hypothesis that the apparently distinct disease entities PV, ET, and PMF are actually variant phenotypes of one single disease –cMPD– arising from clonal expansion of a pluripotential hematopoietic precursor cell.

Another interesting observation was reported recently. Analyzing the age at diagnosis, the group of Dr. Rumi did show in their study on 23 cMPD families an anticipation of the disease in second-generation patients with cMPD consistent with a significant telomere shortening as compared to their parents<sup>21</sup>. Further studies will elucidate the importance and genesis of this observation.

### *JAK2* in familial cMPD

As mentioned above, many studies in cMPD families were initiated after the discovery of *JAK2* mutations as central pathogenic change in cMPD. The first studies on *JAK2* in familial cMPD were performed to test and confirm the hypothesis that *JAK2 V617F* was not the genetic predisposing factor but a secondary somatic event important for disease evolution. This was first demonstrated in a family with two affected patients positive for *JAK2 V617F* whereas the obligate carrier was *JAK2 V617F*-negative<sup>22</sup>. Shortly thereafter, this observation was confirmed by the very large French survey including 72 families and by other studies<sup>19</sup>.

The rate of detection of *JAK2 V617F* is 55-78% in PV, 50-69% in ET, and 75-90% in PMF<sup>18</sup>. Thus, the frequency of this mutation in familial PV is lower than that observed in sporadic patients. Obviously, changes other than in *JAK2* may arise in patients with a predisposition to cMPD and lead to an identical phenotype.

In the French study, the *JAK2* mutation was present in all cMPD patients in 22 families, absent in 6, and heterogeneously distributed in 18 families<sup>19</sup>. This also indicates that on the basis of a common genetic predisposition *JAK2* but also other secondary changes lead to the development of cMPD. An interesting example of such diversity was shown by Pietra et al. demonstrating the presence of either *JAK2 V617F* or a *JAK2* exon 12 mutation in different affected relatives in two single families<sup>23</sup>.

## Familial cMPD and other potential genetic predisposing factors

Previous studies in cMPD families failed to detect a common genetic change predisposing to the development of cMPD. Most studies support an autosomal-dominant inheritance of this predisposition with variable penetrance. Molecular studies excluded a linkage to a number of candidate loci (9p, 20q, 13q, 5q, *MPL*, *EPOR*, *TPO*, *VHL*)<sup>19,20</sup>.

Recent studies revealed a significant association of an increased risk to acquire the *JAK2 V617F* mutation and to develop cMPD with a distinct *JAK2* haplotype<sup>24-26</sup>. However, segregation analyses in familial cMPD patients presenting with *JAK2 V617F* excluded that this haplotype is solely responsible for predisposition to cMPD, thus being in agreement with previous which failed to demonstrate linkage to chromosome 9p.

In summary, the interest in familial cMPD increased in parallel to the increasing number of known affected families but also in parallel to the increase of knowledge on molecular changes in this group of diseases. Studies in these families will contribute to the detection of the underlying genetic predisposition to develop an cMPD and are an important model to test new candidate genes for their actual relevance for disease predisposition and evolution.

## References

- Nichamin SB. [Ein Fall von Erythramie] abstr. Folia Haematol 1908; 6: 301.
- Brubaker LH, Wasserman LR, Goldberg JD, Pisciotta AV, McIntyre OR, Kaplan ME, et al. Increased prevalence of polycythemia vera in parents of patients on polycythemia vera study group protocols. 1984; 16: 367-73.
- Gilbert HS. Familial myeloproliferative disease. Baillieres Clin Haematol 1998; 11: 849-58.
- Charache S, Weatherall DJ, Clegg JB. Polycythemia associated with a hemoglobinopathy. J Clin Invest 1966; 45: 813-22.
- Rosa R, Prehu MO, Beuzard Y, Rosa J. The first case of a complete deficiency of diphosphoglycerate mutase in human erythrocytes. J Clin Invest 1978; 62: 907-15.
- De la Chapelle A, Traskelin AL, Juvonen E. Truncated erythropoietin receptor causes dominantly inherited benign human erythrocytosis. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90: 4495-9.
- Ang SO, Chen H, Hirota K, Gordeuk VR, Jelinek J, Guan Y, et al. Disruption of oxygen homeostasis underlies congenital Chuvash polycythemia. Nat Genet 2002; 32: 614-21.
- Cario H, Schwarz K, Jorch N, Kyank U, Petrides PE, Schneider DT, et al. Mutations in the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor gene and VHL-haplotype analysis in patients with presumable congenital erythrocytosis. Haematologica 2005; 90: 19-24.
- Percy MJ, McMullin ME, Jowitt SN, Potter M, Treacy M, Watson WH, et al. Chuvash-type congenital polycythemia in 4 families of Asian and Western European ancestry. Blood 2003; 102: 1097-9.
- Perrotta S, Nobili B, Ferraro M, Migliaccio C, Borriello A, Cucciolla V, et al. Von Hippel-Lindau-dependent polycythemia is endemic on the island of Ischia: identification of a novel cluster. Blood 2006; 107: 514-9.
- Percy MJ, Furlow PW, Lucas GS, Li X, Lappin TR, McMullin ME, et al. A gain-of-function mutation in the HIF2A gene in familial erythrocytosis. N Engl J Med 2008; 358: 162-8.
- Percy MJ, Zhao Q, Flores A, Harrison C, Lappin TR, Maxwell PH, et al. A family with erythrocytosis establishes a role for prolyl hydroxylase domain protein 2 in oxygen homeostasis. Proc Natl Acad Sci U.S.A 2006; 103: 654-9.
- Wiestner A, Schlemper RJ, van der Maas AP, Skoda RC. An activating splice donor mutation in the thrombopoietin gene causes hereditary thrombocythaemia. Nat Genet 1998; 18: 49-52.
- Ding J, Komatsu H, Wakita A, Kato-Uranishi M, Ito M, Satoh A, et al. Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. Blood 2004; 103: 4198-200.
- Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. PLoS Med 2006; 3: e270.
- Rumi E, Passamonti F, Della Porta MG, Elena C, Arcaini L, Vanelli L, et al. Familial chronic myeloproliferative disorders: clinical phenotype and evidence of disease anticipation. J Clin Oncol 2007; 25: 5630-5.
- Landgren O, Goldin LR, Kristinsson SY, Helgadóttir EA, Samuelsson J, Björkholm M. Increased risks of polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myelofibrosis among 24,577 first-degree relatives of 11,039 patients with myeloproliferative neoplasms in Sweden. Blood 2008; 112: 2199-204.
- Rumi E. Familial chronic myeloproliferative disorders: the state of the art. Hematol Oncol 2008; 26: 131-8.
- Bellanne-Chantelot C, Chaumarel I, Labopin M, Bellanger F, Barbu V, De Toma C, et al. Genetic and clinical implications of the Val617Phe JAK2 mutation in 72 families with myeloproliferative disorders. Blood 2006; 108: 346-52.
- Kralovics R, Stockton DW, Prchal JT. Clonal hematopoiesis in familial polycythemia vera suggests the involvement of multiple mutational events in the early pathogenesis of the disease. Blood 2003; 102: 3793-6.
- Rumi E, Passamonti F, Picone C, Della Porta MG, Pascutto C, Cazzola M, et al. Disease anticipation in familial myeloproliferative neoplasms. Blood 2008; 112: 2587-8.
- Cario H, Goerttler PS, Steimle C, Levine RL, Pahl HL. The JAK2V617F mutation is acquired secondary to the predisposing alteration in familial polycythemia vera. Br J Haematol 2005; 130: 800-1.
- Pietra D, Li S, Brisci A, Passamonti F, Rumi E, Theocharides A, et al. Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. Blood 2008; 111: 1686-9.
- Jones AV, Chase A, Silver RT, Oscier D, Zoi K, Wang YL, et al. JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. Nat Genet 2009; 41: 446-9.
- Kilpivaara O, Mukherjee S, Schram AM, Wadleigh M, Mullally A, Ebert BL, et al. A germline JAK2 SNP is associated with predisposition to the development of JAK2(V617F)-positive myeloproliferative neoplasms. Nat Genet 2009; 41: 455-9.
- Olcaydu D, Harutyunyan A, Jager R, Berg T, Gisslinger B, Pabinger I, et al. A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. Nat Genet 2009; 41: 450-4.



## Gestión clínica en hematología

COORDINADORES: E. FELIU. *Barcelona*  
A.I. HEINIGER. *Málaga*

### Resumen del simposio

El objetivo de este simposio es abordar y discutir diferentes aspectos relacionados con la gestión clínica. La organización de los recursos humanos y tecnológicos con el fin de mejorar integralmente la atención que prestamos a nuestros pacientes sería una buena definición de gestión clínica, aunque hay otras formas para definirla.

El objetivo principal de los profesionales de la gestión clínica en los hospitales es establecer un equilibrio entre la actividad, la calidad asistencial y el consumo de recursos. Las decisiones de los profesionales de la gestión clínica pueden repercutir en la salud de los pacientes atendidos en el hospital. Conocer la percepción de los pacientes es imprescindible para los gestores clínicos; para ello es de gran utilidad el análisis de las encuestas de satisfacción, las reclamaciones y sugerencias. La evaluación global de la satisfacción debe incluir el análisis o la opinión de los pacientes según el lugar de atención y de los familiares o personas cuidadoras. Estas cuestiones serán analizadas por el Dr. Jordi Trelis, director asistencial del Instituto Catalán de Oncología del Hospital Germans Trias i Pujol de Badalona.

No existe una formación reglada en gestión clínica de los médicos, sino que ésta suele ser muy desigual. Para poner en práctica la gestión clínica, es necesario disponer de una serie de recursos y sistemas de información adecuados, conocer la realidad asistencial y diseñar un cuadro de mandos con la selección de indicadores de actividad y calidad, auditorías periódicas, conocer la opinión de los profesionales y los pacientes, entre otros muchos. De la experiencia en una unidad de gestión clínica en la comunidad autónoma de Andalucía versa la exposición de la Dra. M<sup>a</sup> Ángeles Cuesta Casas, del Servicio Hematología y Hemoterapia del Hospital Regional Univeristario Carlos Haya de Málaga.

Los diferentes modelos sanitarios en el conjunto de autonomías y la inexistencia de un horizonte claramente definido para nuestra especialidad, que lucha por sobrevivir integrada, tanto en su vertiente clínica como en la biológica, hace que el tema de la integración/desintegración de la especialidad de Hematología y Hemoterapia despierte gran interés. Para discutir sobre estos temas contamos con la experiencia del Dr. Pedro Sánchez Godoy del Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Universitario Severo Ochoa de Leganés (Madrid).

Para finalizar, el Dr. Valentí Martínez Espinosa, de La Fundación Universitaria del Bagés, en Manresa (Barcelona), analizará cómo los profesionales de la salud pueden y deben estar implicados en sus diferentes lugares de trabajo y cómo las organizaciones sanitarias deben incentivarlos para que se desarrollen y responsabilicen de forma adecuada en los procesos y resultados de la organización.

Esperamos que este simposio permita a los hematólogos españoles un mayor conocimiento sobre la gestión clínica que pueda aportar algún beneficio para los profesionales, los centros de trabajo y los pacientes.

## SATISFACCIÓN DEL PACIENTE HEMATOLÓGICO Y SUS FAMILIAS

J. TRELIS

*Instituto Catalán de Oncología. Hospital Germans Trias i Pujol. Badalona (Barcelona)*

---

### Introducción

Según el diccionario de la Real Academia Española, se entiende por *satisfacción* la “razón, acción o modo con que se sosiega y responde enteramente a una queja, sentimiento o razón contraria”. Incluye también dos definiciones más, como la confianza o seguridad del ánimo y el cumplimiento o deseo del gusto.

La definición per se es ambigua e induce a caer en subjetividades, y es curioso cómo ese término no aparece en diccionarios médicos: será que se sobreentende que todos los pacientes y familias están satisfechos y no es necesario definirlo.

En términos de gestión, se utiliza el concepto de *satisfacción* para relacionarlo con todos los planes de calidad. Las administraciones obligan a disponer de ellos en los centros sanitarios, sean de atención hospitalaria o de atención primaria.

A menudo se confunde el término *satisfacción* con el de *calidad de vida* y, por este motivo, los profesionales los consideran como sinónimos. La realidad es completamente diferente. La satisfacción es el resultado definido por el paciente y familia sobre la interacción de todas las intervenciones relacionadas con su proceso de enfermedad, mientras que la calidad de vida es un concepto mucho más personal e íntimo, relacionado con el propio bienestar personal del paciente y su familia.

A modo de ejemplo, un paciente puede estar satisfecho del resultado de un trasplante pero no estar de acuerdo con el estado que ha quedado su calidad de vida. También es lógico que sea a la inversa: presentar una buena calidad de vida con una insatisfacción total por cómo ha ido el proceso.

Si se pretende buscar sinónimos al término, en la actualidad se considera como correcto hablar de *calidad percibida*.

En resumen, la satisfacción está relacionada con procesos, y la calidad de vida, con sentimientos. No debe olvidarse que en estas áreas hay sesgos de interpretación y uno debe ser muy cuidadoso con éstos.

---

### Evaluación de la satisfacción

La evaluación global de la satisfacción, debe incluir el análisis/opinión de los pacientes según el lugar de

atención y de los familiares o personas cuidadoras. Para poder dar más valor a los resultados, debería incluir la opinión de familiares o cuidadores después de la curación de la enfermedad o el fallecimiento del paciente.

El diseño de las encuestas de satisfacción se realiza en base a dimensiones. Existen diferentes modelos de diseño; en la actualidad el más utilizado es el SERVQUAL, un modelo teórico que mide la calidad percibida.

A grandes rasgos, el análisis de la satisfacción engloba tres grandes apartados: los relacionados con los factores implicados en la satisfacción de las personas usuarias, los relacionados con las modalidades de los servicios donde están atendidos y, por último, los datos comparativos por territorio o unidad de referencia.

En relación con los factores implicados en la satisfacción de las personas usuarias, debería contemplar los siguientes aspectos:

- Aspectos tangibles: relacionados con las instalaciones y equipamientos.
- Aspectos relacionados con la eficacia, con la finalidad de analizar si las respuestas son adecuadas a las necesidades.
- Aspectos relacionados con la capacidad de respuesta: la respuesta a los problemas es ágil, rápida, sin demoras innecesarias...
- Aspectos relacionados con la seguridad: en este apartado es donde se valora la profesionalidad, la capacidad de transmitir confianza, de dar una buena información. Es aquí donde se valora la buena praxis sanitaria.
- Aspectos relacionados con la empatía y comprensión: la capacidad del profesional mediante un trato amable y personalizado, la implicación y el compromiso.

En referencia a las modalidades de los servicios donde están atendidos, se debería tener en cuenta si la atención se realiza en:

- Hospitalización.
- Consultas externas.
- Hospital de día.

Por lo que se refiere a datos comparativos por territorio o unidad de referencia, es adecuado disponer de información de cómo estamos considerados por otros recursos. Más valor tendría comparar información similar con otros (el denominado *benchmarking*).

El siguiente paso en el desarrollo de la evaluación de la satisfacción es mucho más teórico: incluye las características y validación de los cuestionarios, cálculo de la dimensión de la muestra, selección y formación de encuestadores, tratamiento estadístico de los datos, presentación de resultados, análisis y posibles conclusiones de los mismos.

## Estudios relacionados con la satisfacción

Por la muestra de las encuestas (3.000 en una primera fase y 2.000 en una segunda) y la realización del estudio en el territorio nacional, se considera adecuado aludir al estudio denominado *Confianza en el Sistema Nacional de Salud*, realizado por la Escuela de Salud Pública de la Universidad de Harvard en Boston y la Fundació Biblioteca Josep Laporte de Barcelona en 2006<sup>1</sup>.

Los resultados a destacar son:

- Los médicos de hospitales satisfacen en un 56% de forma responsable las necesidades de los pacientes; los médicos de atención primaria, con un 61%, y enfermería, en un 59%, superan este índice.

- El 53% de los encuestados refieren que les preocupan mucho las esperas para ser atendidos.

- El 57% considera que la tecnología sanitaria es moderna.

- En referencia a la satisfacción de los servicios médicos y sanitarios, se consideran muy satisfechos en un 32%, y bastante satisfechos en el 47%.

Es importante matizar que se trata de un encuesta general de satisfacción sobre el modelo sanitario y no específica del ámbito de la oncohematología.

## Satisfacción y paciente hematológico

Difícil, por no decir imposible, es poder encontrar publicaciones relacionadas con el tema, excepto situaciones muy específicas. La mayoría de ellas están relacionadas con el trasplante de médula ósea; no hay evidencia de información en otras enfermedades hematológicas.

Heinonen, en 2001<sup>2</sup>, presenta un estudio donde analiza la evolución de pacientes con trasplante de médula ósea y su índice de satisfacción: el resultado es que, a medida que recuperan su vitalidad y pueden realizar actividades previas a su enfermedad, mayor es su satisfacción.

En este mismo sentido, Kopp, en 1998<sup>3</sup>, describe que una mayor información de los problemas que pueden surgir previamente al trasplante promueve una mayor adaptación emocional en fases posteriores; en el artículo se menciona sólo calidad de vida.

El Instituto Catalán de Oncología, con el soporte técnico de DEP Institut (Instituto de Estudios Sociológicos), ha realizado en 2008 una encuesta de satisfacción a pacientes y familiares en el ámbito específico de las enfermedades oncológicas<sup>4</sup>.

Este estudio, pendiente de publicación, aporta información fundamental para mejorar en aspectos de atención a pacientes y familias atendidas por la institución. En comparación con otros, se considera que la información podría generalizarse a otros centros o áreas específicas en oncohematología.

La dimensión de la muestra es de 2.480 entrevistas realizadas mediante una llamada telefónica.

Aunque los resultados a nivel general son muy buenos, por encima del estándar del 75%, se considera destacar a modo de resumen los aspectos mejor y peor valorados:

- Los aspectos mejor valorados por los pacientes son: el trato y amabilidad del personal de enfermería, el ajuste de la atención recibida a sus necesidades, el respeto a la intimidad y la información en relación con el tratamiento.

- Los aspectos menos valorados por los pacientes son: intervenir en la información que debe darse a los familiares, disponer de una persona a quien llamar en caso de duda o urgencia, el factor tiempo (relacionado con la demora al ingreso, puntualidad en la consulta externa) y la comida del hospital.

- Los aspectos mejor valorados por los familiares son: el trato y amabilidad del personal de enfermería con capacidad para hacerse cargo de su malestar, el ajuste de la atención recibida a sus necesidades y la forma de abordar el caso en la primera visita. Dan mucho valor a la educación sanitaria relacionada con los tratamientos.

- Los aspectos menos valorados por los familiares son: poder participar más en la toma de decisiones, el confort de las habitaciones para el acompañante y el factor tiempo como en el caso del paciente.

Del total de las encuestas, 90 se realizaron a familiares de pacientes que habían fallecido; de éstas destacan:

- Los aspectos mejor valorados son: el trato y amabilidad del personal de enfermería con capacidad para hacerse cargo de su malestar y también del equipo médico, información al paciente ajustada a su voluntad de saber y la ayuda en el control del dolor y sufrimiento.

- Los aspectos menos valorados son: poder participar más en la toma de decisiones y el seguimiento de los familiares después de la muerte.

## Conclusiones

- Satisfacción y calidad de vida deberían de ser conceptos diferentes.

- Las encuestas de satisfacción son necesarias para mejorar los aspectos del día a día en la atención a pacientes y familias.

- Los planes de calidad de cada centro requieren por norma encuestas de satisfacción.

- Las necesidades de los pacientes y sus familias son los factores que más vinculados están con su nivel de satisfacción.

- Una parte de los problemas de satisfacción están relacionados indirectamente con el ámbito de la organización/gestión.

- Otra parte está relacionada directamente con el profesional y la forma que tiene para ejercer su profesionalidad.

---

## Bibliografía

1. www.fbjoseplaporte.org
2. Heinonen H, et al. Quality of life and factors related to perceived satisfaction with quality of life after allogeneic bone marrow transplantation. *Ann Hematol.* 2010; 80 (3): 137-43.
3. Kopp M. Time after bone marrow transplantation as an important variable for quality of life: results of a cross-sectional investigation using two different instruments for quality-of-life assessment. *Ann Hematol.* 1998; 77 (1-2): 27-32.
4. www.dep.net

## GESTIÓN CLÍNICA Y CALIDAD EN HEMATOLOGÍA Y HEMOTERAPIA

M.Á. CUESTA CASAS, A.I. HEINIGER MAZO

*Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Regional Universitario Carlos Haya. Málaga*

En los últimos años los hospitales públicos han experimentado un aumento de la demanda sanitaria que, junto a la limitación de los recursos, ha determinado que se replantee la asistencia sanitaria más acorde a la realidad socioeconómica del siglo XXI. Los hospitales se han visto así sometidos a una gran presión para reducir los gastos sanitarios sin que se pueda ver afectada la calidad asistencial.

Los problemas fundamentales ante los que nos encontramos son el envejecimiento progresivo de la población, que requiere más servicios y de mayor intensidad; cambios en el patrón de las enfermedades; aumenta la duración de la vida de los gravemente incapacitados y terminales; finalmente, se registran cambios en el patrón epidemiológico: inmigración, enfermedades crónicas, etc. Asistimos, asimismo, a un gran desarrollo de nuevas tecnologías (aumento de recursos en hospitales, pruebas complementarias, actos médicos), que, sumado a los cambios en la sociedad, que determinan un aumento de las expectativas de los ciudadanos (se ha producido un cambio en las prioridades sociales), dan lugar a un gran crecimiento del gasto sanitario.

En el caso del sistema sanitario español vemos cómo esta dinámica habitual de los países desarrollados se ha agravado por la situación de escasa integración de los niveles asistenciales, gran crecimiento del gasto e insuficiencia presupuestaria; estilo de dirección excesivamente jerárquico, falta de flexibilidad para poder ejercer una gestión más acorde con la realidad que vivimos y una prestación de asistencia médica más eficaz.

Dicho todo esto, nos enfrentamos a una serie de retos que han determinado en el sistema sanitario en general, y más concretamente en España, un replanteamiento de la asistencia. Las principales expectativas ante esta demanda creciente de servicios son, en primer lugar, la mejora de la equidad de acceso, la prestación de una asistencia sanitaria integral que alcance unos elevados niveles de calidad que han de ser debidamente evaluados y controlados, así como una mejora de los estándares de calidad y satisfacción percibidos por los ciudadanos.

El problema central de toda estrategia de gestión es cómo reducir costes sin disminuir la calidad de los servicios ni su accesibilidad a la población. Los instrumentos básicos para conseguir estos objetivos son las técnicas de gestión de la utilización. Se han desarrollado varias estrategias: entre otras, disminuir el número de camas disponibles en los hospitales, disminución del número de ingresos y estancias inadecuadas, orientar los recursos disponibles para los enfermos crónicos a cuidados en el domicilio (hospitalización domiciliaria, atención social en el domicilio) y los cuidados en la comunidad (hospital de día, centros de día), etc.

Los programas de gestión de la utilización pueden definirse en líneas generales como el conjunto de técnicas utilizadas por los financiadores de la atención sanitaria, sean públicos o compañías aseguradoras, para gestionar los costes asistenciales influyendo en la toma de decisiones clínicas a través de la evaluación individual de la pertinencia o idoneidad de la atención prestada. Frente a la tradicional ausencia de interacción entre el financiador y el proveedor de servicios, la gestión de la utilización implica un cambio radical de la relación entre ambos, convirtiendo al primero en un activo participante en la toma de las decisiones asistenciales.

Ante todo esto, lo primero es que nos planteemos qué es la gestión clínica. Podemos definirla de varias formas, como un proceso de rediseño organizativo que incorpora a los profesionales sanitarios en la gestión de los recursos utilizados en su propia práctica clínica, suponiendo así una herramienta para impulsar la mejora de la calidad en la atención sanitaria mediante la aplicación de técnicas y procedimientos de trabajo con el objetivo de mejorar la eficiencia en la atención.

El objetivo, pues, es ofrecer los mejores resultados en salud a nuestros pacientes (eficacia), a través de prácticas que hayan podido demostrar su capacidad para favorecer el curso clínico de la enfermedad (efectividad), con los menores inconvenientes y costos para el paciente y el sistema (eficiencia). Se permite así al profesional una mayor autonomía organizativa, junto a una mayor responsabilidad en la gestión de los recursos. Es, en resumen, el uso de recursos intelectuales, humanos, tecnológicos y organizativos para el mejor cuidado de los enfermos.



La gestión de los servicios la realizan las administraciones. Todos los hechos que venimos comentando han determinado que a lo largo del tiempo hayan venido surgiendo nuevos modelos organizativos; a raíz fundamentalmente de la Ley 15/1997<sup>1,2</sup>, que habilita nuevas formas de gestión, se abre la posibilidad de que los servicios sanitarios sean prestados por personas jurídicas privadas, de que existan distintos modelos de provisión de servicios, y surgen así los conciertos con entidades privadas, las Fundaciones Públicas Sanitarias, los Consorcios, las Empresas Públicas, concesiones como el Hospital de Alzira o los nuevos hospitales de Madrid.

En cuanto a las fundaciones y empresas públicas, son más flexibles en relación con su gestión, pero siguen siendo organismos públicos de naturaleza pública y de titularidad igualmente pública. El modelo de Alzira surge por el contrario, como una concesión administrativa, presentando una financiación pública y prestación privada. Los nuevos hospitales de la comunidad de Madrid son concesiones con corporaciones locales, con una gestión privatizada. Los servicios de hematología en estas diferentes formas de gestión existen como tales servicios o no, dependiendo del sistema organizativo, formando parte en muchos casos de los servicios de diagnóstico biológico.

Dentro de esta dinámica de cambio, en la red de la comunidad autónoma de Andalucía ha surgido una forma de entender la gestión a través de la creación de las Unidades de Gestión Clínica, dentro del contexto del Sistema Sanitario Público de Andalucía (SSPA).

Las Unidades de Gestión son así la estructura organizativa donde se desarrolla la gestión clínica, partiendo de la premisa de la capacidad de los profesionales para ser responsables y autónomos, gestionar los servicios con idea de mejorar la eficacia, efectividad y eficiencia. Se posibilita así la consecución de unos objetivos relacionados con diferentes decisiones diagnósticas y terapéuticas mediante la coordinación e implicación de las personas.

La gestión clínica permite el abordaje integrado en cuanto a prevención, promoción, asistencia, cuidados y rehabilitación. Los instrumentos para una buena gestión incluyen el conocimiento de las necesidades de salud de la población atendida; una atención sanitaria basada en el mejor conocimiento científico disponible, uso habitual de herramientas de evaluación (guías de práctica clínica, trayectorias clínicas, revisión sistemática de la literatura, metodología de uso adecuado de fármacos, tecnología sanitaria, análisis de coste-utilidad y coste-efectividad, medición de resultados, satisfacción de usuario, etc.), medición asimismo de los resultados de la asistencia sobre la salud de la población, incorporación de la opinión del ciudadano (modelos de práctica integrados y participativos) e impulsos de la investigación y el desarrollo.

En el marco del SSPA existen diferentes formatos de Unidades de Gestión Clínica; hasta ahora la mayoría han sido creadas dentro del contexto de los propios servicios, mediante la integración de los profesionales de las diferentes áreas y estamentos en la consecución de una serie de objetivos compartidos; en otras ocasiones ha sido dentro de equipos multidisciplinares (integración de diferentes servicios). La tendencia actual es integrar en las unidades de los hospitales de referencia a las unidades de hospitales más pequeños con idea de mejorar los flujos de trabajo de todo el sistema potenciando la continuidad asistencial; en definitiva se trata de que el paciente, para un mismo proceso, no tenga que ir a sitios diferentes sino que se centralice toda su atención.

Observamos así, de las diferentes modelos de unidades de hematología creadas hasta el momento, un total de tres unidades, dentro de las cuales están integradas laboratorio y clínica en dos de ellas; en otro caso observamos una división del servicio, encontrándose integradas dentro de áreas multidisciplinares (área clínica integrada en el servicio de oncología, o área de laboratorio dentro del servicio de laboratorios generales).

Nuestra unidad, con un rodaje de siete años, mantiene la integración de las tres áreas de la especialidad: clínica, laboratorio y hemoterapia. Sus objetivos primarios siguen siendo una constante en el quehacer diario: reducir la variabilidad clínica mediante elaboración de protocolos, vías clínicas, planes de cuidados estandarizados y protocolos de trabajo normalizados (PNT); proyectos de cooperación con otros niveles asistenciales mediante talleres educativos, protocolos diagnósticos consensuados; así como la colaboración con otros centros o con la universidad para impulsar la docencia e investigación. La evaluación constante de estos objetivos (anualmente se analizan y proponen nuevos objetivos o mejoras de los niveles obtenidos previamente) está dando como resultado la alta satisfacción de los pacientes, la implantación de procesos diversos, así como un impulso a la investigación y la calidad.

Esta forma de gestión está imbricada con los Procesos Asistenciales Integrados, realizándose una gestión por procesos. Éstos son la herramienta con la que se analizan todos los componentes que intervienen en la prestación sanitaria, ordenando los diferentes flujos de trabajo de la misma, integrando el conocimiento actualizado, intentando disminuir la variabilidad de las actuaciones para lograr un mayor grado de homogeneización.

En el marco del SSPA en relación con nuestra especialidad hay realizados una serie de procesos (creados desde los profesionales de las diferentes unidades de gestión); por ejemplo: proceso de anemias y proceso de soporte hemoterapia. Desde la implantación de este proceso se ha visto cómo mejora la calidad inter-

niveles, las derivaciones de primaria, la respuesta desde consultas de rápida atención, etc., lo que permite hablar con un mismo lenguaje, mejorando la calidad de la atención, realizando menos trabajo innecesario, ya que cada nivel sabe dónde actuar.

Tras analizar esta nueva forma de organización, llegamos a un segundo punto no menos importante: la calidad asistencial; es importante evaluar y asegurar la calidad de los resultados, ya que esto es en definitiva parte integrante, así como uno de los objetivos de nuestro quehacer diario. La mayor parte de los recursos se asignan en decisiones tomadas en condiciones de incertidumbre; concretar, evaluar, evitar la variabilidades importante y nos dará calidad. Se gestiona lo que puede medirse, pero ¿qué herramientas tenemos para medir? Tenemos herramientas para medir la gestión clínica, la gestión económica o la calidad del producto que aportamos<sup>3</sup>.

Entre las herramientas de gestión económica nos encontramos con los sistemas de clasificación de pacientes (grupos relacionados al diagnóstico GRD, conjunto mínimo básico de datos CMBD), contabilidad analítica, control de costos, etc.

Existen igualmente herramientas para la evaluación y mejora de la calidad científica que en definitiva buscan disminuir la variabilidad de la práctica médica, como son los protocolos, vías clínicas, las guías de práctica clínica. Entre los indicadores de evaluación de la calidad, que nos permiten medir en parte la gestión clínica, encontramos los indicadores de salud, los indicadores de actividad y productividad, etc. Dentro de estos últimos encontramos aquellos que nos permiten la evaluación y control de la asistencia, evaluando el uso hospitalario, nos permiten identificar si los ingresos son apropiados, así como las estancias hospitalarias, detectando con ello procedimientos inadecuados para poder facilitar así la elaboración de planes para corregirlos. Una utilización inadecuada tiene importantes efectos negativos, como el incremento de costes hospitalarios y de los gastos de los familiares del paciente, la alteración en el normal funcionamiento de los servicios clínicos así como un aumento del riesgo para el paciente de adquirir infecciones nosocomiales y de estudios, exploraciones diagnósticas o tratamientos innecesarios.

En nuestra unidad hemos realizado, por ejemplo, un estudio, evaluando los ingresos y estancias adecuadas e inadecuadas, así como las causas de dicha inadecuación a través de la aplicación del Appropriateness Evaluation Protocol (AEP). Se trata de un programa de evaluación en el que mediante la aplicación de determinados criterios explícitos y objetivos se juzga la necesidad clínica del ingreso hospitalario y cada uno de los días de hospitalización a partir de la revisión de historias clínicas<sup>4,5</sup>. Existen varios programas el AEP ya comentado, el Intensity-Severity-Discharge Criteria

Set ISD (Criterios de Intensidad y Severidad al Alta), el Standardized Medreview Instrument SMI (Protocolo estandarizado de revisiones médicas) y el Delay Tool DTO (Lista de Demoras). El más utilizado en nuestro medio es el primero. Hemos realizado un estudio para ver el impacto que tenía el cambio del modelo organizativo, la creación de la Unidad de Gestión Clínica, sobre una medida objetiva de evaluación de la calidad como es el AEP, aplicando éste antes y tras un tiempo de rodaje de cuatro años de la Unidad de Gestión Clínica. Hemos observado así una mejora en la calidad asistencial, con una disminución tanto en el número de ingresos inadecuados como en las causas analizadas de inadecuación de éstos. Asimismo, evidenciamos cambios en las causas de inadecuación de las estancias hospitalarias, observando una mejoría en las causas derivadas de la responsabilidad del médico, probablemente debido a los continuos fenómenos de *feedback* realizados a los clínicos, presentando los datos del estudio y proponiendo de forma conjunta puntos de mejora<sup>6</sup>.

Dentro de esta dinámica de intentos de mejora de la calidad asistencial, hemos desarrollado un proyecto consistente en la creación de una seroteca de hemofilia, con objeto de contribuir a la mayor seguridad de nuestros pacientes.

Además de estos sistemas de calidad que estamos analizando, denominados “sistemas de calidad internos”, existen otros sistemas de calidad externos (CAT Banco de Sangre; JACIE Trasplante; Agencias Certificadoras; Agencias de Calidad) ampliamente conocidos en el ámbito de nuestra especialidad y que no vamos a entrar a detallar.

En el SSPA se ha creado dentro de este marco de evaluación la Agencia de Calidad Sanitaria de Andalucía (ACSA), a través de la cual se realiza la acreditación tanto de los profesionales como de las unidades. Desde un punto de vista de atención sanitaria integral (o sea, una atención sanitaria en conjunto), se valoran fundamentalmente los conceptos de *continuidad asistencial* y de *procesos asistenciales* (ya comentados).

La acreditación bajo este sistema es un proceso en el cual a través de la observación y reconocimiento de la forma en que prestamos la atención sanitaria, tanto los profesionales como las unidades en conjunto, vemos si se adapta a nuestro modelo de calidad. Así, existen una serie de estándares que son patrones de referencia (estos estándares, definidos a partir de leyes: Ley 2/1998 de 15 de junio, el II Plan Andaluz de Salud, Plan de Calidad de la Consejería de Salud, los Contratos Programa, Guía de Procesos Asistenciales, etc.), sin olvidar las recomendaciones sobre las mejores prácticas.

Mediante la acreditación se impulsa el proceso de mejora continua, entendido como algo dinámico, así como la evaluación constante dentro del SSPA; en este

proceso se valora el cumplimiento de una serie de estándares de calidad propuestos, se analizan las áreas de mejora detectadas y se proponen líneas de actuación para continuar el camino de mejora.

Estos procesos de acreditación se han iniciado hace algún tiempo. Existen actualmente dos unidades de hematología acreditadas, estando en proceso algunas más; se ha comenzado asimismo el proceso de acreditación de los profesionales. Tanto nuestra unidad de gestión clínica como algunos profesionales de la misma están ya acreditados por la ACSA.

Para finalizar, podemos puntualizar que, aunque el sistema sanitario español se ha situado entre los mejores, con unos resultados buenos, se debe adaptar a las necesidades del momento actual. Se hace necesario, como hemos visto, emprender un cambio en el modelo organizativo y escoger el que mejor se adapte a las necesidades de la comunidad. Además se hace imprescindible la evaluación constante de la actividad sanitaria, que ha de ser controlada y evaluada en todos sus aspectos, tanto los económicos como los relativos a la calidad del servicio ofrecido.

## Bibliografía

1. Sevilla F. La Ley General de Sanidad: el impulso necesario. *Rev Adm Sanit.* 2007; 5 (3): 407-25.
2. Sevilla F. La organización de los servicios sanitarios en las Comunidades Autónomas. *Rev Admin Sanit.* 2006; 4 (1): 13-6.
3. Peiró S. La derivación primaria especializada como problema y como síntoma. *Gestión Clínica y Sanitaria.* 2008; 10 (3): 84-7.
4. Bañeres J, Alonso J, Broquetas J, et al. Ingresos hospitalarios inadecuados y días de estancia inactivos en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica y neoplasia pulmonar. *Med Clínica (Barc.)* 1993; 100: 407-11.
5. Sangha O, Schneeweiss S, Wildner M, et al. Metric properties of the appropriateness evaluation protocol and predictors of inappropriate hospital use in Germany: an approach using longitudinal patient data. *International Journal for Quality in Health Care.* 2002; 14: 483-92.
6. Payne S, ASH A, Restuccia J. The role of feedback in reducing medically unnecessary hospital use. *Medical Care.* 1991; 29 (8 Suppl.): 91-106.

## FUNCIONAMIENTO INTEGRADO DE LA CLÍNICA CON EL LABORATORIO

P. SÁNCHEZ GODOY

*Servicio de Hematología y Hemoterapia  
Hospital Universitario Severo Ochoa. Leganés (Madrid)*

Corren tiempos difíciles en todas las organizaciones. La crisis económica está afectando, de momento, a todos los sectores productivos, y no es más que la con-

secuencia de la evolución natural de una sociedad que no ha permitido que las grandes conquistas sociales que se han ido consiguiendo a través de la historia con tanto esfuerzo pudieran haber llegado a todos. Valores humanos como la solidaridad, justicia o la equidad, tan necesarios para haberlo podido conseguir, han ido siendo vencidos por el egoísmo de unos pocos y la complacencia de otros muchos que se han encontrado más cómodos estando cerca de aquéllos. En este momento existe, además, una crisis de ideas y no se sabe cómo se va a poder salir de ella, pero lo que es seguro es que habrá que continuar, y más tarde o más temprano se saldrá de ella. Es de esperar que aparezcan algunas transformaciones sociales y que se vayan implantando lentamente, ya que no es época de esperar revoluciones y tienen que aparecer también los líderes que las vayan dirigiendo.

En la **medicina actual** también los valores tradicionales que nos han caracterizado a los médicos se han ido perdiendo –o, al menos, han ido cambiando–, dejando paso a grandes dosis de insolidaridad, competitividad, desigualdad y otras cualidades negativas. Al ser, desde sus orígenes, una ciencia en evolución, la crisis actual le afectará, pero de una forma diferente ya que afectará a sus organizaciones; pero no alterará su desarrollo técnico e intelectual, e incluso es posible que recupere en parte sus valores.

La AEHH, junto a otras prestigiosas asociaciones profesionales de la especialidad como la ASH, acaban de cumplir sus primeros 50 años<sup>1,2</sup> y, a través de todo este tiempo, el conocimiento y la práctica de la hematología han sufrido una gran transformación. Se ha conseguido poder curar, o al menos controlar, las enfermedades carenciales; que aunque no las curemos, podamos manejar satisfactoriamente las que tienen un origen inmunitario; conocemos la patología molecular de muchas enfermedades congénitas y, aunque todavía tampoco las podemos curar, sí que podemos dar consejo genético, hacer diagnóstico prenatal y mejorar algunas de ellas con el trasplante. También el desarrollo de la biología molecular está permitiendo descifrar mejor los procesos fisiológicos de la sangre y los patológicos de la mayoría de las enfermedades hematológicas, y estos conocimientos se han ido traduciendo en adelantos terapéuticos para los pacientes. Podemos curar algunas leucemias y linfomas y controlar temporalmente la mayoría de las que no curamos. En el futuro será de esperar que las mejoras continúen desarrollándose, incluso a una mayor velocidad, de forma que en poco tiempo es posible que lleguemos a manejar a los pacientes de forma muy diferente a como lo hacemos actualmente.

El desarrollo de la **especialidad de hematología** podría servir como ejemplo de la evolución de la mejor medicina, ya que ha ido alcanzando un gran desarrollo técnico. Ha sido pionera en los tratamientos qui-

miotéricos del cáncer, en la puesta en marcha de los hospitales de día, en trasplantes de órganos, en la aplicación de las nuevas tecnologías de laboratorio como el inmunofenotipado celular, genética celular, biología molecular, cultivos celulares, ingeniería celular o terapia génica; y, actualmente, en todas sus áreas de trabajo se hace imprescindible la utilización de las nuevas tecnologías, de la comunicación, programas informáticos y programas dirigidos a la calidad y a la gestión de los recursos, lo que hace que mantenga una viveza extraordinaria y pueda ser contemplada con mucho futuro por delante.

---

### La hematología integrada

A nivel organizativo la especialidad también ha ido sufriendo transformaciones. Aparece en la década de los cincuenta, junto a otras especialidades médicas que disgregan la medicina interna como consecuencia de la progresión del conocimiento médico y de la complejidad del diagnóstico y tratamiento de las enfermedades<sup>3</sup>. Le correspondía ocuparse del manejo de las enfermedades de la sangre, y la atención a los pacientes se fue configurando junto a la hemoterapia, que hasta entonces se trataba de un soporte para la cirugía y era realizada por anestesiólogos, y con el laboratorio, donde había que realizar estudios a la sangre necesarios para poder ver cómo se alteraba la morfología de sus componentes en las diversas enfermedades y también los que iban apareciendo para poder estudiar la hemostasia en las enfermedades hemorrágicas.

En los años setenta es cuando se desarrollan los hospitales de la Seguridad Social en nuestro país y, a través de una normativa ministerial, se crean la mayoría de los servicios clínicos asistenciales que se mantienen actualmente y quedan integradas las diversas áreas asistenciales que componen la especialidad en los servicios de hematología y hemoterapia<sup>4</sup>. Es a partir de esta época y en estas estructuras integradas cuando se va produciendo el gran avance de la especialidad, que llega a ser una de las más fructíferas y de mayor prestigio científico en España y fuera de ella.

En estas estructuras integradas, la evolución de la especialidad ha ido cambiando su orientación, dirigiéndose los recursos materiales y económicos preferentemente hacia la clínica, sobre todo para el manejo de las enfermedades oncohematológicas, quedando el resto en un segundo plano. El prestigio y las direcciones de los servicios también, en general, han recaído en los "hematólogos clínicos", y sus causas, aunque hayan sido científico-técnicas, probablemente también hayan influido la trágica imagen social de leucemias y linfomas y el *glamour* de los trasplantes.

La labor asistencial ha podido completarse de forma exitosa con una intensa actividad docente, consiguien-

do el alto grado de preparación que tienen actualmente los hematólogos españoles al finalizar su residencia y con la investigación, que ha sido realizada en su mayor parte colaborando en los diversos grupos cooperativos que tiene la especialidad.

---

### Otros componentes del modelo integrado: hospitales comarcales y los centros de referencia

En la década de los ochenta se dejan de construir grandes hospitales y se pasa a construir otros de menor tamaño que puedan atender a poblaciones más pequeñas y a las áreas rurales. Aunque en ellos se intenta mantener la estructura integrada de la especialidad, los recursos con que cuentan son insuficientes, y las secciones en las que quedaban dividida la especialidad (clínica, hemostasia y coagulación, hemoterapia y laboratorio) pueden contar, como mucho, con un hematólogo en cada una, de forma que en muchos casos esta dotación llega a ser insuficiente y éstos tienen que unirse a otros especialistas, especialmente internistas y otros especialistas de laboratorio, para poder continuar realizando muchas de las actividades hematológicas. Es también en estas organizaciones donde aparece la necesidad de tener que contar con **centros de referencia** donde puedan realizarse actividades que por su complejidad, y con los medios de que disponen, no llegan a poder realizarse.

Con ellos se abre una nueva forma de funcionamiento diferente a la de los clásicos servicios de hematología y hemoterapia, ampliándose el abanico de organizaciones asistenciales que realizan actividades hematológicas. La atención a los pacientes con enfermedades congénitas hemorrágicas es la primera que tiende a centralizarse en centros únicos regionales de referencia, aunque se mantienen dentro de los servicios de hematología y también se abre alguna unidad de trasplante de médula con funcionamiento independiente del resto de la actividad del servicio. Estas nuevas formas no han llegado a suponer una disgregación de la especialidad sino que han contribuido a su mantenimiento integrado.

Algo distinto ha ocurrido con la **hemoterapia**, donde la aparición devastadora del VIH y otras enfermedades transmisibles ha obligado a mejorar el procesamiento de todos los hemoderivados y, a través de diversas normativas internacionales y nacionales, toda su actividad ha venido siendo regulada, y su funcionamiento, modificado; así, los tradicionales bancos de sangre hospitalarios se han transformado en servicios de transfusión, manteniendo la actividad transfusional y otras relacionadas con aféresis y congelaciones de progenitores, y el resto ha pasado a ser realizado en los centros de transfusión, donde su actividad



es parecida a la de cualquier producción industrial y su funcionamiento al de una organización empresarial donde se producen y distribuyen los componentes sanguíneos. La ley obliga a que ambas organizaciones deban estar funcionando en colaboración y sus actividades tienen que seguir siendo realizadas y dirigidas por hematólogos, por lo que son estructuras que aunque modifican el modelo integrado del servicio de hematología, no desintegran el modelo de especialidad. Algunos centros transfusionales como el catalán están introduciendo actividades hematológicas no transfusionales en su cartera de servicios, como el control TAO o una consultoría de hematología clínica, lo que podría interpretarse como un nuevo modelo de practicar una hematología integrada que, a diferencia del modelo clásico, que es hospitalario, tiene su ubicación extrahospitalaria<sup>5</sup>.

### La crisis de la especialidad

Ya durante la década pasada y especialmente en lo que llevamos de ésta, estamos asistiendo a una crisis de la especialidad<sup>6</sup>. Si bien en sus aspectos científicos la hematología española probablemente esté alcanzando su mayor prestigio a nivel internacional, a nivel organizativo estamos asistiendo, con la puesta en marcha de una gran diversidad de modelos de gestión de la atención hematológica, a una desintegración del modelo clásico "integrado", y esto está ocurriendo debido a varios factores:

1. En primer lugar, la medicina está sufriendo las consecuencias de una importante transformación social producida como consecuencia de la gran revolución tecnológica, del crecimiento económico y del desarrollo en general, lo que ha ido acompañado de un incremento continuo de la demanda sanitaria y un incremento continuo del gasto muy superior al crecimiento del PIB.

2. En segundo lugar, se encuentran diversos factores que afectan directamente a los profesionales, como son la desmotivación o las clásicas resistencias al cambio, que son generales a todos los médicos y otros más específicos de los hematólogos, ya que ejercen una especialidad que tiene un alto coste en sus intervenciones, mucha heterogeneidad en sus contenidos y quizá, después de muchos años, esté perdiendo su liderazgo como especialidad vanguardista, dejando paso a otras que están más de moda. También los hematólogos, tras varios años de jefaturas vitalicias y ausencia de carrera profesional, han colaborado en la disgregación de las áreas clásicas de la especialidad, con la intención de poder repartir sus áreas de poder. La creación de la SETS y de la SETH podrían haber sido una consecuencia de ello y a todo ello se le podría unir, quizá, que haya habido cierta

despreocupación en general de anteriores directivas de la AEHH por el mantenimiento de la integración de la especialidad y no hayan sido capaces, como organización, de haber conseguido el suficiente prestigio social para haber podido influir en las decisiones políticas que han ido afectando a la práctica profesional de la especialidad.

3. En tercer lugar, está habiendo problemas de definición y límites con otras especialidades. Nos encontramos en un momento en que otras especialidades del laboratorio necesitan reinventar su identidad<sup>7</sup>. Es difícil de entender que se pueda acceder a ser especialista de una especialidad médica desde diferentes licenciaturas, sin que el diferente contenido formativo que tienen tenga relevancia alguna para el posterior trabajo asistencial que van a tener que desarrollar, como está ocurriendo con Bioquímica, Microbiología y Análisis Clínicos; o que los analistas estén autorizados para poder realizar cualquier tipo de análisis, independientemente de su complejidad o de la institución para la que se realicen, asumiendo, debido a ello, las funciones que les correspondería realizar al resto de especialistas del laboratorio. Esto a nivel práctico tiene una importante repercusión en la calidad de sus actuaciones, y también a nivel profesional, ya que el acceso al mundo laboral les está siendo muy complicado, especialmente a los bioquímicos. En la clínica es menos trascendente y está ocurriendo con Oncología, especialidad muy joven pero que está sufriendo un gran desarrollo y desde siempre ha tenido apatías sobre los linfomas.

4. Por último, hay que hablar del actual sistema de organización de los hospitales, conocido como *gerencialismo*, nacido hace más de veinte años con el objetivo de poner orden en las cuentas; en este momento, y ya con las cuentas algo mejor ordenadas, todo lo que siga funcionando en los términos actuales va a continuar retrocediendo en lo que deben ser organizaciones que funcionen acordes a las necesidades actuales. Los gerentes deberían abandonar el autoritarismo con que actúan, como modelo de dirección, y dejar de ser meros administradores dirigidos desde unas centrales burocratizadas y politizadas. Como gestores de empresas del conocimiento que son, deberían estar dotados de la formación y experiencia necesaria y realizar su función en un escenario donde contarán con la participación de sus profesionales en la gestión y en el resto de actividades.

A nivel internacional, la especialidad está sufriendo problemas parecidos y también está siendo motivo de reflexión en las asociaciones profesionales<sup>8-10</sup>. En Estados Unidos, al contrario de lo que ocurre en nuestro país, tienen una larga tradición de integración de oncología y hematología. Habiendo nacido la oncología como especialidad médica en el seno de la hematología, se están encontrando con que la

mayoría de los profesionales que atienden enfermedades hematológicas tienen doble titulación en hematología y oncología y saben manejar las enfermedades hematooncológicas, pero no tienen formación suficiente para manejar las no malignas, produciéndose una disfuncionalidad en la atención a estos pacientes y se está proponiendo la separación de ambas especialidades<sup>11</sup>.

---

### Los servicios de hematología en los nuevos modelos de gestión

La práctica de la hematología en instituciones privadas ha sido siempre minoritaria, tratándose de una especialidad cuya actividad, en general, se desarrolla en los hospitales públicos y a éstos la legislación reguladora de la administración del estado los somete, al igual que a otras entidades públicas, a un encorsetamiento que hace muy difícil poder gestionarlos. Es a partir de la Ley 15/1997 cuando queda habilitada la posibilidad legal para la implantación de nuevas formas de gestión, ampliándolas de manera notable con la tipología abierta para organismos autónomos, entidades públicas empresariales, sociedades anónimas públicas, sociedades de responsabilidad limitada, consorcios, fundaciones y cooperativas. Algunas de estas nuevas fórmulas de gestión sanitaria se han ido implantando en la mayoría de las comunidades autónomas (CC AA) y, a excepción de los organismos autónomos, el régimen jurídico que tienen es el derecho privado, lo que les ha permitido adoptar cambios importantes en su gestión, haciéndola más flexible y con ello poder conseguir, desde el punto de vista teórico, mejores resultados en el funcionamiento de los centros sanitarios. Pero esto no siempre está ocurriendo así, ya que en ocasiones los cambios no responden a intereses generales o profesionales, sino que lo hacen a necesidades de sus directivos, a veces tomando decisiones arbitrariamente o, incluso, atendiendo a intereses personales.

Estos cambios organizativos están afectando a nuestra especialidad, de forma que, en las nuevas instituciones sanitarias, sean fundaciones, empresas públicas o consorcios, la práctica de la hematología integrada, y dentro de un servicio integrado, está llegando a ser inusual<sup>12</sup>. Es con algunos de estos modelos donde se están realizando experiencias que quebrantan la integridad de la especialidad. Ejemplo de ello están siendo ciertas variantes que se ofrecen, como, por ejemplo, la separación de hematólogos de un mismo hospital, adscribiendo una mitad al servicio de análisis clínicos y la otra al de oncología; o la dependencia funcional de todo un equipo completo de hematólogos de otros especialistas, que lógicamente no cuentan con la acreditación ni prepa-

ración suficiente para tal responsabilidad, o como la realización por “equipos volantes” extrahospitalarios de actividades hematológicas que les correspondería realizar a hematólogos existentes en el propio centro. Es de esperar que muchas de estas experiencias sean transitorias, ya que no han aparecido acompañando al progreso o a intereses generales y la mayoría de ellas no hacen más que crear funcionamientos anormales.

---

### El laboratorio “actual” de hematología

La mayoría de las variantes organizativas que han ido afectando a la especialidad suponen diferentes formas de realizar las tareas hematológicas, pero no tienen por qué afectar a su integridad como especialidad.

La hemoterapia está regulada por ley y sus funciones deben estar asumidas por hematólogos, por lo que su integración está asegurada; y la clínica –aunque existan algunos intentos de absorción por parte de la oncología– tampoco tiene por qué tener problemas, ya que nuestra relación con ellos debe quedar solamente en la conveniencia de tener que compartir algunos recursos estructurales y en que necesitan nuestro apoyo técnico, dados los frecuentes problemas hematológicos que presentan sus pacientes. Es el laboratorio de hematología, junto al resto de laboratorios de diagnóstico biológico, el que (al estar inmerso en una de las actividades asistenciales que mayor transformación está sufriendo) tiene por delante un futuro más incierto, y es en esta área de la especialidad donde existe un peligro real de desintegración.

En España, en los años setenta aparecen ubicados en las cátedras de medicina, y es en la década siguiente, coincidiendo con la creación de los servicios de hematología, cuando se produce un gran avance de las técnicas instrumentales y un gran aumento en el número de pruebas. Se ve la necesidad de tener que realizar controles internos y externos para poder obtener una mayor precisión de los resultados y se inicia su automatización con la aparición de los autoanalizadores, que iban a permitir realizar un gran número de determinaciones en poco tiempo. Es una época en la que los laboratorios se especializan y funcionan separados en las diversas especialidades que forman el laboratorio de diagnóstico clínico.

En los años noventa aparecen nuevas metodologías, especialmente las técnicas de biología, genética molecular y marcajes celulares, que van a aportar pruebas para poder llegar a un mejor conocimiento de las enfermedades. Aparecen también la robotización, que permite un mayor grado de automatización, las pruebas cercanas al paciente y los sistemas de información.

Durante todo este tiempo el laboratorio ha ido consolidando un alto grado de especialización, llegando al **laboratorio actual**, que realiza una actividad que es clave en la asistencia, al aportarla un amplísimo catálogo de pruebas que permiten que se llegue a poder realizar alrededor de un 70% de los diagnósticos en medicina. El gran desarrollo tecnológico ha acabado con los pequeños laboratorios tradicionales con funciones artesanales y ha dado paso a laboratorios con una alta cualificación técnica de los profesionales que trabajan en ellos, consiguiendo una alta fiabilidad de los resultados analíticos, cuentan con una gran capacidad para asumir los avances tecnológicos y están preparados para poder dar cobertura a grandes poblaciones.

El **laboratorio**, que inicialmente se desarrollaba atendiendo a las necesidades de los clínicos, que le iban pidiendo cada vez una mayor calidad y rapidez en poder obtener los resultados, en la actualidad está obligado a satisfacer también las necesidades de gestores, que quieren, sobre todo, que cueste lo menos posible, y de los pacientes, que esperan poder tener las mayores facilidades para llegar a hacérselos. Tiene que ofrecer, por tanto, un servicio sanitario con carácter de excelencia, y ello, unido a la alta complejidad de sus actuaciones, al amplísimo catálogo de pruebas y a la utilización de las nuevas tecnologías, ha conseguido que el laboratorio clínico siga evolucionando y haya tenido que adaptarse a las necesidades de todos ellos. La progresiva complejidad en su funcionamiento, la constante presión para la moderación de los costos, la creciente demanda asistencial y la exigencia de calidad en las instituciones sanitarias, junto a la aparición de legislación que pretende regularlo, hace que una gran parte de su funcionamiento tenga que ser muy parecido al de otros sectores de la producción industrial, y por ello les está copiando muchas de las técnicas de su funcionamiento. Desde esta perspectiva, el **laboratorio actual** está configurado como una pequeña empresa que hay que gestionar, por lo que se puede considerar que se encuentra actualmente en la etapa de la gestión; el “laboratorio gestionado”, que está basado en cuatro pilares que son fundamentales para su funcionamiento: el equipamiento analítico-técnico, el sistema de información, la gestión de los recursos y la gestión de la calidad.

Actualmente, es la **calidad** a nivel técnico su principal objetivo y para ello se le está exigiendo que esté dotado de una *Política de Calidad* y de un *Sistema de Calidad*, con objetivos firmes y responsabilidades claramente definidas, y con un *Programa de Gestión de Calidad* que le permita poder realizar su planificación, su control, su aseguramiento y su mejora continua. El grado de inexactitud y de imprecisión de cada laboratorio debe verificarse participando en *Programas de Evaluación Externa de la Calidad (EQAS)*, que están ga-

rantizados por instituciones profesionales nacionales o extranjeras. En España contamos con el patrocinado por la AEHH, con el que, junto con el programa internacional *EQAS* (de la ECAT Foundation), queda cubierta la práctica totalidad de las pruebas de hematología, trombosis y hemostasia que realizamos. A través de ellos se va a poder monitorizar de una forma continuada el nivel técnico del laboratorio y se van a poder corregir errores en la realización de las pruebas. Más novedosos, en esta metodología de evaluación externa de la calidad, son los *Programas de Garantía Externa de la Calidad (EQAP)*, que amplían la evaluación a áreas extraanalíticas y a la propia gestión de la calidad de los laboratorios.

El laboratorio actual debe tener autorizado su funcionamiento y, para ello, debe cumplir las normativas legales que le afecten. Cada una de las CC AA ha ido desarrollando la suya propia y, en el camino hacia la excelencia en su funcionamiento, a través de la mejora continua, requiere además que alguna entidad autorizada en *acreditación de la Calidad* le audite y le certifique o acredite que efectivamente su funcionamiento cumple con las normas que entidades internacionales de estandarización de la calidad han creado para ello. En el laboratorio de ensayo, son las *normas ISO* las que lo regulan, y dos de estas normas son las que le afectan de una forma más directa: la *UNE-EN ISO 9001:2000* (revisada en 2008) y la *UNE-EN ISO 15189:2003* (revisada en 2007). Cumpliendo la primera, se certifica que el laboratorio tiene implantado un Sistema de Gestión de la Calidad por cualquiera de las entidades acreditadoras autorizadas (AENOR, APPLUS, Bureau Veritas, TÜV, etc.); y, cumpliendo con la segunda, se consigue que se acredite formalmente que el laboratorio tiene capacidad técnica para las tareas que realiza. A diferencia de la certificación, en España únicamente la entidad ENAC está autorizada para poder acreditar.

El laboratorio actual también ha de contar con un responsable que, teniendo claros la misión y los objetivos de su laboratorio y estando dotado de la formación y experiencia suficientes, sea capaz de realizar las funciones que le competen de planificar, organizar, dirigir y controlar todas las actividades o procesos que se realicen, incluidos la investigación y docencia, debiendo delegar y repartir las funciones delegables entre los profesionales que le atienden.

El **laboratorio de hematología** no ha sido ajeno a toda esta evolución. A nivel técnico, en sus propios procedimientos ha sido donde más se ha diferenciado del resto, y también en la capacitación profesional de sus responsables técnicos, que deben ser médicos y especialistas en hematología y hemoterapia. En su funcionamiento también ha cambiado y, junto al resto de laboratorios de un mismo centro, ha pasado de realizar todas sus actividades de una forma aislada, inclu-

so en ubicaciones separadas, a que sean comunes muchas de ellas. Hoy es difícil plantear por separado la mayoría de las actividades que se realizan en las fases pre y postanalíticas o el funcionamiento de servicios importantes como el sistema de información, el mantenimiento informático o el equipo de suministros<sup>13</sup>.

Pero todo este avance y gran desarrollo del laboratorio ha venido acompañado de un aumento continuo de la demanda, lo que conlleva, sobre todo en el sistema público, un gran consumo de recursos y un alto costo difícil de asumir. De ahí que estén surgiendo diversos modelos organizativos, no exentos de polémica. Entre ellos, los **macrolaboratorios**, que, aprovechando los avances tecnológicos y basándose en el teórico efecto beneficioso de la economía de escala, intentan copiar la producción de los sectores industriales, aparentando una mejora en su eficiencia, algo que podría ser cierto si el laboratorio sólo necesitara producir resultados, como ocurre en caso de estudios o chequeos poblacionales. Pero la función del laboratorio de diagnóstico clínico en las instituciones sanitarias y, especialmente, en los hospitales es otra, y consiste en aportar sus pruebas y el conocimiento de los profesionales que en ellos trabajan, a la labor de los clínicos para el diagnóstico, manejo y mejor tratamiento de sus pacientes.

Aquí es donde de nuevo se encuentra una diferencia importante con los otros especialistas del laboratorio, que en general tienen como función (misión) única dar resultados. El hematólogo le añade la interpretación al resultado, pudiendo indicar un estudio más amplio, recomendar un tratamiento adecuado, e incluso puede aplicárselo directamente al paciente, y es, entre otras cosas, porque también le diferencia en este caso del resto de especialistas médicos, que el hematólogo orienta su asistencia en torno a los procesos de una forma integral (utilizando terminología de moda en la gestión sanitaria) de forma que la práctica de la hematología lleva funcionando ya desde hace muchos años como una unidad funcional, “Unidad funcional de la Sangre”; entidades, como la de la mama, que están siendo puestas de moda por los gestores actuales.

Este valor añadido que aporta el hematólogo al laboratorio le va a permitir, además, poder controlar la demanda, realizando las pruebas de su cada día más amplio catálogo, con excepción de hemogramas, tiempos de coagulación y alguna otra de bajo coste, sólo a aquellos cuya solicitud esté bien fundamentada. Este control de la demanda se transforma en un claro beneficio económico, y es condición sine qua non para que, asociado a todas las características descritas anteriormente que debe tener el laboratorio actual, se pueda hablar del laboratorio que requiere la sociedad en este momento, que es un laboratorio eficiente y de calidad contrastada.

---

## El futuro del laboratorio y la hematología molecular

El laboratorio actual se encuentra ya de lleno inmerso en la era de la medicina molecular; por ello, el laboratorio de hematología y la especialidad en sí tienen que estar preparados para realizar todas aquellas pruebas citogenéticas y moleculares que, según vayan dejando de ser experimentales, se vayan convirtiendo en necesarias para el manejo de las enfermedades hematológicas<sup>14</sup>. Estas pruebas están apareciendo cada día a mayor velocidad y están suponiendo una auténtica revolución biológica y tecnológica. Sirviendo inicialmente para realizar un mejor diagnóstico de enfermedades, ya empiezan a ser necesarias para el pronóstico, evaluación de respuesta terapéutica y su seguimiento<sup>15</sup>.

Esta nueva hematología molecular –que ya cuenta con ejemplos prácticos en algunas enfermedades, como la leucemia mieloide crónica o la promielocítica aguda– conlleva una alta complejidad en el manejo de las pruebas a realizar en el laboratorio y debería estar siendo realizada por expertos con la necesaria formación hematológica. Las experiencias actuales con el manejo de la medicina molecular llevado a cabo por profesionales sin el suficiente conocimiento de las enfermedades está suponiendo la realización de extensas baterías de pruebas, muchas de ellas innecesarias y un coste insostenible.

La indicación de las nuevas pruebas moleculares tendrá que individualizarse en función del estado de la enfermedad y del propio paciente; por tal motivo, el laboratorio de hematología molecular, como mejor va a poder ofrecer una mayor calidad técnica y eficiencia será ubicándose en el área de diagnóstico citológico y citometría de flujo y en hospitales que atiendan a este tipo de pacientes, y, como ocurre con otras actividades complejas que tienen alto coste o una baja frecuencia, queden repartidos en niveles de referencia, atendiendo sobre todo a criterios poblacionales<sup>16,17</sup>.

---

## Consideraciones finales

Como hemos venido exponiendo, no están siendo la modernidad, la mejora en la eficiencia o los intereses generales de la sociedad los factores que amenazan con disgregar la especialidad. La confusión existente en las competencias, misiones y definiciones de otras especialidades y su futuro poco claro hace que sus especialistas tengan que estar buscando nuevas actividades y funciones. La hematología es una especialidad médica que, aparte de su contenido, tiene una característica importante que la diferencia del resto: que contempla en conjunto el diagnóstico por el la-



boratorio, el manejo del paciente con enfermedad hematológica y el recurso de la sangre como tratamiento, y ello hace que el hematólogo tenga que asumir funciones en las tres áreas. Los límites en las competencias de la mayoría de las especialidades médicas son realmente difíciles de definir, razón por la cual en nuestra especialidad, al ser tan heterogénea, muchas de las actividades sean parecidas a las de las llamadas “especialidades frontera”<sup>18</sup>, y de ahí que algunas de ellas estén siendo realizadas en ciertos entornos por estos especialistas.

Su pasado como especialidad ha sido brillante; su presente se encuentra inmerso en una crisis que no debe ser entendida en sentido peyorativo, sino como un fenómeno de cambio; y el futuro, aunque difícil de predecir, es de esperar que esté asegurado. Recientemente ha quedado definida por la ley de Ordenación Sanitaria y coincide con la recogida por la American Society of Hematology (ASH), por la European Hematology Association (EHA) y en el Real Decreto del 2 de octubre de 2006. El próximo decreto sobre la troncalidad es de esperar que recoja la propuesta del Grupo de Trabajo del Consejo Nacional de Especialidades en Ciencias de la Salud del Ministerio de Sanidad para que entre a formar parte del tronco médico; y también es de esperar que resuelva las diferencias entre especialidades frontera y contribuya a superar la actual sensación de intrusismo favoreciendo la cooperación entre ellas<sup>19</sup>.

Esta previsible mejoría en las definiciones y limitaciones de las especialidades no quita para que la práctica de la hematología tenga que ser exclusiva del especialista, ya que ésta debe realizarse dentro de un equipo de atención médica con el que comparte responsabilidades y experiencias. El médico de atención primaria y el médico internista no sólo representan el primer contacto con el enfermo, sino que además inician el proceso diagnóstico y van a tener que seguir colaborando en muchos aspectos del manejo y seguimiento de los pacientes hematológicos, al igual que lo deberán seguir haciendo otros especialistas.

En cuanto a cómo deben ser los modelos organizativos, en una sociedad tan abierta como la actual, ciertas dosis de flexibilidad son necesarias y los hematólogos debemos estar abiertos a que sigan apareciendo nuevos modelos donde tengamos que prestar la atención hematológica a nuestros pacientes. Es a las asociaciones profesionales a las que corresponde, como técnicos que son, aportar soluciones a los problemas que se vayan planteando y colaborar con la Administración sanitaria y entidades afines en el diseño de los nuevos modelos. Deberán velar por la existencia de una actividad hematológica de calidad y por unas condiciones laborales de sus profesionales dignas, así como liderar los cambios que deban de irse produciendo.

Al hematólogo le corresponderá seguir avanzando en el conocimiento de las bases celulares y moleculares de las enfermedades y continuar con la puesta en práctica, en cada una de sus actuaciones, de los valores tradicionales que acompañan al progreso y que están en sus manos, como el esfuerzo, conocimiento, adaptación al cambio, innovación y flexibilidad, etc., junto a otros más actuales, como la efectividad y la eficiencia.

## Bibliografía

1. Rozman C. Breve historia de la Asociación Española de Hematología y Hemoterapia (AEHH) y algunas reflexiones para el futuro. *Haematologica*. 2008; 93 (Extra 1): 67-73.
2. Jaffé ER, Kaushansky K. The American Society of Haematology: a success at age 50. *Blood*. 2008; 111: 11-5
3. Beeson PB. The natural history of medical Subspecialties. *Ann Intern Med*. 1980; 93: 624-6.
4. Fernández MN. El reto de la hematología-hemoterapia del siglo XXI. *Haematologica*. 1997; 82 (Supl. 1): 298-302.
5. Pla R, Salinas R. El Banc de Sang i Teixits. Empresa pública de base territorial. V Curso de Gestión en Hematología y Hemoterapia de la AEHH. Barcelona (El Montanyá) 2009.
6. Vicente V, De Arriba F, Amigo ML, Heras I. ¿Sigue siendo útil el modelo de servicio de hematología y hemoterapia clásico e integral? Organización actual y futuro previsible. *Haematologica*. 2008; 93 (Suppl. 1): 232-6.
7. Hallworth M, Hyde K, Cumming A, Peake I. The future for clinical scientists in laboratory medicine. *Clin Lab Haem*. 2002; 24: 197-204.
8. Schafer A. The future of hematology: the need to reassert its identity. *Hematologist*. 2004; 1 (3).
9. Schrier SL. Thoughts on the future of hematology. *Hematologist*. 2005; 2 (2).
10. Bunn HF. The future of hematology: good news, bad news. *Hematologist*. 2004; 1(3).
11. Drews RE. Careers in hematology: hematology-oncology: Do two halves make a whole? *Hematologist*. 2005; (2).
12. Sánchez Godoy P. Modelos de Servicios de Hematología y Hemoterapia en los diversos modelos de gestión: V Curso de Gestión en Hematología y Hemoterapia de la AEHH. Barcelona (El Montanyá), 2009.
13. Sánchez Godoy P. La calidad en el laboratorio de hematología-hemostasia. IV Congreso de la AMHH. 2009.
14. Weatherall DJ. Haematology in the new millennium. *Br J Haemat*. 2000; 108: 1-5.
15. Fielding AK, Ager S, Russell SJ. The future of haematology, molecular biology and gene therapy. *BMJ*. 1997; 314: 1396-9.
16. Morgan GJ, Pratt G. Modern molecular diagnostics and the management of haematological malignancies. *Clin & Lab Haemat*. 1998; 20 (3): 135-41.
17. Richards SJ, Jack AS. The development of integrated haematopathology laboratories: a new approach to the diagnosis of leukaemia and lymphoma. *Clin Lab Haem*. 2003; 25: 337-42.
18. Declaración oficial de la AEHH sobre la especialidad en relación con otras especialidades frontera. Diciembre, 2008. [www.aehh.org](http://www.aehh.org).
19. Alegre A. Informe sobre troncalidades en la formación de especialidades en ciencias de la salud. Consejo Nacional de Especialidades en Ciencias de la Salud. IV Congreso de la AMHH. 2009.

## LA MOTIVACIÓN DE LOS PROFESIONALES DE LA SALUD

V. MARTÍNEZ ESPINOSA

*Fundación Universitaria del Bagés. Manresa (Barcelona)*

Es evidente que no todas las personas actúan, argumentan, trabajan y se relacionan con el entorno personal y laboral de la misma forma.

Las capacidades, conocimientos, habilidades y actitudes individuales se forman a partir de nuestra propia personalidad así como de nuestras experiencias familiares, escolares, laborales y sociales. Nuestra situación en los grupos de trabajo y la valoración que de nuestros resultados se realice en la organización sanitaria donde trabajemos dependerán en gran medida de la capacidad de interrelacionarnos y de cómo transmitimos y nos posicionamos con el resto de nuestros iguales. La personalidad nos identifica, nos individualiza y nos permite diferenciarnos del resto.

A menudo la gente habla de la personalidad como si se tratara de un producto, como una corbata de colores brillantes que le diera vida a un traje viejo. No sólo eso; algunas veces hablamos como si la personalidad consistiera en rasgos atractivos y admirables: efecto, encanto, honestidad. Pero no vemos que la personalidad sea algo mucho más complejo de lo que indica el uso ordinario del término, e incluye tantos rasgos positivos como negativos. Y, entre ellos, las actitudes.

Las actitudes son determinantes sobre la conducta, ya que están ligadas también a la percepción, a la personalidad y a la motivación. Una actitud es un sentimiento o estado mental positivo o negativo de buena disposición, conseguido y organizado a través de la experiencia, que ejerce una influencia específica sobre la respuesta de la persona a los demás, a los objetos y a las situaciones. Las actitudes se aprenden.

Las actitudes también definen nuestra predisposición hacia determinados aspectos del mundo. Por otro

lado, nos proporcionan las bases emocionales de nuestras relaciones interpersonales y de identificación con los demás.

La satisfacción en el trabajo es una actitud que los individuos mantienen con respecto a sus funciones laborales. Es el resultado de sus percepciones sobre su quehacer profesional, basadas en factores relativos al ambiente en que se desarrolla, como el estilo de dirección, las políticas y procedimientos, la afiliación de los grupos de trabajo, las condiciones laborales y el margen de beneficios.

Para poder estar satisfechos, necesitamos estar motivados. La motivación personal es el elemento intrínseco básico que hace que las personas realicen su actividad laboral de forma adecuada y con elevados niveles de satisfacción. En este sentido el ámbito sanitario no es muy diferente del propio de otros ámbitos laborales y profesionales.

Vamos a analizar y reflexionar en esta sesión en torno a cómo los profesionales de la salud pueden y deben estar implicados en sus diferentes lugares de trabajo y cómo las organizaciones sanitarias deben incentivarlos para que se desarrollen y corresponsabilicen de forma adecuada en los procesos y resultados organizativos, económicos y asistenciales.

Si esto se cumple, todos saldremos ganando.

---

### Bibliografía

- Furham A. Personalidad y diferencias individuales en el trabajo. Madrid: Prentice Hall; 1995.
- Gil E, García M. Grupos en las organizaciones. Madrid: Pirámide.; 1996.
- Heller R. Cómo motivar. Barcelona: Grijalbo; 1998.
- Lebeouf M. El gran secreto de la motivación. Empresa Activa. 2009.
- Peters, T. Nuevas organizaciones en tiempos de caos. Deusto. 1994
- Valls, A. Automotivación. Profit Editorial. 2008.
- Watzlawick, P. El arte de amargarse la vida. Barcelona: Herder; 2003.

# Nuevos aspectos clínicos y biológicos de la fibrinólisis

COORDINADORES: P. MARCO. *Alicante*  
J.C. REVERTER. *Barcelona*

## Resumen del simposio

El simposio, dedicado a ofrecer una visión global sobre la fibrinólisis tanto desde el punto de vista del conocimiento fundamental como de su aplicación clínica, se inicia con la presentación de la Dra. A. Estellés. En ella comenta las modificaciones del sistema fibrinolítico que se han descrito en las enfermedades endocrinas. La ponente revisa primero el síndrome metabólico, la resistencia a la insulina y la obesidad, donde se han identificado cambios importantes con hipercoagulabilidad e hipofibrinólisis, debida fundamentalmente a un exceso de PAI-1, aunque también se ha asociado el síndrome metabólico con niveles aumentados de TAFI. En segundo lugar, se centra en el síndrome del ovario poliquístico, donde la alteración del PAI-1, debida a la presencia del alelo 4G del polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1, se ha correlacionado con su desarrollo. Finalmente, revisa los hallazgos en el hipertiroidismo, donde hay hipofibrinólisis y disfunción endotelial, y en el hipotiroidismo, donde las alteraciones pasan de la hipofibrinólisis a la hiperfibrinólisis con el aumento de la gravedad de la afección tiroidea.

La segunda ponencia, presentada por el Dr. J. Álvarez Sabín, comenta la actualidad de la trombolisis en el ictus isquémico. Para ello, primero revisa los estudios pivotaes en que se basa su empleo y luego el ponente señala los retos del futuro de la trombolisis en el ictus, a parte de la propia indicación del t-PA. Estos retos considera que son lograr que sea accesible a un mayor número de pacientes con ictus, mejorar la eficacia terapéutica y ampliar la ventana temporal para su uso. Asimismo, expone las nuevas alternativas terapéuticas de la fibrinólisis, que pueden ser farmacológicas, como los nuevos trombolíticos, o basadas en acciones físicas o mecánicas, como la sonotrombolisis, las microburbujas o la lisis mecánica. Resulta de especial interés la revisión de la combinación del t-PA con inhibidores de las metaloproteasas, que parece que puede mejorar la eficacia del tratamiento, disminuir el edema cerebral y controlar la hemorragia asociada a la trombolisis.

En la tercera ponencia, la Dra. J. Orbe realiza una revisión del sistema fibrinolítico y de las metaloproteasas, implicadas en la angiogénesis y la remodelación vascular y relacionadas con la enfermedad aterotrombótica, y explica la importante relación existente entre fibrinólisis y proteólisis. En su ponencia aporta resultados de investigaciones originales de su grupo sobre la metaloproteasa MMP-10 en la aterotrombosis, en los que se demuestra su expresión en las placas ateroscleróticas inflamatorias y en fase de ruptura. En estos estudios también han probado que la MMP-10 puede favorecer la lisis del coágulo inducida por t-PA disminuyendo la activación del TAFI, lo que le confiere un papel profibrinolítico. Finalmente, revisa las pruebas de laboratorio que estudian la fibrinólisis y las metaloproteasas, destacando la necesidad de estudios que las correlacionen con estudios clínicos en patología aterotrombótica, para establecer su utilidad en la identificación de los pacientes de riesgo vascular.

En la ponencia final, la Dra. A.M. Lauricella revisa la importancia que tiene la estructura de la fibrina en su capacidad para ser lisada, y que ello puede tener relevancia en diferentes patologías, en las que puede permanecer por tiempo prolongado en circulación, induciendo la formación de más trombo, o degradarse anticipadamente, causando riesgo hemorrágico. Explica la variedad de estructuras que puede adoptar la fibrina, lo que modifica sus características y el papel de sus determinantes principales (fibrinógeno, trombina y factor XIII) y revisa las pruebas de laboratorio que se han desarrollado para evaluarla funcionalmente. Por último, comenta cómo la estructura de la fibrina afecta a su propia facilidad para ser lisada, incluyendo el papel de la misma como cofactor de la fibrinólisis, y estudia cómo se ve modificada su estructura y su sensibilidad a la lisis en distintas entidades, incluyendo los estudios de su grupo evaluando el efecto de la homocisteína.

## FIBRINOLISIS Y ENFERMEDADES ENDOCRINAS

A. ESTELLÉS<sup>1</sup>, E. ZORIO<sup>2,5</sup>,  
J. GILABERT-ESTELLÉS<sup>3</sup>, L.A. RAMÓN<sup>1,4</sup>,  
A. BRAZA BOÏLS<sup>1,5</sup>, F. ESPAÑA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación; <sup>2</sup>Servicio de Cardiología;  
<sup>3</sup>Servicio de Ginecología; <sup>4</sup>RECAVA; <sup>5</sup>Fundación  
para la Investigación del Hospital Universitario  
La Fe. Hospital Universitario La Fe. Valencia

### Introducción

El funcionamiento del sistema fibrinolítico tiene como base la conversión de una proenzima, el plasminógeno, en su forma proteolíticamente activa, la plasmina, la cual es capaz de degradar la fibrina y, así, eliminar el coágulo previamente formado<sup>1</sup> (Figura 1). La transformación del plasminógeno en plasmina se produce mediante la acción proteolítica de dos enzimas, denominadas activador tisular del plasminógeno (tPA) y activador del plasminógeno tipo urocinasa (uPA).

Cuando la plasmina actúa sobre la fibrina, genera productos de degradación de la fibrina con residuos de lisina en posición carboxiterminal. Estos residuos constituyen sitios de unión para el tPA y el plasminógeno y por ello son responsables de amplificar enormemente la cascada de la fibrinólisis. Como en cualquier proceso biológico regulado, a esta tendencia profibrinolítica se opone una actividad antifibrinolítica, de tal modo que sólo un adecuado equilibrio entre ambas fuerzas dará lugar a un correcto funcionamiento del sistema global<sup>2</sup>.

La inhibición de la fibrinólisis se ejerce a varios niveles (Figura 1). Por una parte, están los inhibidores de los activadores del plasminógeno. El principal inhibidor de la fibrinólisis *in vivo* es el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 o PAI-1, el cual se sintetiza no sólo en el endotelio vascular sino también en el hígado<sup>3</sup>. Otros inhibidores son el PAI-2, fundamentalmente de origen placentario, del que sólo se detectan niveles plasmáticos significativos en mujeres gestantes<sup>4,5</sup>, y el PAI-3, que más tarde se identificó como el inhibidor de la proteína C<sup>6</sup>, el cual presenta una mayor concentración plasmática pero una menor actividad antifibrinolítica. También se ha descrito otro mecanismo que regula negativamente la activación del plasminógeno, la vía del inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI)<sup>7</sup>. Se sabe que los residuos de aminoácidos básicos (lisina y arginina) exhibidos en la superficie de la fibrina parcialmente degradada sirven de anclaje al plasminógeno y al tPA. Cuando el plasminógeno y el tPA coinciden en la superficie del coágulo de fibrina, tiene lugar la activación del plasminógeno en plasmi-

na. Pues bien, precisamente a ese nivel el TAFI, una vez activado por la trombina (TAFIa), es capaz de eliminar los residuos de lisina y arginina de la superficie de la fibrina, impidiendo la activación del plasminógeno en plasmina y, por lo tanto, limitando la cascada de la fibrinólisis.

La fibrinólisis también se regula una vez que el plasminógeno ha sido ya activado y transformado en plasmina (Figura 1). Así, la actividad proteolítica de la plasmina está regulada por la acción de la  $\alpha_2$ -antiplasmina, su principal inhibidor fisiológico, y, en menor medida, por la  $\alpha_2$ -macroglobulina y el TAFIa.

Éstos son, básicamente, los factores implicados en la fibrinólisis, de tal modo que una correcta hemostasia depende del balance de fuerzas entre todas estas tendencias opuestas. Por otra parte, el equilibrio entre ellas se encuentra íntimamente relacionado con la coagulación. Hay que resaltar que no se trata de un equilibrio estático, sino tremendamente dinámico y adaptable a diferentes situaciones tanto fisiológicas como patológicas.

### Fibrinólisis y enfermedades endocrinas

Desde hace tiempo se han asociado diversas enfermedades endocrinas con modificaciones del sistema hemostático, en general, y del sistema fibrinolítico, en particular. Generalmente, se han observado modificaciones en la coagulación, las plaquetas, el endotelio vascular y la fibrinólisis, que se asocian también con

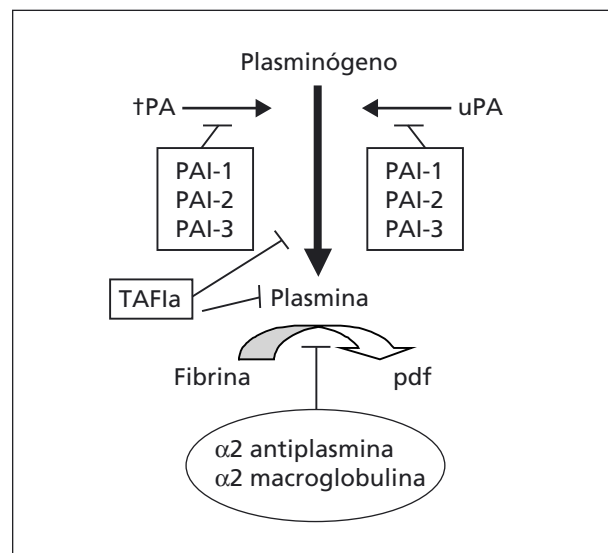


Figura 1. Esquema simplificado del funcionamiento del sistema fibrinolítico. PAI: inhibidor del activador del plasminógeno; pdf: productos de degradación de la fibrina; TAFIa: inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina activado; tPA: activador tisular del plasminógeno; uPA: activador del plasminógeno tipo urocinasa.



riesgo de enfermedad cardiovascular. Dentro de las enfermedades endocrinas y su relación con las modificaciones del sistema fibrinolítico vamos a tratar más específicamente el síndrome metabólico, la resistencia a la insulina y la obesidad, el síndrome del ovario poliquístico y las enfermedades tiroideas.

### **Síndrome metabólico, resistencia a la insulina, obesidad y fibrinólisis**

Probablemente, el mecanismo fisiopatológico que enlaza la obesidad con las patologías metabólicas asociadas a la misma sea la resistencia a la insulina. Se define dicha resistencia como la disminución de la acción biológica de la insulina sobre los tejidos insulino-dependientes, donde se incluyen el hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo. En comparación con la grasa subcutánea, la grasa visceral es más resistente a las acciones de la insulina y más sensible a las hormonas lipolíticas. El aumento de la llegada de ácidos grasos libres al hígado a través del sistema porta es responsable de la dislipemia característica de la obesidad, da lugar a una mayor disponibilidad de sustrato para la síntesis hepática de triglicéridos<sup>8</sup> y, asimismo, contribuye a generar resistencia a la insulina a nivel hepático, inhibiendo la captación y oxidación de glucosa y la síntesis de glucógeno, y aumentando la liberación hepática de glucosa<sup>9</sup>.

El síndrome metabólico es una entidad clínica de rasgos heterogéneos caracterizada por la presencia de, al menos, tres de las siguientes alteraciones: obesidad abdominal, intolerancia a la glucosa o diabetes mellitus tipo 2 y/o resistencia insulínica, dislipemia (niveles elevados de triglicéridos y niveles bajos de HDL colesterol) e hipertensión arterial<sup>10,11</sup>.

Aunque la prevalencia de los componentes del síndrome metabólico aumenta en pacientes obesos, es importante reseñar que no todos los sujetos obesos desarrollan el síndrome metabólico y que incluso individuos no obesos pueden ser diagnosticados de síndrome metabólico.

Con relación al sistema fibrinolítico se ha indicado que los sujetos afectados de síndrome metabólico tienen un tiempo de lisis del coágulo alargado<sup>12</sup>, parcialmente debido al aumento de los niveles circulantes de PAI-1, que es la alteración más importante de la hemostasia en el síndrome metabólico<sup>13</sup>. Muchos autores han sugerido que hay una interacción bidireccional entre los determinantes clásicos del síndrome metabólico y la sobreexpresión del PAI-1. Así, el depósito de grasa observado en el síndrome metabólico puede inducir aumento de TNF, TGF $\beta$ , cortisol, angiotensina II, alteraciones del metabolismo hidrocarbonado y lipídico y estrés oxidativo. Todo ello aumenta la expresión de PAI-1. Por otra parte, el aumento de PAI-1 puede inter-

ferir en la diferenciación de los adipocitos y favorecer el desarrollo de la obesidad y las alteraciones glucolíticas que forman parte de la constelación del síndrome metabólico<sup>11,13</sup>. Por lo tanto, el PAI-1 parece ser más que un simple marcador del síndrome metabólico, y su sobreexpresión debería considerarse un verdadero componente del síndrome metabólico con valor patogénico *per se*<sup>14</sup> y una diana atractiva para el desarrollo de futuras terapias<sup>15</sup>.

Se ha revisado ampliamente el papel específico que tienen las alteraciones del sistema fibrinolítico relacionadas con el síndrome metabólico sobre la fisiología de la enfermedad coronaria. En general, se acepta que la actividad fibrinolítica disminuida que se observa en este contexto se relaciona con la presencia de obesidad visceral y de resistencia insulínica<sup>16</sup>. Se ha indicado que el PAI-1 parece jugar un papel clave a este nivel y su concentración está aumentada tanto en sangre como en las placas coronarias de estos pacientes<sup>17,18</sup>. Aunque el aumento de los niveles de PAI-1 en sangre es el rasgo hemostático más comúnmente asociado con los componentes del síndrome metabólico<sup>11,16,19</sup>, también se ha indicado que el síndrome metabólico se asocia a niveles aumentados de TAFI y ello también contribuiría a la hipofibrinólisis encontrada en dicho síndrome<sup>20,21</sup>.

Además de las alteraciones de los inhibidores fibrinolíticos, también se ha implicado a otros componentes hemostáticos en las alteraciones hemostáticas del síndrome metabólico. Así, podrían contribuir a la hipercoagulabilidad observada la presencia de niveles disminuidos del inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) y el hallazgo de niveles aumentados de factor von Willebrand, fibrinógeno, factores VIII, XIII y factores vitamina K-dependiente<sup>16</sup>. La compleja unión entre coagulación, inflamación y trombosis potencia la importancia del síndrome metabólico en la fisiopatología de la enfermedad coronaria, ya que las partículas proinflamatorias asociadas con el síndrome metabólico<sup>16</sup> pueden multiplicar el efecto protrombótico de las alteraciones hemostáticas previamente comentadas y aumentar la vulnerabilidad de estos pacientes para el desarrollo de la enfermedad coronaria<sup>16</sup>.

En los últimos años gran cantidad de estudios clínicos respaldan la asociación entre obesidad e hipofibrinólisis a través de un incremento de los niveles plasmáticos de PAI-1<sup>19,22</sup> y destacan que la actividad fibrinolítica mejora después de la pérdida de peso debido, precisamente, a una disminución en la concentración de PAI-1<sup>19,23,24</sup>. El aumento de los niveles de PAI-1 en plasma se asocia fundamentalmente con la obesidad abdominal y se puede atribuir a la producción de PAI-1 por el tejido adiposo visceral y la grasa hepática<sup>25-27</sup>. Estos hallazgos sugieren que los niveles circulantes de PAI-1 reflejan la redistribución de la grasa y puede ser un biomarcador de la obesidad de origen central.

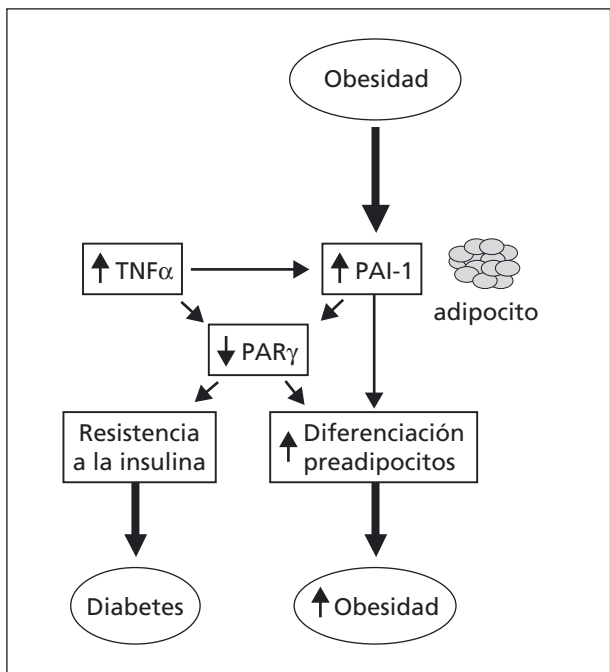


Figura 2. Relación entre PAI-1 y obesidad. Fuente: modificado de M.L. Correia, W.G. Haynes<sup>33</sup>.

En experimentos realizados con modelos murinos a los que se les inducía obesidad, se observó que en ratones que no expresaban PAI-1 se prevenía la acumulación grasa<sup>28</sup>. Por otra parte, tanto la inhibición farmacológica como la deficiencia de PAI-1 ejercían un efecto positivo sobre la obesidad y la sensibilidad a la insulina<sup>29-31</sup>. Estos datos apoyan el papel del PAI-1 como futura diana terapéutica con el objetivo de reducir la obesidad y mejorar la sensibilidad a la insulina<sup>32</sup>.

La Figura 2 resume el papel del PAI-1 en la obesidad. Se ha indicado que el aumento de la expresión de TNFα en el adipocito puede contribuir al aumento de PAI-1 en la obesidad<sup>33</sup> y ambos, TNFα y PAI-1, disminuir la expresión del receptor nuclear PPARγ<sup>33</sup>. Puesto que el PPARγ se ha asociado con una protección frente al riesgo de resistencia a la insulina<sup>34</sup>, se ha sugerido que el bloqueo del PAI-1 podría prevenir la obesidad y la resistencia a la insulina por disminuir la inflamación y aumentar la activación del receptor PPARγ.

Desde hace varios años se ha asociado el polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1 con los niveles circulantes de dicho inhibidor<sup>35</sup>. Así, se ha estudiado la posible relación entre el polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1 y la obesidad, con resultados contradictorios<sup>19,23,36,37</sup>. Nuestro grupo ha encontrado una asociación entre los niveles de PAI-1 y dicho polimorfismo en niños obesos<sup>23</sup> y además en un trabajo reciente hemos observado que, después de la pérdida de peso en pacientes con obesidad mórbida, los pacientes portadores del alelo 4G presentaban unos niveles mayores

de PAI-1 que los portadores de 5G<sup>19</sup>. En dicho trabajo también se evidenció que el porcentaje de cambio del PAI-1 tras la dieta era proporcional al porcentaje de cambio del índice de masa corporal, pero también a la variación de los triglicéridos. Esto sugiere que la disminución de la adiposidad es responsable de la disminución de los niveles de PAI-1, pero que también puede estar influida por la mejora de los factores metabólicos.

### Síndrome de ovario poliquístico y sistema fibrinolítico

El síndrome del ovario poliquístico se considera la enfermedad endocrina más común de las mujeres en edad reproductiva (5-10%)<sup>38</sup>. Se caracteriza por anovulación crónica, infertilidad, hiperandrogenismo y resistencia a la insulina<sup>38,39</sup>. En la actualidad se acepta que dicho síndrome no es sólo una enfermedad ginecológica, sino una enfermedad compleja con implicaciones metabólicas y cardiovasculares, ya que las mujeres con el síndrome del ovario poliquístico son propensas a desarrollar componentes del síndrome metabólico como son diabetes, obesidad, hipertensión arterial y dislipidemia, todos ellos factores de riesgo de enfermedad cardiovascular<sup>39-41</sup>.

La disfunción endotelial es una etapa temprana del desarrollo de la enfermedad cardiovascular. Se ha indicado que diversos marcadores de la disfunción endotelial, como el PAI-1 y el factor von Willebrand, pueden estar aumentados en el síndrome del ovario poliquístico<sup>42-44</sup>, aunque esto no se corrobora en otros estudios<sup>45</sup>. En general, se indica que la disfunción endotelial se asocia al síndrome del ovario poliquístico porque en el mismo existe resistencia a la insulina, hiperandrogenismo y algunos factores marcadores de inflamación, como la proteína C reactiva<sup>42,46</sup>.

Varios marcadores genéticos parecen implicados en la predisposición a este síndrome. Entre ellos, se ha estudiado el polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1, habiéndose observado una asociación entre el alelo 4G y el desarrollo del síndrome<sup>47,48</sup>, mientras que otros autores no han constatado dicha asociación<sup>49</sup>. En un reciente metaanálisis se ha descrito que las portadoras del alelo 4G tienen un aumento moderado de riesgo para desarrollar este síndrome (OR = 1,6)<sup>50</sup>. Diversos estudios han señalado la existencia de niveles aumentados de PAI-1 en mujeres con ovario poliquístico<sup>48</sup>, y en estudios de modelos de ratones que sobreexpresan PAI-1 se ha observado el desarrollo de ovario poliquístico<sup>51</sup>.

En relación con el otro inhibidor de la fibrinólisis, el TAFI, recientemente se ha indicado<sup>52</sup> que en mujeres jóvenes con síndrome de ovario poliquístico obesas o con sobrepeso existe una disminución de la fibrinólisis debido a un aumento en los niveles de TAFI, y este

**Tabla 1. Modificaciones del sistema hemostático en el hipertiroidismo**

Coagulación	Cambio
Fibrinógeno, FVIII, FIX, FVII, factor von Willebrand y trombomodulina	↑
Proteína S y proteína C	↓
Antitrombina	↑=
TFPI	↑↓
<i>Fibrinólisis</i>	
PAI-1	↑
TAFI	↑↓
tPA	↑↓

Fuente: modificado de Erem<sup>54</sup>

rasgo podría contribuir al riesgo aumentado de aterosclerosis temprana.

En otro estudio reciente se valoraron los niveles de PAI-1 y de trombospondina, un inhibidor de la angiogénesis, a nivel circulante y en grasa visceral y subcutánea, en mujeres afectas de ovario poliquístico<sup>53</sup>. En este estudio se observó un aumento de PAI-1 y una disminución de trombospondina, siendo ambos parámetros corregibles tras un tratamiento con metformina. Todo ello evidencia una relación entre obesidad, resistencia a la insulina y angiogénesis en mujeres con síndrome del ovario poliquístico.

### Enfermedades tiroideas y fibrinólisis

La relación entre las enfermedades tiroideas y el sistema hemostático se describió por primera vez a principios del siglo pasado. En general, el hipertiroidismo se asocia con un estado de hipercoagulabilidad, mientras que el perfil hemostático en el hipotiroidismo depende de la gravedad de la enfermedad.

### Hipertiroidismo

Los pacientes con hipertiroidismo muestran una tendencia a complicaciones tromboembólicas. El riesgo, por ejemplo, de tromboembolismo cerebral aumenta en presencia de factores de riesgo como la edad, fibrilación auricular y disfunción de válvula mitral. Sin embargo, el riesgo de tromboembolismo persiste en el hipertiroidismo, independientemente de esos factores. Se ha sugerido que ello se debe a las modificaciones hemostáticas encontradas en pacientes con hipertiroidismo como son hipercoagulabilidad, hipofibrinólisis y disfunción endotelial<sup>54</sup>.

Se han descrito niveles aumentados de FVIII, FIX, FVII y fibrinógeno en pacientes con hipertiroidis-

**Tabla 2. Modificaciones del sistema hemostático en el hipotiroidismo**

Coagulación	Cambio
Fibrinógeno, FVII, factor tisular, FPA	↑
FV, FVIII, FIX; FV, FXI, FXII, factor von Willebrand	↓
Proteína S y proteína C	↓
Antitrombina	↑
TFPI	↑↓
<i>Fibrinólisis en hipotiroidismo moderado</i>	
Actividad fibrinolítica	↓
PAI-1, TAFI	↑
<i>Fibrinólisis en hipotiroidismo severo</i>	
Actividad fibrinolítica	↑
PAI-1	↓

Fuente: modificado de Erem<sup>54</sup>

mo<sup>54,55</sup>. Por otra parte, se ha indicado que el hipertiroidismo afecta a la función endotelial, ya que se ha observado un aumento en los niveles de trombomodulina, factor von Willebrand y moléculas de adhesión<sup>56</sup>. Muchos de estos factores alterados vuelven a la normalidad cuando se alcanza el estado eutiroideo con terapia antitiroidea.

En relación con el sistema fibrinolítico, se ha indicado que en el hipertiroidismo existe un aumento en los niveles de PAI-1 y de TAFI<sup>54</sup>. Sin embargo, otros autores encuentran una disminución de los niveles de TAFI, observando una correlación inversa entre TAFI y PAI-1<sup>57</sup>. En referencia al tPA se ha descrito un aumento en sus niveles, aunque el tPA funcional podría estar disminuido<sup>54</sup>.

Las modificaciones del sistema hemostático y fibrinolítico en el hipertiroidismo se muestran en la Tabla 1.

### Hipotiroidismo

El hipotiroidismo se asocia, generalmente, con una tendencia a la hemorragia, usualmente hemorragias nasales, gingivorragia o menorragia y, más raramente, hemorragias graves después de trauma o cirugía. La patogenia de esta tendencia hemorrágica se desconoce, ya que se ha encontrado tanto hipercoagulabilidad como hipocoagulabilidad<sup>54</sup>. Además, el hipotiroidismo se ha asociado también con cambios en el metabolismo lipídico y con aterosclerosis<sup>54</sup>.

En el hipotiroidismo moderado, con TSH de 10 a 50 mU/L, se ha observado una disminución de la actividad fibrinolítica, reflejada por un aumento del PAI-1 y de la antiplasmina, junto con un aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular (Tabla 2). Sin embar-

go, en el hipotiroidismo grave, con TSH mayor de 50 mU/L, se ha observado un aumento de la actividad fibrinolítica con una tendencia hemorrágica<sup>58</sup>.

Se ha descrito que los niveles de TAFI están elevados en pacientes con hipotiroidismo y que estos niveles se correlacionan con el grado de afectación tiroidea, disminuyendo significativamente con el tratamiento sustitutivo con tiroxina<sup>59</sup>. En otros estudios se ha observado un aumento de fibrinógeno, FVII, PAI-1, antitrombina, trombomodulina y TAFI, y una disminución de FV, FVIII, factor von Willebrand, proteína C, proteína S y TFPI en pacientes con hipotiroidismo no tratado en comparación con controles. Como consecuencia de ello, se ha sugerido que los pacientes con hipotiroidismo presentan disfunción endotelial, hipofibrinólisis e hipercoagulabilidad y, por tanto, más que una tendencia a la hemorragia, este perfil hemostático sugiere un riesgo de trombosis en estos pacientes<sup>60</sup>.

### Consideraciones finales

El síndrome metabólico se acompaña de cambios importantes en el sistema hemostático que pueden favorecer el desarrollo de trombosis. La hipercoagulabilidad y la hipofibrinólisis, debida fundamentalmente a un exceso de PAI-1, contribuyen al riesgo trombótico que se asocia con este síndrome. El aumento de la expresión de PAI-1 que acompaña a la obesidad abdominal es la alteración más comúnmente asociada con el síndrome metabólico. Puesto que el PAI-1 puede también estar directamente relacionado con la fisiopatología de la obesidad, podría ser una atractiva diana terapéutica.

Se ha observado una posible asociación entre el síndrome de ovario poliquístico y el polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1. Sin embargo, son necesarios más estudios para investigar esta asociación, así como su interrelación con otros componentes metabólicos asociados a este síndrome.

La disfunción tiroidea modifica el balance coagulación-fibrinólisis. El hipertiroidismo se asocia con hipercoagulabilidad, hipofibrinólisis y disfunción endotelial y, por tanto, con riesgo trombótico. Sin embargo, las modificaciones hemostáticas observadas en el hipotiroidismo parecen depender de la gravedad de la enfermedad.

### Agradecimientos

*Este trabajo se ha subvencionado parcialmente por las Ayudas de Investigación PI080185, PI070831, CP0700326 y RECAVA (RD06/0014/0004) (Instituto de Salud Carlos III) y la Fundación para la Investigación del Hospital Universitario La Fe de Valencia.*

### Bibliografía

- Zorio E, Gilabert-Estelles J, España F, Ramon LA, Cosin R, Estellés A. Fibrinolysis: the key to new pathogenetic mechanisms. *Curr Med Chem* 2008; 15: 923-9.
- Collen D, Lijnen HR. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* 1991; 78: 3114-24.
- Loskutoff DJ. Regulation of PAI-1 gene expression. *Fibrinolysis* 1991; 5: 197-206.
- Kruithof EK, Baker MS, Bunn CL. Biological and clinical aspects of plasminogen activator inhibitor type 2. *Blood* 1995; 86: 4007-24.
- Estellés A, Gilabert J, Keeton M, Eguchi Y, Aznar J, España F et al. Altered expression of plasminogen activator inhibitor type 1 and type 2 in placentas from pregnant women with preeclampsia and/or intrauterine fetal growth retardation. *Blood* 1994, 84: 143-50.
- Heeb MJ, España F, Geiger M, Collen D, Stump DC, Griffin JH. Immunological identity of heparin-dependent plasma and urinary protein C inhibitor and plasminogen activator inhibitor-3. *J Biol Chem* 1987; 262: 15813-6.
- Bajzar L, Manuel R, Nesheim ME. Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem* 1995; 270: 14477-84.
- Herranz L, Zapata A, Grande C, Megía A, Pallardó LF. Body fat distribution, insulin mediated suppression of non-esterified fatty acids and plasma triglycerides in obese subjects. *Horm Metab Res* 1998; 30: 141-5.
- Bergman RN, Ader M. Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11: 351-6.
- Grundy SM, Brewer HB Jr, Cleeman JI, Smith SC Jr, Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association. *Circulation* 2004; 109: 433-8.
- Alessi MC, Juhan-Vague I. Metabolic syndrome, haemostasis and thrombosis. *Thromb Haemost* 2008; 99: 995-1000.
- Carter AM, Cymbalista CM, Spector TD, Grant PJ, EuroCLOT Investigators. Heritability of clot formation, morphology, and lysis: the EuroCLOT study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 2783-9.
- Alessi MC, Juhan-Vague I. PAI-1 and the metabolic syndrome: links, causes, and consequences. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2200-7.
- Mertens I, Verrijken A, Michiels JJ, Van der Planken M, Ruijs JB, Van Gaal LF. Among inflammation and coagulation markers, PAI-1 is a true component of the metabolic syndrome. *Int J Obes* 2006; 30: 1308-14.
- Westrick RJ, Eitzman DT. Plasminogen activator inhibitor-1 in vascular thrombosis. *Curr Drug Targets* 2007; 8: 966-1002.
- Franchini M, Targher G, Montagnana M, Lippi G. The metabolic syndrome and the risk of arterial and venous thrombosis. *Thromb Res* 2008; 122: 727-35.
- Sobel BE. Increased plasminogen activator inhibitor-1 and vasculopathy. A reconcilable paradox. *Circulation* 1999; 99: 2496-8.
- McGill JB, Schneider DJ, Arfken CL, Lucore CL, Sobel BE. Factors responsible for impaired fibrinolysis in obese subjects and NIDDM patients. *Diabetes* 1994; 43: 104-9.
- Solá E, Vayá A, España F, Castelló R, Ramón LA, Hernández-Mijares A et al. Plasminogen activator inhibitor-1 levels in severe and morbid obesity. Effect of weight loss and influence of 4G/5G polymorphism. *Thromb Res* 2008; 122: 320-7.
- Aso Y, Wakabayashi S, Yamamoto R, Matsutomo R, Takebayashi K, Inukai T. Metabolic syndrome accompanied by hypercholesterolemia is strongly associated with proinflammatory state and impairment of fibrinolysis in patients with type 2 diabetes: synergistic effects of plasminogen activator



- inhibitor-1 and thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *Diabetes Care* 2005; 28: 2211-6.
21. Kilicarslan A, Yavuz B, Guven GS, Atalar E, Sahiner L, Beyazit Y et al. Fenofibrate improves endothelial function and decreases thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor concentration in metabolic syndrome. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2008; 19: 310-4.
  22. Alessi MC, Bastelica D, Morange P, Berthet B, Leduc I, Verdier M et al. Plasminogen activator inhibitor 1, transforming growth factor-beta 1 and BMI are closely associated in human adipose tissue during morbid obesity. *Diabetes* 2000; 49: 1374-80.
  23. Estellés A, Dalmau J, Falcó C, Berbel O, Castelló R, España F, et al. Plasma PAI-1 levels in obese children. Effect of weight loss and influence of PAI-1 promoter 4G/5G genotype. *Thromb Haemost* 2001; 86: 647-52.
  24. Murakami T, Horigome H, Tanaka K, Nakata Y, Ohkawara K, Katayama Y et al. Impact of weight reduction on production of platelet-derived microparticles and fibrinolytic parameters in obesity. *Thromb Res* 2007; 119: 45-53.
  25. Morange PE, Alessi MC, Verdier M, et al. PAI-1 produced *ex vivo* by human adipose tissue is relevant to PAI-1 blood level. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 9: 1361-5.
  26. Bastelica D, Morange P, Berthet B, Borghi H, Lacroix O, Grino M ET al. Stromal cells are the main plasminogen activator inhibitor-1-producing cells in human fat: evidence of differences between visceral and subcutaneous deposits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 173-8.
  27. Alessi MC, Bastelica D, Mavri A, et al. Plasma PAI-1 levels are more strongly related to liver steatosis than to adipose tissue accumulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1262-8.
  28. Ma LJ, Mao SL, Taylor KL, Kanjanabuch T, Guan Y, Zhang Y et al. Prevention of obesity and insulin resistance in mice lacking plasminogen activator inhibitor 1. *Diabetes* 2004; 53: 336-46.
  29. Crandall DL, Quinet EM, El Ayachi S, Hreha AL, Leik CE, Savio DA et al. Modulation of adipose tissue development by pharmacologic inhibition of PAI-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2209-15.
  30. Lijnen HR, Alessi MC, Frederix L, Collen D, Juhan-Vague I. Tiplaxtinin impairs nutritionally induced obesity in mice. *Thromb Haemost* 2006; 96: 731-7.
  31. Liang X, Kanjanabuch T, Mao SL, Hao CM, Tang YW, Declerck PJ, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 modulates adipocyte differentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 290: E103-E113.
  32. Schalkwijk CG, Stehouwer CD. PAI-1 inhibition in obesity and the metabolic syndrome: a promising therapeutic strategy. *Thromb Haemost* 2006; 96: 698-9.
  33. Correia ML, Haynes WG. A role for plasminogen activator inhibitor-1 in obesity: from pie to PAI? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2183-5.
  34. Buzzetti R, Petrone A, Ribaudo MC, Alemanno I, Zavarella S, Mein CA et al. The common PPAR-gamma2 Pro12Ala variant is associated with greater insulin sensitivity. *Eur J Hum Genet* 2004; 12: 1050-4.
  35. Dawson SJ, Wiman B, Hamsten A, Green F, Humphries S, Henney AM. The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in HepG2 cells. *J Biol Chem* 1993; 268: 10739-45.
  36. Van Harmelen V, Wahrenberg H, Eriksson P, Arner P. Role of gender and genetic variance in plasminogen activator inhibitor-1 secretion from human adipose tissue. *Thromb Haemost* 2000; 83: 304-8.
  37. Hoffstedt J, Andersson IL, Persson L, Isaksson B, Arner P. The common -675 4G/5G polymorphism in the plasminogen activator inhibitor -1 gene is strongly associated with obesity. *Diabetologia* 2002; 45: 584-7.
  38. Ehrmann DA. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 2005; 352: 1223-36.
  39. Norman RJ, Dewailly D, Legro RS, Hickey TE. Polycystic ovary syndrome. *Lancet* 2007; 370: 685-97.
  40. Essah PA, Wickham EP, Nestler JE. The metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome. *Clin Obstet Gynecol* 2007; 50: 205-25.
  41. Dokras A. Cardiovascular disease risk factors in polycystic ovary syndrome. *Semin Reprod Med* 2008; 26: 39-44.
  42. Meyer C, McGrath BP, Cameron J, Kotsopoulos D, Teede HJ. Vascular dysfunction and metabolic parameters in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 4630-5.
  43. Carmassi F, De Negri F, Fioriti R, De Giorgi A, Giannarelli C, Fruzzetti F, et al. Insulin resistance causes impaired vasodilation and hypofibrinolysis in young women with polycystic ovary syndrome. *Thromb Res* 2005; 116: 207-14.
  44. Teede HJ, Meyer C, Hutchison SK, Zoungas S, McGrath BP, Moran LJ. Endothelial function and insulin resistance in polycystic ovary syndrome: the effects of medical therapy. *Fertil Steril* 2008; Nov 17 [Epub ahead of print].
  45. Kelly CJ, Speirs A, Gould GW, Petrie JR, Lyall H, Connell JM. Altered vascular function in young women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 742-6.
  46. Tarkun I, Arslan BC, Canturk Z, Turemen E, Sahin T, Duman C. Endothelial dysfunction in young women with polycystic ovary syndrome: relationship with insulin resistance and low-grade chronic inflammation. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 5592-6.
  47. Glueck CJ, Wang P, Fontaine RN, Sieve-Smith L, Tracy T, Moore SK. Plasminogen activator inhibitor activity: an independent risk factor for the high miscarriage rate during pregnancy in women with polycystic ovary syndrome. *Metabolism* 1999; 48: 1589-95.
  48. Diamanti-Kandarakis E, Palioniko G, Alexandraki K, Bergiele A, Koutsouba T, Bartzis M. The prevalence of 4G5G polymorphism of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene in polycystic ovarian syndrome and its association with plasma PAI-1 levels. *Eur J Endocrinol* 2004; 150: 793-8.
  49. Walch K, Grimm C, Huber JC, Nagele F, Kolbus A, Heer LA. A polymorphism of the plasminogen activator inhibitor-1 gene promoter and the polycystic ovary syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005; 23: 77-81.
  50. Bagos PG. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphisms in polycystic ovary syndrome. *Mol Hum Reprod* 2009; 15: 19-26.
  51. Devin JK, Johnson JE, Eren M, Gleaves LA, Bradham WS, Bloodworth JR Jr, Vaughan DE. Transgenic overexpression of plasminogen activator inhibitor-1 promotes the development of polycystic ovarian changes in female mice. *J Mol Endocrinol* 2007; 39: 9-16.
  52. Adali E, Yildizhan R, Kurdoglu M, Bugdayci G, Kulusari A, Sahin HG. Increased plasma thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor levels in young obese women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2009; Apr 13 [Epub ahead of print]
  53. Tan BK, Adya R, Chen J, Farhatullah S, Heutling D, Mitchell D, Lehnert H, Randeve HS. Metformin decreases angiogenesis via NF-[kappa]B and Erk1/2/Erk5 pathways by increasing the antiangiogenic thrombospondin-1. *Cardiovasc Res* 2009; 83: 566-74.
  54. Erem C. Coagulation and fibrinolysis in thyroid dysfunction. *Endocrine* 2009; 35: 293-6.
  55. Erem C, Ersoz HO, Kartý SS, Ukinc K, Hacıhasanoglu A, Degçer O et al. Blood coagulation and fibrinolysis in patients with hyperthyroidism. *J Endocrinol Invest* 2002; 25: 345-50.
  56. Burggraaf J, Lalezari S, Emeis JJ, Vischer UM, de Meyer PH, Pijl H ET al. Endothelial function in patients with hyperthyroidism before and after treatment with propranolol and thiamazol. *Thyroid* 2001; 11, 153-60.
  57. Akinci B, Comlekci A, Yener S, Demir T, Ozcan MA, Bayraktar F, Yesil S. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor an-

tigen levels are inversely correlated with plasminogen activator inhibitor-1 antigen levels in hyperthyroid patients. *Endocr J* 2007; 54: 593-9.

58. Chadarevian R, Bruckert E, Leenhardt L, Giral P, Ankri A, Turpin G. Components of the fibrinolytic system are differently altered in moderate and severe hypothyroidism. *Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 732-7.
59. Akinci B, Comlekci A, Ali Ozcan M, Demir T, Yener S, Demirkan F et al. Elevated thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) antigen levels in overt and subclinical hypothyroid patients were reduced by levothyroxine replacement. *Endocr J* 2007; 54: 45-52.
60. Erem C, Ucuncu O, Yilmaz M, Kocak M, Nuhoglu I, Ersoz HO. Increased thrombinactivatable fibrinolysis inhibitor and decreased tissue factor pathway inhibitor in patients with hypothyroidism. *Endocrine* 2009; 35: 75-80.

## TROMBÓLISIS EN EL ICTUS ISQUÉMICO

J. ÁLVAREZ SABÍN

*Servicio de Neurología.*

*Hospital Universitario Vall d'Hebron.*

*Departamento de Medicina.*

*Universidad Autónoma de Barcelona*

### Introducción

El ictus isquémico es un proceso dinámico: si bien los síntomas y signos neurológicos aparecen de forma brusca tras una oclusión arterial, la lesión encefálica siempre tarda horas en desarrollarse; este periodo de tiempo, denominado ventana terapéutica, es la oportunidad que hay para salvar el tejido cerebral. Cuanto mayor es el tiempo en el que la arteria está ocluida, mayor es el tamaño del infarto cerebral<sup>1</sup>. Pero también, cuanto más dura la oclusión, mayor es el riesgo de hemorragia post-reperusión<sup>2</sup>. El tratamiento trombolítico es capaz de frenar este proceso dinámico: el tPA incrementa en 5 veces la probabilidad de recanalización precoz (6 primeras horas). Ello conduce a infartos cerebrales de menor tamaño y a una mejor situación neurológica y funcional del paciente con ictus isquémico<sup>3</sup>.

Cuatro grandes estudios: ECASS-I (0-6 h), NINDS (0-3 h), ECASS-II (0-6 h) y ATLANTIS (3-5 h), publicados en los últimos 5 años del siglo pasado, condujeron a que en EE UU la FDA aprobase el tratamiento con tPA i.v. para el infarto cerebral de menos de 3 horas de evolución en el año 1996, y en Europa la EMEA recomendase la realización del registro SITS-MOST en el año 2002. La publicación, 5 años después, de los resultados de 6.483 pacientes incluidos en el registro SITS-MOST<sup>4</sup> confirma la eficacia y seguridad en la práctica clínica diaria de la administración del tPA i.v. en las 3 primeras horas.

A pesar de la eficiencia del tratamiento con tPA, éste todavía se está administrando a tan sólo un pequeño porcentaje de pacientes con ictus isquémico (3-8,5% de los pacientes elegibles). Pero además, y según los criterios del registro SITS-MOST, muchos pacientes con ictus isquémicos quedan excluidos de este tratamiento (mayores de 80 años de edad, tiempo de evolución superior a 3 horas, ictus muy importantes por criterios clínicos (NIH > 25) y/o radiológicos, anticoagulados, con diabetes mellitus e ictus previo... Inclusive, solamente el 40-66% de los pacientes tratados con tPA i.v. en las 3 primeras horas en la actualidad alcanzan una repercusión eficaz y precoz.

Los retos actuales de la trombólisis en el ictus isquémico son:

- ¿Cómo hacerla accesible a un mayor número de ictus?
- ¿Cómo aumentar la eficacia?
- ¿Cómo extender la ventana terapéutica?

### Cómo hacerla más accesible a más pacientes con ictus

El tratamiento trombolítico está limitado en la actualidad a un porcentaje pequeño de pacientes. Medidas que deben contribuir a aumentar su accesibilidad a un mayor número de personas son:

- Aquellas dirigidas a mejorar el conocimiento de la población y a planificar y coordinar la atención sanitaria a los pacientes con ictus, tales como el Programa de Atención Sanitaria al Ictus (PASI)<sup>5</sup> y la Estrategia en Ictus del Sistema Nacional de Salud presentada en marzo de este año.
- La utilización de las nuevas tecnologías de imagen y comunicación (TIC), en concreto la telemedicina, puede ayudar a la extensión del uso de la trombólisis sistémica, manteniendo la calidad del tratamiento<sup>6,7</sup>.
- El empleo de fibrinolíticos más fibrino-específicos y con una ventana terapéutica más amplia (*ver más adelante*).

### Cómo aumentar la eficacia

#### Factores relacionados con la eficacia de la recanalización post-trombólisis

Conocemos varios de los factores relacionados con la eficacia de la recanalización arterial post-tratamiento con rt-PA i.v.:

- Las características del trombo, principalmente su composición y origen. El tPA i.v. tiene mayor eficacia para lisar los trombos rojos formados en zonas de estasis sanguínea como son las cavidades izquierdas del corazón.

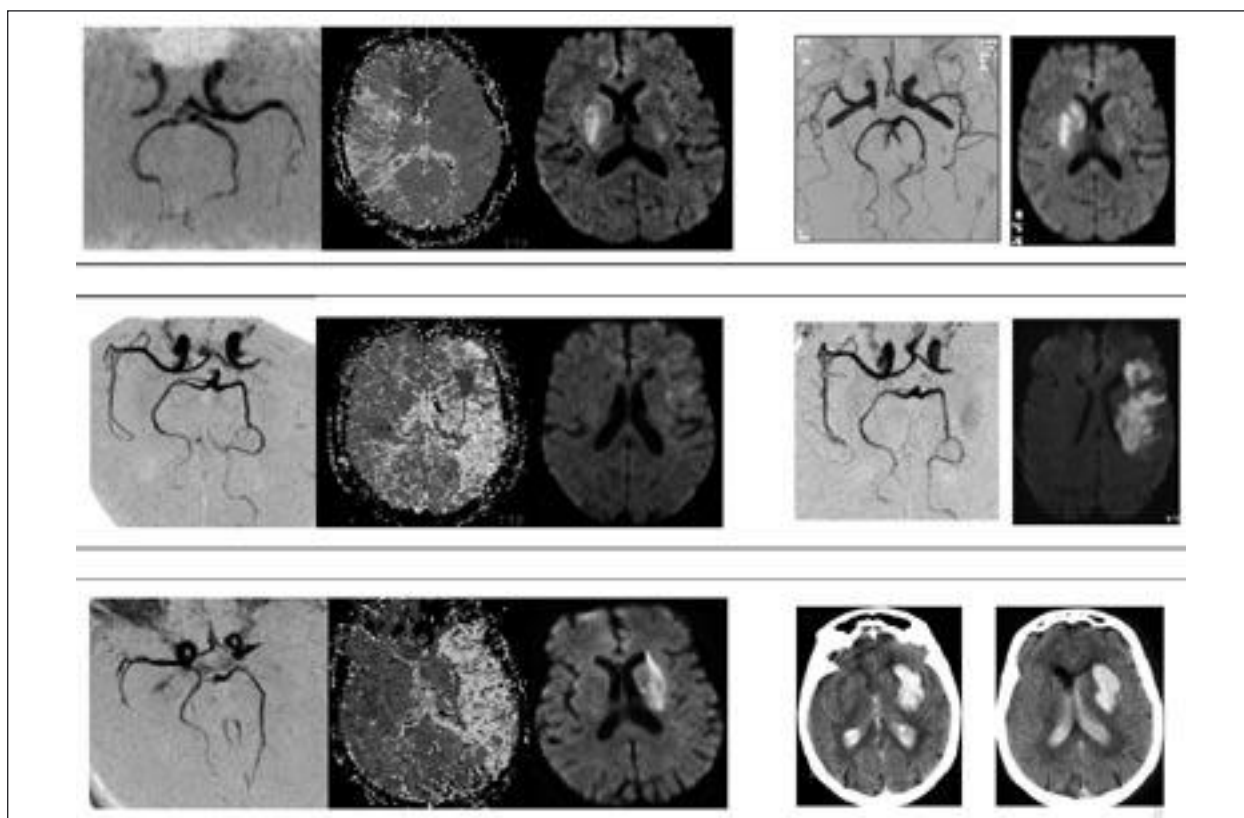


Figura 1. Diferentes respuestas al tratamiento fibrinolítico. Pacientes tratados con la misma dosis de tPA i.v. y con tiempo de evolución del ictus similar presentan diferentes respuestas: el primero, recanalización arterial y buena evolución; el segundo, persistencia de la oclusión arterial y crecimiento de la lesión cerebral, y el tercero, una transformación hemorrágica sintomática.

- El volumen y la localización del trombo. La eficacia de la fibrinólisis i.v. disminuye de forma muy evidente cuanto mayor es el calibre de la arteria cerebral ocluida.
- Etiología del ictus isquémico. La recanalización es más frecuente, rápida y completa en pacientes con ictus cardioembólicos comparada con otros subtipos etiológicos de ictus<sup>8</sup>.
- Velocidad para alcanzar la recanalización. La velocidad de la lisis del coágulo se relaciona con el tamaño de la lesión cerebral y la evolución clínica. El patrón de recanalización arterial súbito es el que se asocia con una mejor evolución<sup>9</sup>.
- Tipo (grado) de recanalización obtenida. La recanalización completa se relaciona con mejor situación funcional.
- Inhibidores endógenos de la fibrinólisis. El perfil de los inhibidores endógenos de la fibrinólisis predice la resistencia a la lisis del trombo tras tratamiento con tPA. Niveles bajos de PAI-1<sup>10</sup> y altos de TAFI<sup>11</sup> se asocian con mayores porcentajes de recanalización precoz y mejor evolución funcional.
- Respuesta neuroinflamatoria. Tanto la MMP-9 como la MMP-13 son predictores independientes de crecimiento más extenso de la lesión en la difusión en las primeras 24 horas del ictus a pesar de la terapia

trombolítica<sup>12</sup>. El efecto deletéreo de la MMP-9 obedece a su sobreexpresión *in situ*, en el parénquima encefálico, apoyando la contribución de la MMP-9 en la lesión cerebral isquémica y en el edema perihematomático<sup>13</sup>.

- Tratamiento previo al ictus. Los pacientes que están tomando estatinas previamente al tratamiento con tPA i.v. tienen 5 veces más probabilidades de presentar una situación de independencia funcional a los 3 meses<sup>14</sup>.

- Factores genéticos. Desconocemos la causa de que pacientes clínicamente idénticos respondan de forma tan diferente a esta terapia (Figura 1). Una de las posibles causas de esta respuesta tan dispar sería la variabilidad genotípica propia de cada individuo. Gracias al estudio Geno-tPA estamos empezando a conocer diversos polimorfismos que condicionan la respuesta al tratamiento trombolítico. Así, el genotipo DD del ACE es un predictor independiente de recanalización arterial post-tPA; los pacientes con el genotipo DD tienen 4 veces más probabilidades de recanalización<sup>15</sup>. El polimorfismo V34L del Fc XIII se asocia con mayor riesgo de transformación hemorrágica sintomática y unas tasas de mortalidad más altas tras la terapia trombolítica<sup>16</sup>.

- Glicemia. La hiperglucemia aguda, al disminuir la actividad fibrinolítica (aumento del PAI-1 y disminu-

ción de la actividad tPA plasmática), retrasa la reperfusión de la penumbra isquémica en pacientes con ictus tratados con tPA. Valores de glicemia basal por encima de 140 mg/dL se asocian de forma independiente con mala evolución (Rankin modificado: 3-6) en estos pacientes (OR 5,65; IC 95%: 1,97-16,18), contrarrestando en gran parte el efecto beneficioso de la recanalización arterial<sup>17</sup>. El impacto de la glicemia basal en la evolución del ictus varía dependiendo del tiempo en el que se alcanza la reperfusión inducida por tPA<sup>18</sup>. Así, el efecto deletéreo de la glicemia basal en el reclutamiento de penumbra isquémica hacia infarto es superior después de una reperfusión precoz (< 3 horas) que en la retardada o en la no reperfusión (OR 3,1, 1,1 y 0,7, respectivamente).

### Sonotrombólisis

La trombólisis potenciada por ultrasonidos o sonotrombólisis consiste en la insonorización (2-MHz) de la arteria ocluida durante 2 horas tras la administración del bolus de tPA i.v. Se ha demostrado que incrementa de forma significativa ( $p = 0,003$ ) el porcentaje de recanalización arterial completa y mejora la situación funcional de los pacientes a los 3 meses, sin incrementar el porcentaje de transformación hemorrágica sintomática<sup>19</sup>. Este efecto beneficioso de los ultrasonidos se alcanza a través de un proceso de microcavitación, el cual produce una disgregación reversible de la fibrina y facilita la penetración del tPA dentro del trombo.

### Sonotrombólisis + microburbujas

Las microburbujas de gas (contrastes ecográficos) al pasar por el haz de ultrasonidos acaban explotando y liberando así una energía que facilita la penetración de tPA al centro del trombo. Un trabajo realizado en la Unidad Neurovascular Vall d'Hebron demuestra cómo la administración de 3 bolos de microburbujas durante la infusión de tPA acompañada de la insolación constante del trombo incrementa todavía más el beneficio sin incrementar el riesgo de transformación hemorrágica sintomática<sup>20</sup>.

### Combinación con antagonistas de la GP IIb/IIIa

Al igual que ocurre en el síndrome coronario agudo, la combinación de tPA más un inhibidor de la GPIIb/IIIa puede mejorar las tasas de recanalización arterial *versus* fibrinólisis sola. El estudio CLEAR<sup>21</sup> ha demostrado la seguridad de dosis bajas de tPA (0,3-0,45 mg/kg) más eptifibatide en pacientes con ictus isquémico tra-

tados en las 3 primeras. El estudio CLEARER estudiará la seguridad y eficacia de dosis de 0,6 mg/kg rt-PA + eptifibatide *versus* rt-PA a dosis estándar.

### Cómo extender la ventana terapéutica

El análisis conjunto de los estudios ECASS, ATLANTIS y NINDS demostraba que cuanto más precoz era el inicio del tratamiento fibrinolítico mejores resultados se obtienen, pero también sugería que el efecto beneficioso (evolución favorable a los 3 meses) del tPA i.v. podía extenderse hasta la 4,5 horas. Esta hipótesis ha sido corroborada por el estudio ECASS III<sup>22</sup>. Los pacientes con ictus isquémico de menos de 4,5 horas de evolución tratados con tPA i.v. tienen un 34% más de posibilidades de presentar a los 3 meses un Rankin de 0-1 que aquellos que recibieron placebo, a expensas de un incremento en el riesgo de HIC sintomática (2,4% *vs.* 0,2%) y una ligera disminución en la mortalidad (7,7% *vs.* 8,4%). Estos resultados son congruentes con los del SITS-ISTR (*Cerebrovasc Dis* 2008; 25: 3), que comparó la evolución de los pacientes del registro SITS-MOST tratados entre las 3 y 4,5 horas con los tratados dentro de las 3 primeras horas, sin encontrar diferencias en la evolución a los 3 meses, transformación hemorrágica sintomática ni mortalidad. Por lo tanto, el rtPA i.v. sigue siendo seguro y eficaz hasta las 4,5 horas.

Pero en la actualidad la ventana para la administración de tPA i.v. la podemos extender más allá: hasta las 6 horas. Para ello, es necesario demostrar la existencia de una oclusión arterial y de tejido cerebral potencialmente salvable (penumbra isquémica). Ello es factible en la práctica clínica diaria gracias al Doppler transcraneal y a la RM multimodal con secuencias de difusión (DF) y perfusión (PF). Precisamente utilizando dichas exploraciones complementarias en una serie de 122 pacientes con ictus isquémico tratados con tPA i.v. (79 de 0 a 3 horas y 43 de 3 a 6 horas) pudimos comprobar la eficacia y seguridad de la fibrinólisis i.v. guiada por Doppler transcraneal y DF-PF por RM en las 6 primeras horas del ictus isquémico, con unos porcentajes similares de recanalización, recuperación funcional y transformación hemorrágica sintomática que cuando se utiliza con ventanas de 3 horas<sup>23</sup>. El análisis de los pacientes del registro alemán conjuntamente con los del ATLANTIS, ECASSS y NINDS<sup>24</sup> confirman nuestros resultados en el sentido de que es seguro y eficaz extender la fibrinólisis i.v. hasta las 6 horas en aquellos pacientes con tejido cerebral en riesgo evidenciado por RM.

Otro trabajo, realizado en la misma unidad, demuestra cómo la gran mayoría de las recanalizaciones inducidas por tPA ocurren durante la primera hora desde el inicio del tratamiento. La probabilidad



de recanalizar durante la segunda hora es sólo de un 16% y cae todavía más, a un 9%, en las 6 primeras horas. Es importante reseñar que los pacientes que recanalizan en las 2 o 6 primeras horas siguen teniendo una mejor evolución neurológica, significativa estadísticamente, que los pacientes que no recanalizan. Por ello, otras técnicas de reperfusión deben ser consideradas si el flujo no mejora en los 60 minutos después del bolus de tPA<sup>25</sup>.

### **Procedimientos intraarteriales de rescate**

La evidencia de que la fibrinólisis endovenosa no es suficiente en muchos casos ha provocado que desde hace unos años se estén adoptando estrategias terapéuticas que permitan mejorar las tasas de reperfusión. Los procedimientos intraarteriales (IA) en el tratamiento de la fase aguda del ictus pueden lograr la recanalización arterial en algunos casos refractarios al tratamiento con tPA i.v. y, por lo tanto, tienen un impacto positivo sobre el pronóstico.

El **tratamiento trombolítico combinado endovenoso/intraarterial** ya se utiliza en varios centros especializados. Sus beneficios radican en que permite iniciar rápidamente el tratamiento (endovenoso). Recordemos que en el ictus agudo “tiempo es cerebro”, y si no se observa recanalización tras 60 minutos se prosigue con procedimientos intraarteriales con los que mediante disrupción mecánica e infusión local de una dosis extra de t-PA se pretende ofrecer un tratamiento de rescate. La trombólisis combinada IV-IA guiada por Doppler transcraneal es eficaz y segura, con una evolución favorable a los 3 meses del 56% de los pacientes<sup>26</sup>.

### **Trombectomía mecánica**

La disrupción mecánica del trombo incrementa, de forma segura, las tasas de recanalización obtenidas por la fibrinólisis IA<sup>27</sup>. Se han desarrollado diversos dispositivos para la realización de la trombectomía mecánica, como el Multi-MERCI, el cual aumenta de forma notable los porcentajes de recanalización arterial en oclusiones de muy escasa respuesta al tPA i.v., sin incrementar las complicaciones<sup>28</sup>. Ya en el año 2004 la FDA aprobó el uso de catéteres para embolectomías en las arterias cerebrales en pacientes con ictus isquémico en los que está contraindicada la fibrinólisis i.v. o que no responden a la misma.

### **Nuevos fibrinolíticos**

- **Desmoteplase:** Fibrinolítico con una afinidad superior a la fibrina y sin efecto excitotóxico. El estudio

DEDAS demostró cómo su administración por vía i.v. entre las 3 y 9 horas después del inicio de un ictus isquémico es segura; además, al utilizar dosis de 125 µg/kg había una tendencia a una mejoría en la evolución clínica de aquellos pacientes con tejido cerebral salvable en la RM cerebral<sup>29</sup>. Sin embargo, un nuevo estudio en fase IIb (DIAS II), para replicar estos resultados, no demostró beneficio. En la actualidad está en marcha un nuevo estudio en fase III.

- **Tenecteplase (TNK):** Fibrinolítico fibrino selectivo con el que se alcanzan mayores porcentajes de recanalización y que tiene un menor riesgo hemorrágico. Estudio en fase II en marcha.

### **Terapia combinada: tPA + inhibidor metaloproteasas**

La limitación de la fibrinólisis a las 3 horas está relacionada, en parte, con el incremento en el riesgo de edema cerebral y transformación hemorrágica con trombólisis retardada asociado con lesión de la barrera hematoencefálica. El tPA a través de una sobreexpresión de MMP-9 contribuye a la lesión de la barrera hematoencefálica. Por ello, un inhibidor de las MMP podría prevenir este efecto nocivo del tPA. En un estudio experimental la combinación de minociclina (un inhibidor de las MMP) y la administración de tPA a las 6 horas de la inducción de isquemia disminuye los niveles de MMP-9, reduce el infarto y disminuye el riesgo hemorrágico<sup>30</sup>. Por lo tanto, la terapia combinada con minociclina puede extender la ventana temporal del tratamiento con tPA en el ictus isquémico.

### **Bibliografía**

1. Arenillas JF, Rovira A, Molina C, Grivé E, Montaner J, Alvarez-Sabín J. Prediction of Early Neurological Deterioration using Diffusion and Perfusion Weighted Imaging in Hyperacute Middle Cerebral Artery Ischemic Stroke. *Stroke* 2002; 33: 2197-2205.
2. Montaner J, Alvarez-Sabín J, Molina C, Anglés A, Abilleira S, Arenillas J, González MA, Monasterio J. Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke. Temporal profile and relation to neurological impairment. *Stroke* 2001; 32:1759-1766.
3. Molina C, Montaner J, Abilleira S, Romero F, Ibarra B, Arenillas JF, Alvarez Sabin J. Timing of spontaneous recanalization and risk of hemorrhagic transformation in acute cardioembolic stroke. *Stroke* 2001; 32: 1079-1084.
4. Wahlgren N, Ahmed N, Davalos A, Ford GA, Grund M, Hacke W, et al. Thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke in the Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke-Monitoring Study (SITS-MOST): an observational study. *Lancet* 2007; 369: 275-282.
5. Alvarez Sabín J, Alonso de Leciñana M, Gallego J, Gil Peralta A, Casado I, Castillo J, Díez Tejedor E, Gil A, Jiménez C, Lago A, Martínez-Vila E, Ortega A, Rebollo M, Rubio F. Plan de atención sanitaria al ictus. *Neurología* 2006; 21:717-726.
6. Audebert HJ, Kukla C, Vatankeh B, Gotzler B, Schenkel J, Hofer S, al. Comparison of tissue plasminogen activator ad-

- ministration management between Telestroke Network hospitals and academic stroke centers: The Telemedical Pilot Project for Integrative academic stroke centers. *Stroke* 2006; 37: 1822-1827).
7. Ribó M, Alvarez-Sabín J. ¿Puede la telemedicina restablecer la equidad geográfica en el tratamiento del ictus agudo?. *Rev Neurol* 2008; 46:557-560.
  8. Molina CA, Montaner J, Arenillas JF, Ribo M, Rubiera M, Alvarez-Sabin J. Differential pattern of tissue plasminogen activator-induced proximal middle cerebral artery recanalization among stroke subtypes. *Stroke*. 2004; 35: 486-90.
  9. Delgado-Mederos R, Rovira A, Alvarez-Sabín J, Ribó M, Munuera J, Rubiera M, Santamarina E, Maisterra O, Delgado P, Montaner J, Molina CA. Speed of tPA-induced clot lysis predicts DWI lesion evolution in acute stroke. *Stroke* 2007; 38:955-960.
  10. Ribo M, Montaner J, Molina CA, Arenillas JF, Santamarina E, Alvarez-Sabin J. Admission fibrinolytic profile predicts clot lysis resistance in stroke patients treated with tissue plasminogen activator. *Thromb Haemost*. 2004; 91: 1146-1151.
  11. Montaner J, Ribó M, Monasterio J, Molina C, Alvarez-Sabín J. Thrombin-activable fibrinolysis inhibitor levels in the acute phase of ischemic stroke. *Stroke* 2003; 34: 1038-1040.
  12. Rosell A, Alvarez-Sabin J, Arenillas JF, Rovira A, Delgado P, Fernandez-Cadenas I, Penalba A, Molina CA, Montaner J. A Matrix Metalloproteinase Protein Array Reveals a Strong Relation Between MMP-9 and MMP-13 With Diffusion-Weighted Image Lesion Increase in Human Stroke. *Stroke* 2005; 36: 1415-1420.
  13. Rosell A, Ortega-Aznar A, Alvarez-Sabín J, Fernández-Cadenas I, Ribó M, Molina CA, Eng H. Lo, Montaner J. Increased brain expresión of Matrix Metalloproteinase-9 after ischemic and hemorrhagic human stroke. *Stroke* 2006; 37:1399-1406.
  14. Alvarez-Sabín J, Huertas R, Quintana M, Rubiera M, Delgado P, Ribo M, Molina CA, Montaner J. Prior statin use may be associated with improved outcome after rt-PA. *Stroke* 2007; 38: 1076-1078.
  15. Fernandez-Cadenas I, Molina CA, Alvarez-Sabin J, Ribo M, Penalba A, Ortega-Torres L, Delgado P, Quintana M, Rosell A, Montaner J. ACE gene polymorphisms influence t-PA-induced brain vessel reopening following ischemic stroke. *Neurosci Lett*. 2006; 398: 167-71.
  16. Gonzalez-Conejero R, Fernandez-Cadenas I, Iniesta JA, Marti-Fabregas J, Obach V, Alvarez-Sabin J, Vicente V, Corral J, Montaner J. Role of Fibrinogen Levels and Factor XIII V34L Polymorphism in Thrombolytic Therapy in Stroke Patients. *Stroke* 2006; 37: 2288-2293.
  17. Alvarez-Sabin J, Molina CA, Montaner J, Arenillas JF, Huertas R, Ribo M, Codina A, Quintana M. Serum glucose as a predictor of poor outcome in reperfused t-PA treated patients. *Stroke* 2003; 34: 1235-1241.
  18. Alvarez-Sabín J, Molina CA, Ribó M, Arenillas JF, Montaner J, Huertas R, Rubiera M, Santamarina E. Impact of acute hyperglycemia on stroke outcome after thrombolysis. Risk stratification in relation to time to reperfusion. *Stroke* 2004; 35: 2493-2498.
  19. Alexandrov AV, Molina CA, Grotta JC, Ford SR, Garami Z, Alvarez-Sabín J, Montaner J, Saqqur M, Demchuk AM, Chernyshev OY, Moye LA, Hill MD, Wojner AW. A Multi-center Randomized Trial of Ultrasound-Enhanced Systemic Thrombolysis for Acute. *N Engl J Med* 2004; 351: 2170-2178.
  20. Molina CA, Ribo M, Rubiera M, Montaner J, Santamarina E, Delgado-Mederos R, Arenillas JF, Huertas R, Purroy F, Delgado P, Alvarez-Sabín J. Microbubble administration accelerates clot lysis during continuous 2-MHz ultrasound monitoring in stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator. *Stroke* 2006; 37: 425-429.
  21. Pancioli AM, Broderick J, Brott T, et al. The combined approach to lysis utilizing eptifibatid and rtPA in acute ischemic stroke. The CLEAR stroke trial. *Stroke* 2008; 39: 3268-3276.
  22. Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, et al. Thrombolysis with Alteplase 3 to 4.5 Hours after Acute Ischemic Stroke. *N Engl J Med* 2008; 359: 1317-1329.
  23. Ribo M, Alvarez-Sabín J, Montaner J, Romero F, Delgado P, Rubiera M, Delgado-Mederos R, Molina CA. Temporal profile of recanalization after iv tPA, selecting patients for rescue reperfusion techniques. *Stroke* 2006; 37: 1000-1004.
  24. Thomalla G, Schwark C, Sobesky J, Bluhmki E, Fiebach JB, Fiehler J, et al. Outcome and symptomatic bleeding complications of intravenous thrombolysis within 6 hours in MRI-selected stroke patients. *Stroke* 2006; 37: 852-858.
  25. Ribo M, Alvarez-Sabín J, Montaner J, Romero F, Delgado P, Rubiera M, Delgado-Mederos R, Molina CA. Temporal profile of recanalization after iv tPA, selecting patients for rescue reperfusion techniques. *Stroke* 2006; 37:1000-1004.
  26. Sekoranja L, Loulidi J, Yilmaz H, Lovblad K, Temperli P, Comelli M, Sztajzel RE. Intravenous versus combined (intravenous and intra-arterial) thrombolysis in acute ischemic stroke. A transcranial color-coded Duplex sonography-guided pilot study. *Stroke* 2006; 37: 1805-1809.
  27. Noser EA, Shaltoni HM, Hall CE, Alexandrov AV, Garami , Cacayorin ED, Song JK, Grotta JC, Campbell MS. Aggressive mechanical clot disruption. A safe adjunct to thrombolytic therapy in acute stroke. *Stroke* 2005; 36: 292-296.
  28. Smith WS, Sung G, Saver J, , et al. Mechanical thrombectomy for acute ischemic stroke. Final results of the Multi MERCI trial. *Stroke* 2008; 39: 1205-1212.
  29. Furlan AJ, Eydin D, Albers GW, Al-Rawi Y, Lees KR, Rowley HA, et al. Dose escalation of desmoteplase for acute ischemic stroke (DEDAS). Evidence of safety and efficacy 3 to 9 hours after stroke onset. *Stroke* 2006; 37: 1227-1231.
  30. Murata Y, Rosell A, Scannevin RH, Rhodes KJ, Wang X, Lo EH. Extensión de the thrombolytic time window with minocycline in experimental stroke, *Stroke* 2008; 39: 3372-3377.

## FIBRINOLISIS Y PROTEOLISIS: IMPLICACIONES E INTERPRETACIÓN CLÍNICA DE LAS PRUEBAS DE LABORATORIO

J. ORBE, J.A. RODRÍGUEZ, J.A. PÁRAMO

*Laboratorio de Aterosclerosis. Área de Ciencias Cardiovasculares. Centro de Investigación Médica Aplicada. Universidad de Navarra. Pamplona*

### Introducción

Las enfermedades cardiovasculares de naturaleza aterotrombótica constituyen la principal causa de morbimortalidad en nuestro medio. Dentro de este grupo, los procesos tromboticos causados por la oclusión vascular por un coágulo de fibrina representan el principal mecanismo desencadenante de los eventos de mayor relevancia clínica, como el infarto agudo de miocardio (IAM) o el ictus isquémico (INE, 2007). Una alteración de los sistemas proteolíticos puede ser de capital importancia en la patogenia de estos procesos. Los dos sistemas proteolíticos que participan de forma más activa en la enfermedad cardiovascular son el sistema fibrinolítico y el de las metaloprotea-

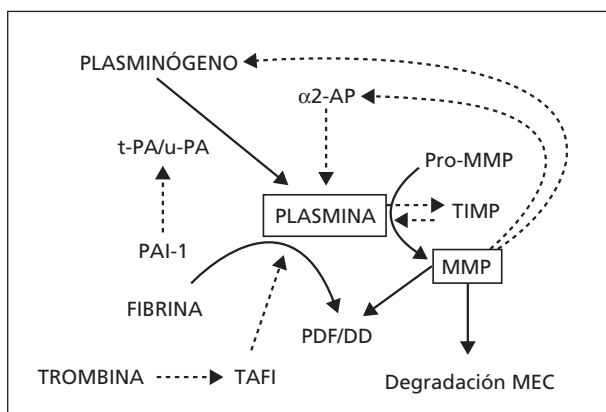


Figura 1. Interacciones entre los sistemas fibrinolítico/metaloproteasas. Líneas de trazo continuo: activación; líneas de trazo discontinuo: inhibición.

sas, los cuales cooperan para modular la integridad vascular (Figura 1).

### Sistema fibrinolítico

El sistema fibrinolítico, denominado también sistema plasminógeno/plasmina, es el encargado de la disolución en la fibrina intravascular manteniendo la fluidez circulatoria. Está compuesto por la proenzima inactiva plasminógeno, que se convierte en la enzima activa plasmina, encargada de degradar la fibrina insoluble en productos de degradación solubles. Se han descrito dos activadores fisiológicos del plasminógeno (AP): el activador tisular del plasminógeno (t-PA) y el tipo urocinasa (u-PA). La inhibición del sistema fibrinolítico tiene lugar a nivel de los AP, principalmente por el inhibidor específico del t-PA (PAI-1) o a través del inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI), y a nivel de la plasmina, principalmente por la  $\alpha$ 2-antiplasmina ( $\alpha$ 2-AP).

La activación del plasminógeno por el t-PA está implicada principalmente en la disolución de la fibrina circulante, mientras que el u-PA se une a su receptor en la superficie celular (u-PAR) para activar el plasminógeno unido a la célula, siendo su principal función la de activar la fibrinólisis durante el remodelado y la reparación tisular, función macrofágica, ovulación, embrioinplantación e invasión tumoral<sup>1</sup>.

La regulación del sistema fibrinolítico está mediada por el control de la síntesis, secreción y aclaramiento de los activadores e inhibidores del plasminógeno y por las interacciones específicas entre sus componentes. Un desequilibrio en el sistema fibrinolítico por excesiva activación conlleva la aparición de hemorragias, mientras que una activación defectuosa favorece la tendencia trombótica.

### Componentes del sistema fibrinolítico

- **El plasminógeno** es una glicoproteína de cadena simple de 92 KDa cuya concentración plasmática es de 200  $\mu$ g/mL. Su activación a plasmina se produce por la rotura del enlace peptídico Arg561-Val562, que da lugar a 2 cadenas, una pesada con los 5 dominios kringle, que contienen los lugares de unión de la lisina por los que esta proteína se une a la fibrina, y otra ligera, que contiene el dominio catalítico. El plasminógeno nativo es Glu-plasminógeno que, en el plasma, se convierte en Lys-plasminógeno, siendo éste el sustrato preferente de los AP. El plasminógeno se activa por el t-PA en dos fases: en la primera, el t-PA activa lentamente el plasminógeno sobre la superficie intacta de fibrina y, en la segunda, la fibrina parcialmente degradada expone lugares de unión adicionales y probablemente diferentes para el plasminógeno y el t-PA, incrementado de manera significativa su velocidad de activación.

- **El t-PA** es una serínproteasa de 70 kDa cuya concentración plasmática es de 5 ng/mL. Se produce en forma activa de cadena simple y, por acción de la plasmina, se convierte en la enzima de doble cadena también enzimáticamente activa. El t-PA actúa preferentemente sobre el plasminógeno en presencia de fibrina.

- **El u-PA** es una glicoproteína de 54 kDa producida también como cadena simple y convertida por la plasmina en enzima de doble cadena. Su concentración plasmática es de 2 ng/mL. A diferencia del t-PA, el u-PA no contiene lugares de unión de la lisina, por lo que no se puede unir directamente a la fibrina. La activación del plasminógeno por u-PA se produce principalmente en la superficie celular, ya que la unión a su receptor (u-PAR) favorece la generación de plasmina.

- **La  $\alpha$ 2 antiplasmina ( $\alpha$ 2-AP)** es una glicoproteína que contiene un 13% de carbohidratos y que se encuentra en el plasma a una concentración de 70  $\mu$ g/mL. Es una serpina con numerosos residuos lisina que contribuyen a su unión con la plasmina, siendo su principal inhibidor fisiológico. La  $\alpha$ 2-AP se une a la plasmina libre formando un complejo plasmina- $\alpha$ 2-AP (PAP), que puede ser detectado en la circulación en determinados estados patológicos. Este inhibidor también se une al coágulo de fibrina en presencia de  $Ca^{+2}$  y FXIIIa.

- **El PAI-1** es una serpina de 52 kDa que rápidamente se inactiva, salvo que sea estabilizada por la proteína S o por la vitronectina. Su concentración en el plasma es de 20 ng/mL y es el principal inhibidor del t-PA y u-PA. Tiene una gran eficiencia inhibiendo al t-PA en el plasma, y su concentración se eleva rápidamente en diferentes patologías (trombosis, cáncer, enfermedad hepática, etc.).

- **El TAFI** es una carboxipeptidasa de 60 kDa que se convierte en la enzima activa por la rotura del enla-

ce peptídico Arg92-Arg93. Su concentración plasmática es de 5 µg/mL. Sus principales activadores son el complejo trombina/trombomodulina y la plasmina. El TAFI actúa rompiendo los residuos lisina carboxiterminales de la fibrina parcialmente degradada inhibiendo la unión del plasminógeno a la fibrina. Además, inhibe la conversión del Glu-plasminógeno a Lys-plasminógeno y reduce la inhibición de la plasmina por  $\alpha$ 2-AP. El TAFI también elimina los residuos de lisina carboxiterminales de los receptores celulares del plasminógeno e inhibe los procesos de migración *in vivo* y angiogénesis *in vitro*<sup>2</sup>.

---

### Sistema de metaloproteasas: interacciones con el sistema fibrinolítico

Las metaloproteasas (MMP) son una familia de proteínas dependientes de zinc y calcio que se secretan en forma de zimógenos, que pueden ser activadas por otras proteasas y por plasmina. En general, contienen un dominio catalítico con residuos de histidina e iones zinc y un dominio regulador (pro-peptido), responsable de la forma latente o inactiva por unión de una cisteína al centro activo, que al escindir se activa la enzima. Sobre esta unidad básica se añade un número variable de dominios estructurales (hemopexina, fibronectina, etc.), que les confieren especificidad por el sustrato, regulan la unión a proteínas de matriz extracelular (MEC) y determinan la interacción con los inhibidores de metaloproteasas (TIMP). Aunque la mayoría de estas enzimas son secretadas, existe también un grupo de MMP unidas a membrana por dominios intracitoplasmáticos y transmembrana (MT-MMP)<sup>3</sup>. Estudios de cristalografía han puesto de manifiesto que el dominio catalítico de todas las MMP tiene una topología diferente del lugar activo, lo que da lugar a diferencias en la especificidad por los sustratos. Las cuatro subclases de MMP que participan más activamente en la degradación de MEC son: colagenasas (MMP-1, MMP-8), gelatinasas (MMP-2 y MMP-9), estromelisininas (MMP-3, MMP-10 y MMP-11) y las metaloproteasas asociadas a membrana (MT-MMP)<sup>4</sup>.

La principal función de las MMP es degradar los componentes de la MEC. En condiciones fisiológicas, contribuyen al remodelado tisular y al ciclo menstrual y participan en los procesos de reparación de tejidos<sup>3</sup>. En los últimos años se ha descrito que existe una estrecha cooperación entre el sistema fibrinolítico y el de las MMP a distintos niveles, lo que sugiere que ambos sistemas pueden cooperar en la actividad proteolítica, aunque su relevancia fisiológica aún no se ha establecido (Figura 1). A nivel patológico juegan un papel relevante en la aterosclerosis, la angiogénesis y el cáncer. Datos obtenidos de animales deficientes en MMP

o en componentes del sistema fibrinolítico indican que la activación *in vivo* de algunas MMP ocurre por mecanismos dependientes del sistema plasminógeno/plasmina, pero también han demostrado que existen rutas alternativas al sistema plasminógeno/plasmina para la degradación de la fibrina<sup>5,6</sup>. Asimismo, estudios celulares demuestran que las MMP pueden reducir la actividad plasmina asociada a la superficie celular, a través de la disminución de la cantidad de plasminógeno y por hidrólisis de los inhibidores de la fibrinólisis ( $\alpha$ 2-macroglobulina y PAI-1)<sup>7</sup>.

Se han asociado cambios en la expresión de MMP o inhibidores con enfermedad arterial coronaria y con trombosis, siendo numerosos los estudios que encuentran que existe una asociación entre los niveles de MMP y la presencia de estas patologías o sus factores de riesgo. Además, nuestro grupo y otros han descrito otras funciones, como la capacidad de las MMP para degradar el fibrinógeno y la fibrina<sup>8</sup>, así como su participación en los fenómenos hemorrágicos tras tratamiento fibrinolítico<sup>9,10</sup>. Sin embargo, no se ha establecido con precisión el papel de las MMP en la formación y en la lisis de fibrina, ni sus posibles efectos secundarios sobre la hemostasia o toxicidad celular.

---

### La metaloproteasa-10 (MMP-10) o estromelisinina-2: ¿nuevo agente profibrinolítico?

En los últimos años nuestro grupo ha explorado el papel de una metaloproteasa, la MMP-10, en la fisiopatología de la aterosclerosis. La MMP-10 o estromelisinina-2 es una endopeptidasa que se localiza en el cromosoma 11 y es expresada por diversos tipos celulares como las células endoteliales, monocitos, fibroblastos, etc. Puede ser activada por plasmina, calicreína, triptasa, elastasa y catepsina G, y degrada un amplio rango de sustratos de la MEC (elastina, fibronectina, gelatina, laminina, tenascina-C, vitronectina y colágeno tipo II, III, IV, IX, X, XI). Además, la MMP-10 puede activar otras MMP, como la proMMP-1, -3, -7, -8 y -9<sup>11</sup>.

Se ha demostrado que la MMP-10 participa en diversos procesos fisiológicos, como el crecimiento óseo o la cicatrización de heridas. Además, se halla sobreexpresada en córneas de pacientes con retinopatía diabética y se ha relacionado con algunos tipos de carcinomas (cabeza, esófago y pulmón), así como con tumores linfoides. Diversos estudios *in vitro* demuestran que la expresión de MMP-10 puede inducirse tanto por factores de crecimiento como por citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ). Recientemente se ha descrito que participa en la regresión de la formación de capilares mediante la activación de la MMP-1 y que es importante para la integridad vascular.



En nuestro grupo hemos demostrado que esta proteasa se induce por estímulos inflamatorios y protrombóticos<sup>11,12</sup>, se localiza en placas ateroscleróticas avanzadas en lugares de rotura inminente y está elevada en pacientes ateroscleróticos<sup>13</sup> o con niveles elevados de trombina<sup>14</sup>, lo que sugiere que puede estar implicada en el proceso aterotrombótico. Además, hemos demostrado que la MMP-10 altera la formación y lisis de coágulos actuando sobre proteínas de la coagulación/fibrinólisis, de modo que favorece la lisis del coágulo inducida por t-PA. Estudios *in vivo*, en ratones *knockout* para la MMP-10 (MMP10<sup>-/-</sup>) confirmaron que la ausencia de MMP-10 reducía significativamente el tiempo de hemorragia sin alterar el número de plaquetas y, en un modelo de isquemia cerebral<sup>15</sup>, hemos observado que los ratones MMP10<sup>-/-</sup> con trombosis en la arteria cerebral media reperfundían peor que los animales WT. Todo ello sugiere que existe *in vivo* un mecanismo dependiente de la MMP-10 que favorece la lisis del coágulo en este modelo de ictus. Finalmente, nuestros resultados sugieren que el efecto profibrinolítico de la MMP-10 está mediado por la inactivación del TAFI *in vitro* e *in vivo*, confirmando las interrelaciones proteolisis/fibrinólisis (Figura 1).

Por tanto, la MMP-10, por sus propiedades profibrinolíticas, podría constituir un nuevo agente en la terapia trombolítica. Serán necesarios estudios futuros que confirmen el papel de la MMP-10 en el diagnóstico de la enfermedad aterotrombótica y su uso terapéutico, así como el empleo de inhibidores selectivos como nueva estrategia antifibrinolítica.

## Pruebas fibrinolíticas

### Globales

Entre los ensayos globales clásicos para evaluar la capacidad fibrinolítica del plasma destacan el tromboelastograma, el tiempo de lisis de euglobulinas y la placa de fibrina. Estos métodos estudian todos los factores que juegan un papel decisivo en este sistema, pero no analizan su concentración ni su actividad aisladamente. El tromboelastógrafo determina en sangre el tiempo que tarda en formarse el coágulo, el tipo de coágulo formado y su capacidad de lisis<sup>16</sup>. Se emplea para determinar coagulopatías en pacientes con cirugía de alto riesgo hemorrágico y transfusión masiva, así como para la monitorización de la antifibrinólisis. Además, diversos estudios indican que podría emplearse para determinar estados hipercoagulables, fibrinólisis y actividad del factor XIII, aunque su uso no está validado. El tiempo de lisis de euglobulinas monitoriza la formación y lisis del coágulo de fibrina sobre la fracción euglobulínica del plasma, siendo útil para diferenciar la fibrinólisis primaria de

la coagulación intravascular diseminada (CID) y también se puede emplear para controlar terapias trombolíticas en pacientes con IAM, si bien son pruebas no empleadas de manera rutinaria por su laboriosidad y tiempo en obtener resultados. Finalmente, la placa de fibrina permite medir la capacidad fibrinolítica del plasma en función del área de lisis que produce una muestra sobre fibrina polimerizada<sup>17</sup>. Todas estas pruebas pueden ser útiles para diagnosticar el estado fibrinolítico, si bien no se realizan de forma rutinaria en los laboratorios de hemostasia.

### Específicas

PDF y dímero D se determinan con pruebas inmunológicas, para valorar los productos de degradación de la fibrina (PDF y DD), que aumentan en sangre en estados de hiperfibrinólisis.

El dímero D es el producto de la digestión por plasma de la fibrina polimerizada. Los ensayos disponibles se basan en anticuerpos monoclonales que reconocen distintos epítopes y tanto el formato y los calibradores como la instrumentación varían de unos laboratorios a otros. Los primeros ensayos de dímero D se realizaban con bolas de látex cubiertas con un anticuerpo contra la región de unión de la fibrina al FXIII. Estos ensayos eran poco sensibles y requerían de personal especializado para medir la aglutinación. Seguidamente se desarrollaron nuevos métodos de aglutinación automáticos con partículas recubiertas de anticuerpo que se agregan en presencia de dímero D, pero se trata de métodos semicuantitativos, ya que la especificidad de los anticuerpos varía frente a los distintos fragmentos de degradación de la fibrina. Finalmente, se desarrollaron los ELISA, que son muy sensibles, pero requieren más tiempo de realización, aunque actualmente están automatizados. En la práctica, el dímero D se emplea para descartar tromboembolismo venoso (valor predictivo negativo > 90%) así como para el diagnóstico y monitorización de la activación de la coagulación en la CID. Recientemente se ha propuesto su utilidad en la predicción de recurrencia de TEV<sup>18</sup>.

### $\alpha$ 2-AP

La  $\alpha$ 2-AP es el inhibidor fisiológico más importante de la plasmina. Su determinación es útil en la evaluación de la hiperfibrinólisis, monitorización de la terapia trombolítica, diagnóstico de defecto de síntesis por daño hepático o defecto congénito y evaluación de episodios hemorrágicos debidos a déficit de  $\alpha$ 2-AP. Los métodos empleados son cromogénicos, inmunológicos (electroforesis de Laurell o inmunonefelo-

metría) y ELISA empleando plasma citratado pobre en plaquetas.

### *Plasminógeno*

El plasminógeno es el zimógeno que se convierte a su forma activa, la plasmina, por los activadores del plasminógeno. Se han reportado varios casos de trombosis en individuos con hipoplasminogenemia o con alteraciones estructurales en la molécula de plasminógeno. Existen técnicas para determinar tanto el plasminógeno funcional (sustratos cromogénicos) como el antigénico (ELISA), y su uso clínico está considerado únicamente para la detección de sujetos con hipoplasminogenemia.

### *t-PA*

El t-PA es la enzima encargada de convertir el proenzima plasminógeno en la enzima activa plasmina que se encarga de degradar la fibrina. Se ha descrito en algunos estudios una correlación entre actividad t-PA y tendencia trombótica y se ha asociado con la progresión de enfermedad hepática. También se han observado niveles elevados de t-PA en retinopatía en diabetes tipo I y en trasplante cardiaco. Se pueden determinar tanto los niveles antigénicos como los de actividad en muestras de plasma humano. Los ensayos de actividad emplean como tapizado anticuerpos anti-PAI-1 o anticuerpos anti-t-PA que fijan el t-PA activo y se revelarán con un sustrato específico de la plasmina. Los ensayos para determinar el t-PA antigénico se basan en "ELISA sandwich" convencionales con 2 anticuerpos anti-t-PA, uno de ellos marcado con peroxidasa y revelado con sustrato de la peroxidasa.

### *PAI-1*

El PAI-1 es el principal inhibidor de los activadores del plasminógeno. Se han asociado niveles elevados de PAI-1 con patología trombótica, progresión aterosclerótica y restenosis coronaria, pero su papel predictor de enfermedad coronaria arterial aún está en debate. Se ha demostrado su eficacia como marcador pronóstico del cáncer de mama e incluso como predictor de respuesta a terapia. A nivel clínico su determinación es útil para el diagnóstico del déficit de PAI-1, que se manifiesta con hemorragia, aunque los test actuales no son muy sensibles para niveles bajos. Los ensayos disponibles para medir PAI-1 son funcionales y antigénicos. En el primer caso, se atrapa el PAI-1 activo mediante la inmovilización de t-PA activo en la placa y se detectará posteriormente

con un secundario anti-PAI-1 marcado con peroxidasa; en el segundo caso, se trata de ELISA sandwich que reconocen todas las formas de PAI-1, activo, latente y sustrato.

### *TAFI*

El TAFI es una carboxidasa con efecto antifibrinolítico. Existen diversos estudios sobre la asociación de los niveles de TAFI con la trombosis arterial, y las conclusiones a las que llegan son contradictorias. Se ha asociado un incremento de TAFI con aumento de riesgo de ictus, así como con diversos tipos de ictus isquémico. Otros estudios indican que no existe una relación clara entre los niveles de TAFI y la enfermedad arterial coronaria y, por último, un estudio reciente en IAM indica que son los niveles bajos de actividad TAFI los que se asocian con un mayor riesgo de infarto. A nivel clínico, más que su posible determinación para el diagnóstico se baraja su empleo en el tratamiento antifibrinolítico para evitar hemorragias o el empleo de inhibidores del TAFI en la terapia trombolítica para incrementar la eficiencia del t-PA. Existen métodos diferentes de medir el TAFI: el antigénico con técnica de ELISA con distintos anticuerpos frente a diferentes regiones de la proteína e incluso frente al péptido de activación, y el funcional, ensayo cromogénico en el que el TAFI inactivo se transforma en enzima activa con un reactivo que contiene trombina/trombomodulina que reacciona con un sustrato produciendo color detectado a 405 nm. Algunos de los ensayos de ELISA se ha demostrado que son dependientes de polimorfismos del TAFI, por lo que los estudios epidemiológicos documentados deben ser interpretados con precaución (Tabla 1).

---

## **Pruebas para metaloproteasas**

### **Globales**

Se han determinado los niveles de MMP y TIMP en diversas patologías como enfermedad arterial, cáncer y metástasis, angiogénesis, enfermedades inflamatorias, etc. Diversos estudios han demostrado que las MMP participan en la fisiopatología vascular y pueden contribuir a la progresión y ruptura de la placa de ateroma, así como a la expansión de los aneurismas arteriales, e intervienen en otros procesos numerosos en los que participan la ruptura de la lámina basal y la inflamación como artrosis, o la isquemia cerebral<sup>3</sup>. Sin embargo, no se ha establecido aún su uso clínico en el diagnóstico, tratamiento o prevención de estas patologías.

Tabla 1. Evaluación de los sistemas fibrinolisis/metaloproteasas

<i>Fibrinolisis</i>	
Pruebas globales	Pruebas específicas*
<b>Tiempo de lisis de euglobulinas</b> Plasma citrato	Dímero D (aglutinación, ELISA)
<b>Tromboelastograma</b> Sangre total, plasma	$\alpha$ 2 antiplasmina (funcional, cromogénico, inmunoquímicos)
<b>Placa de fibrina</b> Plasma citrato	Plasminógeno (antigénico y funcional)
	t-PA (Antigénico y funcional)
	Inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1)
	TAFI (antigénico y funcional)
<i>Metaloproteasas</i>	
<b>Sustratos cromogénicos</b> Plasma, suero	ELISAS antigénicos (MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -10, -11, TIMP-1, -2, -3 y -4) Plasma y/o suero
<b>Zimografía</b> Plasma, suero	ELISAS actividad (MMP-1, -2, -3, -9 y -13) Plasma y/o suero
<b>Zimografía reversa</b> Plasma, suero	

\* Todas se realizan con plasma citratado

### Sustratos cromogénicos

Las MMP se pueden medir de manera global mediante sustratos cromogénicos, que son pequeñas moléculas que se hidrolizan rápidamente por MMP. Dependiendo del sustrato tienen una especificidad distinta, aunque no existen sustratos específicos para una sola MMP.

### Zimografía

Se emplean para determinar la actividad proteolítica circulante del plasma o suero<sup>19</sup>. Para ello se utilizan geles de acrilamida con un porcentaje del sustrato para las MMP de interés (gelatina, caseína). Tras la electroforesis e incubación, las MMP activas, separadas según su peso molecular, digieren el sustrato, pudiéndose determinar su actividad proteolítica midiendo el área de lisis.

### Zimografía reversa

La técnica de zimografía reversa permite disponer de un método alternativo de detección de los TIMP. Como en el caso anterior, se utilizan geles de acrilamida polimerizados con un porcentaje de gelatina y MMP-2 o MMP-9. Tras la electroforesis e incubación, la metaloproteasa digiere todo el gel, excepto aquellas zonas en las que se localizan los TIMP o los com-

plejos MMP/TIMP, que se pueden medir tras la tinción del gel.

### Específicas

Para determinar los niveles antigénicos de MMP, se emplea la técnica de ELISA sandwich, no de forma rutinaria en la clínica, si bien los estudios actuales indican que puede aportar información adicional sobre el grado de inflamación, progresión o severidad en algunas patologías. Existen ELISA específicos para cada una de las MMP así como sus inhibidores. Incluso se pueden realizar arrays de MMP sobre plasma y suero mediante ELISA sandwich multiplex que permiten cuantificar hasta 13 de estas proteínas o sus inhibidores simultáneamente.

Además, existen ensayos de actividad específicos para algunas metaloproteasas. En estos ensayos emplean un anticuerpo específico para la MMP que fijan a la placa, de forma que al añadir la muestra se une la MMP al anticuerpo y puede detectarse su actividad con un sustrato genérico de MMP detectable por colorimetría o fluorescencia.

### Conclusiones

Existen numerosas interrelaciones entre el sistema fibrinolítico y el proteolítico que confirman su relevante papel en procesos fisiológicos y patológicos,

como la aterosclerosis y el cáncer. Es posible la determinación de las proteínas que componen ambos sistemas con pruebas de laboratorio globales y específicas. Se precisan estudios clínicos que confirmen el valor diagnóstico de cada prueba, de modo que su incorporación al laboratorio permita un diagnóstico precoz y más preciso de la enfermedad vascular y establecer su valor en la monitorización del tratamiento.

## Bibliografía

- Rijken DC, Lijnen HR. New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J Thromb Haemost* 2009;7:4-13.
- Lijnen HR. Elements of the fibrinolytic system. *Ann N Y Acad Sci* 2001;936:226-36.
- Rodríguez JA, Orbe J, Páramo JA. Metalloproteases, vascular remodeling and atherothrombotic syndromes. *Rev Esp Cardiol* 2007;60:959-67.
- García-Touchard A, Henry TD, Sangiorgi G, Spagnoli LG, Mauriello A, Conover C, Schwartz RS. Extracellular proteases in atherosclerosis and restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1119-27.
- Lijnen HR, Silence J, Lemmens G, Frederix L, Collen D. Regulation of gelatinase activity in mice with targeted inactivation of components of the plasminogen/plasmin system. *Thromb. Haemost.* 1998;79:1171-76.
- Arza B, Hoylaerts MF, Féliz J, Collen D, Lijnen HR. Prostromelysin-1 (proMMP-3) stimulates plasminogen activation by tissue-type plasminogen activator. *Eur J Biochem.* 2000;267:6378-84.
- Prager GW, Breuss JM, Steurer S, Mihaly J, Binder BR. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces rapid pro-urokinase (pro-uPA) activation on the surface of endothelial cells. *Blood* 2004;103:955-62.
- Bini A, et al. Characterization of MMP-3, MMP-7, and MT1-MMP derived fibrin(ogen) fragments D-dimer and D-like monomer. *Biochemistry* 1999;38:13928-36.
- Kang SS, Kook JH, Hwang S, Park SH, Nam SC, Kim JK. Inhibition of MMP-9 attenuated neural progenitor cell migration after photothrombotic ischemia. *Brain Res* 2008;1228:20-6.
- Konstantino Y, et al. Potential implications of matrix metalloproteinase-9 in assessment and treatment of coronary artery disease. *Biomarkers* 2009;14:118-29.
- Montero I, Orbe J, Varo N, Beloqui O, Monreal JI, Rodríguez JA, Díez J, Libby P, Páramo JA. C-reactive protein induces MMP-1 and -10 in human endothelial cells: implications for clinical and subclinical atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:1369-78.
- Rodríguez JA, Orbe J, Martínez de Lizarrondo S, Calvayrac O, Rodríguez C, Martínez-González J, Páramo JA. Metalloproteases and atherothrombosis: MMP-10 mediates vascular remodeling promoted by inflammatory stimuli. *Front Biosci* 2008;13:2916-21.
- Orbe J, Montero I, Rodríguez JA, Beloqui O, Roncal C, Páramo JA. Independent association of MMP-10, cardiovascular risk factors and subclinical atherosclerosis. *J Thromb Haemost* 2007;5:91-7.
- Orbe J, Zudaire M, Serrano R, Coma-Canella I, Martínez de Sarrondo S, Rodríguez JA, Páramo JA. Increased thrombin generation after acute versus chronic coronary disease as assessed by the thrombin generation test. *Thromb Haemost* 2008;99:382-7.

- Orset C, et al. Mouse model of in situ thromboembolic stroke and reperfusion. *Stroke* 2007;38:2771-8.
- Traverso CI, Caprini JA, Arcelus JI. The normal thromboelastogram and its interpretation. *Semin Thromb Hemost.* 1995;21:7-13.
- Vinazzer H. Basics and practice in evaluating plasminogen. *Haemostasis.* 1988;181:41-5.
- Adam SS, Key NS, Greenberg CS. D-dimer antigen: current concepts and future prospects. *Blood* 2009;113:2878-87.
- Catterall JB, Cawston TE. Assays of matrix metalloproteinases (MMPs) and MMP inhibitors: bioassays and immunoassays applicable to cell culture medium, serum, and synovial fluid. *Methods Mol Biol.* 2003;225:353-64.

## IMPORTANCIA DE LA ESTRUCTURA DE LA FIBRINA EN SU LISABILIDAD: ESTUDIO EN DISTINTAS SITUACIONES PATOLÓGICAS

A.M. LAURICELLA, D.N. DE PARIS, A. ARÍN, G. ROSA

*Laboratorio de Hemostasia y Trombosis.  
Departamento de Química Biológica.  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.  
Universidad de Buenos Aires (Argentina)*

La fibrina es una malla proteica resultante de la polimerización del fibrinógeno (Fbg) que constituye el soporte del tapón hemostático. La fibrina es el sustrato de la plasmina en la reacción lítica. Por lo tanto, su estructura y demás características son determinantes en la velocidad de su disolución. Estas características pueden variar en diferentes situaciones fisiológicas, como también en numerosos estados patológicos.

La lisabilidad de la fibrina evalúa cuánto demora la degradación del polímero por el sistema plasminógeno-plasmina ante condiciones controladas.

Además, la fibrina juega una importante función de cofactor, modulando la acción de la trombina, la activación del plasminógeno, la actividad de plasmina, t-PA,  $\alpha_2$ AP y factor XIII dentro del coágulo.

En la molécula de fibrinógeno existen sitios de unión a proteínas del sistema de coagulación (trombina, F XIII), y a proteínas fibrinolíticas ( $\alpha_2$ -antiplasmina, plasminógeno, t-PA)<sup>1</sup>.

La activación de plasminógeno (Plg) por t-PA aumenta 1.000 veces en presencia de fibrina. Los sitios de unión para estas proteínas están ocultos en el Fbg y dispuestos de tal manera que el t-PA no puede activar el Plg. Cambios conformacionales posteriores a la fibrinoformación exponen estos sitios favoreciendo la activación del Plg y circunscribiendo la actividad lítica al lugar donde se encuentra el coágulo sanguíneo<sup>2</sup>.



## Caracterización de la fibrina

La fibrina puede ser caracterizada por diferentes propiedades, importantes para la detección de alteraciones. Las propiedades más estudiadas son la evaluación cinética de formación de la fibrina, la estructura, permeabilidad, viscoelasticidad y compactabilidad, entre otras.

La cinética de fibrinoformación puede estudiarse determinando la densidad óptica (DO) en función del tiempo. Las curvas resultantes son caracterizadas mediante: la fase de latencia (que corresponde al tiempo de inicio de la coagulación); la pendiente (que representa la velocidad de fibrinoformación) y la densidad óptica máxima ( $DO_{m\acute{a}x}$ ) (asociada a la estructura final de la fibrina).

La estructura de la fibrina generalmente es evaluada por microscopía electrónica de barrido (MEB) (Figura 1) o por microscopía confocal (Figura 2)<sup>3</sup>. En nuestro laboratorio se utiliza también la microscopía de campo oscuro para evaluar la estructura de redes de fibrina (Figura 3). Esta metodología permite visualizar la fibrina sin tratamiento alguno, evitando cualquier modificación debida a la técnica. Además, como la muestra es iluminada con una fuente de baja potencia, se minimizan alteraciones del gel como contracción o deshidratación. La microscopía de campo oscuro ha resultado ser una técnica rápida, accesible y adecuada para detectar alteraciones estructurales en la fibrina de pacientes de diversas patologías.

La fibrina puede presentar estructuras muy variadas (Figura 1). La arquitectura global puede ser homogénea (ya sea compacta o abierta) o heterogénea (si posee poros o nudos)<sup>4</sup>. Puede cuantificarse el número de ramificaciones por área, el grosor de las fibras y la longitud entre ramificaciones. Usualmente una arquitectura compacta de porosidad disminuida se asocia con fibras delgadas, muy ramificadas, mientras que una estructura abierta generalmente se vincula con fibras gruesas<sup>5</sup>.

El grado de entrecruzamiento de la fibrina por factor XIIIa puede evaluarse utilizando electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS).

La permeabilidad de la fibrina se estudia midiendo el flujo de fluido a través del gel. Se evalúa principalmente a través del coeficiente de permeabilidad específica ( $K_s$ ), cuyo valor aumenta cuanto más permeable es el gel. La relación masa/largo de las fibras ( $\mu$ ) (calculado a partir de  $K_s$  y mediciones turbidimétricas) es proporcional a la  $DO_{m\acute{a}x}$  y su aumento indica que la fibrina posee una arquitectura abierta, formada por fibras más gruesas<sup>3</sup>.

Las propiedades viscoelásticas, cuantificadas por estudios reométricos, evalúan la consistencia de la fibrina, principalmente a través del módulo elástico ( $G'$ ,

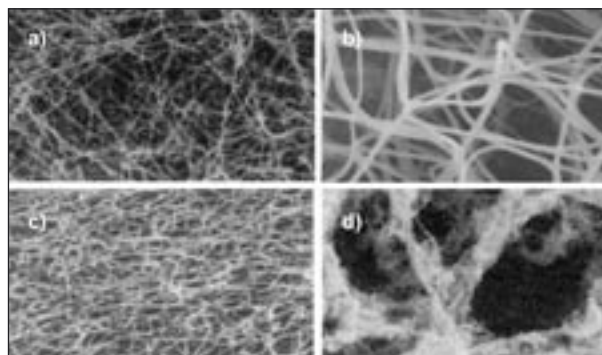


Figura 1. Arquitectura global de las redes de fibrina: a) homogénea; b) homogénea abierta, formada por fibras gruesas; c) homogénea compacta; d) heterogénea compacta con grandes poros.

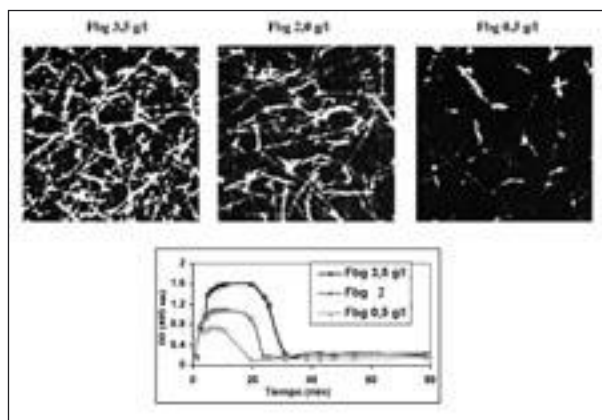


Figura 2. Efecto de la concentración de fibrinógeno sobre la estructura y la cinética de formación-lisis de la fibrina, en una etapa.

asociado a la dureza y rigidez del material) y del módulo viscoso ( $G''$ , vinculado con la deformabilidad y la viscosidad del componente fluido)<sup>5</sup>. Estos parámetros evalúan la respuesta del material a pequeñas deformaciones, sin alterar su estructura, mientras que la compactabilidad cuantifica el colapso de las fibras ante grandes deformaciones.

Para evaluar la lisis se utilizan dos sistemas diferentes: uno en una sola etapa (o fibrinolisis intrínseca), donde los sistemas de formación y lisis de la fibrina se activan simultáneamente (aunque con distinta cinética) de modo que ambos procesos son evaluados en forma conjunta, mientras que el sistema en dos etapas (por difusión o permeación de los agentes líticos) permite evaluar separadamente ambos procesos. Pueden utilizarse diferentes métodos: densitométrico cinético o por un sistema de perfusión, percolando activadores de Plg y cuantificando productos líticos, como dímero D y productos de degradación de la fibrina, en el

eluyente. Los cambios morfológicos que se producen durante la fibrinólisis intrínseca son similares a los observados en dos etapas<sup>6</sup>.

### Factores que influyen en las propiedades de la fibrina

La concentración de fibrinógeno en plasma normal fluctúa en un estrecho rango (2-4 g/L); no obstante, estas pequeñas variaciones modifican la estructura de la fibrina. Al aumentar la concentración de Fbg, la fibrina resulta más compacta y rígida, de mayor turbidez, menos permeable y más difícil de lisar (Figura 2)<sup>8</sup>. La situación *in vivo* es más compleja aún, ya que la concentración de Fbg en el entorno de la fibri-noformación es muy diferente a la que se encuentra en circulación.

Variaciones en la estructura del Fbg, incluso sus variantes naturales, pueden producir cambios pronunciados en la fibrina resultante.

La molécula de Fbg puede presentar anomalías congénitas o adquiridas, que alteran su funcionalidad provocando desórdenes de la coagulación y generalmente conducen a redes de fibrina con alteraciones estructurales y/o funcionales. El 40% de las disfibrinogenemias congénitas detectadas no presentan alteraciones clínicas, mientras que el resto puede manifestarse por trastornos hemorrágicos, trombóticos, a veces ambos en el mismo paciente, abortos espontáneos o cicatrización defectuosa. Se ha propuesto una clasificación de las diferentes estructuras en base a las fibrinas obtenidas a partir de 38 disfibrinogenemias hereditarias<sup>7</sup>, que fueron agrupadas en base a la combinación de sus propiedades: redes semejantes a las normales, heterogéneas con poros o nudos, y con distinto grado de ramificación y porosi-

dad. Los estudios de las disfibrinogenemias han permitido explicar la relación estructura-función de los distintos aminoácidos del Fbg y cómo influye en la fibrina resultante.

El aumento de la fuerza iónica produce fibrina de estructura más ramificada y compacta, de mayor turbidez y rigidez, de porosidad marcadamente disminuida que la fibrina obtenida a menor fuerza iónica<sup>8</sup>. Los cationes divalentes tienen una importancia relevante en la estructura de la fibrina. En concentraciones fisiológicas, el Fbg posee los sitios de unión a calcio de alta afinidad ocupados, mientras que los de baja afinidad (como los residuos del ácido siálico) tienen función regulatoria. El calcio mantiene la estructura y estabilidad del Fbg. Además, aumenta el grosor de las fibras, la rigidez y resistencia mecánica de los geles de fibrina.

La concentración de trombina ejerce un efecto complejo sobre la fibrina (Figura 4A). Al aumentar la concentración de trombina, la fibrina incrementa su ramificación y densidad de fibras, mientras disminuye su porosidad. Pero a concentraciones mayores aun, se produce el efecto contrario. Además, está reportado que concentraciones de trombina crecientes (de entre 0,05 y 2 U/mL) generan fibras de menor diámetro. Las mayores variaciones de la fibrina *in vivo* son posiblemente causadas por la concentración de trombina, debido a los mecanismos fisiológicos complejos que controlan y regulan su actividad.

La actividad del factor XIII influye drásticamente en propiedades de la fibrina, principalmente en las viscoelásticas, la permeabilidad y su susceptibilidad a la lisis, si bien su efecto sobre la estructura es controvertido. Se ha reportado que los coágulos entrecruzados presentaron valores de G' cinco veces mayores que los no entrecruzados, indicando un pronunciado aumento de su dureza<sup>9</sup>.

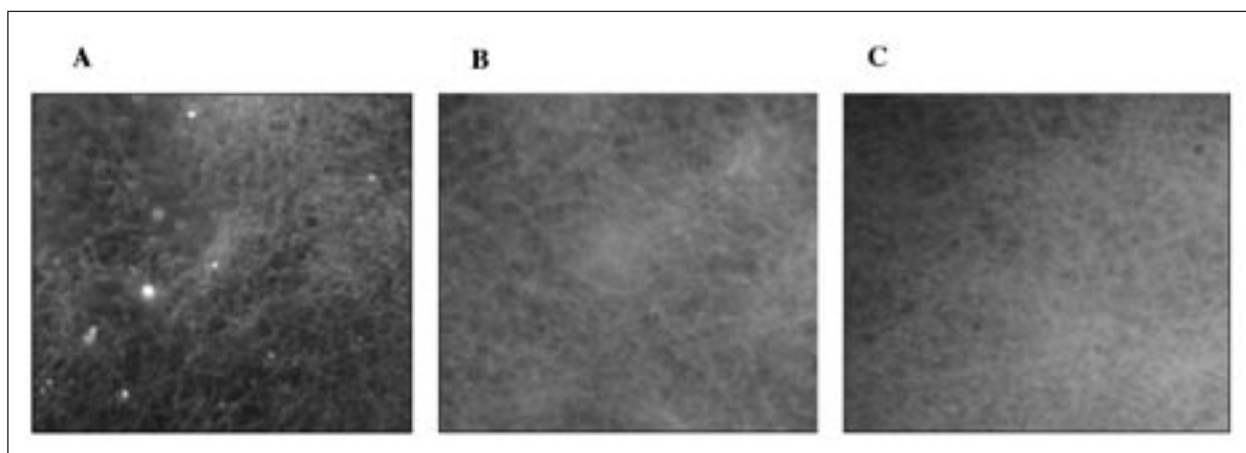


Figura 3. Redes de fibrina plasmática obtenidas con trombina (conc. final: 0,05 U/mL) por microscopía de campo oscuro de: A) individuo normal; B) paciente diabético; C) paciente con mieloma múltiple.

## Influencia de la estructura de la fibrina en su lisabilidad

La velocidad de fibrinólisis está estrechamente relacionada con el tamaño de las fibras y la arquitectura de la red de fibrina. La plasmina corta transversalmente fibras individuales, de modo que dentro del mismo gel las fibras delgadas se lisan antes que las gruesas. Las redes de estructura abiertas se lisan más rápidamente que las compactas a causa de la reducida cantidad de fibras por unidad de volumen y la movilidad facilitada de componentes fibrinolíticos<sup>5,10</sup>.

La eficiencia de la fibrina como cofactor de la activación del Plg también depende de la arquitectura de las fibras: fibras gruesas resultan mejor cofactor<sup>11,5</sup>.

La permeabilidad de la fibrina es un factor decisivo en la velocidad de lisis. El transporte de plasminógeno y sus activadores por permeación a través del coágulo aumentó la velocidad de lisis aproximadamente 100 veces comparado con el transporte por difusión<sup>12</sup>. Además, se documentó un marcado aumento de la fibrinólisis (más de 10 veces) al incrementar la velocidad de permeación de los mediadores fibrinolíticos dentro de los geles de fibrina. No se vieron diferencias entre la lisis de geles gruesos y finos cuando se utilizaron altas concentraciones de plasmina o u-PA en el flujo a través de los geles.

La concentración del fibrinógeno produce un efecto muy claro en la estructura final de la fibrina y su disolución: a mayor concentración de fibrinógeno, mayor  $DO_{máx}$  y mayor tiempo de lisis (Figura 2). Del mismo modo, la lisis de fibrina generada por diferente concentración de trombina es proporcional a la  $DO_{máx}$  alcanzada (Figura 4B).

## Alteraciones de la fibrina y estados patológicos

Las redes de fibrina se modifican, además, en una serie de estados patológicos. La glucosa aumenta el entrecruzamiento de la fibrina y el grosor de las fibras, disminuyendo la permeabilidad, tanto *in vitro* como *ex vivo* (Figura 3)<sup>13</sup>. La fibrina de pacientes con mieloma mostró menor fase de latencia, presentando una estructura más compacta y ramificada cuya lisis resultó disminuida (Figura 3). En el síndrome nefrótico se observan redes de fibrina compactas y rígidas, resistentes a la lisis<sup>14</sup>.

Hay numerosos trabajos que vinculan las alteraciones de la fibrina y su lisabilidad para explicar los mecanismos de diferentes patologías, principalmente en casos particulares de trombosis, como enfermedad cardiovascular, aterosclerosis, etc. Se compara-

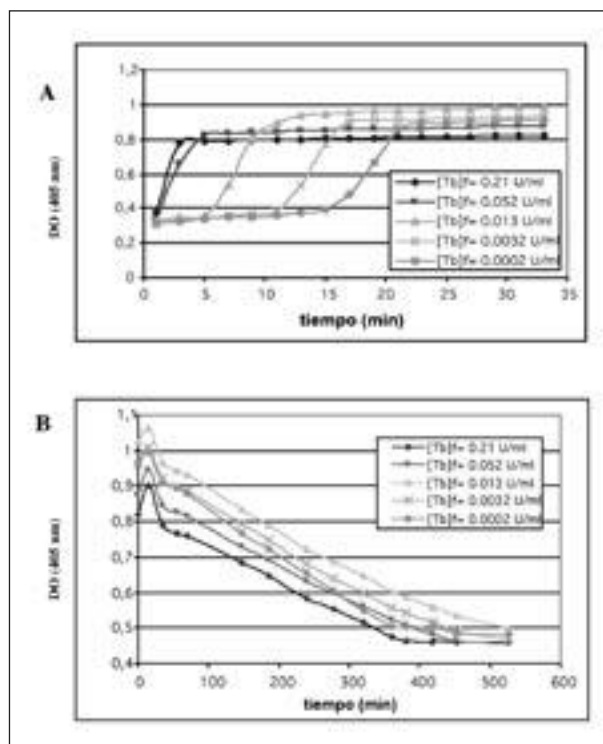


Figura 4. Ensayo de A) formación y B) lisis de fibrina obtenida con distintas concentraciones de trombina (ensayo en dos etapas).

ron las características de la fibrina de 100 jóvenes con enfermedad coronaria arterial prematura *versus* 100 controles con niveles hemostáticos semejantes<sup>15</sup>. La fibrina de estos pacientes comenzó a polimerizar antes que la de los controles, mostraron una estructura densa, menos permeable, formada por fibras más gruesas.

Por otra parte, la fibrina de 38 pacientes menores de 45 años con infarto de miocardio resultó más compacta, menos permeable, con fibras más gruesas. La función fibrinolítica deteriorada de estos pacientes fue asociada al aumento de la actividad plasmática de PAI-1 y a la estructura anormal de la fibrina<sup>16</sup>. Resultados semejantes se reportaron en un estudio de 33 pacientes post-infarto de miocardio<sup>17</sup> que mostraron, además, aumento de fibrinógeno plasmático, factor von Willebrand, PAI-1 y lipoproteína (a) comparados con 33 controles sanos. Además, la rigidez de la fibrina detectada en estos pacientes resultó un predictor independiente de la enfermedad arterial coronaria prematura y de hipofibrinólisis.

Los alelos Val 34 del F XIII y Aα312 Ala del Fbg están asociados a riesgo aterotrombótico, aunque estas relaciones no han sido explicadas por estudios clínicos y de laboratorio. Se relacionaron interacciones entre la estructura y función de la fi-

brina con polimorfismos de Fbg (A $\alpha$  Thr 312 Ala) y FXIII (Val 34 Leu), además de otros factores de riesgo cardiovascular, en 125 pacientes con accidente cerebrovascular (ACV)<sup>18</sup>. Se ha obtenido fibrina más compacta y menos permeable relacionada con la presencia de estos alelos que podrían explicar las asociaciones encontradas con el riesgo trombótico.

En nuestro laboratorio se estudió el efecto de altas concentraciones de homocisteína (Hcy: factor de riesgo independiente para enfermedad aterosclerótica) sobre distintas propiedades de la fibrina. El análisis cuantitativo de las imágenes obtenidas por microscopía electrónica demostraron que la Hcy produjo redes compactas y ramificadas, constituidas por fibras más cortas y gruesas que las del control<sup>19</sup>. Los geles de fibrina provenientes de fibrinógeno incubado con Hcy resultaron menos porosos, rígidos y más resistentes a la deformación por fuerza centrífuga.

Los tiempos de lisis de redes de fibrina obtenidos en presencia de Hcy resultaron prolongados cuando se utilizó activador del plasminógeno tipo urocinasa (u-PA). Sin embargo, el aminoácido no modificó la actividad biológica de plasmina, plasminógeno, ni de sus activadores. Por lo tanto, la lisis dificultada estaría asociada a la estructura de la fibrina alterada por la Hcy y no a la acción del aminoácido sobre los componentes fibrinolíticos evaluados<sup>20</sup>.

En síntesis, más allá de los detalles moleculares, la fibrina no es igual en cualquier circunstancia: puede variar por diferentes condiciones fisiológicas o estados patológicos, y sus características van a determinar su función y permanencia en circulación. Las alteraciones de la molécula de fibrinógeno pueden producir fibrina anormal, de diferente disolución, ya sea que permanezca tiempos prolongados en circulación induciendo la formación de otros trombos, o bien que se degrade anticipadamente produciendo riesgo hemorrágico. El aumento de calcio incrementa la rigidez y porosidad de la red.

La fibrina tiene una importante función como cofactor de la fibrinólisis. La activación del plasminógeno y la acción de la plasmina sobre la fibrina dependen de la estructura de la red. Las redes compactas son lisadas más lentamente, mientras que dentro del mismo gel las fibras delgadas son disueltas antes que las gruesas. Por otra parte, las fibras gruesas resultan mejor cofactor de la activación del plasminógeno.

Si bien se han hecho grandes avances en la comprensión de situaciones fisiopatológicas que producen diferente respuesta fibrinolítica fisiológica o inducida por fármacos, queda aún mucho por dilucidar.

## Bibliografía

- Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost*. 2005 Aug; 3(8):1894-904. Review.
- Medved L, Nieuwenhuizen W. Molecular mechanisms of initiation of fibrinolysis by fibrin. *Thromb Haemost* 2003; 89: 409-419.
- Blombäck B, Carlsson K, Hessel B, Liljeborg A, Procyk R and Aslund N. Native fibrin gel networks observed by 3 D microscopy, permeation and turbidity. *Biochim Biophys Acta* 1989; 997: 96-110.
- Collet JP, Park D, Lesty C, Soria J, Soria C, Montalescot G, et al. Influence of fibrin network conformation and fibrin fiber diameter on fibrinolysis speed. Dynamic and structural approaches by confocal microscopy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1354-1361.
- Weisel JW. Structure of fibrin: impact on clot stability. *J Thromb Haemost*. 2007 Jul;5 Suppl 1:116-24.
- Wu JH, Siddiqui K, Diamond S. Transport phenomena and clot dissolving therapy: an experimental investigation of diffusion-controlled and permeation-enhanced fibrinolysis. *Thromb Haemost* 1994; 72 (1): 105-12.
- Sugo T, Endo H, Matsuda M, Ohmori T, Madoiwa S, Mimuro J, Sakata Y. A classification of the fibrin network structures formed from the hereditary dysfibrinogens. *J Thromb Haemost*. 2006 Aug; 4(8): 1738-46.
- Blombäck B, Banerjee D, Carlsson K, Hamsten A, Hessel B, Procyk R, Silveira A, Zacharski L. Native fibrin gel networks and factors influencing their formation in health and disease. *Adv Exp Med Biol*. 1990; 281: 1-23.
- Siebenlist KR, Meh DA, Mosesson MW. Protransglutaminase (Factor XIII) Mediated Cross-linking of Fibrinogen and Fibrin. *Thromb Haemostasis* 2001; 86:1221-1228.
- Kolev K, Machovich R. Molecular and cellular modulation of fibrinolysis. *Thromb Haemost* 2003; 89: 610-21.
- Gabriel DA, Muga K, Boothroyd EM. The effect of fibrin structure in fibrinolysis. *J Biol Chem* 1992; 267: 24259-24263.
- Sabovic M, Blinc A. Biochemical and biophysical conditions for blood clot lysis. *Eur J Physiol* 2000; 440 [Suppl]: R134-R136.
- Jörneskog G, Egberg N, Fagrell B, Fatah K, Hassel B, Johnson H, et al. Altered properties of the fibrin gel structure in the patients with IDDM. *Diabetología* 1996; 39: 1519-1532.
- Yoshida Y, Shiiki H, Iwano M, Uyama H, Hamano K, Nishino T, Dohi K. Enhanced expression of plasminogen activator inhibitor 1 in patients with nephrotic syndrome. *Nephron*. 2001 May; 88(1):2 4-9.
- Mills JD, Ariens RA, Mansfield MW, Grant PJ. Altered fibrin clot structure in the healthy relatives of patients with premature coronary artery disease. *Circulation*. 2002 Oct 8; 106(15): 1938-42.
- Fatah K, Silveira A, Tornvall P, Karpe F, Blombäck M, Hamsten A. Proneness to formation of tight and rigid fibrin gel structures in men with myocardial infarction at a young age. *Thromb Haemost*. 1996 Oct; 76(4): 535-40.
- Collet JP, Allali Y, Lesty C, Tanguy ML, Silvain J, Ankri A, et al. Altered fibrin architecture is associated with hypofibrinolysis and premature coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Nov;26(11):2567-73.
- Lim BC, Ariens RA, Carter AM, Weisel JW, Grant PJ. Genetic regulation of fibrin structure and function: complex gene-environment interactions may modulate vascular risk. *Lancet*. 2003 Apr 26; 361(9367): 1424-31. Erratum in: *Lancet*. 2003 Jun;361(9376):2250
- Lauricella AM, Quintana I, Kordich L. Effect of homocysteine thiol group on fibrin networks: Another possible mechanism of harm. *Thrombosis Research* 2002, 107: 75-79.
- Lauricella AM, Quintana IL, Sassetti B, Castañón MM, Kordich LC. Influence of homocysteine on fibrin network lysis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2006; 17: 181-6.



# Terapia celular: de la investigación básica a la transfusión sanguínea

COORDINADORES: L. BLANCO. *Valladolid*  
P. ORTIZ. *Barcelona*

## Resumen del simposio

Aunque la terapia celular aparece en la literatura como un procedimiento terapéutico novedoso, la utilización de células como tratamiento en ciertas enfermedades es un hecho que se han planteado los científicos desde antiguo. Ya en el en el siglo XV, Paracelso hacía referencia a la utilización de células de la misma estirpe para curar enfermedades (“el corazón cura al corazón, el pulmón cura al pulmón, el bazo cura al bazo...; lo igual cura lo igual”).

La transfusión sanguínea es el primer procedimiento de terapia celular y también data de antiguo. Ya en 1667, J. B. Denis transfundió a un paciente enfermo mental sangre de un carnero, y desde entonces esta forma de terapia celular ha progresado y perfeccionado hasta convertirse hoy día en una práctica habitual.

El pasado siglo se intentó la infusión de células de otros tejidos. En el año 1912, Kuettner mantenía la teoría y ensayaba la posibilidad de cortar los órganos en pequeñas piezas e inyectarlos disueltos en solución salina, aunque fue unos años más tarde, en 1931, cuando Niehans puso en práctica esta teoría inyectando pequeños trocitos de paratiroides de buey disueltos en salino e inyectados a su vez a una paciente con hipoparatiroidismo grave. La paciente recuperó la función paratiroidea y vivió más de 30 años. Podemos decir que 1931 fue el año del nacimiento de la terapia celular tal y como la entendemos en la actualidad. Después del éxito del primer tratamiento, Niehans continuó experimentando con inyecciones de células vivas extraídas de otros órganos de animales sanos.

Fue también a principios del siglo XX cuando Alexander Maximov planteó su teoría sobre la existencia de células pluripotenciales circulantes que no sólo eran capaces de regenerar células iguales, sino que también podían regenerar células de otros órganos y tejidos.

En la segunda mitad del siglo XX, los estudios sobre progenitores hematopoyéticos, sobre todo en relación con los trasplantes, han sido clave para conocer el proceso de diferenciación celular y han sentado las bases de la terapia celular.

La diferenciación hematopoyética se produce durante el desarrollo embrionario y en el adulto bajo circunstancias de estimulación que inducen la aparición de células precursoras en diferentes estadios (*stem cells*, o células madre). Estas células son capaces de responder dividiéndose y madurando a células funcionales pudiendo regenerar medula ósea normal. Durante la división, la diferenciación y el desarrollo celular juegan un papel intercurrente numerosos factores extrínsecos como son las citocinas, los factores de crecimiento y las hormonas.

El hecho de que la transfusión sanguínea de glóbulos rojos está experimentando un incremento progresivo en los últimos años, junto a una estabilización en el número de donaciones de sangre, y, por otro lado, la idea de poder disponer de glóbulos rojos suficientes, sin riesgo de transmitir enfermedades infecciosas y con determinado grupo sanguíneo han dado lugar a la aplicación de los conocimientos sobre el origen de las células madre hematopoyéticas, sobre las señales que utiliza el embrión para generarlas y/o multiplicarlas y sobre cómo los afecta el microambiente medular, para mimetizar la eritropoyesis *ex vivo* y llegar a la producción de glóbulos rojos destinados a transfusión.

En este simposio, de rabiosa actualidad, profundizaremos en estos temas y en el estado actual de esta manufacturación de glóbulos rojos y los problemas que se deberán salvar, de la mano de grandes expertos en estas áreas.

## MECANISMOS QUE REGULAN LA GENERACIÓN DE CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS EN EL EMBRIÓN DE RATÓN: ¿QUÉ SE NECESITA PARA PRODUCIR CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS?

A. BIGAS SALVANS

Coordinadora del Grupo de Investigación en Células Madre y Cáncer. Programa de Investigación en Cáncer. IMIM-Hospital del Mar. Parc de Recerca Biomèdica. Barcelona

### Introducción

Las células madre hematopoyéticas son las responsables de la formación de células sanguíneas especializadas durante toda la vida. Para ello, estas células deben tener la capacidad de autorenovación, así como de diferenciación hacia los distintos tipos celulares. La capacidad de autorenovación indefinida es la que diferencia a estas células de los progenitores multipotentes. Históricamente se han desarrollado diversas técnicas para caracterizar y distinguir las células madre de otros precursores hematológicos indiferenciados. Actualmente, se considera que una célula madre hematopoyética es aquella que es capaz de reconstituir la hematopoyesis al ser transplantada a un organismo inmunodeprimido<sup>1</sup>. Estas células residen en la médula ósea de una persona adulta y se perpetúan mediante autoreplicación. Sin embargo, en algún momento debe existir un precursor a partir del cual las células madre del adulto se generan. Actualmente hay evidencias de que esta célula precursora existe, al menos, durante la vida embrionaria, ya que se ha demostrado que las células hematopoyéticas de un ratón adulto provienen de un precursor con características endoteliales (VE-cad+ aunque también Runx+) que se formó durante el desarrollo embrionario y que muy probablemente coincide con el denominado *hemangioblasto*<sup>2-5</sup>. Estas investigaciones son muy importantes para demostrar que el proceso de la hematopoyesis embrionaria esconde las claves para saber generar células madre hematopoyéticas con capacidad de formar todos los tipos de células hematológicas a largo plazo (Figura 1).

### Hematopoyesis primitiva en el saco vitelino

¿Qué sabemos sobre la hematopoyesis en el embrión humano? Al igual que en el ratón, hay una

primera etapa embrionaria que se caracteriza por la formación de algunos tipos de células sanguíneas, mayoritariamente eritrocitos y macrófagos. Este proceso tiene lugar durante un corto periodo de tiempo y se conoce como hematopoyesis primitiva. Estas células sanguíneas primitivas se originan en el saco vitelino, que es la estructura más externa de origen embrionario, probablemente para facilitar el acceso del oxígeno a los eritrocitos. Estas células serán las encargadas de distribuir oxígeno al embrión cuando éste haya crecido suficiente como para que no pueda conseguirlo por difusión celular. Esto ocurre a partir de los 21 días de desarrollo en el embrión humano (día 8,5 en ratón), que es cuando se establece la circulación entre el embrión y el saco vitelino mediante las arterias y venas vitelinas, y al mismo tiempo se observa la conexión entre el embrión y la placenta (mediante las arterias y venas umbilicales). Cuando estas conexiones se han establecido, las células hematopoyéticas primitivas originadas previamente en el saco embrionario están disponibles para circular hasta el embrión y cubrir las necesidades iniciales de oxígeno y nutrientes. El proceso de la hematopoyesis primitiva, aunque muy importante durante el desarrollo, es un proceso transitorio e independiente del que formará las células hematopoyéticas que mantendrán al

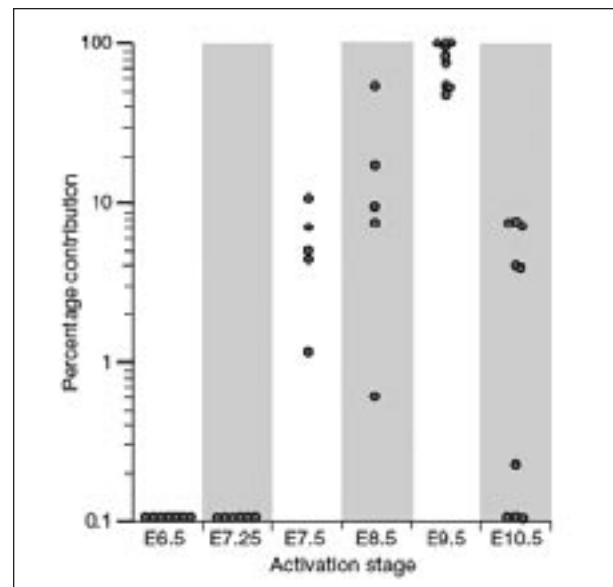


Figura 1. La gráfica muestra el porcentaje de células hematopoyéticas  $\beta$ -galactosidas+ en un ratón adulto que provienen de unos precursores marcados a distintos días de desarrollo embrionario (eje X, E6.5 a E10.5). Estos estudios demuestran que células Runx1+ marcadas genéticamente en un embrión de día 9.5 (aproximadamente) son precursoras del 100% de las células sanguíneas que se encuentran en el ratón adulto). Publicado por Samokhvalov et al., *Nature* 2007.

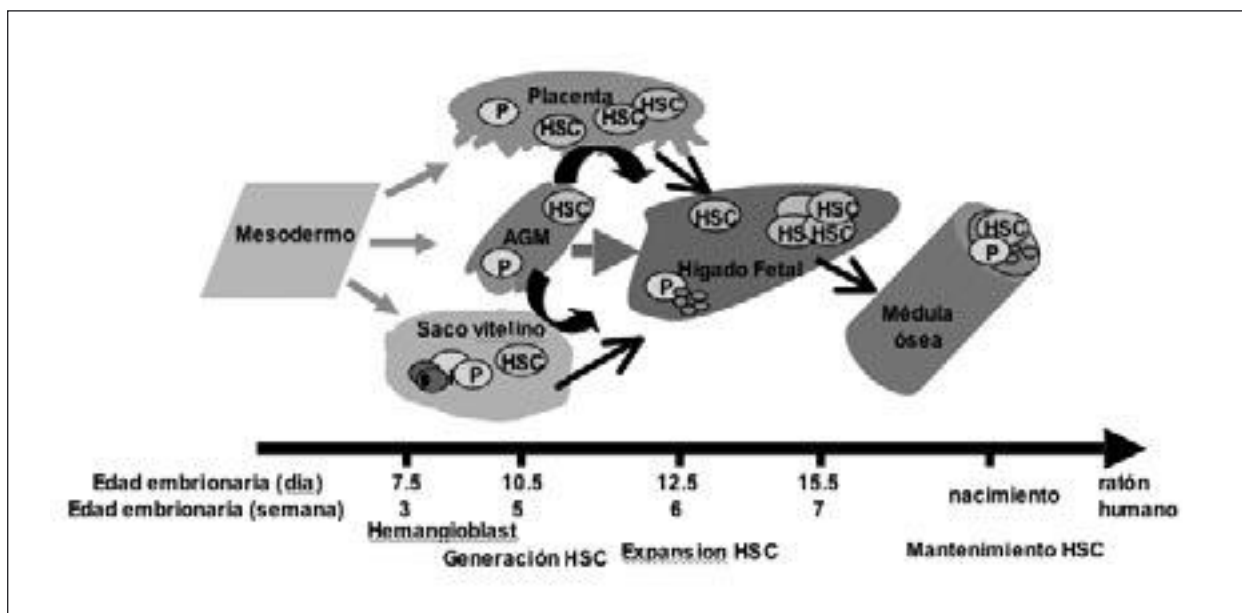


Figura 2. Representación de las distintas fases y nichos hematopoyéticos durante el desarrollo hematopoyético en el embrión de ratón y humano (a partir de Mikkola *et al.*,<sup>(12)</sup>). El proceso de formación de estas células se ha caracterizado en los últimos años gracias en parte al estudio de ratones mutantes que presentan alteraciones en las primeras etapas de la hematopoyesis. Asimismo, los embriones mutantes para genes como AML1/Runx1 o GATA2 entre otros, carecen de células hematopoyéticas capaces de reconstituir un organismo adulto<sup>(13,14)</sup>. Se considera que la expresión de estos genes es parcialmente responsable de la ejecución del programa hematopoyético.

organismo adulto. Más adelante, sin embargo, el saco embrionario puede tener capacidad para formar otras células que sean precursoras de las células madre adultas. Esta posibilidad está todavía en discusión<sup>5,6</sup>.

### Hematopoyesis definitiva durante el desarrollo embrionario

A partir de día 19 de desarrollo embrionario humano (día 10 en el ratón), en la región caudal de la aorta dorsal, donde se localiza la gónada y el mesonefros (AGM), se observan células hematopoyéticas indiferenciadas que, a diferencia de las células hematopoyéticas primitivas, tienen la capacidad de regenerar la hematopoyesis de forma permanente al ser trasplantadas a un ratón SCID irradiado<sup>7</sup>. Esta característica es la que identifica a las células madre hematopoyéticas y las primeras células de este tipo que se detectan en el embrión, se generan en esta región de la AGM, asociadas al endotelio de la aorta<sup>8</sup>. Últimamente, se ha descrito que simultáneamente se originan células de las mismas características en la placenta y en las arterias vitelinas y umbilicales, indicando que muy probablemente las condiciones para generar células madre hematopoyéticas se consiguen en diversas estructuras arteriales del embrión<sup>9,11</sup> (Figura 2).

### Vías de señalización molecular que regulan la formación de células madre hematopoyéticas en el embrión

Nuestro laboratorio está investigando el papel que algunas vías de señalización como Notch y Wnt tienen en el proceso de formación de las células madre hematopoyéticas. Como es lógico, los experimentos funcionales deben hacerse en ratón para después buscar las comparaciones en el caso de células humanas.

En estudios publicados recientemente hemos demostrado que la vía de Notch debe activarse para que las células hematopoyéticas de la aorta puedan formarse. Notch es una proteína que se encuentra en la membrana de muchas células y que interactúa con otras proteínas que se encuentran en células adyacentes (ligandos). Estas interacciones célula-célula tienen como resultado el procesamiento de Notch y su internacilización al núcleo de la célula donde funciona como factor de la transcripción. En el caso de la hematopoyesis embrionaria en la aorta, sabemos que Notch tiene que interactuar con Jagged1 para que se pueda formar hematopoyesis<sup>17</sup>.

Otra línea de investigación importante en el laboratorio consiste en identificar la función de la vía de señalización de Wnt que es importante en este proceso (Figura 3).

## Aplicaciones de la investigación embrionaria en la generación de tejido sanguíneo

La disponibilidad de células madre hematopoyéticas es actualmente el punto limitante para el trasplante hematológico de muchos enfermos sin donantes compatibles. En los últimos años, y gracias al desarrollo de los bancos de células de cordón umbilical, se ha aumentado ligeramente el número de donantes para ciertos tipos de trasplantes. Sin embargo, para mejorar esta situación de forma permanente, necesitamos investigar sobre nuevas fuentes de células madre. En este sentido, las células derivadas de células madre embrionarias (células ES, del inglés *embryonic stem*) representan una nueva expectativa a la solución de este problema. Hoy en día podemos generar muchos tipos celulares a partir de células madre embrionarias. Se han generado todos los tipos celulares hematopoyéticos, e incluso células que son capaces de reconstituir ratones inmunodeprimidos (SCID), indicando que el proceso de generar células madre hematopoyéticas a partir de estas células es posible<sup>18</sup>. Sin embargo, la reproducibilidad y eficiencia de este proceso hace que sea imposible pensar en su utilización terapéutica. En resumen, no se ha conseguido generar células madre hematopoyéticas de forma reproducible a partir de células madre embrionarias. Gran parte de este fracaso es debido a que no conocemos cómo se generan estas células, y para ello debemos estudiar cómo se hace en el embrión e intentar seguir los mismos pasos en el laboratorio (Figura 4).

### Problemas asociados a la hematopoyesis embrionaria: ¿dónde se generan las leucemias? ¿Existen células preleucémicas en el embrión?

Investigaciones recientes demuestran que existen algunas aberraciones cromosómicas asociadas a leucemias que se originan durante la fase fetal o embrionaria. Se ha observado que si un gemelo monoplacental desarrolla leucemia a una edad temprana (antes de los 4 años), el otro tiene más posibilidades de padecer ese mismo tipo de leucemia comparado con el resto de la población<sup>19</sup>. Además en pacientes que han desarrollado leucemias, se han encontrado en muestras de sangre obtenidas al nacer alteraciones genéticas asociadas a leucemias, indicando que estas alteraciones se han originado durante el periodo embrionario o

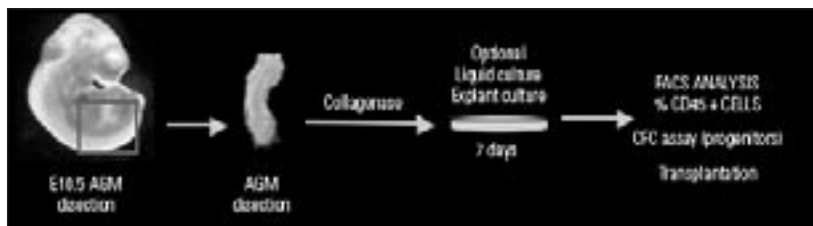


Figura 3. Protocolo experimental para analizar las células hematopoyéticas que se originan en la aorta de un embrión de ratón. Estas células, una vez obtenidas, se disgregan mediante incubación en colagenasa y se pueden trasplantar a ratones irradiados para estudiar las HSC.

fetal. Estos descubrimientos ponen de manifiesto la necesidad de controlar la seguridad de muestras de sangre de cordón umbilical al ser utilizadas para trasplante, muy especialmente en posibles casos de trasplantes autólogos para pacientes que han desarrollado leucemias.

### Conclusiones

- Las células madre hematopoyéticas se generan a partir de precursores endoteliales durante el periodo de desarrollo embrionario.
- Durante la etapa embrionaria distintos tejidos vasculares/arteriales tienen la capacidad de generar células madre hematopoyéticas incluida la arteria umbilical, vitelina, placenta y sobre todo la aorta dorsal. Investigar y conocer los mecanismos moleculares que utiliza el embrión para formar las células hematopoyéticas es un paso imprescindible para generar estas células en el laboratorio a partir de precursores o células embrionarias.

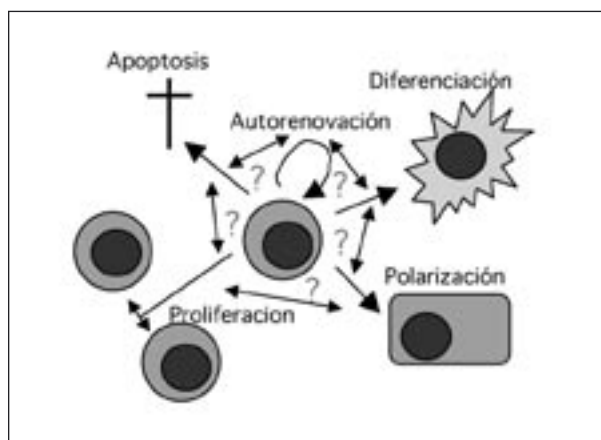


Figura 4. Diferentes procesos biológicos a los que pueden optar las células madre: autorreproducción, diferenciación, muerte celular o apoptosis, proliferación o migración.



## Agradecimientos

*Este grupo de investigación posee financiación del Ministerio de Innovación y Ciencia (SAF2007-60080) y Red de Cáncer (RETIC RD06/0020/0098).*

## Bibliografía

- Purton LE, Scadden DT. Limiting factors in murine hematopoietic stem cell assays. *Cell Stem Cell* 2007; 1 (3): 263-70.
- Lancrin C, et al. The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. *Nature* 2009; 457 (7231): 892-5.
- Chen MJ, Yokomizo T, Zeigler BM, Dzierzak E, Speck NA. Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter. *Nature* 2009; 457 (7231): 887-91.
- Eilken HM, Nishikawa S, Schroeder T. Continuous single-cell imaging of blood generation from haemogenic endothelium. *Nature* 2009; 457 (7231): 896-900.
- Samokhvalov IM, Samokhvalova NI, Nishikawa S. Cell tracing shows the contribution of the yolk sac to adult haematopoiesis. *Nature* 2007; 446 (7139): 1056-61.
- Moore MA, Metcalf D. Ontogeny of the haematopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br J Haematol* 1970; 18 (3): 279-96.
- Tavian M, Robin C, Coulombel L, Peault B. The human embryo, but not the yolk sac, generates lympho-myeloid stem cells: mapping multipotent hematopoietic cell fate in intra-embryonic mesoderm. *Immunity* 2001; 15 (3): 487-95.
- Medvinsky A, Dzierzak E. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 1996; 86: 897-906.
- Ottersbach K, Dzierzak E. The murine placenta contains hematopoietic stem cells within the vascular labyrinth region. *Dev Cell* 2005; 8 (3): 377-87.
- Gekas C, Dieterlen-Lievre F, Orkin SH, Mikkola HK. The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. *Dev Cell* 2005; 8 (3): 365-75.
- de Bruijn MF, et al. Definitive hematopoietic stem cells first develop within the major arterial regions of the mouse embryo. *Blood* 2000; 96 (8): 2902-4.
- Mikkola HK, Gekas C, Orkin SH, Dieterlen-Lievre F. Placenta as a site for hematopoietic stem cell development. *Exp Hematol* 2005; 33 (9): 1048-54.
- North TE, et al. Runx1 expression marks long-term repopulating hematopoietic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Immunity* 2002; 16 (5): 661-72.
- Ling KW, et al. GATA-2 plays two functionally distinct roles during the ontogeny of hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 2004; 200 (7): 871-82.
- de Bruijn MF, et al. Hematopoietic stem cells localize to the endothelial cell layer in the midgestation mouse aorta. *Immunity* 2002; 16 (5): 673-83.
- Tavian M, Peault B. The changing cellular environments of hematopoiesis in human development in utero. *Exp Hematol* 2005; 33 (9): 1062-9.
- Robert-Moreno A, et al. Impaired embryonic haematopoiesis yet normal arterial development in the absence of the Notch ligand Jagged1. *EMBO J* 2008; 27 (13): 1886-95.
- Ji J, et al. OP9 stroma augments survival of hematopoietic precursors and progenitors during hematopoietic differentiation from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2008; 26 (10): 2485-95.
- Greaves MF, Maia AT, Wiemels JL, Ford AM. Leukemia in twins: lessons in natural history. *Blood* 2003; 102 (7): 2321-33.

## BACK AND FORTH WITH THE STEM CELL NICHE: HOW RHO GTPASES CONTROL STEM CELL TRAFFICKING

J.A. CANCELAS

*Division of Experimental Hematology,  
Cincinnati Children's Research Foundation,  
University of Cincinnati Medical Center,  
Cincinnati (OH, USA)*

### Introduction

In adults, hematopoietic stem cells and progenitors (HSC/P) reside in the BM and are largely absent from PB<sup>1</sup>. HSC/P transplants are used to replace the endogenous hematopoiesis of patients in the treatment of cancer and some genetic disorders<sup>2-8</sup>. The success of stem cell transplants depends on the number and quality of HSC infused, a receptive host BM and, in the case of allogeneic transplants, on the immunotolerance of the recipient for the progeny engrafted stem cells.

While BM harvests were previously utilized to collect transplantable hematopoietic stem cells, current clinical practice mostly applies the biological phenomenon of HSC/P mobilization from the marrow into the peripheral blood (PB) to allow leukapheresis harvest<sup>9</sup>, as it does not require general anesthesia and is typically associated with shorter periods of post-pancytopenia<sup>8,10</sup>. Administration of cytokines, such as Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF)<sup>3</sup> or Stem Cell Factor (SCF)<sup>11</sup>, chemokine-receptor inhibitors (e.g. AMD3100)<sup>12</sup> and cytotoxic drugs (e.g. cyclophosphamide)<sup>3-7</sup> have been used clinically to increase the number of circulating HSC/P. A goal of PBSCT for hemato-oncological diseases is to optimize the number of HSC to ensure low levels of the morbidity and mortality associated with rescue in the myeloablative setting<sup>6,10</sup>. In addition, PBSC are ideal targets to be utilized in cell and gene therapies<sup>13</sup>. The administration of G-CSF is currently the major method for mobilization of HSC/P for clinical usage. However, over 40% of patients who have undergone intensive chemotherapy, and between 10% and 20% of all patients and normal individuals, fail to mobilize sufficient numbers of HSC/P for successful PBSCT<sup>9</sup>.

HSC homing and engraftment are crucial to successful transplantation, and clinical engraftment is severely compromised when donor-cell numbers are limited. For instance, the low number of HSC/P appears to limit the use of umbilical cord blood for transplantation of adult patients, where limited HSC dose appears to be associated with delayed engraftment and unacceptably high rates of graft failure<sup>14-18</sup>. Another

example is found in the current design of cell/gene therapy protocols, which require large amounts of HSC/P for *ex vivo* manipulation and subsequent reinfusion. The fact that chemotherapy-based protocols may be inadequate or unacceptable to mobilize stem cells in many immunodeficiencies and other non-malignant hematological diseases, makes the search for other methods of mobilization highly desirable. The current alternative is the use of cytokine-induced mobilization, but this is hampered by a high variability in the efficiency of mobilization<sup>9</sup>. Several investigators<sup>19-21</sup> have suggested that mobilized PB stem cells may also contribute to the generation of non-lymphohematopoietic tissues. While controversial<sup>22-24</sup>, these data, suggest potential additional therapeutic application of mobilized PBSC. Thus, increasing the HSC/P availability, by improving stem cell mobilization, and functional modifications of the HSC/P to facilitate their homing and engraftment abilities, might provide an answer to cases of absent or poor engraftment after HSC/P transplantation.

### Mechanisms of HSC/P Homing and Retention in bone marrow

Bone marrow engraftment in the context of HSC/P transplantation is based on the ability of intravenously administered cells to lodge in the medullary cavity and be retained in the appropriate marrow space, a process referred to as homing. It is hypothesized that homing is a multistep process, encompassing a sequence of highly regulated events that mimic the migration of leukocytes to inflammatory sites. This process includes a first phase of tethering and rolling of cells to the endothelium via E- and P-selectins, firm adhesion to the vessel wall via integrins, transendothelial migration, and chemotaxis through the extracellular matrix (ECM) to the endosteal space<sup>25-27</sup>. A second phase involves the interaction of specific HSC/P surface receptors, such as  $\alpha_4\beta_1$ -integrin receptor with stromal vascular-cell-cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and fibronectin in the ECM<sup>28</sup>. After intravenous infusion, HSC/P can be temporarily detected in other organs, such as liver, lung and kidneys, but disappear from these sites within 48 h after transplantation. In contrast, the retention of HSC/P in BM is sustained and appears specific. The factors that influence this specific retention have been studied recently and probably involve the interplay between chemokines, growth factors, proteolytic enzymes, and adhesion molecules<sup>29</sup>. Among the chemokines, CXCL12, also called Stromal Derived Factor-1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ ), and its receptor, CXCR4, play key roles in human HSC trafficking and repopulation<sup>30</sup>. CXCL12  $\alpha$  is expressed by both human

and murine BM endothelium and stroma<sup>31,32</sup> and is a powerful chemoattractant of HSC/P<sup>33,34</sup>. CXCL12 may also regulate survival of HSC/P<sup>35,36</sup>. CXCL12 induces the integrin-mediated firm arrest of human HPCs, facilitates their transendothelial migration<sup>27,31</sup>, regulates homing<sup>37</sup> and BM engraftment<sup>38</sup>. Furthermore, CXCL12 is also required for the retention of murine HSC/P within the BM<sup>39,40</sup>. A second factor critical for HSC/P survival and engraftment is SCF, the ligand for the receptor tyrosine kinase, c-kit, which is expressed on BM stromal cells. A transmembrane isoform of SCF, membrane-bound SCF (transmembrane, tm-SCF), has recently been shown to be critical in the lodgment and retention of HSC within the hematopoietic microenvironment, although it does not appear to play a role in the homing of transplanted cells to BM<sup>41</sup>. Integrin adhesion molecules also play important roles. Among them,  $\alpha_4\beta_1$ -integrin is probably the best characterized<sup>42-45</sup> and is discussed below.

### Mechanisms of HSC/P Mobilization and Trafficking

HSC/P mobilization is also a dynamic and complex process<sup>46-48</sup>. HSC/P must exit the stem cell niche in the BM, migrate through the marrow sinusoidal endothelium, and circulate in the blood. Circulating HSC/P and BM-adherent HSC/P appear to be interchangeable. It has been shown in parabiotic mice that HSC/P can leave their niche without induction, traffic through the bloodstream, and finally migrate into BM of the conjoined animal<sup>49-52</sup>. This suggests that HSC/P trafficking is a physiological phenomenon. If so, circulating HSC/P would be predicted to move into the BM microenvironment through transendothelial migration directed by chemoattractants, and finally anchor within the extravascular BM space where proliferation and differentiation occur. In this process, adhesion molecules, chemokine receptors and integrin signaling require signal integration that drives cytoskeleton rearrangements, gene transcription activation, cell survival and cell cycle activation.

At the molecular level, the interaction between CXCL12 and the G-coupled chemokine receptor CXCR4 has been recognized as pivotal in stem cell mobilization. As HSC/P are known to migrate towards a positive gradient of CXCL12<sup>53</sup>, it has been suggested that treatment with G-CSF, cyclophosphamide or interleukin (IL)-8 leads to a reduction of CXCL12 in BM, resulting in a positive gradient towards PB and induction of HSC/P migration towards PB. Raising the plasma levels of CXCL12, by intravenous injection of CXCL12-expressing adenovirus<sup>54</sup> or sulfated polysaccharides<sup>55</sup>, or by inhibition of the

CXCR4 receptor<sup>12,56,57</sup>, leads to mobilization of HSC/P. G-protein inhibition by pertussis toxin<sup>58</sup> induces a similar mobilization effect, probably by interfering with the CXCR4 signaling pathway.

Functional blocking of  $\alpha_4\beta_1$ -integrin (receptor for VCAM-1 and fibronectin) alone or together with  $\alpha_1\beta_2$ -integrins or the functional blocking of the  $\beta_2$  integrin LFA-1 (leukocyte function-associated antigen-1) by antibodies, results in mobilization of HSC/P<sup>59,60</sup>. HSC/P accumulate in the PB soon after gene deletion in inducible  $\alpha_4\beta_1$ -integrin deficient mice. Although their numbers gradually stabilize at a lower level, progenitor cell influx into the circulation continues at above-normal levels for more than 50 wks with a concomitant progressive accumulation of spleen HSC/P<sup>44</sup>.

Playing an important and independent role in HSC/P mobilization is the interaction between SCF and its receptor, c-kit. SCF/c-kit interaction plays a critical role in G-CSF-mediated mobilization<sup>61,62</sup>, and SCF in combination with G-CSF has been shown to enhance HSC/P mobilization<sup>63</sup>. As mentioned above, tm-SCF has been shown to be critical in retaining HSC/P in BM<sup>41</sup>.

A key observation is that Rac proteins, members of the RHO GTPase family of small, Ras-like molecules are downstream signaling components of all of these surface proteins ( $\beta_1$ -integrins, CXCR4 and c-kit) and thus represent a convergence of biochemical pathways critical for engraftment and mobilization<sup>64-66</sup>. Indeed, combined deficiency of Rac1 and Rac2 induces a striking mobilization of HSC/P into circulation while Rac1-deficiency is associated with engraftment failure in murine transplant models<sup>67</sup>.

### **RHO GTPases as Signal Integrators**

The signals involved in engraftment and mobilization drive cytoskeleton rearrangements, gene transcription activation, cell survival and cell cycle activation. In 1992, Ridley and Hall<sup>68,69</sup> reported that cytoskeleton rearrangements are controlled by members of the RHO GTPase family. The Rho family of small monomeric GTPases, members of the Ras superfamily, includes 22 genes coding for at least 25 proteins. Based on sequence identity, domain structure and function, the Rho proteins can be divided into 6 families, including: Rac, RhoA related proteins, Cdc42 group, TC10 and TCL, Rnd, the RhoBTB subset and the Miro subfamily (ref.). RHO proteins are molecular switches that cycle between inactive guanosine diphosphate (GDP)-bound and active guanosine triphosphate (GTP)-bound states. In the GTP-bound form, RHO proteins interact with their specific effector or target molecules to trigger diverse cellular responses. Activation of RHO GTPases is induced by a divers-

ty of Dbl-family guanine nucleotide exchange factors (GEFs)<sup>70</sup> that are activated by receptor-dependent kinases. Negative regulation of GTPases is achieved by acceleration of the intrinsic GTPase function of the Rho proteins by GTPase activating proteins (GAPs) or sequestering and stabilizing the inactive, GDP-bound state by GDP dissociation inhibitors (GDIs). In contrast to these regulatory mechanisms controlling most Rho GTPases, members of the RhoE subfamily, including the recently described hematopoietic-specific RhoH, have been demonstrated incapable of GTP hydrolysis and thus remain constitutively GTP-bound. These constitutively active GTPases are therefore, thought to be regulated on the transcriptional or post-translational level.

Members of the Rho GTPase family show high conservation (40 - 95%) at the amino acid level. The best studied members of this family are Rac1, RhoA and Cdc42. In fibroblasts and leucocytes, Rho activation induces the assembly of filamentous (F)-actin and myosin filaments (stress fibers), while Rac and Cdc42 promote the formation of surface protrusions and ruffling (lamellipodia) and finger-like membrane extensions (filopodia) respectively, both actin containing structures. Rho GTPase-induced F-actin assembly is accompanied by clustering of integrin receptors in membrane structures overlying the F-actin. In several cell systems, RHO GTPases thus integrate stimuli from the activation of tyrosine kinase receptors<sup>71,72</sup>, chemokine receptors<sup>73</sup> and integrin receptors<sup>74</sup>, which are key regulators of both homing and mobilization.

---

### **Rac RHO GTPases in HSC/P homing, retention and migration**

The Rac GTPase subfamily includes three highly homologous proteins: Rac1, Rac2 and Rac3. Rac1 is ubiquitously expressed while Rac2 is expressed only in hematopoietic cells<sup>75</sup>. Rac3 appears expressed in a variety of cell lines and appears to play an important role in myelopoiesis (ref.) and in the development of p190-BCR/ABL-dependent leukemogenesis<sup>76</sup>, but little is known about its expression in other primary tissues and its function in stem cells. Rac proteins play a major role in the development of lamellipodia and membrane ruffling and also activate a number of kinase pathways.

Many of the stimuli that have been shown crucial for HSC homing and retention, and specifically the interaction CXCL12 $\alpha$ /CXCR4, signal through Rac RHO GTPases. The first observations were based on the use of very unspecific tools that affected different Rac RHO GTPases. The high level of homology among RHO GTPases and the resultant lack of discriminating tools, such as specific antibodies, did not

allow a conventional analysis of the differential role of Rac proteins.

Nishita *et al.* showed that CXCL12 activates Rac1 and Cdc42 in Jurkat T cells in a pertussis toxin (PTX)-sensitive fashion, whereas RhoA activation was PTX-insensitive (88), which suggested specific signaling via Gi proteins toward Rac and Cdc42, but not to RhoA. Specifically in HSC/P, Whetton *et al.*, based on the use of Clostridium difficile toxin B (an inactivator of Rho, Rac and Cdc42) and the use of a downstream inhibitor of RhoA, showed that the migratory potential of primitive hematopoietic cells is lower than compared to more mature hematopoietic cells<sup>77</sup> and that this migration can be boosted by stimulating the cells with lysophospholipids (lysophosphatidic acid, sphingosine-1-phosphate) in combination with CXCL12 and that Rho GTPases were implicated in their signaling. We have observed that either Rac1 or Rac2-deficiencies substantiate a migration impairment of hematopoietic stem cells through CXCL12 gradients<sup>67,78</sup>. Interestingly, the deficiency of Vav-1 (a hematopoietic-specific Rac GEF, but able to activate both Rac1 and Rac2) induces a severe migration impairment through a CXCL12 $\alpha$  gradient and in T cells appears to have a pivotal role in the transmission of signals from the CXCR4 receptor<sup>79</sup>.

Specifically, Rac Rho GTPases in HSC/P constitute an example of homologous proteins, which share some functions but are completely specific for other cell-specific relevant functions. Our group has devoted a special emphasis over the past years to specifically analyze the differential role in genetically targeted animals of the very homologous Rac1 and Rac2 GTPases in migration and homing of hematopoietic cells. By using genetically targeted mice and hematopoietic reconstitution models, we have been able to delineate some of the specific functions of Rac1 and Rac2 in HSC/P, as well as in more mature hematopoietic cells, including B cells<sup>80,81</sup>, T cells<sup>81,82</sup>, mast cells<sup>83-85</sup>, eosinophils<sup>86</sup> and platelets<sup>87</sup>.

An example of well-studied Rac-dependent functions is Rac2 in neutrophils. We were able to show that Rac2-deficient mice displayed an impaired host defense with diminished L-selectin mediated tethering, reduced chemotaxis through formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fmlp) gradients and reduced actin polymerization and oxidative burst that correlated with low activation levels of mitogen-activated protein kinases (MAPK)<sup>88</sup>. Mutational analysis of a patient with phagocytic immunodeficiency allowed us and others to identify a mutation in the Rac2 gene (D57N) resulting in expression of a dominant-negative version of the Rac2 protein<sup>89,90</sup>. This patient suffered this disease despite normal activation of Rac1. Rac2-deficient mice display neutrophilia but normal myeloid progenitor proliferation *in vitro*.

From our studies, it has become clear that effects of Rac1 or Rac2 deficiencies are in many cases due to specific defects, rather than to an overall reduction of Rac levels. These differences may be due to either differential GEF-dependent activation or specific intracellular localization. In myeloid cells, specificity of function of Rac1 versus Rac2 maps to the carboxy-terminus and the regulation of intracellular GTPase localization<sup>91</sup> which may be dependent on interaction with other proteins.

In HSC/P, non-specific Rac dominant-negative mutant expression induces a HSC engraftment defect<sup>92</sup>. A detailed study of the stem cell compartment in Rac2<sup>-/-</sup> mice allowed us to observe that Rac2-deficient HSC show normal short-term engraftment but display an abnormal interaction of HSC with the hematopoietic microenvironment, which leads to defective hematopoiesis in quantitative cobblestone-area forming cell (CAFC) assays and long-term engraftment assays<sup>93</sup>. At the same time, mimicking the phenotype of  $\alpha 4$  deletion or anti- $\alpha 4$  antibody administration<sup>44,94</sup>, Rac2-deficient mice displayed an increased pool of circulating HSC/P (around 2-3 fold), which suggested that Rac2 is required to retain cells in the bone marrow microenvironment and this effect may be specifically dependent on  $\alpha_4\beta_1$ -integrin-mediated adhesion to fibronectin but not on  $\alpha_5\beta_1$ -integrin. Hypermotility of Rac2-deficient HSC/P appeared to be due to an unbalanced compensatory activation of Rac1 and Cdc42 and increased F-actin polymerization following CXCL12 $\alpha$  activation<sup>78</sup>.

We have recently approached to the analysis of the specific role of Rac1 in stem cell homing and migration. Rac1<sup>-/-</sup> HSC are incapable of short term engraftment and demonstrate reduced *in vitro* growth associated with impaired growth factor-stimulated p27<sup>kip1</sup> down-regulation and Cyclin D1 induction<sup>67</sup>, while Rac2<sup>-/-</sup> HSC, as mentioned earlier, show normal short-term engraftment but demonstrate defective growth factor rescue of apoptosis *in vitro*. The basis of the severe engraftment defect of Rac1<sup>-/-</sup> HSC appears to be related to a homing/microlocalization defect in the bone marrow cavity for primitive CAFC and selected HSC/P *in vivo*<sup>95</sup>, which correlates with the finding that signaling pathways downstream of the receptor tyrosine c-kit, the chemokine receptor CXCR4 and  $\beta 1$  integrins, previously implicated in lodging and engraftment<sup>31,41,42</sup> are defective in Rac-deficient HSC/P *in vitro*<sup>64-66</sup>. Importantly, the combination of defects in these two pathways contributes to the profound defect in growth *in vitro* and *in vivo* seen in Rac1<sup>-/-</sup>; Rac2<sup>-/-</sup> HSCs and their massive egress from bone marrow to peripheral blood<sup>67,95</sup>. This is likely due to strongly reduced mediated adhesion in the Rac1<sup>-/-</sup>/Rac2<sup>-/-</sup> cells. Single deficiency of Rac1 or Rac2 leads to impaired *in vitro* migration to-



ward CXCL12 $\alpha$ , a response that is further reduced when both GTPases are absent, indicating that for migration, these GTPases are partially redundant. Reintroduction of Rac1 expression in circulating double Rac1/Rac2-deficient HSC/P allows their engraftment in lethally irradiated recipients<sup>95</sup>. In addition, we have shown that the reversible inhibition of Rac activation by a novel, rationally designed small molecule (NSC23766) which had been designed to interfere the binding between Rac proteins and several GEFs<sup>96</sup> induces HSC/P mobilization in a “poor-mobilizer” murine model that correlates in time and fashion with p21-activated kinase inhibition<sup>95</sup>.

An example of applicability of Rac targeting is Fanconi anemia (FA). FA is an inherited disorder characterized by early-onset progressive bone marrow (BM) failure, congenital abnormalities and predisposition towards cancer<sup>97</sup>. FA group A is the predominant complementation group (>60% of all diagnosed FA patients). The only curative therapy currently available is allogeneic stem cell transplantation from a non-affected donor. Unfortunately, the availability of unaffected sibling donors is low for the majority of patients and the disease-free survival rate for transplant using a matched unrelated donor is not optimal, ranging from 15 to 67%<sup>98,99</sup>. Since many children with FA are diagnosed prior to the onset of severe pancytopenia<sup>100</sup> a possible novel experimental therapy could use autologous hematopoietic stem cells (HSC) prior to BM failure, for corrective molecular intervention. Studies which examine the feasibility of collecting HSC/P have shown that stem cell mobilization using granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) is not robust in mice<sup>101</sup>, or in FA patients which may require prolonged periods of daily apheresis procedures to obtain clinically relevant numbers of HSC<sup>102,103</sup>. Xenogeneic homing of FA patient BM progenitors appears decreased<sup>104</sup>. FA-A cells also showed defects in both cell-cell and cell-matrix adhesion. Complementation of FA-A deficiency by reexpression of *FANCA* readily restored adhesion of FA-A cells. A significant decrease in the activity of the Rho GTPase Cdc42 was found associated with these defective functions in patient-derived cells, and expression of a constitutively active Cdc42 mutant was able to rescue the adhesion defect of FA-A cells. Interestingly, inhibition of Rac GTPases by *in vivo* administration of the small molecule NSC23766 is able to rescue part of the progenitor mobilization failure of FA-A cells in a murine model of HSC/P mobilization induced by G-CSF<sup>105</sup>.

Although outside the scope of this review, the role of Rac activation in distinct stem cell-initiated and how Rac targeting may impair the pathogenesis in distinct stem cell-initiated diseases, like chronic myelogenous leukemia and MLL-rearranged acute myelogenous leukemia<sup>106-109</sup> has been demonstrated.

## Other RHO GTPases and their crosstalk with Rac in HSC/P homing and migration

Much less is known about the role of other RHO GTPases in HSC/P homing and migration. Cross-talk among different small RhoGTPases and Ras members would explain the role of these proteins in apparently contradictory functions<sup>110</sup>. In fibroblasts, introduction of constitutive active or dominant negative mutants of Cdc42, Rac and RhoA were shown to effect activation or inhibition of each other. Growth factor receptor induced activation of Cdc42 has been shown to activate Rac, which in turn stimulates Rho activity resulting in cytoskeletal remodeling.

Overexpression of Cdc42-activating or dominant-negative mutants in fibroblasts have shown that Cdc42 plays an essential role in cell-growth control by regulating G<sub>1</sub>-S cell-cycle transition<sup>111,112</sup>. In embryonic stem cells, however, gene targeting of Cdc42 did not affect cell growth or replication<sup>113</sup>. Recently, Wang *et al.*<sup>114</sup> have shown in a gain-of-function model for Cdc42 (Cdc42GAP<sup>-/-</sup>), that hyperactivation of Cdc42 induces anemia with a significant reduction in fetal liver and bone marrow cellularity, decreased erythroid/myeloid progenitor content and decreased HSC/P content. The decrease in HSC/P number was associated with increased apoptosis of the Cdc42GAP<sup>-/-</sup> HSC/Ps and activation of JNK-mediated apoptotic machinery, showing impaired cortical F-actin assembly, deficiency in adhesion and migration, and defective short- and long-term competitive repopulation ability. The mechanism of how gain-of-function of Cdc42 induces a hematopoietic impairment is not clear yet. HSC from Cdc42<sup>-/-</sup> mice also show defective migration and adhesion, which is associated with abnormal F-actin assembly, homing, and engraftment/retention in the BM. Cdc42<sup>-/-</sup> mice show increased numbers of circulating HSC and developmental abnormalities in myelopoiesis and erythropoiesis<sup>115,116</sup>. Interestingly, HSC aging has also been related to Cdc42 activity. Adhesion of HSC to the hematopoietic microenvironment appears to be reduced while G-CSF-induced mobilization is increased in aged HSC compared with young HSCs and this difference may be, at least partly, a consequence of the increased activity of the small Rho GTPase Cdc42 in aged HSCs<sup>117</sup>.

The RhoA subfamily members when overexpressed as activated proteins contribute to contractility and formation of stress fibers and focal adhesions, which are mainly responsible for strong attachment to the underlying extracellular matrix. Different Rho proteins have been associated with different proliferation effects. While RhoA and RhoC are usually growth-promoting, RhoB inhibits cell growth<sup>118,119</sup> and has been shown to be downregulated in cancer cells<sup>120</sup>. In some cells, including hematopoietic cells,

Rac and Rho GTPases provide inhibitory crosstalk in these functions. In fact, Ras-induced membrane ruffling due to activation of Rac leads subsequently to formation of stress fibers in a Rho-dependent fashion<sup>121</sup>. These observations delineated a signaling pathway where activated Rac induced Rho activation.

RhoA leads to stress fiber formation and cell shape changes, although most of these studies have been performed on fibroblasts. In fibroblasts, activation of RhoA has been reported to decrease the expression of Cdk inhibitors and to shorten G1<sup>122</sup>. Using the same cell types, inactivation of RhoA has been shown to induce the expression of cyclin D–Cdk4 complexes in early G1 phase and promote a rapid G1/S phase transition<sup>123,124</sup>.

Transforming growth factor- $\beta$ -induced activation of RhoA has been shown in mammary cells to stimulate the nuclear translocation of p160 ROCK, a known target of RhoA, which results in cell cycle arrest by decreasing the activity of Cdc25A phosphatase and decreasing Rb phosphorylation<sup>125</sup>. Therefore, the effect of RhoA GTPase activity on cell cycle and proliferation appears both cell type and agonist specific. In contrast with the published role of RhoA in fate determination and differentiation in mesenchymal stem cells<sup>126</sup>, inhibition of RhoA activity through expression of the dominant negative mutant RhoAN19 via retrovirus-mediated gene transfer was associated with a significant enhancement of HSC engraftment and reconstitution *in vivo*<sup>127</sup>. Increased engraftment of HSC expressing RhoAN19 was associated with increased cyclin D1 expression and enhanced proliferation and cell cycle progression of hematopoietic progenitor cells *in vitro*, despite this enhanced engraftment *in vivo*. Consistent with studies reported in fibroblast cells<sup>128</sup>, RhoA was essential for normal adhesion and migration of hematopoietic progenitor cells *in vitro*. Decreased activity of RhoA GTPase resulted in defective  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 and  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrin mediated adhesion and impaired CXCL12-directed migration of hematopoietic progenitor cells *in vitro*. These results are surprising given the role of adhesion and migration in HSC engraftment. Taken together, these data suggest that RhoA GTPase plays a crucial role in HSC engraftment, although the mechanism of enhanced engraftment seen with expression of the DN RhoA protein is unclear. In the context of previous reports describing Rac GTPase function in HSC<sup>67,95</sup>, these studies suggest that inhibition in Rac activity may enhance mobilization, whereas inhibition of RhoA may augment HSC engraftment.

A distinct type of Rho proteins is constituted by RhoH. RhoH is a hematopoietic-specific, GTPase-deficient member of the Rho GTPase family. RhoH has been shown to modulate Rac signaling<sup>129-131</sup>. The biochemical clue on how RhoH antagonizes Rac came

from studies in primary HSC/P, where RhoH deletion leads to increased chemotaxis and chemokinesis towards the chemoattractant CXCL12. This hypermigratory response is due to increased Rac1 activity and translocation of Rac1 protein to the cell membrane, where it colocalizes with cortical F-actin and lipid rafts. Expression of a Rac dominant-negative mutant inhibits the cortical F-actin assembly and chemotaxis of wild-type and RhoH-deficient HSC/P to the same extent. Conversely, overexpression of RhoH in HSC/P blocks the membrane translocation of Rac1 and impairs cortical F-actin assembly and chemotaxis in response to CXCL12 stimulation. At a molecular level, subcellular localization and inhibitory function of RhoH in HSC/P appear to be regulated by C-terminal motifs, including a CKIF prenylation site, required for specific membrane localization where targets Rac<sup>129</sup>.

In summary, Rho GTPases play a crucial role in the integration and modulation of signals from cortical receptors, specifically chemokine receptor CXCR4, c-kit and  $\beta$ 1-integrins, and the analysis of their specific functions may help us to delineate specific pathways and molecular targets for pharmacologic intervention in stem cell and gene therapy.

## References

- Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1995; 11: 35-71.
- Breems DA, van Hennik PB, Kusadasi N, et al. Individual stem cell quality in leukapheresis products is related to the number of mobilized stem cells. *Blood.* 1996; 87: 5370-5378.
- Cancelas JA, Hernandez-Jodra M, Zamora C, et al. Circulating stem cell collection in lymphoma and myeloma after mobilization with cyclophosphamide and granulocyte colony-stimulating factor for autologous transplantation. *Vox Sang.* 1994; 67: 362-367.
- Boque C, Petit J, Sarra J, et al. Mobilization of peripheral stem cells with intensive chemotherapy (ICE regimen) and G-CSF in chronic myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 1996; 18: 879-884.
- Martinez C, Sureda A, Martino R, et al. Efficient peripheral blood stem cell mobilization with low-dose G-CSF (50 microg/m2) after salvage chemotherapy for lymphoma. *Bone Marrow Transplant.* 1997; 20: 855-858.
- Cancelas JA, Querol S, Canals C, et al. Peripheral blood CD34+ cell immunomagnetic selection in breast cancer patients: effect on hematopoietic progenitor content and hematologic recovery after high-dose chemotherapy and autotransplantation. *Transfusion.* 1998; 38: 1063-1070.
- Petit J, Boque C, Cancelas JA, et al. Feasibility of ESHAP + G-CSF as peripheral blood hematopoietic progenitor cell mobilisation regimen in resistant and relapsed lymphoma: a single-center study of 22 patients. *Leuk Lymphoma.* 1999; 34: 119-127.
- Salazar R, Sola C, Maroto P, et al. Infectious complications in 126 patients treated with high-dose chemotherapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1999; 23: 27-33.

9. Kessinger A, Sharp JG. The whys and hows of hematopoietic progenitor and stem cell mobilization. *Bone Marrow Transplant.* 2003; 31: 319-329.
10. Sola C, Maroto P, Salazar R, et al. Bone Marrow Transplantation: Prognostic Factors of Peripheral Blood Stem Cell Mobilization with Cyclophosphamide and Filgrastim (r-metHuG-CSF): The CD34+ Cell Dose Positively Affects the Time to Hematopoietic Recovery and Supportive Requirements after High-Dose Chemotherapy. *Hematol.* 1999; 4: 195-209.
11. Briddell RA, Hartley CA, Smith KA, McNiece IK. Recombinant rat stem cell factor synergizes with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in vivo in mice to mobilize peripheral blood progenitor cells that have enhanced repopulating potential. *Blood.* 1993; 82: 1720-1723.
12. 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: 1095-1102.
13. Graham RM, Bishopric NH, Webster KA. Gene and cell therapy for heart disease. *IUBMB Life.* 2002; 54: 59-66.
14. Wagner JE, Broxmeyer HE, Byrd RL, et al. Transplantation of umbilical cord blood after myeloablative therapy: analysis of engraftment. *Blood.* 1992; 79: 1874-1881.
15. Wagner JE, Barker JN, DeFor TE, et al. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood.* 2002; 100: 1611-1618.
16. Gluckman E, Locatelli F. Umbilical cord blood transplants. *Curr Opin Hematol.* 2000; 7: 353-357.
17. Gluckman E, Rocha V, Chevret S. Results of unrelated umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. *Rev Clin Exp Hematol.* 2001; 5: 87-99.
18. Gluckman E. Current status of umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol.* 2000; 28: 1197-1205.
19. Yeh ET, Zhang S, Wu HD, Korbling M, Willerson JT, Estrov Z. Transdifferentiation of human peripheral blood CD34+ enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells in vivo. *Circulation.* 2003; 108: 2070-2073.
20. Korbling M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N Engl J Med.* 2003; 349: 570-582.
21. Hennessy B, Korbling M, Estrov Z. Circulating stem cells and tissue repair. *Panminerva Med.* 2004; 46: 1-11.
22. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature.* 2004; 428: 668-673.
23. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature.* 2004; 428: 664-668.
24. Andrew E, Arai FS, Kwabena O, Agyeman, Robert Hoyt, bandana Sachdev, Xu-Xi Yu, Hong San, Mark Metzger, Cynthia Dunbar and Donald Orlic. Lack of benefit from cytokine mobilized stem cell therapy for acute myocardial infarction in nonhuman primates. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 41: 335.
25. Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science.* 1996; 272: 60-66.
26. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 1994; 76: 301-314.
27. Peled A, Kollet O, Ponomaryov T, et al. The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood.* 2000; 95: 3289-3296.
28. Williams DA, Rios M, Stephens C, Patel VP. Fibronectin and VLA-4 in haematopoietic stem cell-microenvironment interactions. *Nature.* 1991; 352: 438-441.
29. Papayannopoulou T. Bone marrow homing: the players, the playground, and their evolving roles. *Curr Opin Hematol.* 2003; 10: 214-219.
30. Lapidot T, Kollet O. The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. *Leukemia.* 2002; 16: 1992-2003.
31. Peled A, Grabovsky V, Habler L, et al. The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow. *J Clin Invest.* 1999; 104: 1199-1211.
32. Nagasawa T, Tachibana K, Kishimoto T. A novel CXC chemokine PBSF/SDF-1 and its receptor CXCR4: their functions in development, hematopoiesis and HIV infection. *Semin Immunol.* 1998; 10: 179-185.
33. Wright DE, Bowman EP, Wagers AJ, Butcher EC, Weissman IL. Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines. *J Exp Med.* 2002; 195: 1145-1154.
34. Aiuti A, Webb JJ, Bleul C, Springer T, Gutierrez-Ramos JC. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med.* 1997; 185: 111-120.
35. Lataillade JJ, Clay D, Dupuy C, et al. Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34(+) cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival. *Blood.* 2000; 95: 756-768.
36. Broxmeyer HE, Kohli L, Kim CH, et al. Stromal cell-derived factor-1/CXCL12 directly enhances survival/antiapoptosis of myeloid progenitor cells through CXCR4 and G(alpha)i proteins and enhances engraftment of competitive, repopulating stem cells. *J Leukoc Biol.* 2003; 73: 630-638.
37. Kollet O, Spiegel A, Peled A, et al. Rapid and efficient homing of human CD34(+)/CD38(-/low)CXCR4(+) stem and progenitor cells to the bone marrow and spleen of NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. *Blood.* 2001; 97: 3283-3291.
38. Peled A, Petit I, Kollet O, et al. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science.* 1999; 283: 845-848.
39. Ma Q, Jones D, Springer TA. The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment. *Immunity.* 1999; 10: 463-471.
40. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature.* 1996; 382: 635-638.
41. Driessen RL, Johnston HM, Nilsson SK. Membrane-bound stem cell factor is a key regulator in the initial lodgment of stem cells within the endosteal marrow region. *Exp Hematol.* 2003; 31: 1284-1291.
42. Papayannopoulou T, Craddock C, Nakamoto B, Priestley GV, Wolf NS. The VLA4/VCAM-1 adhesion pathway defines contrasting mechanisms of lodgment of transplanted murine hemopoietic progenitors between bone marrow and spleen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92: 9647-9651.
43. Papayannopoulou T, Craddock C. Homing and trafficking of hemopoietic progenitor cells. *Acta Haematol.* 1997; 97: 97-104.
44. Scott LM, Priestley GV, Papayannopoulou T. Deletion of alpha4 integrins from adult hematopoietic cells reveals roles in homeostasis, regeneration, and homing. *Mol Cell Biol.* 2003; 23: 9349-9360.
45. Papayannopoulou T, Priestley GV, Nakamoto B, Zafirooulos V, Scott LM. Molecular pathways in bone marrow homing



- ing: dominant role of alpha(4)beta(1) over beta(2)-integrins and selectins. *Blood*. 2001; 98: 2403-2411.
46. Thomas J, Liu F, Link DC. Mechanisms of mobilization of hematopoietic progenitors with granulocyte colony-stimulating factor. *Curr Opin Hematol*. 2002; 9: 183-189.
  47. Rafii S, Heissig B, Hattori K. Efficient mobilization and recruitment of marrow-derived endothelial and hematopoietic stem cells by adenoviral vectors expressing angiogenic factors. *Gene Ther*. 2002; 9: 631-641.
  48. Kronenwett R, Martin S, Haas R. The role of cytokines and adhesion molecules for mobilization of peripheral blood stem cells. *Stem Cells*. 2000; 18: 320-330.
  49. Wang J, Kimura T, Asada R, et al. SCID-repopulating cell activity of human cord blood-derived CD34+ cells assured by intra-bone marrow injection. *Blood*. 2003; 101: 2924-2931.
  50. Wright DE, Wagers AJ, Gulati AP, Johnson FL, Weissman IL. Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science*. 2001; 294: 1933-1936.
  51. Warren S, Chute RN, Farrington EM. Protection of the hematopoietic system by parabiosis. *Laboratory Investigation*. 1960; 9: 191-198.
  52. Abkowitz JL, Robinson AE, Kale S, Long MW, Chen J. The mobilization of hematopoietic stem cells during homeostasis and after cytokine exposure. *Blood*. 2003.
  53. Sweeney EA, Papayannopoulou T. Increase in circulating SDF-1 after treatment with sulfated glycans. The role of SDF-1 in mobilization. *Ann N Y Acad Sci*. 2001; 938: 48-52; discussion 52-43.
  54. Hattori K, Heissig B, Tashiro K, et al. Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood*. 2001; 97: 3354-3360.
  55. Sweeney EA, Lortat-Jacob H, Priestley GV, Nakamoto B, Papayannopoulou T. Sulfated polysaccharides increase plasma levels of SDF-1 in monkeys and mice: involvement in mobilization of stem/progenitor cells. *Blood*. 2002; 99: 44-51.
  56. Tavor S, Petit I, Porozov S, et al. CXCR4 regulates migration and development of human acute myelogenous leukemia stem cells in transplanted NOD/SCID mice. *Cancer Res*. 2004; 64: 2817-2824.
  57. Liles WC, Broxmeyer HE, Rodger E, et al. Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Blood*. 2003; 102: 2728-2730.
  58. Papayannopoulou T, Priestley GV, Bonig H, Nakamoto B. The role of G-protein signaling in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Blood*. 2003; 101: 4739-4747.
  59. Papayannopoulou T, Priestley GV, Nakamoto B, Zafiropoulos V, Scott LM, Harlan JM. Synergistic mobilization of hemopoietic progenitor cells using concurrent beta1 and beta2 integrin blockade or beta2-deficient mice. *Blood*. 2001; 97: 1282-1288.
  60. Craddock CF, Nakamoto B, Andrews RG, Priestley GV, Papayannopoulou T. Antibodies to VLA4 integrin mobilize long-term repopulating cells and augment cytokine-induced mobilization in primates and mice. *Blood*. 1997; 90: 4779-4788.
  61. Heissig B, Hattori K, Dias S, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*. 2002; 109: 625-637.
  62. Levesque JP, Hendy J, Winkler IG, Takamatsu Y, Simmons PJ. Granulocyte colony-stimulating factor induces the release in the bone marrow of proteases that cleave c-KIT receptor (CD117) from the surface of hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol*. 2003; 31: 109-117.
  63. McNiece IK, Briddell RA. Stem cell factor. *J Leukoc Biol*. 1995; 58: 14-22.
  64. Miao H, Li S, Hu YL, et al. Differential regulation of Rho GTPases by beta1 and beta3 integrins: the role of an extracellular domain of integrin in intracellular signaling. *J Cell Sci*. 2002; 115: 2199-2206.
  65. Nishita M, Aizawa H, Mizuno K. Stromal cell-derived factor 1alpha activates LIM kinase 1 and induces cofilin phosphorylation for T-cell chemotaxis. *Mol Cell Biol*. 2002; 22: 774-783.
  66. Taylor ML, Metcalfe DD. Kit signal transduction. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2000; 14: 517-535.
  67. Gu Y, Filippi MD, Cancelas JA, et al. Hematopoietic cell regulation by Rac1 and Rac2 guanosine triphosphatases. *Science*. 2003; 302: 445-449.
  68. Ridley AJ, Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*. 1992; 70: 389-399.
  69. Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*. 1992; 70: 401-410.
  70. Zheng Y. Dbl family guanine nucleotide exchange factors. *Trends Biochem Sci*. 2001; 26: 724-732.
  71. Timokhina I, Kissel H, Stella G, Besmer P. Kit signaling through PI 3-kinase and Src kinase pathways: an essential role for Rac1 and JNK activation in mast cell proliferation. *Embo J*. 1998; 17: 6250-6262.
  72. Taylor ML, Metcalfe DD. Kit signal transduction. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2000; 14: 517-535.
  73. del Pozo MA, Vicente-Manzanares M, Tejedor R, Serrador JM, Sanchez-Madrid F. Rho GTPases control migration and polarization of adhesion molecules and cytoskeletal ERM components in T lymphocytes. *Eur J Immunol*. 1999; 29: 3609-3620.
  74. del Pozo MA, Alderson NB, Kiosses WB, Chiang HH, Anderson RG, Schwartz MA. Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains. *Science*. 2004; 303: 839-842.
  75. Reibel L, Dorseuil O, Stancou R, Bertoglio J, Gacon G. A hemopoietic specific gene encoding a small GTP binding protein is overexpressed during T cell activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991; 175: 451-458.
  76. Cho YJ, Zhang B, Kaartinen V, et al. Generation of rac3 null mutant mice: role of Rac3 in Bcr/Abl-caused lymphoblastic leukemia. *Mol Cell Biol*. 2005; 25: 5777-5785.
  77. Whetton AD, Lu Y, Pierce A, Carney L, Spooner E. Lyso-phospholipids synergistically promote primitive hematopoietic cell chemotaxis via a mechanism involving Vav 1. *Blood*. 2003; 102: 2798-2802.
  78. Yang FC, Atkinson SJ, Gu Y, et al. Rac and Cdc42 GTPases control hematopoietic stem cell shape, adhesion, migration, and mobilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98: 5614-5618.
  79. Vicente-Manzanares M, Cruz-Adalia A, Martin-Cofreces NB, et al. Control of lymphocyte shape and the chemotactic response by the GTP exchange factor Vav. *Blood*. 2005; 105: 3026-3034.
  80. Walmsley MJ, Ooi SK, Reynolds LF, et al. Critical roles for Rac1 and Rac2 GTPases in B cell development and signaling. *Science*. 2003; 302: 459-462.
  81. Croker BA, Handman E, Hayball JD, et al. Rac2-deficient mice display perturbed T-cell distribution and chemotaxis, but only minor abnormalities in T(H)1 responses. *Immunol Cell Biol*. 2002; 80: 231-240.
  82. Li B, Yu H, Zheng W, et al. Role of the guanosine triphosphatase Rac2 in T helper 1 cell differentiation. *Science*. 2000; 288: 2219-2222.
  83. Tan BL, Yazicioglu MN, Ingram D, et al. Genetic evidence for convergence of c-Kit- and alpha4 integrin-mediated signals on class IA PI-3kinase and the Rac pathway in regulating integrin-directed migration in mast cells. *Blood*. 2003; 101: 4725-4732.



84. Gu Y, Byrne MC, Paranaivitana NC, et al. Rac2, a hematopoiesis-specific Rho GTPase, specifically regulates mast cell protease gene expression in bone marrow-derived mast cells. *Mol Cell Biol.* 2002; 22: 7645-7657.
85. Yang FC, Kapur R, King AJ, et al. Rac2 stimulates Akt activation affecting BAD/Bcl-XL expression while mediating survival and actin function in primary mast cells. *Immunity.* 2000; 12: 557-568.
86. Fulkerson PC, Zhu H, Williams DA, Zimmermann N, Rothenberg ME. CXCL9 inhibits eosinophil responses by a CCR3- and Rac2-dependent mechanism. *Blood.* 2005; 106: 436-443.
87. Akbar H, Kim J, Funk K, et al. Genetic and pharmacologic evidence that Rac1 GTPase is involved in regulation of platelet secretion and aggregation. *J Thromb Haemost.* 2007; 5: 1747-1755.
88. Roberts AW, Kim C, Zhen L, et al. Deficiency of the hematopoietic cell-specific Rho family GTPase Rac2 is characterized by abnormalities in neutrophil function and host defense. *Immunity.* 1999; 10: 183-196.
89. Williams DA, Tao W, Yang F, et al. Dominant negative mutation of the hematopoietic-specific Rho GTPase, Rac2, is associated with a human phagocyte immunodeficiency. *Blood.* 2000; 96: 1646-1654.
90. Ambruso DR, Knall C, Abell AN, et al. Human neutrophil immunodeficiency syndrome is associated with an inhibitory Rac2 mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97: 4654-4659.
91. Filippi MD, Harris CE, Meller J, Gu Y, Zheng Y, Williams DA. Localization of Rac2 via the C terminus and aspartic acid 150 specifies superoxide generation, actin polarity and chemotaxis in neutrophils. *Nat Immunol.* 2004; 5: 744-751.
92. Gu Y, Jia B, Yang FC, et al. Biochemical and biological characterization of a human Rac2 GTPase mutant associated with phagocytic immunodeficiency. *J Biol Chem.* 2001; 276: 15929-15938.
93. Jansen M, Yang FC, Cancelas JA, Bailey JR, Williams DA. Rac2-deficient hematopoietic stem cells show defective interaction with the hematopoietic microenvironment and long-term engraftment failure. *Stem Cells.* 2005; 23: 335-346.
94. Papayannopoulou T, Nakamoto B. Peripheralization of hemopoietic progenitors in primates treated with anti-VLA4 integrin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90: 9374-9378.
95. Cancelas JA, Lee AW, Prabhakar R, Stringer KE, Zheng Y, Williams DA. Rac GTPases differentially integrate signals regulating hematopoietic stem cell localization. *Nat Med.* 2005; 11: 886-891.
96. Gao Y, Dickerson JB, Guo F, Zheng J, Zheng Y. Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101: 7618-7623.
97. Williams DA. Fanconi's anemia: genomic instability leading to aplastic anemia and cancer predisposition. *Hematology - The European Hematology Association Program.* 2006; 2: 24-28.
98. Wagner JE, Eapen M, MacMillan ML, et al. Unrelated donor bone marrow transplantation for the treatment of Fanconi anemia. *Blood.* 2007; 109: 2256-2262.
99. Yabe M, Yabe H, Matsuda M, et al. Bone marrow transplantation for Fanconi anemia. Adjustment of the dose of cyclophosphamide for preconditioning. *Am J Pediatr Hematol Oncol.* 1993; 15: 377-382.
100. Giampietro PF, Verlander PC, Davis JG, Auerbach AD. Diagnosis of Fanconi anemia in patients without congenital malformations: an international Fanconi Anemia Registry Study. *Am J Med Genet.* 1997; 68: 58-61.
101. 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: 1307-1318.
102. Croop JM, Cooper R, Fernandez C, et al. Mobilization and collection of peripheral blood CD34+ cells from patients with Fanconi anemia. *Blood.* 2001; 98: 2917-2921.
103. Kelly PF, Radtke S, Kalle C, et al. Stem cell collection and gene transfer in fanconi anemia. *Mol Ther.* 2007; 15: 211-219.
104. Zhang X, Shang X, Guo F, et al. Defective homing is associated with altered Cdc42 activity in cells from patients with Fanconi anemia group A. *Blood.* 2008; 112: 1683-1686.
105. Milsom MD LA, Zheng Y, Cancelas JA. Fanca-/- hematopoietic stem cells demonstrate a mobilization defect which can be overcome by administration of the Rac inhibitor NSC23766. *Haematologica.* 2009; in press.
106. Wei J, Wunderlich M, Fox C, et al. Microenvironment determines lineage fate in a human model of MLL-AF9 leukemia. *Cancer Cell.* 2008; 13: 483-495.
107. Thomas EK, Cancelas JA, Zheng Y, Williams DA. Rac GTPases as key regulators of p210-BCR-ABL-dependent leukemogenesis. *Leukemia.* 2008; 22: 898-904.
108. Muller LU, Schore RJ, Zheng Y, et al. Rac guanosine triphosphatases represent a potential target in AML. *Leukemia.* 2008; 22: 1803-1806.
109. Thomas EK, Cancelas JA, Chae HD, et al. Rac guanosine triphosphatases represent integrating molecular therapeutic targets for BCR-ABL-induced myeloproliferative disease. *Cancer Cell.* 2007; 12: 467-478.
110. Burridge K, Wennerberg K. Rho and Rac take center stage. *Cell.* 2004; 116: 167-179.
111. Olson MF, Ashworth A, Hall A. An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science.* 1995; 269: 1270-1272.
112. Lamarche N, Tapon N, Stowers L, et al. Rac and Cdc42 induce actin polymerization and G1 cell cycle progression independently of p65PAK and the JNK/SAPK MAP kinase cascade. *Cell.* 1996; 87: 519-529.
113. Chen F, Ma L, Parrini MC, et al. Cdc42 is required for PIP(2)-induced actin polymerization and early development but not for cell viability. *Curr Biol.* 2000; 10: 758-765.
114. Wang L, Yang L, Filippi MD, Williams DA, Zheng Y. Genetic deletion of Cdc42GAP reveals a role of Cdc42 in erythropoiesis and hematopoietic stem/progenitor cell survival, adhesion, and engraftment. *Blood.* 2006; 107: 98-105.
115. Yang L, Wang L, Kalfa TA, et al. Cdc42 critically regulates the balance between myelopoiesis and erythropoiesis. *Blood.* 2007; 110: 3853-3861.
116. Yang L, Wang L, Geiger H, Cancelas JA, Mo J, Zheng Y. Rho GTPase Cdc42 coordinates hematopoietic stem cell quiescence and niche interaction in the bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104: 5091-5096.
117. Xing Z, Ryan MA, Daria D, et al. Increased hematopoietic stem cell mobilization in aged mice. *Blood.* 2006; 108: 2190-2197.
118. Du W, Lebowitz PF, Prendergast GC. Cell growth inhibition by farnesyltransferase inhibitors is mediated by gain of geranylgeranylated RhoB. *Mol Cell Biol.* 1999; 19: 1831-1840.
119. Chen Z, Sun J, Pradines A, Favre G, Adnane J, Sebt SM. Both farnesylated and geranylgeranylated RhoB inhibit malignant transformation and suppress human tumor growth in nude mice. *J Biol Chem.* 2000; 275: 17974-17978.
120. Adnane J, Seijo E, Chen Z, et al. RhoB, not RhoA, represses the transcription of the transforming growth factor beta type II receptor by a mechanism involving activator protein 1. *J Biol Chem.* 2002; 277: 8500-8507.
121. Ridley AJ, Hall A. Distinct patterns of actin organization regulated by the small GTP-binding proteins Rac and Rho. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1992; 57: 661-671.
122. Olson MF, Paterson HF, Marshall CJ. Signals from Ras and Rho GTPases interact to regulate expression of p21Waf1/Cip1. *Nature.* 1998; 394: 295-299.

123. Roovers K, Klein EA, Castagnino P, Assoian RK. Nuclear translocation of LIM kinase mediates Rho-Rho kinase regulation of cyclin D1 expression. *Dev Cell*. 2003; 5: 273-284.
124. Welsh CF, Roovers K, Villanueva J, Liu Y, Schwartz MA, Assoian RK. Timing of cyclin D1 expression within G1 phase is controlled by Rho. *Nat Cell Biol*. 2001; 3: 950-957.
125. Bhowmick NA, Ghiassi M, Aakre M, Brown K, Singh V, Moses HL. TGF-beta-induced RhoA and p160ROCK activation is involved in the inhibition of Cdc25A with resultant cell-cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100: 15548-15553.
126. Sordella R, Jiang W, Chen GC, Curto M, Settleman J. Modulation of Rho GTPase signaling regulates a switch between adipogenesis and myogenesis. *Cell*. 2003; 113: 147-158.
127. Ghiaur G, Lee A, Bailey J, Cancelas JA, Zheng Y, Williams DA. Inhibition of RhoA GTPase activity enhances hematopoietic stem and progenitor cell proliferation and engraftment. *Blood*. 2006; 108: 2087-2094.
128. Hall A, Paterson HF, Adamson P, Ridley AJ. Cellular responses regulated by rho-related small GTP-binding proteins. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1993; 340: 267-271.
129. Chae HD, Lee KE, Williams DA, Gu Y. Cross-talk between RhoH and Rac1 in regulation of actin cytoskeleton and chemotaxis of hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 2008; 111: 2597-2605.
130. Gu Y, Zheng Y, Williams DA. RhoH GTPase: a key regulator of hematopoietic cell proliferation and apoptosis? *Cell Cycle*. 2005; 4: 201-202.
131. Li X, Bu X, Lu B, Avraham H, Flavell RA, Lim B. The hematopoiesis-specific GTP-binding protein RhoH is GTPase deficient and modulates activities of other Rho GTPases by an inhibitory function. *Mol Cell Biol*. 2002; 22: 1158-1171.

## ¿ES POSIBLE PRODUCIR COMPONENTES SANGUÍNEOS *IN VITRO* A PARTIR DE CÉLULAS MADRE?

A. PLA, J.J. CAIRÓ, J. GARCÍA

*XCELIA. División de Terapias Avanzadas. Banc de Sang i Teixits de Catalunya. Barcelona*

La transfusión sanguínea ha sido, desde siempre, objeto de intensa actividad científica, hecho que ha permitido la aparición de sucesivas generaciones de productos, a medida que la técnica ha ido avanzando, cada vez más especializados y efectivos. Los primeros productos disponibles, consistentes en concentrados de eritrocitos, plaquetas y derivados plasmáticos, dieron paso a las tecnologías de manipulación de progenitores hematopoyéticos, y éstas, a la utilización de diversas fuentes de progenitores hematopoyéticos mínimamente manipulados como producto terapéutico (médula ósea, sangre periférica movilizada y cordón umbilical). En el momento actual, y gracias a los avances producidos en el campo de la biología de las células madre hematopoyéticas, se está evaluando una nueva generación de terapias personalizadas, encaminadas a combatir diversas patologías de carác-

ter inmunológico u oncológico. Siguiendo este camino de continua evolución, y teniendo en cuenta el complicado contexto en que se encuentra hoy en día la donación de sangre, el desarrollo de nuevas tecnologías capaces de responder a las necesidades de la transfusión de emergencia son de gran interés estratégico. La estabilización del nombre de donaciones, el aumento continuo en la demanda de unidades para transfundir y el cada vez más elevado coste de producción por bolsa asociado a los constantes incrementos de las medidas de seguridad transfusional, justifican los esfuerzos y hacen muy atractivas las aplicaciones tecnológicas que puedan generar sustitutos a la donación convencional. La posibilidad de disponer de una fuente de células rojas liberada de la donación, con capacidad de responder a las necesidades de los diversos grupos sanguíneos y que carezca de los riesgos asociados a transmisión de enfermedades infecciosas que comporta la transfusión tradicional, representaría un gran avance en el campo de la medicina transfusional.

Las principales aproximaciones tecnológicas dirigidas a generar alternativas a la donación desarrolladas hasta el momento se han focalizado en la generación de sustitutos sintéticos. Estos productos basados en soluciones capaces de transportar oxígeno mediante la utilización de perfluorocarbonos o soluciones de hemoglobina estabilizadas, a pesar del gran esfuerzo y tiempo invertidos en su desarrollo, han producido por el momento resultados poco esperanzadores. Por ejemplo, los ensayos clínicos realizados con sustitutos de los hematíes en base a hemoglobina han mostrado que pueden inducir elevaciones de la presión arterial, o disminución de la perfusión de los tejidos, entre otros efectos adversos. También se ha asociado la administración de estos productos a un incremento en el riesgo de mortalidad de hasta un 30% y un aumento de la posibilidad de padecer infarto de miocardio del 3%<sup>1</sup>.

Como aproximación alternativa a los sustitutos sintéticos, la obtención de hematíes a partir de células madre representa una posibilidad esperanzadora. El mejor conocimiento de la biología de las células madre hematopoyéticas, su interacción con el nicho hematopoyético y los factores que gobiernan las rutas de diferenciación hacia los diversos linajes han permitido dilucidar algunos de los requerimientos necesarios para mimetizar la eritropoyesis *ex vivo*<sup>3</sup>. En este tipo de aproximaciones, uno de los principales problemas que se ha debido afrontar ha sido la enucleación. Este fenómeno, cuyos mecanismos no son plenamente conocidos, ha podido finalmente ser reproducido *ex vivo* gracias al reconocimiento de la importancia del nicho hematopoyético y el entorno de señales que lo configuran. Con esta pieza del rompecabezas se ha abierto el camino a la producción de hematíes a partir de di-

versas fuentes de células madre. Diversos trabajos han mostrado la factibilidad técnica de obtener células rojas *ex vivo* a partir fuentes de células madre hematopoyéticas adultas y embrionarias. Como dato relevante, cabe destacar que las células obtenidas a partir de progenitores hematopoyéticos de sangre de cordón, muestran características funcionales muy similares a los hematíes normales<sup>4</sup>. Tienen el mismo contenido en hemoglobina, la misma morfología, tienen capacidad de captación y liberación de oxígeno y, en el aspecto de propiedades elásticas y de comportamiento *in vivo*, han demostrado ser capaces de sobrevivir en huéspedes murinos inmunosuprimidos. Independientemente de la fuente celular empleada, las tecnologías disponibles para la obtención de hematíes sintéticos se basan en los mismos principios; la maduración secuencial mediante factores solubles y la inducción de la enucleación mediante un cocultivo en capa estromal o mediante la señales aportadas por factores humorales. Estas metodologías se caracterizan por generar las células rojas a costa del agotamiento de las células madre hematopoyéticas de partida o en el caso de las embrionarias de las células madre hematopoyéticas generadas en cultivo, hecho que requiere de un continuo flujo de entrada de nuevas células en el proceso. Como alternativa a esta limitación se están intentado establecer líneas eritroides derivadas de células madre embrionarias con el objetivo de obtener una célula que se capaz de diferenciarse hacia eritrocitos funcionales y a la vez retenga la capacidad de ser expandida de forma masiva<sup>6</sup>.

Los procesos actuales permiten obtener el equivalente de dos a cuatro concentrados de hematíes por unidad de cordón umbilical. En contraste, la generación fisiológica de las células sanguíneas en la médula ósea se produce de forma extremadamente efec-

tiva y exquisitamente regulada de forma que en el humano adulto se generan alrededor de diez mil millones de células rojas cada hora. Esta diferencia abismal entre las eficiencias celulares subyacentes a los procesos de generación *in vivo* o *ex vivo* de hematíes pone de manifiesto las importantes limitaciones de las tecnologías de producción existentes. Por lo tanto, a pesar del importante avance realizado, es necesario destacar que la aplicación a gran escala de estas tecnologías requiere de la solución de problemas complejos. Entre éstos, cabe destacar el coste prohibitivo de los medios y factores de crecimiento empleados, la compleja ingeniería requerida para estandarizar los procesos y la baja tasa de conversión entre el número de células de entrada al proceso (progenitores hematopoyéticos) respecto del número de hematíes obtenidos.

---

## Bibliografía

1. Natanson C, Kern S, Laurie P, et al. Cell-free haemoglobin-based blood substitutes and risk of myocardial infarction and death. *JAMA* 2008; 19: 2304-12.
2. Mohandas N. Banking on red blood cells. *Nature biotechnology* 2005; 23: 35-6.
3. Migliaccio G, Pietro R, Giacomo V. In vitro mass production of human erythroid cells from the blood of normal donors and of thalassemic patients. *Blood cells, molecules and diseases* 2002; 28: 169-80.
4. Giatarrana MC, Kobary L, Lapillonne H. Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. *Nature Biotechnology* 2004; 23: 69-74.
5. Lu SJ, Feng Q, Park JS, et al. Biological properties and enucleation of red blood cells from human embryonic stem cells. *Blood* 2008; 112: 4475-89.
6. Hiroyama T, Miharada K, Sudo K et al. Establishment of Mouse embryonic stem cell derived erythroid progenitor cell lines able to produce functional red blood cells. *PLoS One* 2008; 3 (2): e1544.

# CASOS CLÍNICO-CITOLÓGICOS

**COORDINADORAS:** E. TUSET. *Girona*  
M.<sup>ª</sup>J. MURUZÁBAL. *Cantabria*





## CASO 1

## NIÑO DE 3 AÑOS CON ALTERACIONES EN LA PIGMENTACIÓN, PANCITOPENIA Y FIEBRE

F.J. ORTUÑO<sup>1</sup>, J.L. FUSTER<sup>2</sup>, M.L. LOZANO<sup>1</sup>,  
M.M. BERMÚDEZ<sup>2</sup>, E. LLINARES<sup>2</sup>, A. GALERA<sup>2</sup>,  
S. ALFAYATE<sup>2</sup>, A.I. ANTÓN<sup>1</sup>, J. RIVERA<sup>1</sup>,  
M.M. OSMA<sup>1</sup>, A. JEREZ<sup>1</sup>, V. VICENTE<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servicios de Hematología y Oncología Médica.

Hospitales Morales Meseguer y Reina Sofía

<sup>2</sup>Servicio de Pediatría. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. Murcia

**Motivo de consulta:** Un niño de tres años y once meses ingresó por un cuadro de nueve días de evolución de fiebre (39 °C), dolor y distensión abdominal. Sus padres, de origen marroquí pero residentes en España desde hacía 3 años, eran consanguíneos (primos hermanos) y estaban sanos. El niño carecía de antecedentes patológicos.

**Exploración física:** Palidez cutáneo-mucosa, coloración “gris-plateada” del cabello, hepatoesplenomegalia de 3 y 4 cm, respectivamente, y cuadro de gingivitis-periodontitis. La exploración neurológica fue normal. Un estudio oftalmológico objetivó exotropía izquierda con motilidad ocular extrínseca normal; la agudeza visual, el polo anterior y el fondo de ojo eran normales.

**Pruebas complementarias:** Bioquímica plasmática y urinaria normales. En el hemograma se objetivó: leucocitos:  $1,9 \times 10^9/L$  (neutrófilos: 11% [ $0,2 \times 10^9/L$ ]; linfocitos: 73%; monocitos: 15%; eosinófilos: 0%; basófilos: 1%); hematíes:  $3,3 \times 10^{12}/L$ ; Hb: 84 g/L; VCM: 77,2 fL; HCM: 25,6 pg; CHCM: 33,2 g/dL; ADE: 20,5%; Plt:  $74 \times 10^9/L$ . La cifra de reticulocitos era de 3,5% ( $116 \times 10^9/L$ ). VSG: 5 mm/1.<sup>a</sup> h. La coagulación básica (protrombina, TTPA y fibrinógeno) fue normal. Un estudio de funcionalidad plaquetaria efectuado posteriormente objetivó: PFA colágeno/ADP: 124 s. (intervalo normal: 57-100); PFA colágeno/EPI: 158 s. (81-131); además de hipoagregabilidad a diversos agonistas, las plaquetas del paciente mostraban una externalización deficiente de gránulos alfa (selectina P, CD62) y, sobre todo, de gránulos densos (CD63) tras estimulación y presentaban una captación de <sup>14</sup>C-serotonina y de mepacrina muy reducida, compatible con déficit de gránulos densos.

A consecuencia de la exotropía se efectuó estudio de LCR que objetivó: leucocitos: 4/ $\mu$ L; hematíes 1/ $\mu$ L; glucosa: 53 mg/dL; proteínas: 11,4 mg/dL y citología

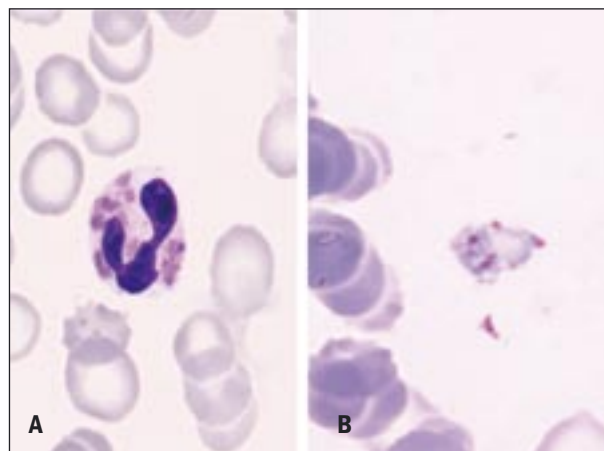


Figura 1. Sangre periférica: granulación azurófila anómala en polimorfonucleares neutrófilos (A) y granulación anómala en las plaquetas (B) (May-Grünwald-Giemsa,  $\times 1.000$ ).

negativa para células neoplásicas. Diversos estudios microbiológicos, incluidos hemocultivos seriados, una amplia batería serológica y diversos estudios en heces fueron negativos. Los niveles de inmunoglobulinas G, A y M, así como las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica fueron normales para su edad con la única excepción de una disminución en la proporción y recuento absoluto de células CD19+ (2%: 54/ $\mu$ L).

Las pruebas de imagen (ecografía abdominal y TAC) confirmaron la existencia de hepatoesplenomegalia homogénea de 13 y 11 cm, respectivamente, con ecoestructura normal y sin lesiones focales. No se detectaron otros hallazgos anómalos en la radiología convencional, ecografía abdominal ni en la RM craneal.

La revisión del frotis de sangre periférica evidenció la presencia de granulación azurófila anómala en los polimorfonucleares neutrófilos y granulación anómala en las plaquetas (Figura 1). Un aspirado de médula ósea (MO) objetivó: normocelularidad con 7% de elementos de serie eritroide con predominio poliorotocromático; en la serie granulocítica se contó un 8% de elementos inmaduros de predominio mieloblasto-promielocito y un 65% de elementos semimaduros y maduros, objetivándose en ambos casos granulación azurófila atípica de gran tamaño (en algún caso alcanzando 3-4  $\mu$ m), que en el caso de los elementos más maduros coexistía con la granulación secundaria. La granulación atípica presentaba cierta heterogeneidad, destacando en los elementos más inmaduros una tonalidad rosada, siendo más púrpura en elementos más maduros y observándose algunos con tonalidad vinácea (Figura 2). Es de destacar asimismo la objetivación de formas “pseudocristalinas”, así

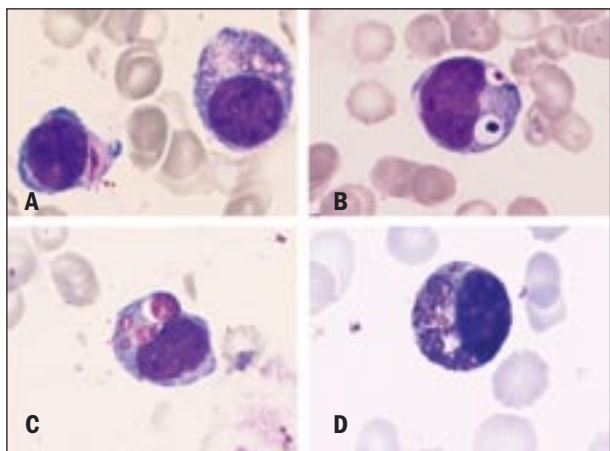


Figura 2. Médula ósea: granulación atípica heterogénea; elementos más inmaduros con tonalidad rosada, y más púrpura en elementos maduros –algunos, con tonalidad vinácea–. Es de destacar asimismo la objetivación de formas “pseudocristalinas” y formaciones en anillo (A,D). (May-Grünwald-Giemsa,  $\times 1000$ ).

como de numerosas formaciones en anillo. Los monocitos suponían el 5% y los linfocitos el 12% (con algún gránulo azurófilo –rojo púrpura– atípico); los megacariocitos eran abundantes. Curiosamente, la tinción de peroxidasa, además de magnificar los hallazgos en la serie mieoide los hizo más homogéneos en su mayoría, aunque alguna estructura anular se reveló negativa. La fosfatasa ácida era muy débil o negativa. El estudio citogenético reveló un cariotipo 46 XY. El estudio ultraestructural confirmó la presencia en la serie mie-

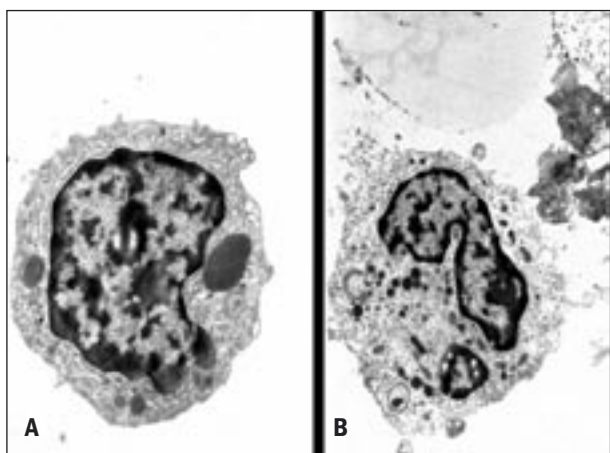


Figura 3. Estudio ultraestructural (MO): presencia en la serie mieoide de inclusiones gigantes rodeadas de membrana, y de morfología y contenido heterogéneo (A), así como presencia de estructuras en forma de anillo en la serie monocítica (B) ( $\times 4.000$ ).

loide de inclusiones gigantes rodeadas de membrana y de morfología y contenido heterogéneo, así como la presencia de estructuras en forma de anillo en la serie monocítica (Figura 3). El estudio molecular incluyó la secuenciación completa del gen *LYST* objetivándose mutación G>A en posición cDNA 11348 (11362 según referencia U67615) en homocigosis; su repercusión en la estructura de la proteína era de un cambio de glicina por arginina en la posición 3724 de la secuencia aminoacídica. La mutación se confirmó en heterocigosis en ambos padres.

La visualización bajo microscopía óptica del pelo mostró un cabello medulado con presencia de agregados de melanina de tamaño aumentado, contorno regular y distribución uniforme. Con luz polarizada se objetivó birrefringencia monomorfa y blanquecina. No se efectuó biopsia cutánea.

**Diagnóstico:** Síndrome de Chediak-Higashi (SCH).

**Evolución:** Ante la presencia de fiebre, hepatomegalia y pancitopenia se asumió que el paciente estaba en fase acelerada (criterio clínico) y se inició tratamiento inmunomodulador según protocolo *LHH-2004* basado en la administración de dexametasona, ciclosporina y etopósido con buena respuesta clínica, aunque con persistencia de la neutropenia. A los seis meses del diagnóstico fue sometido a un alotrasplante hematopoyético de donante no emparentado. Controles posteriores han demostrado quimerismo completo y resolución de la neutropenia con normalización del hemograma y desaparición de las anomalías morfológicas propias del SCH tanto en sangre como en médula ósea.

**Discusión:** El síndrome de Chediak-Higashi es un trastorno autosómico recesivo caracterizado por alteraciones en la morfología, el tamaño y la localización de diversas organelas citoplasmáticas, cuyas anomalías acaban por producir una disfunción celular generalizada. Es una enfermedad rara, con menos de quinientos casos descritos en los últimos veinte años y tan sólo 12 mutaciones caracterizadas como responsables de este cuadro<sup>1</sup>.

**Patogenia:** El gen mutado responsable del SCH se caracterizó en 1996, denominándose *gen LYST* o *CHS1*, y se localiza en 1q42-43<sup>2</sup>. La proteína CHS, perteneciente a la familia BEACH, se localiza en el citoplasma de células de diversos tejidos y, aunque su función concreta no se ha determinado aún, se ha postulado que regula la morfología, el tamaño y la localización de las organelas; su alteración provoca anomalías del tráfico de proteínas desde y entre las organelas y, además, provoca que las membranas celulares tengan menor capacidad de reparación que en los individuos sanos, ya que ésta depende de la fusión de microlisomas periféricos, que por sus características anómalas tienen limitado tanto sus ca-

pacidades de tráfico como de fusión. Se ha sugerido que la alteración podría originarse en un ensamblado anómalo de los microtúbulos<sup>3</sup>.

El gen y la proteína del SCH afectan a la síntesis o al mantenimiento de los gránulos de almacenamiento y secreción. Los lisosomas de leucocitos y fibroblastos, los gránulos densos de las plaquetas, los gránulos azurófilos de los neutrófilos y los melanosomas de los melanocitos, entre otros, tienen mayor tamaño y morfología irregular, lo que reafirma la existencia de una vía común en la síntesis de organelas que están implicadas en el almacenamiento. En pacientes con SCH, y en los estadios más inmaduros de la serie mielóide neutrofílica, los gránulos azurófilos se fusionan entre sí y con componentes de la membrana citoplasmática formando megagránulos que tienen un contenido disminuido de enzimas hidrolíticas, incluyendo proteinasas, elastasas y catepsina G. En estadios intermedios (p. ej., mielocito), se forman gránulos secundarios normales; de esta manera en los polimorfonucleares neutrofílicos coexisten ambas poblaciones de gránulos. Como resultado de lo anterior, existe agregación espontánea de moléculas de superficie que conlleva un consumo elevado de oxígeno en reposo, una capacidad reducida de adhesión a superficies endoteliales y una respuesta quimiotáctica reducida. Estos neutrófilos eliminan a los microorganismos a través de la liberación de enzimas hidrolíticas diluidas desde los gránulos gigantes a los fagosomas (en vez de su ingestión y destrucción por vía oxidativa), lo que predispone a infecciones bacterianas. Adicionalmente, muchos de los granulocitos anómalos entran en apoptosis en la MO por incapacidad de regular la activación de su membrana, lo que resulta en neutropenia con recuentos en torno a  $2,5 \times 10^9/L$ . En los monocitos ocurre un fenómeno similar al descrito en la serie mielóide neutrofílica. Las tres líneas de la serie linfóide también están alteradas<sup>1,3</sup>.

Se ha sugerido que la naturaleza de las mutaciones puede predecir la severidad del SCH. Pacientes con mutaciones de sentido alterado (*missense*) podrían sintetizar una proteína LYST/CHS1 parcialmente funcional y, por tanto, tendrían un fenotipo clínico menos severo que los pacientes con mutaciones finalizadoras (*nonsense*)<sup>1</sup>.

**Ultraestructura:** Las células presentan gránulos gigantes junto a gránulos azurófilos y específicos (secundarios) de tamaño normal<sup>4</sup>. Los gránulos gigantes pueden observarse ya desde las fase de mieloblasto/promielocito y, aunque inicialmente se sugirió que podrían derivar de gránulos tanto específicos como azurófilos<sup>4</sup>, estudios posteriores han demostrado que la liberación de mieloperoxidasa, fosfatasa ácida y la tetraspanina CD63 están afectadas, pero no así la liberación de lactoferrina ni de gelatinasa, lo que su-

giere la afectación únicamente de los gránulos primarios<sup>5</sup>. Las inclusiones gigantes varían en su morfología ultraestructural: rodeadas de membrana, pueden tener forma oval, redondeada o irregular y una subestructura relativamente homogénea o, por el contrario, contener estructuras lamelares membranosas, figuras mielínicas características y material osmiofílico finamente granular. En los monocitos se pueden encontrar organelas en forma de anillo. En los linfocitos, los gránulos gigantes contienen estructuras fenestradas, materiales cristaloides, pequeñas esferas electrondensas, conjuntos lamelares y figuras mielínicas<sup>5,6</sup>.

**Clínica:** Debido a una melanización deficiente de los melanosomas, los pacientes con SCH tienen un grado variable de albinismo óculo-cutáneo que se acompaña de fotosensibilidad cutánea, y pelo entre gris y blanco; por el mismo motivo, presentan hipopigmentación ocular y, con frecuencia, fotofobia y reducción tanto del campo como de la agudeza visual. Las infecciones piógenas de repetición constituyen la manifestación más frecuente y precoz del SCH; afectan más frecuentemente a mucosas (gingivitis), piel, tracto respiratorio y tracto digestivo (con clínica de enterocolitis). En piel pueden manifestarse como un pioderma superficial, abscesos subcutáneos profundos, incluso como úlceras profundas remedando un pioderma gangrenoso<sup>1,3</sup>.

Los pacientes con SCH presentan alteraciones moderadas de la hemostasia que cursan con frecuentes equimosis y sangrado mucoso. Habitualmente, a pesar de un recuento de plaquetas normal, el tiempo de sangrado está prolongado como consecuencia de la alteración de la agregación plaquetaria, que es consecuencia de la disminución de los gránulos densos y, por ello, cursa con déficit de almacenamiento de ADP, ATP, serotonina, calcio y pirofosfato<sup>1,3</sup>.

La mayoría de los pacientes (>80%) con SCH acaban por desarrollar la denominada *fase acelerada*, que se caracteriza por proliferación linfohistiocítica que remeda un linfoma y que afecta a múltiples órganos (hígado, bazo y médula ósea) y puede ocurrir a cualquier edad. Característicamente el paciente presenta hepatoesplenomegalia y fiebre alta en ausencia de infección bacteriana; además, los pacientes desarrollan pancitopenia, la clínica hemorrágica se hace más marcada y, en último término, aumenta la susceptibilidad a infecciones. El inicio de la fase acelerada se ha relacionado con infección por EBV, simulando en estos casos a un síndrome hemofagocítico mediado por virus. La proliferación linfóide se asocia a anemia, sangrado, incremento y recurrencia de infecciones víricas y, sobre todo, bacterianas que afectan a piel y tracto respiratorio. Los gérmenes más frecuentemente implicados tanto en fase acelerada como en estadios más precoces son *Staphylococcus aureus* (el de



mayor incidencia), *Streptococcus pyogenes* y *Pneumococcus* spp.; *Candida* y *Aspergillus* son también patógenos frecuentes. Esta fase cursa con afectación progresiva del estado general y fallo multiorgánico, y en la mayoría de los casos conduce al fallecimiento. Pocos pacientes llegan a la edad adulta y, en éstos, la clínica neurológica es la predominante; la expresión de ésta es variable, pero puede incluir parkinsonismo, demencia y neuropatía periférica. El mecanismo de la neuropatía no está claro ya que se han descrito tanto neuropatías axonales como desmielinizantes. La ataxia cerebelosa por degeneración espinocerebelar puede ser una manifestación clínica relevante en estadios muy avanzados<sup>1,3</sup>.

**Diagnóstico:** Por sospecha clínica y por la observación de vesículas citoplasmáticas de gran tamaño en prácticamente todas las líneas celulares (piel, tejido nervioso, hematopoyesis, etc.). El diagnóstico se establece habitualmente mediante estudio citológico, por la objetivación de grandes inclusiones en todas las líneas de la hematopoyesis, particularmente las series mieloide neutrofilica y eosinofílica, lo que se aprecia en las tinciones panópticas pero se magnifica con la tinción de peroxidasa. El estudio ultraestructural y, sobre todo, el molecular con detección de mutaciones del gen *LYST* son confirmatorios. Las biopsias cutáneas objetivan melanosomas gigantes que se transfieren escasamente a los queratinocitos. Es frecuente la existencia de hipergammaglobulinemia policlonal<sup>1,3</sup>.

**Diagnóstico diferencial:** Desde el punto de vista clínico, la existencia de albinismo parcial, sangrado anómalo, infecciones recurrentes y clínica neurológica obliga al diagnóstico diferencial con los síndromes de Griscelli y de Hermansky-Pudlak (principalmente, el de tipo 2) y, en menor grado, con el síndrome de Wittcott-Aldrich<sup>3</sup>. Es de destacar que todos ellos cursan sin presencia de gránulos gigantes.

El diagnóstico diferencial citológico y ultraestructural, por presencia de inclusiones gigantes, debe establecerse con las anomalías de May-Hegglin y de Alder-Reilly, con el síndrome de Sebastian, particularmente con su variante<sup>4</sup> y, en menor grado, con el síndrome de Fechtner y la granulomatosis crónica<sup>5,6</sup>.

**Tratamiento y pronóstico:** Se ha ensayado el ácido ascórbico en altas dosis (200 mg/d en niños y 2g/d en adultos) con el fin de corregir las alteraciones de los microtúbulos, lo que mejora a algunos pacientes en fase estable. La profilaxis antibiótica es preceptiva. En fases aceleradas se ha postulado tratamiento con quimioterapia con efecto microtubulítico (vincristina, vinblastina y colchicina), inhibidores de la topoisomerasa II (etopósido), con inmunomoduladores (corticoides y ciclosporina) y con combinaciones de los anteriores, dando lugar a respuestas a corto

plazo pero poco duraderas<sup>1,3</sup>. Con tratamientos convencionales los niños raramente alcanzan los diez años, falleciendo habitualmente por infecciones incontroladas. El trasplante de médula ósea alógena es el único tratamiento curativo, ya que permite tanto la reconstitución hematopoyética como la inmunológica; este procedimiento no detiene, sin embargo, las alteraciones neurológicas vinculadas al SCH. El momento del trasplante ha sido controvertido, y, si bien inicialmente sólo se indicaba una vez iniciada la fase acelerada, en la actualidad se han observado mejores resultados en los pacientes trasplantados precozmente. Los trasplantes de donante no emparentado o de cordón umbilical son otras alternativas<sup>7</sup>.

### Para recordar

- El SCH se origina en una mutación del gen *LYST*/*CHS1* localizado en 1q42-43. Aunque se desconoce la función de la proteína anómala, el resultado es una alteración en la morfología, el tamaño y la localización de diversas organelas citoplasmáticas.
- En pacientes con el contexto clínico apropiado, el diagnóstico se establece por la objetivación de grandes inclusiones citoplasmáticas en las líneas de la hematopoyesis y por la demostración de las alteraciones moleculares del gen *LYST*.
- El único tratamiento curativo para las alteraciones hematológicas del SCH es el trasplante alogénico de médula ósea, que sin embargo no altera el curso de las alteraciones neurológicas.

### Bibliografía

1. Kaplan J, De Domenico I, McVey Ward D. Chediak-Higashi Syndrome. *Curr Opin Hematol* 2008; 15: 22-9.
2. Barbosa MD, Nguyen QA, Tchernev VT, et al. Identification of the homologous beige and Chediak-Higashi syndrome genes. *Nature* 1996; 382: 262-5.
3. Introne W, Boissy RE, Gahl WA. Clinical, molecular and cell biological aspects of Chediak-Higashi syndrome. *Mol Genet Metabol* 1999; 68: 283-303.
4. White JG, Mattson JC, Nichols WL, Luban NL, Greinacher A. A variant of the Sebastian platelet syndrome with unique neutrophil inclusions. *Platelets* 2002; 13: 121-7.
5. Anomalías en la morfología y función de los granulocitos neutrófilos. En: Rozman C, Woessner S, Feliu E, Lafuente R, Berga L. Ultraestructura celular en hematología. Barcelona: Salvat; 1985. p. 83-91.
6. Kjeldsen L, Calafat J, Borregaard N. Giant granules of neutrophils in Chediak-Higashi syndrome are derived from azurophil granules but not from specific and gelatinase granules. *J Leukoc Biol* 1998; 64: 72-7.
7. Eapen M, DeLaat CA, Baker KS, et al. Hematopoietic cell transplantation for Chediak-Higashi syndrome. *Bone Marrow Transplant* 2007; 39: 411-5.

## CASO 2

### HIPOPLASIA MEDULAR CON PEQUEÑA CLONA HPN

M. AYMERICH<sup>1</sup>, M. SUÁREZ-LLEDO<sup>2</sup>,  
A. MARTÍNEZ-TRILLOS<sup>2</sup>, J.L. AGUILAR<sup>1</sup>,  
M. ROZMAN<sup>1</sup>, B. NOMDEDÉU<sup>2</sup>, N. VILLAMOR<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Hematopatología. <sup>2</sup>Servicio de Hematología.  
Hospital Clínic de Barcelona. IDIBAPS.  
Universidad de Barcelona

**Motivo de consulta:** Mujer de 29 años sin alergias medicamentosas conocidas ni hábitos tóxicos, controlada desde hace 6 meses en consulta externa por trombocitopenia descubierta en el transcurso de un control analítico. Tras el estudio inicial se catalogó de trombocitopenia periférica y no se realizó tratamiento al mantener unas cifras de plaquetas de  $60-70 \times 10^9/L$ . A los tres meses de iniciada la plaquetopenia se añade anemia y leucopenia moderadas.

**Antecedentes personales:** Mononucleosis infecciosa a los 10 años. Candidiasis vaginal tratada con itraconazol hace 9 meses. Ingreso por pielonefritis aguda con bacteriemia por *E. coli* hace 3 meses y resuelta con antibioticoterapia, donde se objetiva la aparición de neutropenia y anemia moderadas junto a la plaquetopenia inicial.

**Exploración física:** Normal, salvo leve palidez cutáneo-mucosa. No se palpan adenopatías ni visceromegalias.

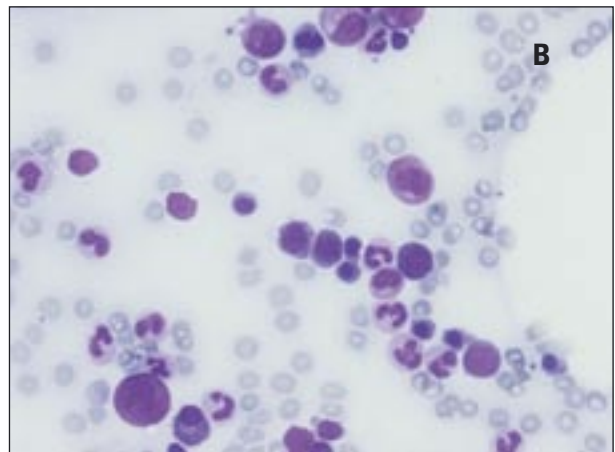
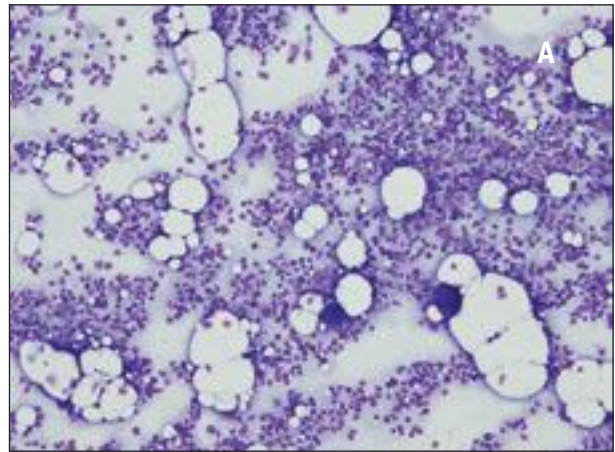
**Exploraciones complementarias:** *Hemograma:* Leucocitos:  $3,80 \times 10^9/L$ ; neutrófilos:  $2,0 \times 10^9/L$ , hemoglobina: 101 g/L; VCM: 101 fL; reticulocitos:  $33,7 \times 10^9/L$ ; plaquetas:  $44 \times 10^9/L$ ; VPM 9,5 fL. El examen citológico de la sangre periférica no mostró anomalías morfológicas en ninguna de las series, ni en la fórmula leucocitaria.

*Bioquímica:* Perfil hepático, renal, proteínas totales, complemento (C3, C4, CH50): normales, así como LDH, haptoglobina y bilirrubina.

*Serologías víricas:* VHB, VHC, VIH, IgM VEB, IgG e IgM parvovirus B19, IgG CMV negativas; IgG EBV y IgG VHH6 positivas.

*Autoanticuerpos y aloanticuerpos:* Anticuerpos antisuerales, ANA, anti-DNA, test de Coombs directo y anticuerpos irregulares normales o negativos. El estudio inmunohematológico de las plaquetas (PIFT, anticuerpos por inmunofluorescencia directa/indirecta y eluido) no detectó anticuerpos antiplaquetarios.

*Mielograma:* El aspirado inicial en el momento de la trombocitopenia fue normocelular con presencia de las tres series hematopoyéticas. Los megacariocitos eran abundantes y algunos mostraron un citoplas-



Figuras 1. El mielograma realizado cuando existía pancitopenia moderada fue de celularidad rica, con presencia de las tres series hematopoyéticas y aumento de la eritroblástica. Los megacariocitos fueron cuantitativa y cualitativamente normales. Asimismo, la serie blanca mostraba un aspecto normal (A: MGG  $\times 100$ ; B: MGG  $\times 400$ ).

ma basófilo. Estos hallazgos fueron compatibles con una trombocitopenia de origen periférico. El mielograma realizado cuando se asoció la anemia y leucopenia fue de celularidad rica, con presencia de las tres series hematopoyéticas y aumento de la eritroblástica. Los megacariocitos fueron cuantitativa y cualitativamente normales. Asimismo, la serie blanca mostraba un aspecto normal (Figura 1).

*Biopsia de médula ósea* (Figuras 2-3): Arquitectura medular alterada por la existencia de áreas de hipoplasia-aplasia junto a otras normocelulares. Presencia de las tres series hematopoyéticas. Disminución de la granulocítica y de la megacariocítica. Escasa presencia de linfocitos y de células plasmáticas. Edema y hemorragia intersticiales. Índice pronóstico = 4 (disminución de la celularidad hematopoyética: grado II; infiltración linfoplasmocítica: grado I; hemorragia intersticial: gra-

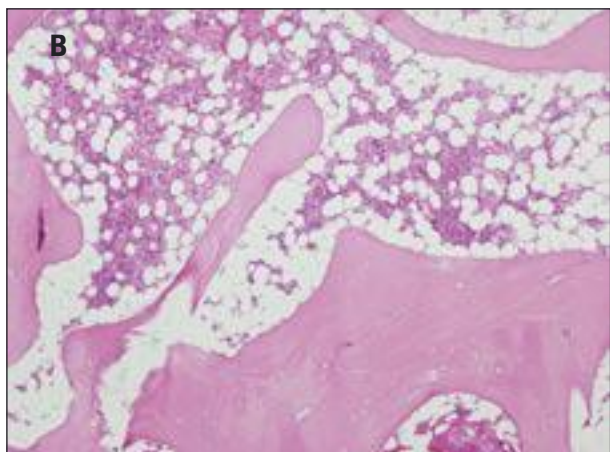
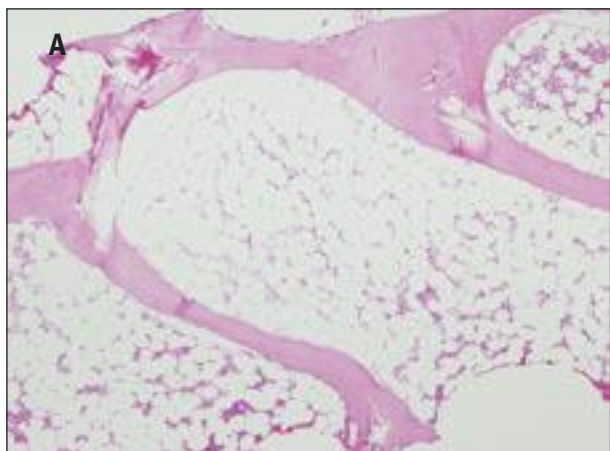


Figura 2. Arquitectura medular alterada por la existencia de áreas de hipoplasia-aplasia (A) junto a otras normocelulares (B). Compatible con aplasia medular (patrón en damero) (A: HE  $\times$  40; B: HE  $\times$  100).

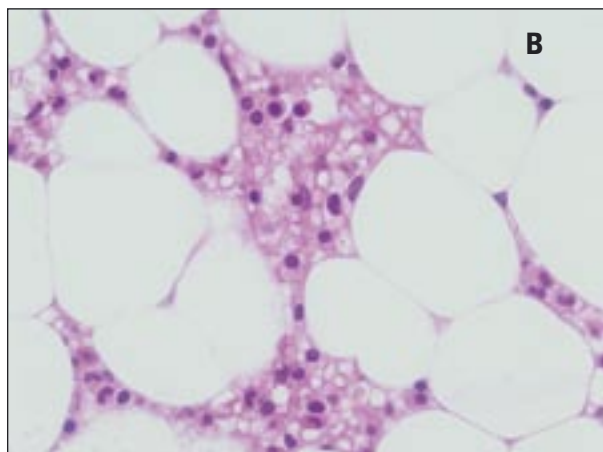
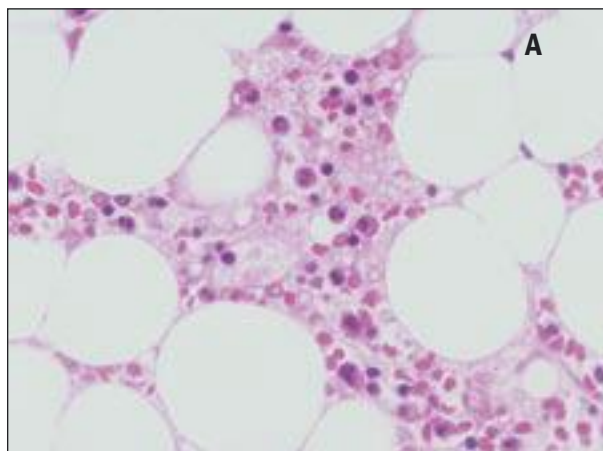


Figura 3. Presencia de escasos linfocitos y células plasmáticas. Edema y hemorragia intersticiales (HE  $\times$  400).

do  $1/2 = 0,5$ ; edema interfibrilar: grado  $1/2 = 0,5$ ). Índice de FAG: 142. Compatible con aplasia medular (patrón en damero).

**Inmunofenotipo de sangre periférica** (Figura 4): un 0,8% de eritrocitos son CD59 negativos, un 1-2% de neutrófilos muestran déficit de CD16, CD24, CD66 y CD55 y un 1-3% de los monocitos muestran déficit de CD14 y CD55.

**Citogenética de médula ósea:** 46 XX [20].

**Diagnóstico:** Hipoplasia medular con pequeña clona HPN.

**Evolución:** Se inició tratamiento con ciclosporina 100 mg/12 horas. Actualmente pendiente de la valoración de la respuesta al tratamiento.

**Discusión:** La aplasia medular (AA) tiene una incidencia de 2-4/1.000.000 hab/año. No hay diferencias de género y predomina en pacientes jóvenes (edad mediana: 30 años). El diagnóstico se establece por la presencia de citopenia en dos o más series hemato-

poyéticas junto a una pérdida de más del 25% de la celularidad de la médula ósea, demostrada por biopsia, en ausencia de infiltración neoplásica, tratamiento quimioterápico previo o fibrosis, teniendo en cuenta que en este parámetro es fundamental la edad. Según la etiología, puede ser idiopática (5-80%) o secundaria (14-95%) a irradiación, drogas, tóxicos industriales, agentes químicos, virus, enfermedades autoinmunes, timoma u otras situaciones<sup>1</sup>.

El estudio de la histopatología medular mediante biopsia es obligado para el diagnóstico de AA. Su estudio revela la desaparición más o menos absoluta del parénquima hematopoyético, con sustitución por células grasas, junto con diversos tipos de lesión intersticial, tales como edema, hemorragia e infiltración linfoplasmocitaria. La distribución de estas lesiones puede ser uniforme o bien heterogénea alternando zonas de aplasia con otras normales o incluso hiperplásicas, configurando la llamada *aplasia en damero*. Estas lesiones histopatológicas de la médula ósea se pueden cuantificar en un índice con demostrado valor pronóstico<sup>2</sup>, si



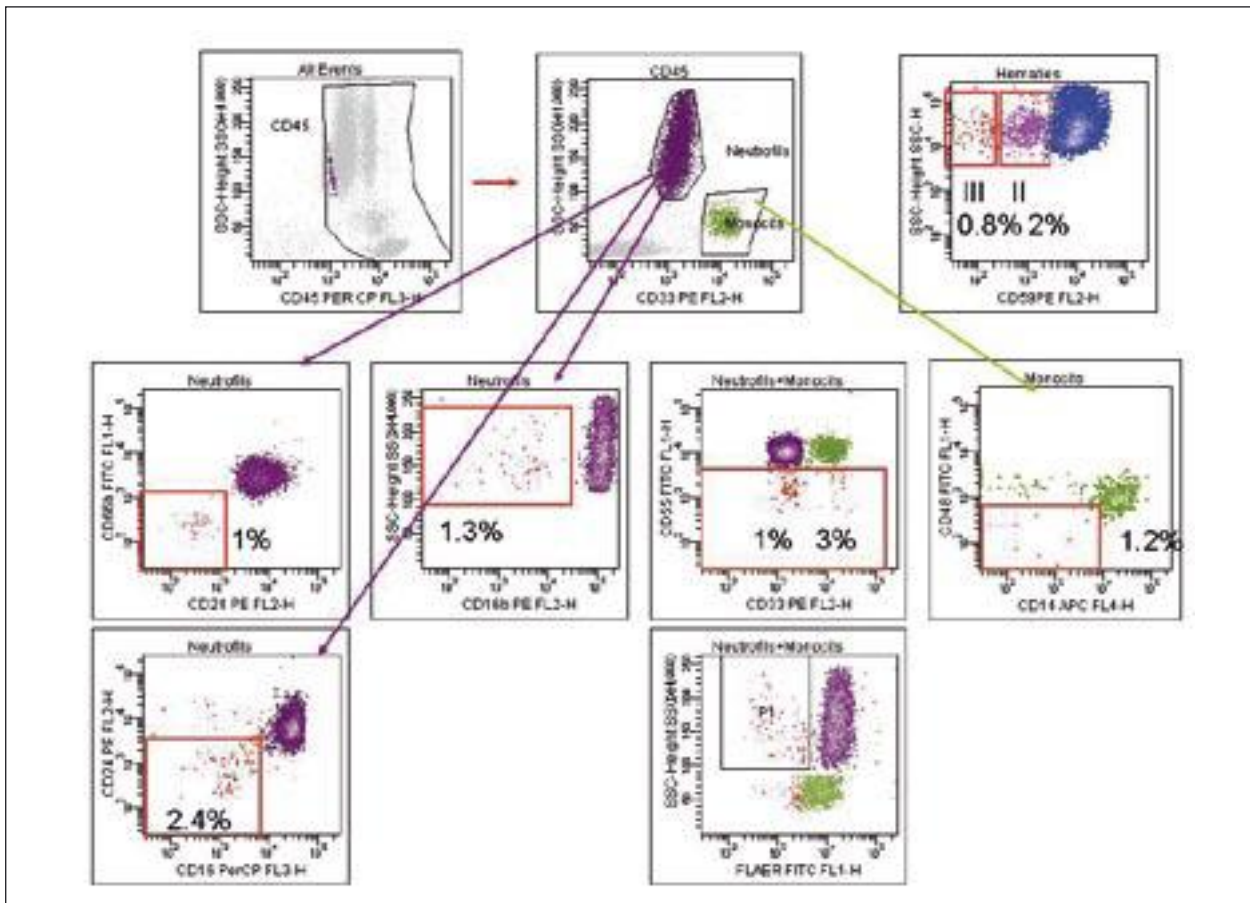


Figura 4. Inmunofenotipo de sangre periférica por citometría de flujo. Un 0,8% de los eritrocitos son CD59-negativos; un 1-2% de neutrófilos muestran déficit de CD16, CD24, CD66 y CD55; y un 1-3% de los monocitos muestran déficit de CD14 y CD55.

bien los valores hemoperiféricos son los que determinan la gravedad de la aplasia. Según éstos, la AA se clasifica en moderada, severa o muy severa<sup>1</sup> (Tabla 1).

La patofisiología de la AA no se conoce con certeza, pero la hipótesis más extendida es la de mecanismo inmunitario mediada por proliferaciones oligoclonales de linfocitos T contra la *stem cell*, lo que produce apoptosis e insuficiencia medular. Parece que los linfocitos T podrían activarse por un mecanismo de reacción cruzada con antígenos presentes en la *stem cell* o bien por polimorfismos genéticos de las citocinas. En los casos con incidencia familiar, se postula la hipótesis del acortamiento de los telómeros por mutaciones que conlleva una deficiente capacidad proliferativa de la célula madre hematopoyética<sup>3</sup>.

La HPN es una alteración clonal de la *stem cell* hematopoyética causada por una mutación somática adquirida en el gen PIG-A, que bloquea la biosíntesis del sistema de anclaje GPI (glucosil-fosfatidil-inositol) y, en consecuencia, la expresión de proteínas GPI-ligadas en la clona afectada. Este déficit se pone

de manifiesto mediante el estudio inmunofenotípico por citometría de flujo, que es la técnica de elección para la detección de esta anomalía<sup>4</sup>. La ausencia de CD59 en la superficie de los hematíes explica la hemólisis intravascular que caracteriza a esta enfermedad. El déficit de CD59 condiciona la falta de inactivación de los últimos componentes de la cascada del complemento sobre los hematíes, lo que conlleva la hemólisis<sup>5</sup>.

La presencia de una clona HPN asintomática, sin clínica ni biología de hemólisis, es un hallazgo frecuente en el curso de la AA, que puede evolucionar

Tabla 1. GETH-2001. Insuficiencia medular. Criterios de gravedad

Moderada	Neutrófilos $> 0,5 \times 10^9/L$
<b>Grave</b>	Al menos dos de los siguientes criterios: Neutrófilos $< 0,5 \times 10^9/L$ Plaquetas $< 20 \times 10^9/L$ Reticulocitos corregidos por el hematocrito $< 1\%$
<b>Muy grave</b>	Neutrófilos $< 0,2 \times 10^9/L$ Resto de parámetros, igual al anterior



y llegar a manifestarse clínicamente. Al 40-50% de los pacientes con AA se les puede detectar la presencia de una clona HPN por citometría de flujo<sup>5-7</sup>. En la mayoría de los casos el porcentaje de la clona HPN es pequeño, lo que no se traduce en manifestaciones de hemólisis. Se supone que estas clonas aparecen porque al disminuir la población normal de *stem cells* se pone de manifiesto la presencia de clonas defectuosas, que pueden incluso encontrarse en individuos normales, o bien por daño directo del ADN de la *stem cell* por activación de señales proapoptóticas<sup>8</sup>. Se ha descrito que la presencia de estas pequeñas clonas HPN en la AA puede conferir una mejor respuesta al tratamiento inmunosupresor y, por ello, un pronóstico más favorable<sup>9</sup>.

Nuestra paciente presentaba una hipoplasia medular moderada en damero con un IP bajo y con la presencia de una pequeña clona HPN: datos, todos ellos, indicativos de buen pronóstico y buena respuesta al tratamiento. Inició tratamiento inmunosupresor con ciclosporina y actualmente esta pendiente de evaluación de la respuesta.

#### Para recordar

- El estudio de la histopatología medular mediante biopsia es obligado para el diagnóstico de AA y no puede basarse exclusivamente en el examen de sangre y del aspirado medular.
- La presencia de pequeñas clonas HPN en la AA puede conferir mejor respuesta al tratamiento inmunosupresor y, por ello, un pronóstico más favorable.

#### Bibliografía

1. GETH-2001. Protocolo de Diagnóstico y Tratamiento de la Aplasia Medular. Subcomité de Aplasia Medular del GETH (Grupo Español de Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos), Asociación Española de Hematología y Hemoterapia. Protocolo de Estudio y Tratamiento de la Aplasia Medular.
2. Rozman C, Marín P, Bruges R, Feliu E. Valor pronóstico de la histopatología medular en la anemia aplásica. *Leuk Res* 1985; 30: 982-92.
3. Young NS, Scheinberg P, Calado RT. Aplastic anemia. *Curr Opin Hematol* 2008; 15: 162-8.
4. Hill A, Richards SJ, Hillmen P. Recent developments in the understanding and management of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 2007; 137: 181-92.
5. Richards SJ, Whitby L, Cullen MJ, Dickinson AJ, Granger V, Reilly JT, Hillmen P, Barnett D. Development and evaluation of a stabilized whole-blood preparation as a process control material for screening of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2008; 76B: 47-55.
6. Young NS. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and myelodysplastic syndromes: clonal expansion of PIG-A-mutant hematopoietic cells in bone marrow failure. *Haematologica* 2009; 94: 3-7.

7. Wang SA, Pozdnyakova O, Jorgensen JL, Medeiros LJ, Stachurski D, Anderson M, Raza A, Woda BA. Detection of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in patients with myelodysplastic syndromes and related bone marrow diseases, with emphasis on diagnostic pitfalls and caveats. *Haematologica* 2009; 94: 29-37.
8. Maciejewski JP, Risitano A. Hematopoietic stem cells in aplastic anemia. *Arch Med Res* 2003; 34: 520-7.
9. Sugimori C, Chuhjo T, Feng X, Yamazaki H, Takami A, Teramura M, Mizoguchi H, Omine M, Nakao S. Minor population of CD55. *Blood* 2006; 107: 1308-14.

### CASO 3

#### PACIENTE CON ADENOPATÍAS, TOXICODERMIA Y LEUCEMIA AGUDA CON DIFERENCIACIÓN EOSINOFÍLICA DE CARÁCTER CLONAL

E. LUÑO<sup>1</sup>, C. SANZO<sup>1</sup>, R. LLORENTE<sup>1</sup>, E. FUENTE<sup>2</sup>, M. GONZÁLEZ<sup>1</sup>, A. FERNÁNDEZ<sup>3</sup>, F. JONTE<sup>1</sup>, E. FANJUL<sup>1</sup>, B. ORDÓÑEZ<sup>3</sup>, A. DÍAZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Hematología. Hospital Universitario Central de Asturias. Oviedo. <sup>2</sup>Servicio de Anatomía Patológica y <sup>3</sup>Servicio de Hematología. Hospital de Cabueñes. Gijón (Asturias)

**Motivo de consulta:** Paciente de 55 años de edad, remitido a nuestro centro en mayo de 2007, con el diagnóstico de leucemia aguda. A su ingreso refería astenia, anorexia, disgeusia y pérdida de 20 kg de peso en los últimos 8 meses, junto con fiebre elevada de reciente aparición.

**Historia clínica:** Varón, ex fumador desde hace 9 años, úlcus gástrico *H. pylori* positivo tratado. En diciembre de 2006, tras biopsia de adenopatía axilar, fue diagnosticado de enfermedad de Hodgkin estadio IV-B. En aspirado de médula ósea, eosinofilia (12%) constituida por eosinófilos anormales, 3% células hiperbasófilas con núcleo grande y 1 o 2 nucléolos con 7% de blastos (Figura 1: A-C). La biopsia ósea fue hiper celular con frecuentes eosinófilos, sin células CD30 ni CD15 positivas, que excluía infiltración por linfoma de Hodgkin (LH). No se realizó estudio citogenético. Recibió BEACOPP<sub>x2</sub> con importante mielosupresión. En febrero de 2007 ingresó por insuficiencia respiratoria, observándose en TAC un patrón con áreas en vidrio deslustrado. El estudio A-P del lavado broncoalveolar mostró una celularidad constituida por neutrófilos, eosinófilos y algunas células gigantes que se consideraron Reed-Sternberg (RS). Con tratamiento antibiótico desaparecieron las alteracio-

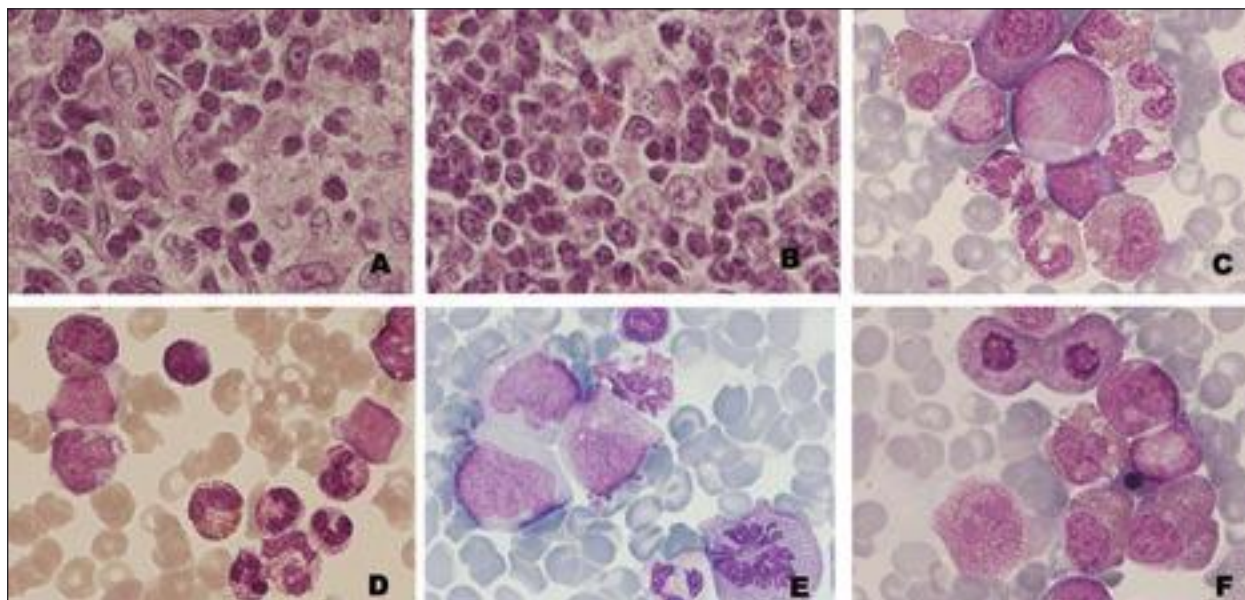


Figura 1. A-B: Histología del ganglio linfático al diagnóstico de LH. Infiltración por células poco diferenciadas, algunas de gran tamaño, entremezcladas con un denso infiltrado linfoide maduro y eosinófilos. C: Médula ósea al diagnóstico de LH, MGG  $\times 1.000$ . Blastos agranulares de gran tamaño y eosinofilia. D-F: SP y MO al diagnóstico de LAM eosinofílica, MGG  $\times 1000$ . Blastosis agranular y eosinofilia. Mitosis eosinofílica.

nes radiológicas. Por ausencia de respuesta, recibió ABVDx2 precisando soporte con FSC-G, EPO y hemoderivados. Tras el 2.º ciclo presenta pancitopenia y blastosis periférica siendo diagnosticado de leucemia aguda.

**Exploración física:** Adenopatías cervicales, axilares e inguinales (las mayores, de 2 cm). Hepatomegalia de 2 cm por debajo del reborde costal. Máculas cutáneas hiperpigmentadas muy extensas y confluentes.

**Pruebas complementarias:** *Hemograma:* Hb 71 g/L; VCM: 91,2 fL; reticulocitos:  $52,2 \times 10^9/L$ ; plaquetas:  $57 \times 10^9/L$ ; leucocitos:  $1,66 \times 10^9/L$  (blastos: 6%; cayados: 2%; segmentados: 6%; eosinófilos: 59%; monocitos: 2%; linfocitos: 21%). En el frotis de sangre periférica, blastos de tamaño grande, citoplasma escaso basófilo, agranular, con vacuolas ocasionales y sin bastones de Auer, eosinófilos atípicos, muchos multilobulados (hasta 7 segmentos), otros inmaduros (Figura 1: D). Neutrófilos hipogranulares displásicos. *Estudio de coagulación:* TTP: 48,2" (R1.6); TP: 17,6" (R1.5); tasa de protrombina: 51%; TT: 18" (R1.4); fibrinógeno derivado: 458  $\mu g/dL$ ; DD: 339 ng/mL. *Bioquímica general:* LDH: 1.876 U/L; úrico: 8,9 mg/dL; urea: 52 mg/dL; creatinina: 1,16 mg/dL. Pruebas de función hepática: normales, excepto BbT (1,21 mg/dL) y Bb I (0,32 mg/dL). Proteínas totales: 58,4 g/LM; albúmina: 29,1 g/L. *Serología de virus:* VIH, parvovirus B<sub>19</sub>, HBs Ag, anti HBC, anti HBs y anti VHC: negativos. EBV, herpes simple,

varicela-zóster y CMV IgG: positivos. Toxoplasma, TPFA y RPR negativos. *Mielograma:* Normocelular con infiltración blástica 23,4%, 1% promielocitos, 0,5% metamielocitos, 0,5% cayados, 0,5% segmentados, 30% eosinófilos, 2,5% monocitos y 14,5% linfocitos. Los blastos eran de tamaño mediano-grande, con elevada relación N/C, 1-3 nucléolos, citoplasma basófilo, sin granulación ni bastones (Figura 1: E-F). Frecuentes clasmatosis. Serie mieloide madura escasa y displásica, metamielocitos y mielocitos gigantes e hipogranularidad en serie madura. Serie eritroblástica 27,2%, sin aparentes rasgos displásicos. Megacariocitos normales. Hiperplasia del SMF con hemofagocitosis. *Citoquímica:* mieloperoxidasa negativa en blastos. *Inmunofenotipo MO:* blastos 16%, CD45, CD34, CD117 (30%), DR, CD33, CD13, CD7, CD56 y CD4 positivos, y MPX, CD15, Cd14, CD11b, CD11c y Ags B y T negativos. Eosinofilia 52%. *Estudio ultraestructural:* blastos 32%, 65% MOP positivos a nivel de cisterna perinuclear, Golgi, cisternas del RER y gránulos, 1/3 de estos blastos MOP positivos eran de mayor tamaño con nucléolos gigantes. El 35% restante, eran MOP negativos y de gran tamaño, en ocasiones con dos trozos nucleares y grandes nucléolos que recordaban células RS (Figura 2). El 34% de la celularidad eran eosinófilos EOP positivos CNK resistentes con importantes anomalías subcelulares y desviación izquierda (Figura 3: A-G). Las series mieloide madura no eosinofílica, eritroblástica y megacariocítica presentaban ras-



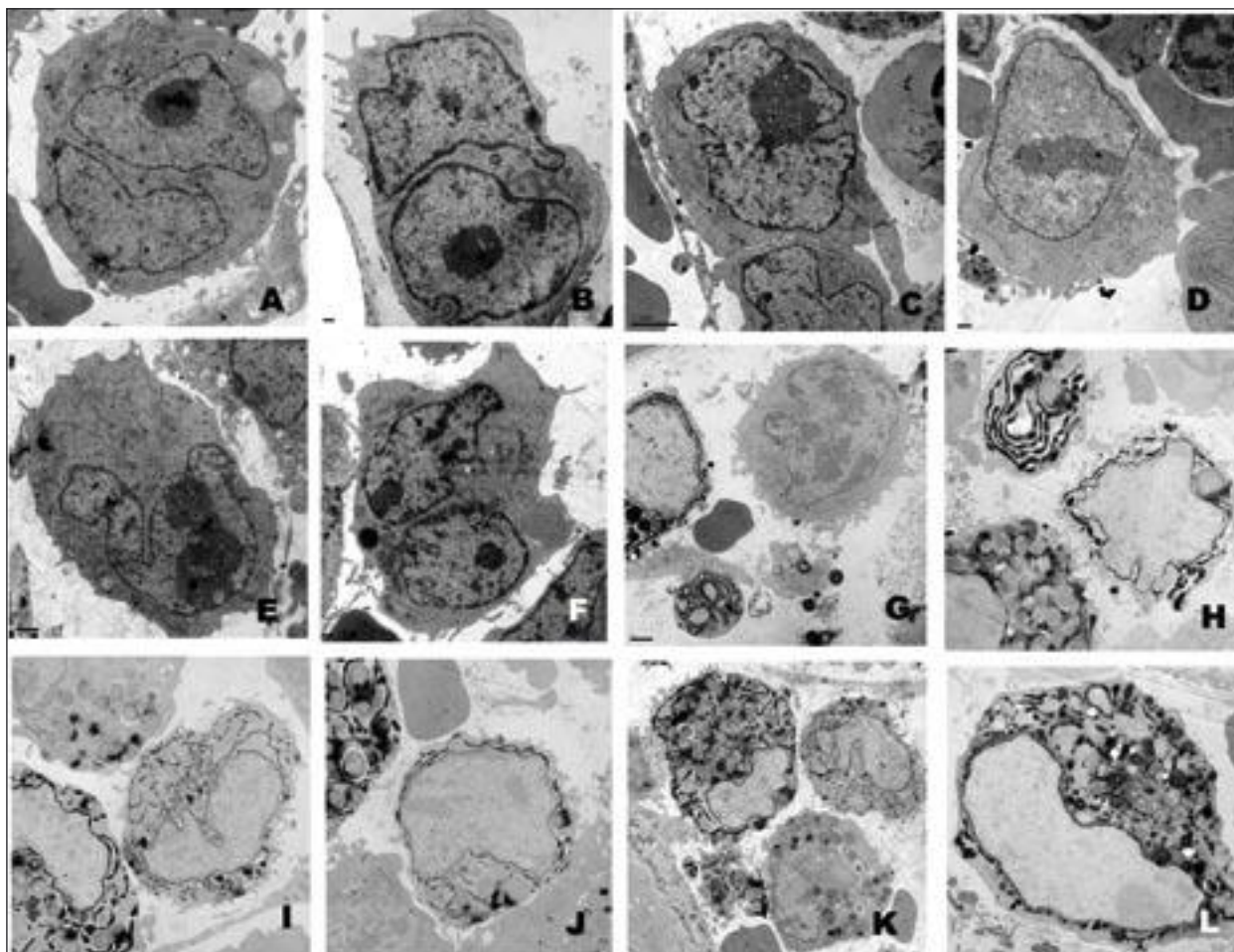


Figura 2. Aspirado de médula ósea, LAM eosinofílica, MET. A-F: Imágenes ultraestructurales correspondientes a blastos de gran tamaño, núcleos constituidos por eucromatina y grandes nucléolos, algunos binucleados, citoplasma agranular excepto en F, que contiene un gránulo primario de gran tamaño. Doble contraste  $\times 10k$ . G) Blasto de gran tamaño MOP negativo. F-L: Blastos de menor tamaño MOP positivos en aparato secretor y gránulos y eosinófilos con sus gránulos primarios característicos, EOP positivos, desde estadios precoces de diferenciación. Reacción de peroxidasa, método de Breton-Gorius, muestra sin contrastar  $\times 1k$ .

gos displásicos (Figura 3: H-I). Intensa hiperplasia del SMF con fagocitosis. *Cariotipo en médula ósea*: 45,XY,-7,t(12;13)(q12;p11)[15]/46,XY[5]. *Hibridación in situ fluorescente*: monosomía 7 en 52% de los núcleos (Figura 4). Se descartó del(5q), inv(16), reordenamiento BCR/ABL y reordenamiento PDGFRA. *Biología molecular*: Se descartaron por RT-PCR translocaciones BCR-ABL, AML-ETO y CBFβ-MYH11. No se detectó alteración en los genes FLT3 ni NPM1. *Biopsia de MO*: áreas normo e hipocelulares, eosinofilia y fibrosis reticulínica focal. *PAAF de adenopatía*: Frecuentes linfocitos maduros, segmentados, 10% eosinófilos (uno de ellos, inmaduro) y blastos de morfología indiferenciada. No se vieron células de Reed-Sternberg (RS), siendo el inmunofenotipo de los blastos similar al de MO. *Biopsia cutánea*: Espongiosis basal, edema de la dermis papilar y discreta dermatitis con eosinofilia, compatible con toxicodermia.

*TC toracoabdominal*: Disminución en número y tamaño de adenopatías axilares respecto al control de dos meses antes. Hepatomegalia.

**Evolución:** Recibió inducción según el protocolo Pethema (DNR-Ara-C 3/7), disminuyendo notablemente el tamaño de las adenopatías, con sólo leve mejoría de la pigmentación cutánea. También se observó desaparición transitoria de la blastosis periférica con progresión inmediata. Recibió reinducción con un ciclo EMA sin respuesta, siendo éxitus en progresión.

**Diagnóstico:** LAM eosinofílica (LAE) con displasia multilineal y monosomía 7 asociada.

**Discusión:** El diagnóstico de leucemia aguda eosinofílica requiere, junto a los hallazgos típicos de leucemia aguda mieloide, anemia, trombocitopenia y blastosis en sangre y médula ósea, la presencia de diferenciación eosinofílica en la médula y eosinófilos leucémicos en sangre. Los blastos son agranulares en microscopía

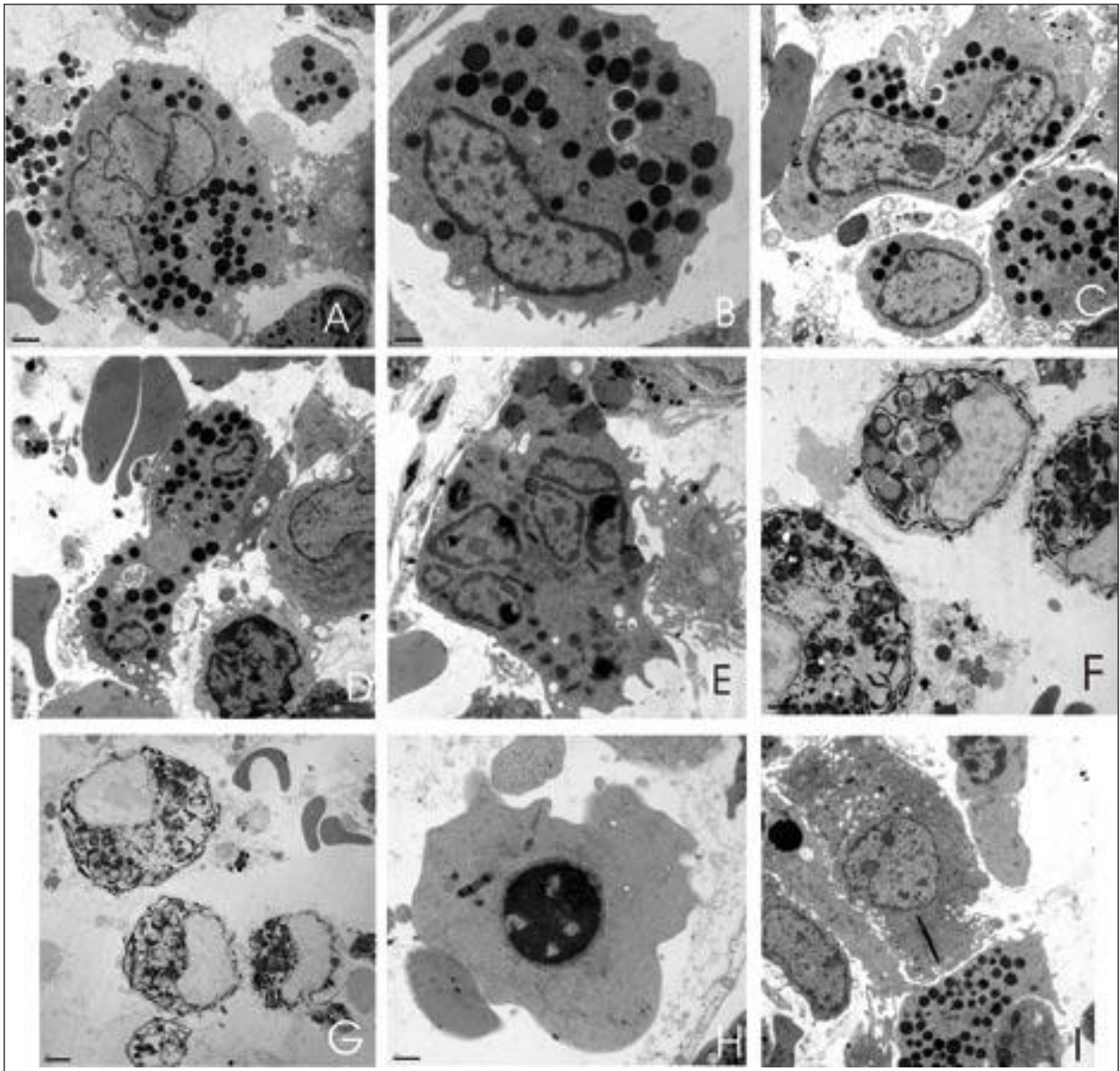


Figura 3. Aspirado de médula ósea, LAM eosinofílica, MET. A-E: Imágenes ultraestructurales de eosinófilos con desviación izquierda, anomalías nucleares y predominio de gránulos inmaduros sin cristaloides en formas semimaduras y maduras. En E, eosinófilo maduro multinucleado, como los descritos en microscopía óptica, conteniendo gránulos con cristaloides y gránulos lipídicos. Doble contraste. F-G: Eosinófilos EOP positivos CNK resistentes. Reacción de peroxidasa + CNK, muestra sin contrastar  $\times 8k$ . H: Eritroblasto con hierro intramitocondrial. Doble contraste  $\times 20k$ . I) Megacariocito hipolobulado con gran inclusión electrondensa, doble contraste  $\times 6k$ .

óptica, y junto a ellos hay una importante proporción de células inmaduras eosinofílicas. Los eosinófilos son claramente dismórficos, con asincronía N/C, núcleos que muestran signos de maduración y citoplasma poco granuloso que contiene gránulos anormales, que con frecuencia carecen de refringencia por la ausencia de gránulos con cristaloides. Son frecuentes las formas maduras multilobuladas. El examen al microscopio electrónico es fundamental ya que permite confirmar la participación de eosinófilos inmaduros, la severa dismorfia nuclear y el predominio de gránulos inmaduros

sin cristaloides. Con la reacción de peroxidasa incubada con CNK, es posible demostrar la peroxidasa característica de los gránulos eosinofílicos, que es resistente al cianuro potásico. Hepatomegalia, esplenomegalia y adenopatías son hallazgos exploratorios frecuentes, mientras que no hay lesiones cardíacas o neurológicas secundarias a la liberación del contenido tóxico de los gránulos, características de la leucemia eosinofílica crónica (LEC). La ausencia de esta patología podría estar en relación con el carácter agudo de la LAE y/o con la ausencia o menor potencial tóxico de los gránulos in-



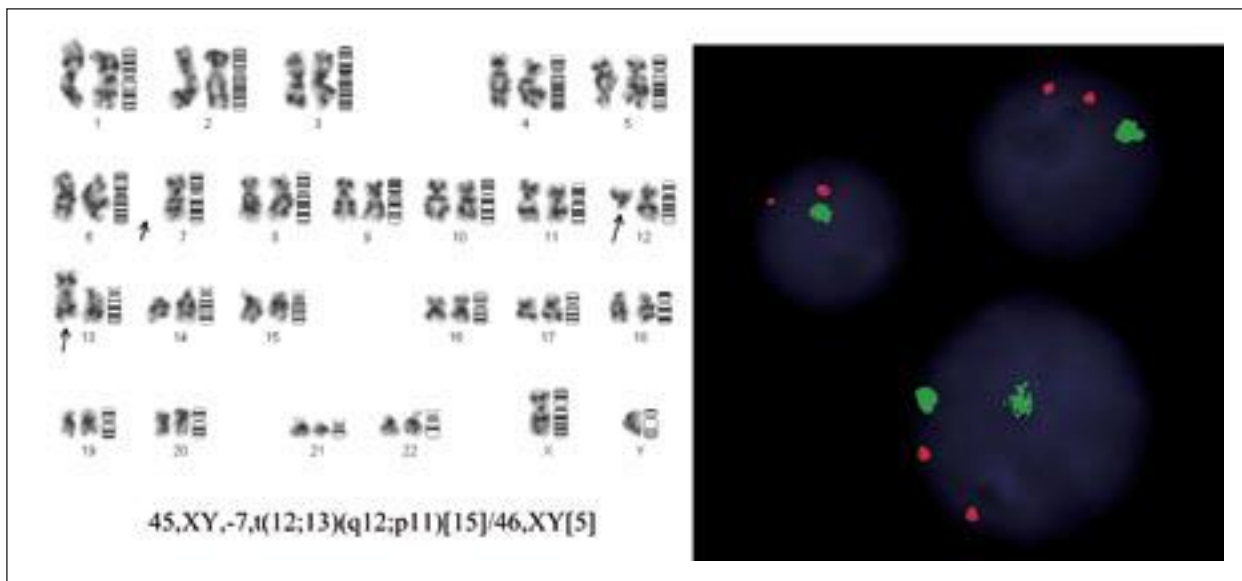


Figura 4. Citogenética convencional en médula ósea al diagnóstico de LAM eosinofílica: 45,XY,-7,t(12;13)(q12;p11) (izquierda). Hibridación in situ fluorescente con sondas CEP7 (verde) y LSI 21q22 (rojo) demostrando monosomía 7 (derecha).

maduros del eosinófilo. Puede existir también afectación cutánea como consecuencia de extensos infiltrados eosinófilos. Las anomalías citogenéticas descritas en los raros casos de LAE incluyen translocaciones que afectan a los cromosomas 10 y 11, mientras que anomalías del cromosoma 12 se han descrito en LAM con eosinofilia y fenotipo distinto de LAE. La monosomía 7, como en el caso que presentamos, es un hallazgo citogenético característico de síndrome mielodisplásico y de neoplasias mieloides secundarias a terapia, no de LAE. Respecto a si la sobreexpresión de WT1 pudiera ser frecuente en LAE permitiendo el diagnóstico diferencial con LEC, son muy pocos los casos estudiados. El tratamiento de LAE no es diferente al de otras leucemias agudas. El caso que presentamos cumple todas las características de leucemia aguda eosinofílica de inicio extramedular con sólo 10% de blastos en MO al inicio, adenopatías, hepatomegalia y afectación cutánea. En ella los eosinófilos son la línea celular dominante en la clona leucémica, como lo demuestra el hecho de que a partir de blastos indiferenciados, y tras su diferenciación a blastos mieloperoxidasa-negativos, ultraestructural y fenotípicamente mieloides, exhiben diferenciación granular eosinofílica desde los más precoces estadios del desarrollo, además de las características dismórficas reseñadas previamente. Se trata, según los criterios establecidos por la clasificación OMS 2008, de una LAE con cambios relacionados con mielodisplasia, tanto por la presencia de displasia multilineal como por la existencia de monosomía 7 asociada que confirma el carácter clonal de la eosinofilia. El diagnóstico inicial de LH, que podría sugerir la posibilidad

diagnóstica de eosinofilia asociada a una coexistente neoplasia mieloides y linfoides, creemos que puede ser excluido tras la revisión clínica, morfológica, histopatológica y citogenética del caso en su conjunto.

#### Para recordar

- Los pacientes con eosinofilia ( $> 0,5 \times 10^9/L$ ) pueden ser incluidos en tres categorías: eosinofilia reactivas, eosinofilia clonales y eosinofilia idiopáticas.
- Las eosinofilia reactivas pueden aparecer asociadas a linfomas, sobre todo linfomas de Hodgkin y LNH-T, así como a leucemias agudas linfoblásticas. En general, en estos procesos los eosinófilos no forman parte de la clona maligna, por lo que es importante la evaluación detallada del paciente y el estudio morfológico, histopatológico, citogenético y molecular.
- Los eosinófilos forman parte de la clona maligna en diversas hemopatías: leucemia eosinofílica crónica, mastocitosis sistémica, leucemia mielomonocítica crónica, leucemia mielomonocítica juvenil, leucemia mieloides crónica, leucemia mieloides crónica atípica, algunas leucemias mieloides agudas, síndromes mielodisplásicos y, en raras ocasiones, leucemias agudas linfoblásticas.
- La leucemia eosinofílica es una leucemia con fenotipo poco común que probablemente es el reflejo de la menor frecuencia de la línea celular eosinofílica en sangre y médula ósea. Su diagnóstico requiere la confirmación de que el fenotipo eosinófilo es el dominante en la clona leucémica.

## Bibliografía

1. Lichtman MA, Segel GB. Uncommon phenotypes of acute myelogenous leukemia: basophilic, mast cell, eosinophilic, and myeloid dendritic cell subtypes: A review. *Blood Cells Mol Dis.* 2005; 35: 370-83.
2. Tefferi A, Patnaik MM, Pardanani A. Eosinophilia: secondary, clonal and idiopathic. *British J Haematol.* 2006; 133: 468-92.
3. Fletcher S, Bain B. Eosinophilic leukaemia. *British Medical Bulletin.* 2007; 81-82: 115-27.
4. Gotlib J, Cross NCP, Gary Gilliland D. Eosinophilic disorders: molecular pathogenesis, new classification, and modern therapy. *Best practical and Research Clinical Haematology.* 2006; 19: 535-69.
5. Valent P. Pathogenesis, classification, and therapy of eosinophilia and eosinophil disorders. *Blood Reviews.* 2009; doi: 10.1016/j.blre.2009.01.001.
6. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, editors. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, vol. 2.* Geneva (Switzerland) and Albany (NY, USA): WHO Press; 2008.

## CASO 4

### PRESENTACIÓN SIMULTÁNEA DE LINFOMA LINFOCÍTICO Y LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

V.L. PERI<sup>1</sup>, J.M. BOSCH BENÍTEZ<sup>1</sup>,  
C. CAMACHO GARCÍA<sup>2</sup>, J.L. ALFONSO  
MARTÍN<sup>2</sup>, R. FERNÁNDEZ MARTÍN<sup>1</sup>,  
M.M. CABALLERO GÓMEZ<sup>1</sup>, J.D. GONZÁLEZ  
SAN MIGUEL<sup>1</sup>, J.M. DÍAZ CREMADES<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Hematología; <sup>2</sup>Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario Insular de Gran Canaria (Las Palmas de Gran Canaria)

**Motivo de consulta:** Varón de 61 años que refiere astenia de cinco meses de evolución con empeoramiento progresivo, pérdida de peso y sudoración profusa en el último mes. Acude al Servicio de Urgencias por dolor y presencia de masa en zona inguinal derecha.

**Historia clínica:** Paciente con antecedentes personales de diabetes mellitus de tipo 2 en tratamiento con antidiabéticos orales, ex fumador de 3 cajetillas/día e intervenido de meniscos hace 15 años.

**Exploración física:** Presencia de adenopatías latero-cervicales, supraclaviculares y axilares bilaterales no dolorosas en torno a los 2-3 cm, así como inguinal derecha de 3 cm. Resto, sin interés.

**Pruebas complementarias:** *Hemograma:* hemoglobina: 86 g/L; VCM: 86 fL; plaquetas:  $90 \times 10^9/L$ ; leucocitos:  $4,7 \times 10^9/L$ . La fórmula leucocitaria mostraba

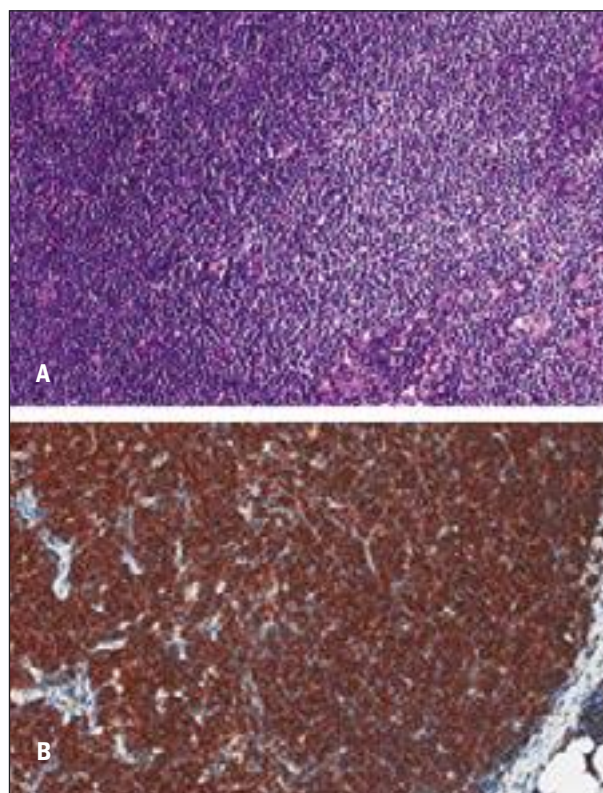


Figura 1. Biopsia de ganglio linfático: A: proliferación de linfocitos de talla pequeña (tinción hematoxilina-eosina  $\times 200$ ). B: CD20 positivo por inmunohistoquímica.

38% segmentados, 4% cayados, 42% linfocitos, 10% monocitos, 4% eosinófilos, 2% mielocitos, 2% eritroblastos. *Frotis de sangre periférica:* a destacar únicamente anisopoiquilocitosis y dacriocitos. *Bioquímica:* LDH 651 UI/dL; resto, dentro de límites normales. *TAC de cuerpo completo:* múltiples adenopatías bilaterales en las zonas inguinales, axilares y laterocervicales. Conglomerado retroperitoneal desde los hilios renales hasta la bifurcación de la aorta. *Biopsia de ganglio linfático:* arquitectura borrada por una proliferación difusa de linfocitos de talla pequeña, núcleo redondo con cromatina grumosa y pequeños nucléolos. Se reconocen algunas áreas vagamente nodulares, con presencia de áreas claras constituidas por células de mayor tamaño, cromatina clara y nucléolo prominente (Figura 1: A). Inmunohistoquímica positiva para CD79a, CD5, Bcl2, CD20 (Figura 1: B) y débilmente para CD23. No se detecta CD3, CD10, ciclina D1 ni CD138. Compatible con linfoma linfocítico (LL)/leucemia linfática crónica (LLC).

*Aspirado de médula ósea:* hiper celular con escasos megacariocitos e infiltración del 83% por linfocitos de talla pequeña, núcleo regular, algo excéntrico con cromatina densa. Se observa un 1% de células de aspecto monocítico, de talla grande, citoplasma basófilo con

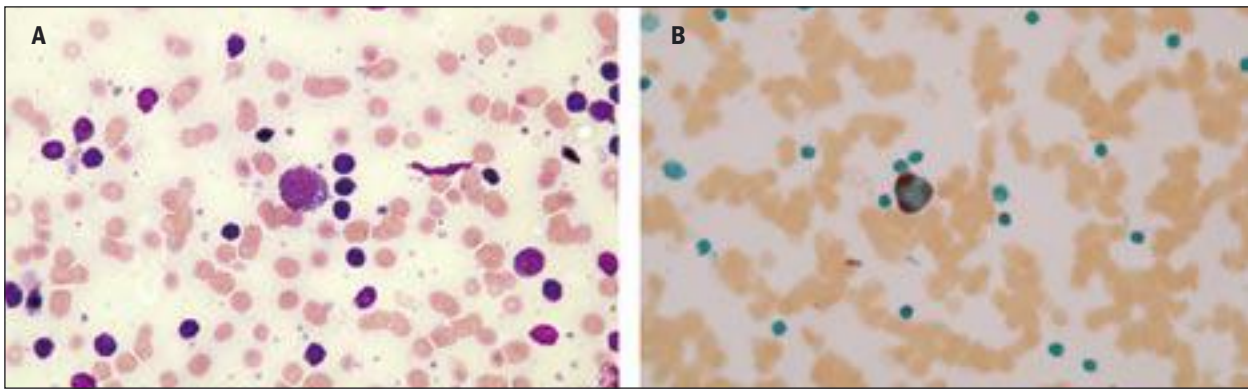


Figura 2. Aspirado de médula ósea: A: Sobre la infiltración linfocitaria se observan células de talla mediana, citoplasma vacuolado, con nucléolo (tinción Wright-Giemsa  $\times 400$ ). B: Las células de aspecto monocítico son butiratoesterasa-positivas ( $\times 400$ ).

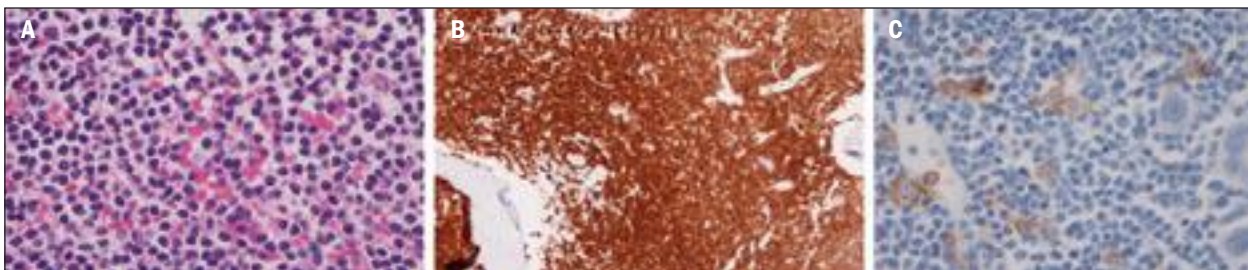


Figura 3. Biopsia de médula ósea: A: Infiltración difusa por linfocitos de talla pequeña y cromatina grumosa (tinción hematoxilina-eosina  $\times 400$ ). B: Linfocitos CD20 positivos. C: CD56 por inmunohistoquímica, apreciándose sobre el infiltrado difuso por LNH la presencia de escasos blastos positivos.

vacuolas, núcleo con nucléolo evidente, algunas en mitosis (Figura 2: A), positivas para la butirato esterasa (Figura 2: B). *Inmunofenotipo* (IF): los linfocitos expresaban CD19, CD5, CD22, CD20, CD79b, CD23 y kappa<sup>débil</sup>, negativo para CD10 y lambda. Conclusión: infiltrado por LNH-B con morfología e IF compatible con LLC. *Biopsia de médula ósea*: infiltración difusa por linfocitos de talla pequeña, núcleo redondeado y cromatina grumosa (Figura 3: A) con inmunohistoquímica positiva para CD79a, CD23, CD5 y CD20 (Figura 3): B). Siendo negativa para CD3 y ciclina D1. Fibrosis reticulínica moderada. Compatible con infiltración difusa por LNH. *Estudio citogenético por FISH*: trisomía del 12 en el 64% de las células observadas en médula ósea (Figura 4).

**Evolución:** Diagnosticado de linfoma linfocítico (LL) estadio IV (MO)-B, recibió poliquimioterapia tipo FCR (fludarabina, ciclofosfamida y rituximab) cada 28 días por 6 ciclos. Tras cinco días de finalizar el último ciclo presenta cefalea intensa, agitación y fiebre con cifras en sangre periférica normales. Sospechando meningitis se realiza una *punción lumbar*: recuento celular de  $1,1 \times 10^9/L$ . En el frotis de citocentrífuga se observan células de aspecto blástico de gran tamaño, amplio citoplasma algo basófilo con vacuo-

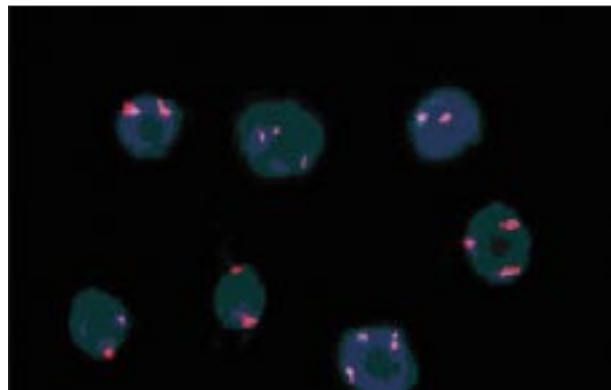


Figura 4. Trisomía del 12 por FISH en médula ósea. Se detecta la presencia de dos líneas celulares: en la primera (64%), tres señales de la sonda centromérica del cromosoma 12, y en la segunda (36%), dos señales.

las y núcleo con presencia de varios nucléolos (Figura 5: A). Citoquímica: mieloperoxidasa con positividad granular en algunos elementos y butirato esterasa positiva (Figura 5: B-C). *Inmunofenotipo*: marcadores pan-B, negativos. CD45<sup>dim</sup>, MPOc, TDTc, CD15, CD64, CD33, CD11b y CD56 positivos (Figura 5: D). CD34,



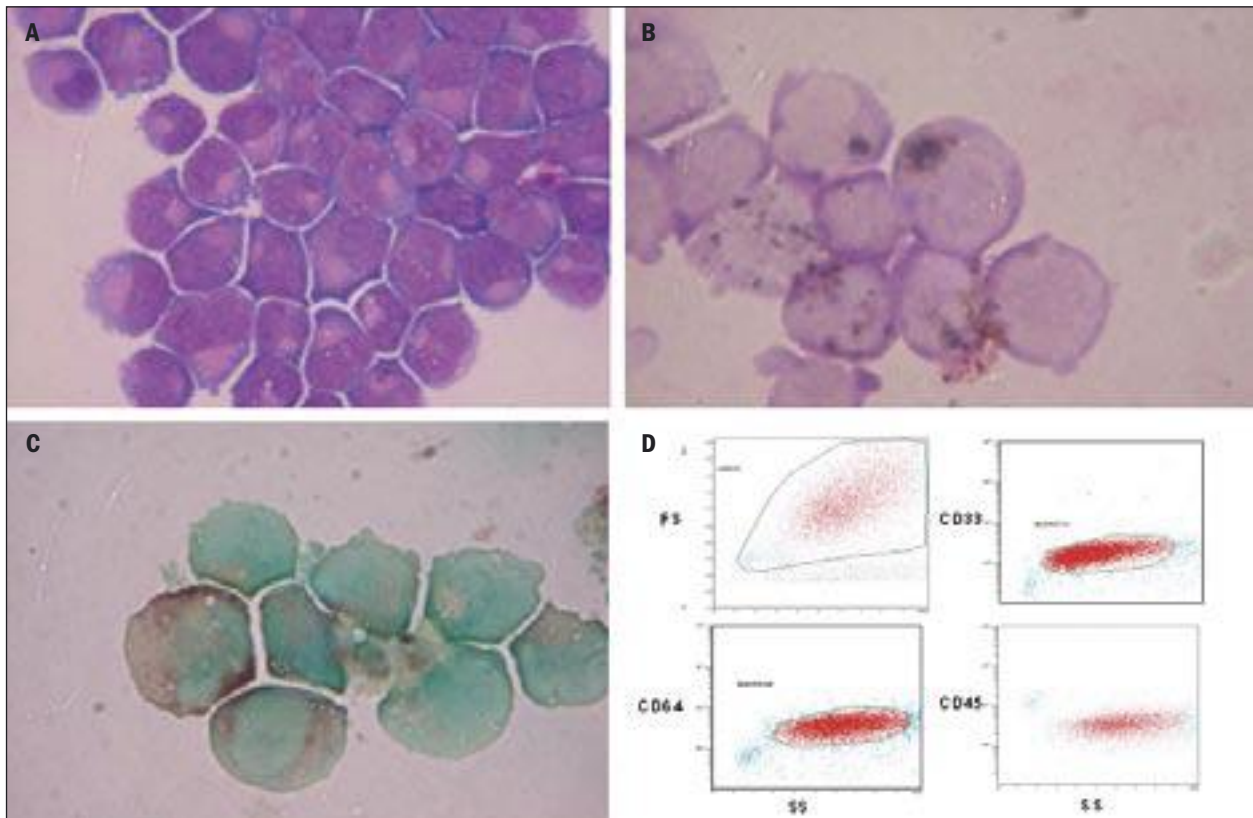


Figura 5. Citocentrífuga de líquido cefalorraquídeo: A: Presencia de células de aspecto blástico, de talla mediana grande, citoplasma basófilo vacuolado, núcleo irregular con nucléolo (tinción Wright-Giemsa  $\times 1.000$ ) B: Algunos blastos presentaban positividad granular para la mieloperoxidasa ( $\times 1.000$ ) C: Tinción citoquímica butirato esterasa positiva ( $\times 1.000$ ). D: Citometría de flujo en LCR. Se aprecian los blastos con alto FS y SS que expresan CD45 débil, CD64 y CD33.

HLA-DR, CD13 y CD14 negativos. *Cariotipo*: 50, XY, add (1)(p36.2), ins (2)(p11.2) +4, del 5(q13,q33), add (7)(q31), del (8)(q13,q22), +22, +mar 1, +mar 2 [20].

El *mielograma* demuestra una infiltración de distribución muy irregular de 24% de blastos de talla mediana-grande, citoplasma ligeramente basófilo con granulación azurófila y núcleo irregular con nucléolo (Figura 6). El estudio del inmunofenotipo mostraba una población CD45<sup>dim</sup>, CD117, CD33, CD11b, CD15, CD64, CD65, CD7, CD4 y CD56 positivos, mientras que el estudio de marcadores de LL fue negativo por lo que se consideró la enfermedad mínima residual (EMR) para LL negativa. *Cariotipo*: 47, XY, ins (2)(p11.2), del (5)(q13q33), del (8)(q13q22), -9, -13, +mar 1, +mar 2, +mar 3 [4] / 50, idem, +4, +9, +13, +22, -mar 2 [4] / 45, X, -Y, [3] / 46, XY [7].

El paciente falleció por fallo multiorgánico antes de instaurar tratamiento quimioterápico.

**Diagnóstico:** LAM- M5b (FAB) con infiltración de SNC, precedida de un LL.

De forma retrospectiva se realizó CD56 por inmunohistoquímica en la primera biopsia de médula ósea, corroborando la presencia concomitante de LL/LLC con LAM (Figura 3: C).

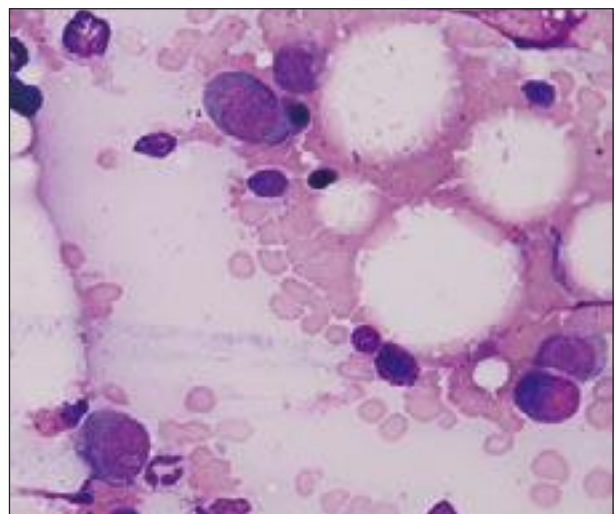


Figura 6. Mielograma: Presencia de blastos de talla mediana-grande, citoplasma basófilo con granulación azurófila y núcleo irregular con nucléolo (tinción Wright-Giemsa  $\times 600$ )

**Discusión:** Los pacientes con LLC/LL tienen un riesgo aumentado de desarrollar segundas neoplasias.



Alrededor del 10% presentan esta complicación, sobre todo tumores sólidos de pulmón, tubo digestivo y piel, no habiéndose demostrado, sin embargo, un riesgo mayor de desarrollar neoplasias mieloides. Asimismo, en un 3-10% de los casos se asiste a la aparición de un linfoma de células grandes (síndrome de Richter), que en cerca de la mitad de los casos surge de la transformación de la propia clona de la LLC, relacionándose con la infección del VEB, frecuente en pacientes inmunodeprimidos. La trisomía del 12, las alteraciones del cromosoma 11, así como otros múltiples defectos genéticos han sido descritos en estos pacientes. La presentación extranodal del síndrome de Richter se ha visto en múltiples localizaciones, incluido el SNC<sup>1</sup>.

Se sabe que el uso de radioterapia o quimioterapia –sobre todo, alquilantes– en el tratamiento de LL/LLC produce un aumento en la incidencia de LAM secundarias. Éstas tienen un cariotipo complejo con afectación frecuente de los cromosomas tanto 5 como 7 y muy mal pronóstico, con una supervivencia media de 3,5 meses<sup>2</sup>.

El desarrollo de leucemia aguda linfoblástica durante el curso de LL/LLC es muy infrecuente. La mayoría de los casos reportados parece descender de la misma clona que la LLC; sin embargo, en algunos casos no se ha podido demostrar claramente este hecho, siendo la supervivencia global, en todos los casos, muy baja<sup>3,4</sup>.

La presentación simultánea de LMA y LL/LLC es una rareza. Hay varias teorías sobre la etiología de este fenómeno: secundario al déficit inmunológico propio de la LLC o a algún agente leucemógeno común para ambas patologías, o bien atribuible a una simple coincidencia de aparición en el tiempo. Algunos autores proponen la teoría de dos clones malignas separadas, mientras que otros apoyan la evolución del mismo clon. Esta última posibilidad podría explicar la remisión completa de ambas enfermedades, descrita en tres casos clínicos, tras el tratamiento de inducción para la LAM<sup>4,6</sup>.

En 1997 Mitterbauer *et al.* probaron la presencia de dos clones diferentes a través de análisis inmunológico y molecular en una paciente de 77 años con LLC de curso indolente que no precisó tratamiento y que, tras ocho años de evolución, desarrolló una AREB de curso agresivo que se transformó en LAM a los seis meses. Se corroboró por el reordenamiento IgH por PCR, siendo monoclonal en la LLC y negativa en los blastos mieloides, y el patrón de inactivación del cromosoma X con una metilación diferente en ambas entidades<sup>7</sup>.

Se han publicado sólo 22 casos de presentación simultánea, los cuales tenían una edad media de 68 años, 15 hombres y 7 mujeres. Siete de estos casos ocurrieron en pacientes ya diagnosticados de LLC sin tratamiento que desarrollaron la LAM meses más tarde (8-48 meses), y en el resto el diagnóstico fue simultáneo. Según la clasificación de la OMS/FAB, seis de ellos fueron diagnosticados de LAM con maduración (M2), cuatro mielomo-

nocítica (M4), una monocítica (M5), una mieloblástica sin maduración (M1), dos SMD y el resto fueron clasificables. Salvo en dos pacientes en los que se tomó una actitud paliativa, y en siete pacientes en los que no consta el dato, la supervivencia global media de los pacientes tratados fue de 142 días. La causa de la muerte fue en la mayoría de los casos por hemorragia (5 pacientes) y sepsis (6 pacientes). Dos de los pacientes alcanzaron la remisión completa. Solamente en nueve casos se realizó cariotipo, siendo complejo en tres<sup>4,11</sup>.

Nuestro caso corresponde al diagnóstico simultáneo de ambas enfermedades, por la demostración retrospectiva de la presencia de blastos en la primera médula ósea, aunque el grado de infiltración por LNH linfocítico/LLC no permitió el diagnóstico en un primer momento, y por el escaso tiempo transcurrido entre ambas entidades. Probablemente el tratamiento con FCR instaurado para la LL/LLC tuvo cierto efecto sobre la infiltración medular por LMA de este paciente (no existía una infiltración masiva) no pudiendo evitar la proliferación en el SNC por la escasa penetrancia de estos fármacos en el mismo.

#### Para recordar

- Los pacientes con LL/LLC tienen mayor incidencia de presentar neoplasias (sobre todo, carcinomas de piel, pulmón y tubo digestivo) que la población en general. Esta complicación puede aparecer antes, durante o después del tratamiento, en cuyo caso no guardan necesariamente relación con el mismo. También se puede observar la transformación a un linfoma difuso de células grandes (LDCG) en casi un 10% de los casos.
- La incidencia total de leucemia aguda secundaria es de 1,7%. Los casos de LAM concomitante con LLC es una rareza, no habiéndose podido demostrar un mayor riesgo de desarrollar neoplasias mieloides en estos pacientes.
- Hay que tener en cuenta que en algunos casos, como en nuestro paciente, el diagnóstico de leucemia aguda puede estar enmascarado por la intensa infiltración linfocitaria de la LLC.

#### Bibliografía

1. Omoti CE, Omoti AE. Richter syndrome: a review of clinical, ocular, neurological and other manifestations. *Br J Hematol* 2008; 142: 709-16.
2. Morrison VA, Rai KR, Peterson BL, Kolitz JE, Elias L, Appelbaum FR, et al. Therapy-related myeloid leukemias are observed in patients with chronic lymphocytic leukemia after treatment with fludarabine and chlorambucil: results of an intergroup study, cancer and leukemia group B 9011. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3878-84.

3. Tadeusz Robak. Second malignancies and Richter's Syndrome in patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Hematology* 2004; 9: 387-400.
4. Lima M, Porto B, Rodrigues M, Teixeira M, Coutinho J, Ribeiro AC, et al. Cytogenetic findings in a patient presenting simultaneously with chronic lymphocytic leukemia and acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 1996; 87: 38-40.
5. Caballero MD, González M, Cañizo MC, Orfao A, Nieto MJ, San Miguel JF. Concomitant Chronic Lymphocytic Leukaemia (CLL) and Acute Myeloid Leukemia. Complete remission of CLL achieved with high-dose Cytosine Arabinoside. *Leukemia* 1992; 8: 856-8.
6. Conlan MG, Mosher DF. Concomitant chronic lymphocytic leukemia, acute myeloid leukemia and thrombosis with protein C deficiency. *Cancer* 1989; 63: 1398-401.
7. Mitterbauer G, Schwarzmeier J, Mitterbauer M, Jaeger U, Fritsch G, Schwarzinger I. Myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia supervening previously untreated chronic B-lymphocytic leukemia: demonstration of the concomitant presence of two different malignant clones by immunologic and molecular analysis. *Ann Hematol* 1997; 74: 193-7.
8. Lawlor E, McCann SR, Whelan A, Grealley J, Temperley JJ. Acute Myeloid Leukaemia Occurring in Untreated Chronic Lymphatic Leukaemia. *Br J Haematol* 1979; 43: 369-73.
9. Manoharan A, Catovsky D, Clein P, Traub NE, Costello C, O'Brien M, et al. Simultaneous or spontaneous occurrence of lympho-and myeloproliferative disorders: a report of four cases. *Br J Haematol* 1981; 48: 111-6.
10. Roberts PD, Forster PM. Chronic lymphocytic leukaemia associated with acute myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1973; 25: 203-6.
11. Robertson LE, Estey E, Kantarjian H, Koller C, O'Brien S, Brown B, et al. Therapy-related leukemia and myelodysplastic syndrome in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1994; 12: 2047-51.

## CASO 5

### FIEBRE, PANCITOPENIA Y HEPATOESPLENOMEGALIA EN VARÓN DE 37 AÑOS CON INFECCIÓN POR VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

L. MORABITO<sup>1</sup>, T. MARTÍN-SANTOS<sup>1</sup>, J.M. RAYA<sup>1</sup>, I. CEBALLOS<sup>2</sup>, H. ÁLVAREZ-ARGÜELLES<sup>3</sup>, L.M. GONZÁLEZ DEL CASTILLO<sup>1</sup>, M.R. ALEMÁN<sup>4</sup>, M.L. BRITO<sup>1</sup>, L. HERNÁNDEZ-NIETO<sup>1</sup>

Servicios de <sup>1</sup>Hematología y Hemoterapia; <sup>2</sup>Oncología Médica; <sup>3</sup>Anatomía Patológica; <sup>4</sup>Medicina Interna. Hospital Universitario de Canarias. La Laguna (Santa Cruz de Tenerife)

**Historia clínica:** Paciente varón de 37 años que ingresa en agosto de 2007 por fiebre, dificultad respiratoria y dolor abdominal.

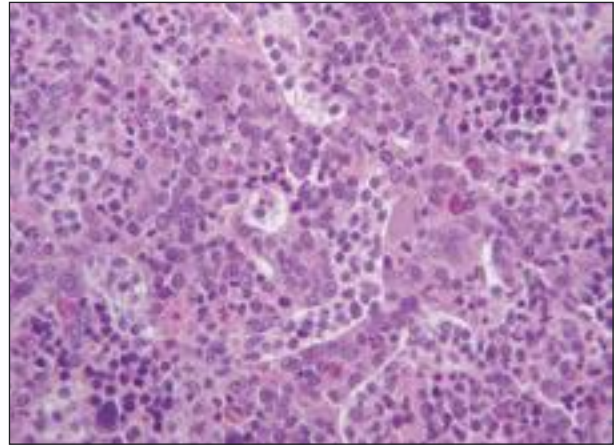


Figura 1. Biopsia de médula ósea que muestra hiper celularidad llamativa y sinusoides dilatados e infiltrados por elementos linfoides atípicos de talla pequeña (hematoxilina-eosina ×400).

**Antecedentes personales:** Infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) e infección por VHC, diagnosticadas en 1994, con cumplimiento irregular del tratamiento antirretroviral y criterios de sida desde 2006. Ex ADVP, en tratamiento de mantenimiento con metadona. Otros antecedentes incluían endocarditis tricuspídea por *Pseudomonas aeruginosa*, neumonía necrotizante y condilomas acuminados perianales intervenidos.

**Exploración física:** Desnutrición intensa. Hepatomegalia de 3 cm por debajo de reborde costal y esplenomegalia marcada. Ausencia de adenopatías periféricas. El resto de la exploración no mostró hallazgos destacables.

**Pruebas complementarias:** *Hemograma:* hemoglobina 70 g/L, leucocitos  $0,5 \times 10^9/L$ , plaquetas  $78 \times 10^9/L$ . Cifra de linfocitos CD4+  $41/mm^3$  y carga viral de 497 copias/mL. *Bioquímica:* dentro de límites normales, incluida LDH.  $\beta 2$ -microglobulina: 4,14 mg/L (valores normales: 0,7-3,4). *Baciloscopias* (esputo, sangre, orina y heces): negativas. *Radiografía de tórax:* dentro de límites normales. *TAC de tórax, abdomen y pelvis:* hepatomegalia homogénea moderada y esplenomegalia gigante "hasta pala iliaca". Ausencia de adenopatías. *Mielograma:* grado de celularidad y hematopoyesis diferencial no valorables por ausencia de grumo. Presencia de un 23% de células linfoides atípicas. *Biopsia de médula ósea:* celularidad significativamente aumentada, con ausencia del componente graso, existencia de un infiltrado linfoide constituido por células de talla media con un patrón de distribución predominantemente intrasinusoidal (Figura 1). Por técnicas de inmunohistoquímica se demostró que eran de estirpe T (CD3+) (Figura 2). Fibrosis reticulínica grado II, sin fibrosis colágena. *Estudio histológico del bazo (pieza de esplenecto-*

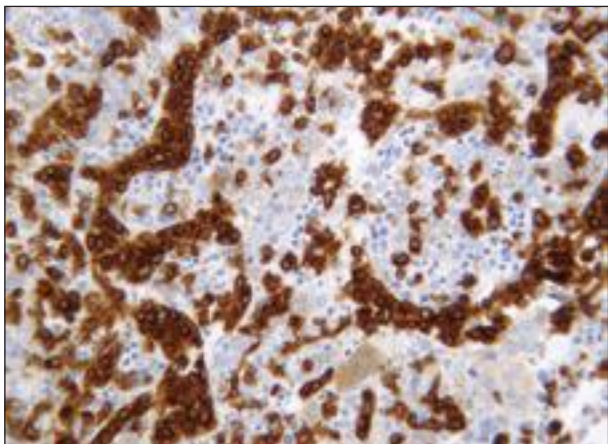


Figura 2. Biopsia de médula ósea con sinusoides dilatados y ocupados por abundantes células de naturaleza linfoide T, demostrada mediante tinción inmunohistoquímica. Patrón intrasinusoidal con discreto componente de afectación intersticial (CD3+, × 400).

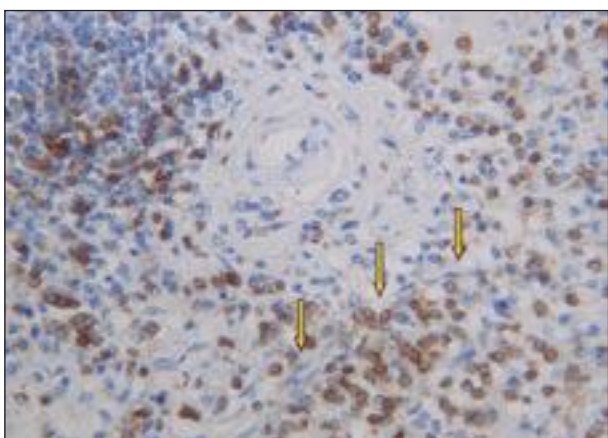


Figura 3. Presencia de un infiltrado celular monomorfo constituido por células pequeñas-medianas de naturaleza T y predominio intrasinusoidal, que afecta principalmente a la pulpa roja (CD3+, × 400).

mía): presencia de un infiltrado celular monomorfo de células pequeñas-medianas CD3+, de predominio intrasinusoidal, que afectaba principalmente a la pulpa roja, con ligera atrofia de pulpa blanca (Figura 3).

**Diagnóstico:** Linfoma T hepatoesplénico, estadio IVB.

**Evolución:** En el postoperatorio inmediato de la esplenectomía se detectó una leucocitosis ( $24,7 \times 10^9/L$ ) con una linfocitosis significativa ( $19,8 \times 10^9/L$ ). En el examen del frotis de sangre la población linfoide estaba constituida fundamentalmente por células de talla pequeña a mediana, núcleo de contornos irregulares y nucléolo visible, generalmente único; citoplasma basófilo y agranular (Figura 4). En el análisis inmunofenotí-

pico por citometría de flujo, el 95% de los linfocitos en sangre eran T (CD3+), y un 3%, de estirpe B (CD19+). Las células T eran de dos tipos: la población mayoritaria (75%) correspondía a una clona neoplásica positiva para CD3, CD2, CD7, CD56, CD16 y TCR- $\gamma\delta$  (negativa para CD4, CD8, CD5, CD1a, CD57, CD25, CD11c y TCR- $\alpha\beta$ ), compatible con leucemización del linfoma T hepatoesplénico (subtipo gamma-delta); una subpoblación minoritaria (18%) representaba células T normales (CD3+CD4+ 4% y CD3+CD8+ 14%). Se obtuvo una buena respuesta inicial a la quimioterapia con esquema CHOP, pero, como era de esperar, el curso clínico fue agresivo y la enfermedad se agravó cinco meses después, de nuevo como enfermedad en fase leucémica. El paciente falleció transcurridos 6 meses desde el diagnóstico.

**Discusión:** El linfoma no Hodgkin (LNH) es la más común de entre las neoplasias definitorias de sida y una de las causas más frecuentes de mortalidad<sup>1</sup>. Habitualmente suele ser de naturaleza B, agresivo y de alto grado. Los linfomas más frecuentemente relacionados con el sida son: linfoma de Burkitt, linfoma difuso de células grandes B, linfoma primario de cavidades y linfoma plasmoblástico. Los linfomas T comportan sólo alrededor de un 3% de todos los LNH que acontecen en pacientes infectados por VIH<sup>2</sup> y, entre ellos, resulta aún más extraordinario encontrar algún caso de linfoma T hepatoesplénico.

El linfoma T hepatoesplénico es una neoplasia extranodal y sistémica que deriva de linfocitos T citotóxicos, habitualmente de tipo gamma-delta, y que de forma característica infiltra marcadamente los sinusoides del bazo, el hígado y la médula ósea<sup>3</sup>. Se acepta que la primera descripción se debe a Kadin *et al.* en 1981. Representa menos del 1% de todos los LNH y suele afectar a adultos jóvenes, con predominio en varones. No se ha podido probar una asociación etiopatogénica con algún tipo de infección vírica. Existe una mayor incidencia en pacientes que han recibido un trasplante de órgano sólido (riñón, corazón) sometidos a inmunosupresión a largo plazo, y más recientemente se ha descrito la aparición de este tipo de linfomas en pacientes afectados de enfermedad inflamatoria intestinal crónica (sobre todo, enfermedad de Crohn) tratados con anticuerpos anti-TNF como infliximab en asociación a terapia inmunosupresora o inmunomoduladora<sup>4</sup>. Los enfermos suelen presentarse con hepatoesplenomegalia, citopenias en sangre (sobre todo, trombocitopenia) y síntomas B, y sin adenopatías periféricas. Suelen encontrarse alteraciones citogenéticas, y de forma recurrente se ha detectado en ellos la presencia de isocromosoma 7q; también es frecuente la trisomía 8.

La última clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de las neoplasias linfoides (2008) no menciona la sangre periférica como lugar de afectación por el linfoma T hepatoesplénico<sup>3</sup>, ni siquiera



de forma inusual, pero diversos autores han recogido esta posibilidad, sobre todo después de esplenectomía. De ahí que sea importante reconocer la morfología de la población linfocítica neoplásica en sangre, además de sus características inmunofenotípicas. Las células linfomatosas expresan generalmente CD2, CD3, CD7, CD16, CD56, CD38 y el receptor gamma-delta de los linfocitos T, mientras que suelen ser negativas para CD4, CD8, CD5, CD57 y el receptor alfa-beta. Bastante más raramente, un subtipo de estos linfomas puede ser CD8 positivo y negativo para marcadores NK (CD16, CD56), y excepcionalmente se ha comunicado algún caso CD5 positivo. Finalmente, además del tipo gamma-delta descrito, también existe la variedad alfa-beta de linfoma T hepatoesplénico, de características clínicas básicamente similares al primero, si bien parece afectar más a mujeres<sup>5</sup>.

Desde un punto de vista terapéutico se han comunicado resultados favorables en casos aislados utilizando diferentes esquemas, bien como monoterapia (interferón-alfa, 2'-deoxicoformicina), poliquimioterapia (alemtuzumab + cladribina, CHOP ± bortezomib, hiper-CVAD), o mediante trasplante de progenitores hematopoyéticos, más frecuentemente alogénico en pacientes pediátricos. Sin embargo, en la mayoría de las ocasiones cursa de forma agresiva y fatal en pocos meses, a pesar de una buena respuesta inicial al tratamiento.

Como han citado otros autores, debemos tener en cuenta que en la era de la terapia antirretroviral combinada se ha asistido a un aumento de las neoplasias no definitorias de sida, y que éstas conllevan una mayor morbilidad y mortalidad que aquellas reconocidas como definitorias<sup>1,6</sup>. Desde un punto de vista etiopatogénico, para el caso de los LNH-B se postula que, teniendo en cuenta la inmunosupresión asociada a la infección por VIH, la estimulación antigénica continua de los linfocitos B por el propio VIH u otras infecciones concurrentes (VEB, VHC y otros) parece ser crucial en el proceso de linfomagénesis<sup>7</sup>. Esta estimulación podría conducir a un reordenamiento de los genes variables de las inmunoglobulinas (IGV) que finalmente produciría la expansión de una clona linfomatosa. Aunque recientemente han tenido lugar avances importantes en el conocimiento de la patogenia de los linfomas T periféricos nodales<sup>8</sup>, las alteraciones moleculares patogénicas permanecen desconocidas en la mayoría de las entidades, y lo mismo podemos aplicar a aquellos linfomas T de naturaleza extrano-

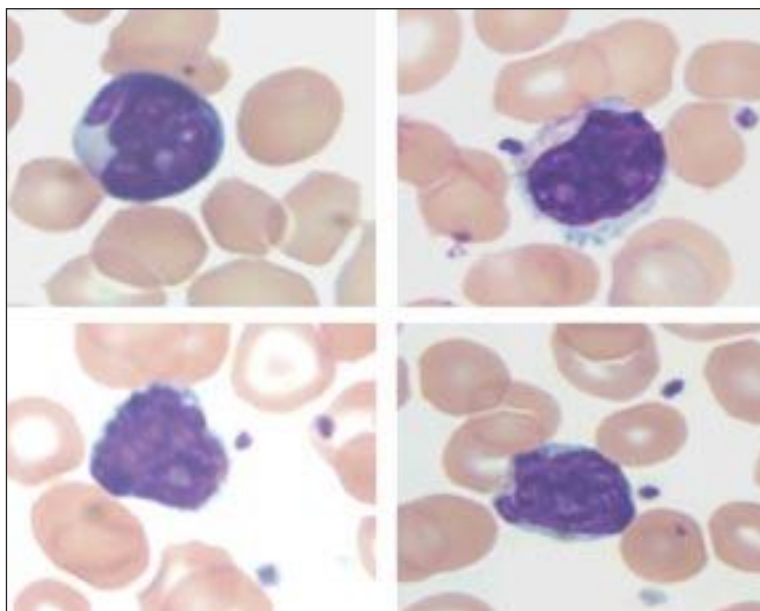


Figura 4. Expresión en sangre del linfoma T hepatoesplénico: detalles morfológicos de las células neoplásicas con tinción panóptica (May-Grünwald-Giemsa,  $\times 1000$ ).

dal. Además, si tenemos en cuenta que los linfomas T comportan el 10-15% de todos los casos de LNH en la población en general y que en los pacientes con infección por VIH este porcentaje es inferior, nos resulta aún más difícil establecer una relación etiopatogénica entre la infección por VIH y el desarrollo de un linfoma T hepatoesplénico, como ocurrió en nuestro paciente. De hecho, en la literatura revisada sólo hemos encontrado otro caso de linfoma T gamma-delta hepatoesplénico en enfermos con sida<sup>9</sup>, lo cual da idea del carácter excepcional de esta asociación.

#### Para recordar

- Los linfomas T comportan sólo un 3% de todos los LNH que acontecen en pacientes infectados por el VIH. El linfoma T hepatoesplénico, cuyo curso clínico suele ser agresivo y fatal en pocos meses, resulta excepcional en este tipo de pacientes.
- Aunque la clasificación de la OMS de las neoplasias linfocíticas (2008) no menciona la sangre periférica como lugar de afectación por el linfoma T hepatoesplénico, es conocida esta posibilidad (sobre todo, después de esplenectomía), y debemos reconocer la morfología de la población linfocítica neoplásica y sus características inmunofenotípicas.
- Teniendo en cuenta los aspectos epidemiológicos y etiopatogénicos de los linfomas T periféricos, es difícil establecer una correlación entre la infección por VIH y la aparición de un linfoma T hepatoesplénico.



## Bibliografía

- Spano JP, Costagliola D, Katlama C, Mounier N, Oksenhendler E, Khayat D. AIDS-related malignancies: state of the art and therapeutic challenges. *J Clin Oncol* 2008; 26: 4834-42.
- Arzoo KK, Bu X, Espina BM, Seneviratne L, Nathwani B, Levine AM. T-cell lymphoma in HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004; 36: 1020-7.
- Gaulard P, Jaffe ES, Krenacs L, Macon WR. Hepatosplenic T-cell lymphoma. En: Swerdlow SH, et al. (eds.). *WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon: IARC Press; 2008. p. 292-3.
- MacKey AC, Green L, Liang LC, Dinndorf P, Avigan M. Hepatosplenic T cell lymphoma associated with infliximab use in young patients treated for inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007; 44: 265-7.
- Macon WR, Levy NB, Kurtyn PJ, Salhany KE, Elkhalfa MY, Casey TT, et al. Hepatosplenic alphabeta T-cell lymphomas: a report of 14 cases and comparisons with hepatosplenic gammadelta T-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 285-96.
- Bonnet F, Chêne G. Evolving epidemiology of malignancies in HIV. *Curr Opin Oncol* 2008; 20: 534-40.
- Rivera JM, Navarro JT. Human immunodeficiency virus-related non-Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 2008; 93: 1129-32.
- De Leval L, Gaulard P. Pathobiology and molecular profiling of peripheral T-cell lymphomas. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2008; 2008: 272-9.
- Vega F, Medeiros J, Gaulard P. Hepatosplenic and other  $\gamma\delta$  T-cell lymphomas. *Am J Clin Pathol* 2007; 127: 869-80.

## CASO 6

### LEUCEMIA AGUDA LINFOIDE T CON MARCADORES MIELOIDES

M. CAMÓS<sup>1</sup>, T. TOLL<sup>1</sup>, S. RIVES<sup>1</sup>, A. CATALÀ<sup>1</sup>, M. PÉREZ-IRIBARNE<sup>2</sup>, R. BERRUECO<sup>1</sup>, N. CONDE<sup>1</sup>, A. QUINTERO<sup>1</sup>, E. TUSET<sup>3</sup>, J. ESTELLA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Hematología y <sup>2</sup>Laboratorio de Genética. Hospital Sant Joan de Déu. Esplugues de Llobregat (Barcelona). <sup>3</sup>Laboratorio de Hematología. ICO-Hospital Universitari Dr. Josep Trueta. Girona

**Motivo de consulta:** Niño de 10 años de edad que consulta por aparición en los últimos 5 días de tumores laterocervicales, sin fiebre ni síndrome tóxico acompañante.

**Historia clínica:** El paciente presentaba como único antecedente personal un testículo en ascensor pendiente de intervención quirúrgica con analítica preoperatoria normal dos meses antes del ingreso.

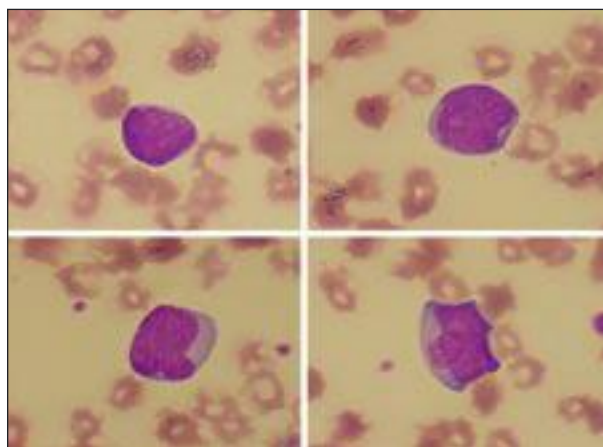


Figura 1. Sangre periférica: blastos de pequeño y mediano tamaño, núcleo de forma irregular y cromatina inmadura con nucléolos visibles y citoplasma sin granulación. (May-Grünwald-Giemsa).

**Exploración física:** Estado general conservado con palidez mucosa y cutánea. Mazacote adenopático latero-cervical bilateral de palpación no dolorosa de 8-10 cm de diámetro. No visceromegalias ni otras alteraciones destacables a la exploración.

#### Exploraciones complementarias:

**Hemograma:** Hemoglobina: 64 g/L; plaquetas:  $287 \times 10^9/L$ ; leucocitos:  $4,5 \times 10^9/L$  (82% blastos, 1% neutrófilos segmentados, 15% linfocitos, 2% monocitos).

**Morfología de sangre periférica:** 82% de células inmaduras de pequeño o mediano tamaño, con núcleo de forma redondeada o irregular de cromatina inmadura con nucléolos visibles y escaso citoplasma sin granulación (Figura 1).

**Bioquímica:** normal, salvo LDH 717 UI/L (normal < 550 UI/L).

**Coagulación:** tiempo de protrombina: 83%; TTPa: 21,6 segundos; fibrinógeno: 2,2 g/L.

**Serologías:** negativas para VIH, VHC, VHB, CMV y VEB.

**Pruebas de imagen:** la Rx de tórax fue normal, así como el ecocardiograma. La ecografía abdominal mostró una hepatomegalia leve sin esplenomegalia.

**Estudio de LCR:** líquido acelular con bioquímica normal.

**Aspirado medular:** celularidad abundante con práctica ausencia de las series granulocítica, eritroide y megacariocítica. Infiltración por un 95% de células blásticas de características similares a las descritas en sangre periférica (Figura 2A).

**Citoquímica en médula ósea:** Mieloperoxidasa: negativa en la población blástica. Negro Sudán: tinción negativa en los blastos. PAS: positividad granular citoplasmática en 15% de los blastos. Fosfatasa áci-

da: positividad difusa débil en la totalidad de los blastos (Figuras 2: B-C).

**Inmunofenotipo de médula ósea por citometría de flujo:** 90% de infiltración por células inmaduras (CD45+d, CD34++, CD123+, HLA-DR+ heterogéneo) con expresión de marcadores de línea linfóide T (CD3c+, CD3s-/+, CD5++, CD7++, CD2-/+) y positividad para antígenos de línea mieloide (CD117+het, CD33+, CD15++) y CD135. El resto de marcadores linfoides T (CD4, CD8, CD1a) y mieloides, así como de línea linfóide B, eritroide y megacariocítica fueron negativos. Se identificaba una subpoblación de blastos (25%) de pequeño tamaño, menor expresión de CD34, HLA-DR, CD117 y CD33 pero una mayor expresión de CD2 (Figura 3).

**Estudios citogenéticos:** 1) **Cariotipo de médula ósea:** 45,XY, del (5q), -7 [3] 46,XY, del (5q), del (7q) [14]. 2) **Estudios de FISH:** Gen *MLL* normal. El estudio del cromosoma 7 mediante la sonda LSI 7q mostró un 16% de núcleos con monosomía 7 y un 80% con delección 7q31. La sonda LSI 5q31 mostró una monosomía 5 y una delección 5q31 en el 15% y 83% de los núcleos analizados, respectivamente.

**Estudios moleculares:** 1) **PCR del gen quimérico *CBFB-MYH11*:** negativa. **PCR del gen quimérico *RUNX1-RUNX1T1*:** negativa. **PCR del gen de fusión *BCR-ABL*:** negativa (isoforma p190 y p210). **PCR de cribado de mutaciones del gen *FLT3*:** no detección de duplicación

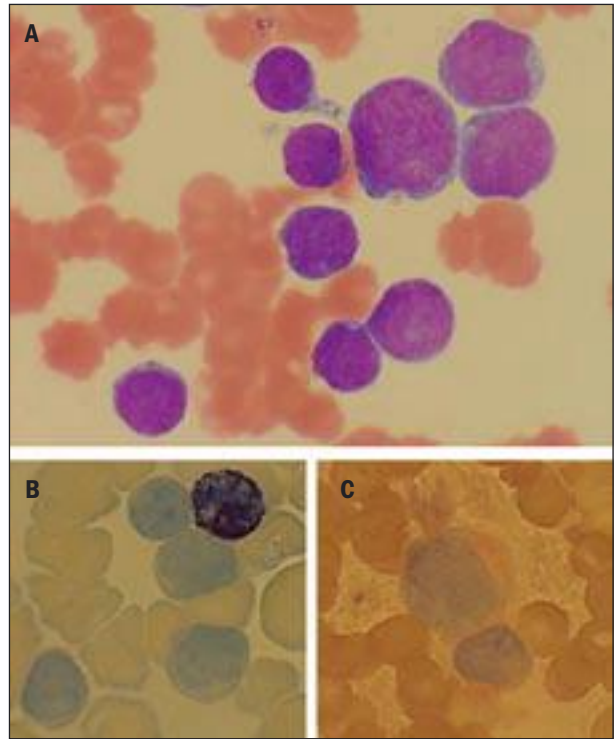


Figura 2. Médula ósea: A: May-Grünwald-Giemsa: detalle de los blastos de diferente tamaño en médula. B: Citoquímica: mieloperoxidasa negativa en los blastos. C: Citoquímica: fosfatasa ácida débilmente positiva en el 100% de los blastos.

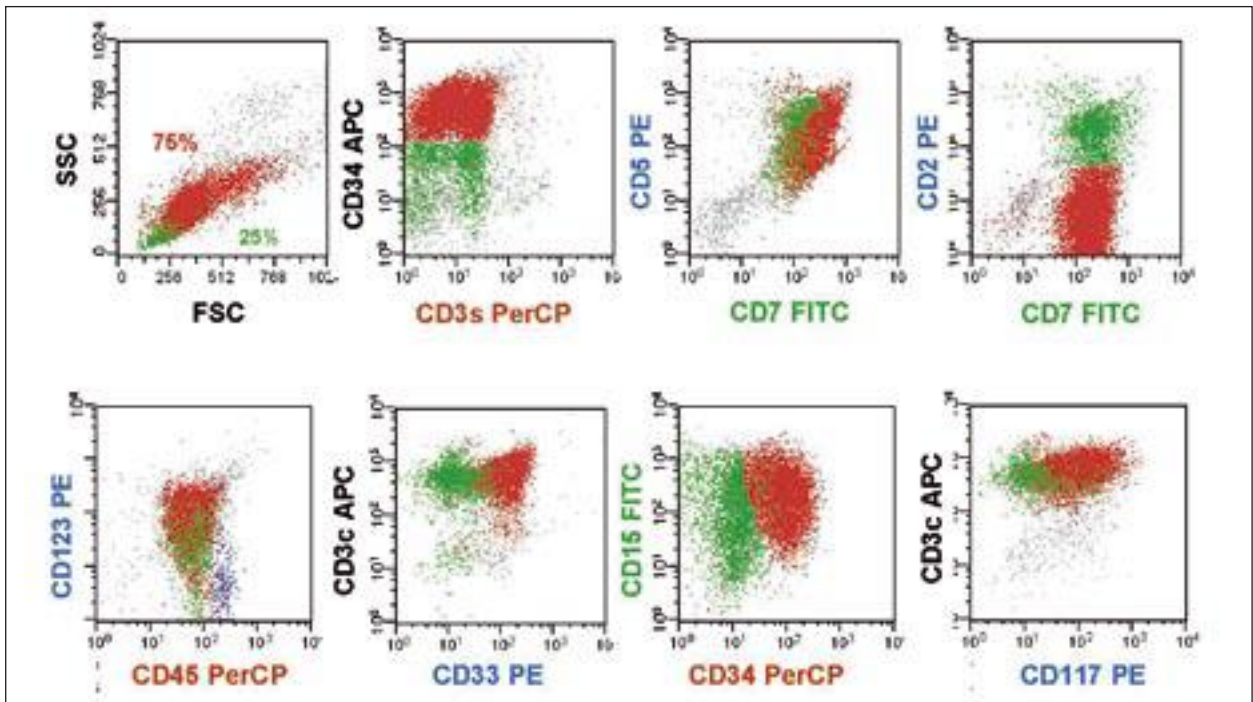


Figura 3. Estudio de médula ósea mediante citometría de flujo: las células blásticas son CD45+d, CD34+, CD123+, HLA-DRhet, CD3s-/+, CD3c+, CD5++, CD7++, CD2het, CD117+, CD33+, CD15+.

interna en tándem. 2) *Reordenamiento de la cadena gamma del receptor de célula T*: imagen oligoclonal.

**Diagnóstico:** Leucemia aguda bifenotípica T-mieloide (clasificación EGIL 1995), leucemia linfoblástica aguda de línea T (LLA-T) (clasificación OMS 2008), con expresión de marcadores mieloides.

**Evolución:** El paciente inició tratamiento quimioterápico según protocolo LAL/SHOP-AR 2005, pero debido a las características de la leucemia se pasó posteriormente a los bloques de intensificación según el protocolo de LLA de muy alto riesgo. Como complicación clínica destacable presentó una osteomielitis del hueso iliaco izquierdo.

*Evolución de la enfermedad residual mínima (ERM):* en el día +14 de tratamiento se observó la persistencia de un 80% de blastos por morfología. Al final de la inducción se encontraba en remisión morfológica, con un 0,09% de ERM por citometría y negatividad de las pruebas citogenéticas. Posteriormente la ERM ha persistido negativa y el paciente está recibiendo el tratamiento de mantenimiento.

**Discusión:** La leucemia linfoblástica aguda T (LLA-T) representa el 25% de las LLA en adultos y el 15% de las leucemias linfoblásticas pediátricas<sup>1</sup>. Morfológicamente los linfoblastos de la LLA-T son indistinguibles de los blastos de línea B, por lo que se precisan estudios inmunofenotípicos para clasificar estas leucemias. El antígeno CD3 de citoplasma (CD3ε) define la línea linfoide T, aunque también puede observarse en precursores de células NK. Las LLA-T expresan además de forma variable CD1a, CD2, CD3 de superficie (CD3s), CD4, CD5, CD7, CD8 y CD10. El European Group for the Classification of Acute Leukemia (EGIL) propuso una clasificación inmuno-

lógica de las LLA-T que correlacionaba el fenotipo de los blastos con el estadio de diferenciación intratímica normal, con la formación de cuatro subtipos: pro-T, pre-T, tímico cortical y tímico maduro<sup>2,3</sup>.

En algunos casos de LLA-T, puede observarse la expresión de antígenos de otras líneas hematopoyéticas: un 10% de pacientes presentan positividad para CD79a y en una proporción variable de casos se ha descrito la expresión de antígenos mieloides. Así, las LLA-T pueden expresar CD13 y/o CD33 en un 20-30% de casos y CD117 en un 10-14% de estas leucemias<sup>4-6</sup>. La positividad de CD117 (receptor c-kit) se ha relacionado con casos de LLA-T de fenotipo intermedio-maduro y con mutaciones del gen *FLT3*<sup>6,7</sup>.

La coexpresión simultánea de antígenos linfoides y mieloides en un mismo blasto ha sido objeto de numerosos estudios en la literatura desde hace años; este hecho es relevante en cuanto que la atribución de una línea linfoide o mieloides a una leucemia comportará un tratamiento dirigido diferente. Históricamente, el término *leucemia bilineal* se aplicó a aquellos casos con presencia de dos poblaciones clonales de diferente linaje, mientras que las *leucemias bifenotípicas* eran definidas como aquellas en las que los blastos coexpresaban antígenos de diferente línea en la misma célula. El grupo EGIL definió en 1995 un sistema de puntuación basado en el número y grado de especificidad de los marcadores expresados en la célula leucémica con la finalidad de distinguir los casos genuinamente bifenotípicos de aquellas leucemias con coexpresión aberrante de antígenos de otra línea<sup>2</sup>. Para considerar una leucemia como bifenotípica debía existir una puntuación superior a 2 en dos o

más líneas diferentes (Tabla 1). Muy recientemente, en la última revisión de la clasificación de las hemopatías malignas de la OMS se redefine el concepto de *leucemias agudas de fenotipo mixto* (MPAL: *mixed phenotype acute leukemias*), que incluyen aquellos casos en los que la expresión de antígenos de más de una línea hace imposible asignar a un caso un linaje con seguridad, independientemente de que existan una o más poblaciones blásticas<sup>4</sup>. Los criterios utilizados por la OMS para definir una MPAL son mucho más restrictivos, con lo que algunos de los casos diagnosticados previamente de leucemias bifenotípicas recibirían otra denominación (Tabla 2). En esta clasificación, la

Tabla 1. Sistema de puntuación para la definición de leucemia aguda bifenotípica según el grupo EGIL-2. La leucemia aguda bifenotípica se establece cuando la puntuación es mayor de 2 en dos linajes distintos

Puntuación	Linaje		
	Linfoide-B	Linfoide-T	Mieloide
<b>2</b>	CD79a	CD3	MPO*
	IgMc	Anti-TCR-αβ	
	CD22c	Anti-TCR-γδ	
<b>1</b>	CD19	CD2	CD117
	CD10	CD5	CD13
	CD20	CD8	CD33
		CD10	CD65
<b>0,5</b>	TdT	TdT	CD14
	CD24	CD7	CD15
		CD1a	CD64

\* MPO: mieloperoxidasa demostrada por métodos citoquímicos o inmunológicos.



**Tabla 2. Criterios de leucemia aguda de fenotipo mixto según la clasificación de la OMS de 2008<sup>4</sup>**

<i>Línea mielóide</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Mieloperoxidasa (citometría de flujo, inmunohistoquímica o histoquímica); o</li> <li>· Dos o más antígenos de diferenciación monocítica (NSE, CD11c, CD14, CD64, lisozima)</li> </ul>
<i>Línea linfóide T</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>· CD3 citoplasmático (por citometría de flujo con anticuerpos contra la cadena <math>\epsilon</math> de CD3; por inmunohistoquímica el uso de un anticuerpo policlonal anti-CD3 puede detectar la cadena <math>\zeta</math> de CD3, que no es específica de célula T); o</li> <li>· CD3 de superficie (raro en la leucemia aguda de fenotipo mixto)</li> </ul>
<i>Línea linfóide B</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>· CD19 de expresión intensa con al menos uno de los siguientes expresados de forma intensa: CD79a, CD22 citoplasmático, CD10; o</li> <li>· CD19 de expresión débil con al menos 2 de los siguientes expresados de forma intensa: CD79a, CD22 citoplasmático, CD10</li> </ul>

expresión de mieloperoxidasa y/o de dos o más antígenos de diferenciación monocítica es indispensable para atribuir a una población blástica un linaje mielóide, mientras que la expresión de CD13, CD33 y CD117 no es suficientemente específica. Por tanto, el caso que presentamos hubiera sido clasificado como leucemia bifenotípica linfóide T-mielóide (puntuación: 4,5 y 2,5, respectivamente) según los criterios del grupo EGIL, mientras que según la clasificación OMS 2008 sería una LLA de línea T con expresión de marcadores mieloides.

En la literatura se han descrito las leucemias agudas con marcadores T y mieloides simultáneos como leucemias de mal pronóstico, con un predominio en varones adolescentes y frecuente aparición de linfoadenopatías. La mayoría de estos casos presentan diferentes anomalías cromosómicas, algunas de ellas recurrentes, aunque ninguna puede considerarse específica de estas leucemias. En nuestro caso los estudios citogenéticos demostraron monosomías de los cromosomas 5 y 7, así como deleciones de 5q y 7q en la mayoría de las células. Estas anomalías han sido descritas en diferentes series de leucemias linfoblásticas, tanto de línea B como T<sup>8,9</sup> y, más concretamente, en series de leucemias bifenotípicas T-mieloides<sup>10-12</sup> y en leucemias con cambios de fenotipo en la recaída<sup>9,13</sup>. Estos hallazgos han sugerido que tanto la monosomía 7 como la deleción 5q ocurren en un progenitor hematopoyético pluripotencial con capacidad de diferenciación linfóide y mielóide<sup>9,13,14</sup>, de forma similar a lo que se ha demostrado en las pérdidas de 5q en algunos síndromes mielodisplásicos<sup>15</sup>.

En este sentido, muy recientemente se ha publicado un estudio que define un nuevo subtipo de LLA-T originado de un subtipo de timocitos con características de *stem cell* y capacidad para diferenciarse en múltiples líneas, incluidas la linfóide y la mielóide

de (ETP: *early T-cell precursors*)<sup>16</sup>. En este trabajo se analizaron 239 casos de LLA-T combinando nuevas tecnologías como los *arrays* de expresión génica o los *arrays* de polimorfismos (SNP) con técnicas clásicas de inmunofenotipo, citogenética y biología molecular. El resultado fue la identificación de un subtipo de LLA-T denominado ETP-LLA que supone el 12% del total de LLA-T y que presenta unas características clínicas y biológicas distintivas. Las ETP-LLA se caracterizan por presentar un fenotipo característico con negatividad para CD1a y CD8, expresión débil de CD5 y positividad para uno o más marcadores de inmadurez o marcadores

mieloides, excluyendo la mieloperoxidasa (Tabla 3). Este fenotipo implica que algunos de estos casos hubieran podido clasificarse previamente como leucemias bifenotípicas, siguiendo los criterios del grupo EGIL. El análisis de SNP-*arrays* demostró en las ETP-LLA una mayor inestabilidad genética, con una frecuencia elevada de pérdidas y ganancias cromosómicas, entre las que se describen deleciones de 13q y de 5q. Los casos definidos como ETP-LLA presentaron un perfil de expresión génica homogéneo, con sobreexpresión de CD44, CD34, c-KIT, GATA2, CE-BPA y de los oncogenes LMO1, LYL1 y ERG. En este sentido, la expresión elevada de ERG se había asociado previamente a un peor pronóstico en la LLA-T y en la leucemia mieloblástica en adultos<sup>17,18</sup>. Desde el punto de vista clínico, los casos de ETP-LLA presentaron un pronóstico muy desfavorable, con menor supervivencia global (SG) y menor supervivencia libre de eventos respecto al resto de LLA-T (SG a los 10 años 19 vs. 84%,  $p < 0,001$ ). La peor respuesta al tratamiento de estos casos se evidenció en un alto porcentaje de casos con una enfermedad residual mínima detectable durante el seguimiento y un alto índice de recidivas o fallos al tratamiento (72 vs. 10%,  $p < 0,001$ ).

En resumen, el caso que presentamos habría sido diagnosticado hace unos años de leucemia bifenotípica, pero no cumpliría actualmente criterios para considerarse una MPAL. Por otro lado, nuestro caso podría encuadrarse en el nuevo subtipo de LLA-T denominado ETP-LLA, ya que tiene un perfil fenotípico y genético compatible, si bien la expresión de CD5 en nuestro paciente no era débil.

Ante la heterogeneidad de las LLA-T es necesario analizar series amplias de pacientes para identificar factores pronósticos que permitan adaptar el tratamiento al riesgo específico de cada paciente.



Tabla 3. Principales características de las leucemias ETP-LLA definidas por Coustan-Smith et al.<sup>(46)</sup>

· Frecuencia: 30/239 LLA-T (12,6%).
· Origen: leucemia originada en células precursoras T precoces (ETP), subtipo de timocitos recién llegados de la médula ósea al timo con capacidad de diferenciación a línea mieloide y linfoide.
· Inmunofenotipo: <ul style="list-style-type: none"> <li>- ausencia (&lt;5% linfoblastos positivos) de CD1a y CD8</li> <li>- CD5 de expresión débil con menos de un 75% de linfoblastos positivos</li> <li>- expresión de uno o más de los siguientes marcadores de <i>stem-cell</i> o mieloides en al menos el 25% de linfoblastos: CD117, CD34, HLA-DR, CD13, CD33, CD11b o CD65</li> </ul>
· Citogenética convencional: múltiples alteraciones clonales en el mayoría de casos, ninguna de ellas específica. Se observan del(13q) en 4/17 casos y del(5q) en 4/17 casos.
· SNP-array: mayor número de anomalías en el número de copias de DNA respecto al resto de LLA-T, incluyendo ganancias y pérdidas.
· Perfil de expresión génica: <ul style="list-style-type: none"> <li>- sobreexpresión de CD44, CD34, KIT, GATA2, CEBPA, SPI1, ID2 y MYB, así como de los factores de transcripción oncogénicos LMO1, LYL1 y ERG</li> <li>- infraexpresión de CD1, CD3, CD4, CD8, RAG1, NOTCH3, PTCRA, LEF1, TCF12, LAT, LCK, TCF7 y ZAP70</li> </ul>
· Clínica: <ul style="list-style-type: none"> <li>- edad de presentación: 13/17 pacientes edad ≥ 10 años</li> <li>- peor respuesta al tratamiento con mayores niveles de enfermedad residual mínima en los sucesivos controles</li> <li>- evolución desfavorable: menor supervivencia global a los 10 años (19% vs 84%) y supervivencia libre de evento; mayor incidencia de recidiva o fallo del tratamiento (72% vs. 10%)</li> </ul>

### Para recordar

- Las leucemias agudas de fenotipo mixto (MPAL) son aquellas en las que la expresión de antígenos de más de una línea hace imposible asignar a un caso un linaje con seguridad. Su diagnóstico requiere el cumplimiento de unos criterios definidos por la clasificación de la OMS. La positividad de los marcadores mieloides CD13, CD33 y/o CD117 en las LLA-T no implica una MPAL y, de forma aislada, no ha demostrado tener una importancia pronóstica en estas leucemias.
- Por el contrario, la expresión de marcadores mieloides en el contexto de un patrón fenotípico específico (CD1a-, CD8-, CD5+débil, CD34+, CD117+, HLA-DR+) puede corresponderse con un nuevo subtipo de leucemias originadas en un precursor muy inmaduro con capacidad de diferenciación mieloide y linfoide (ETP-LLA), con un pronóstico muy desfavorable.
- Las leucemias linfoblásticas T presentan una gran heterogeneidad a nivel biológico y es necesaria la combinación de diferentes técnicas para identificar posibles subtipos con pronóstico diferenciado.

### Bibliografía

1. Rives S. Leucemia aguda linfoblástica en el niño. *Hematol Práct* 2008; 3: 21-8.
2. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, Van't Veer MB. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. *Leukemia* 1995; 9: 1783-6.
3. Burger R, Hansen-Hagge TE, Drexler HG, Gramatzki M. Heterogeneity of T-acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) cell lines: suggestion for classification by immunophenotype and T-cell receptor studies. *Leuk Res* 1999; 23: 19-27.
4. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein N, Thiele J, Vardiman JW. World Health Organization classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press; 2008.
5. Suggs J, Cruse JM, Lewis RE. Aberrant myeloid marker expression in precursor B-cell and T-cell leukemias. *Exp Mol Pathol* 2007; 83: 471-3.
6. Legitimo A, Consolini R, Cocito MG, Buffoni R, Basso G, Macchia P. The c-kit receptor and its ligand stem cell factor in childhood malignant lymphoid precursors. *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19: 981-7.
7. Paietta E, Ferrando AA, Neuberg D. Activating FLT3 mutations in CD117/KIT(+) T-cell acute lymphoblastic leukemias. *Blood* 2004; 104: 558-60.
8. Heerema NA, Nachman JB, Sather HN, La MK, Hutchinson R, Lange BJ, Bostrom B, Steinherz PG, Gaynon PS, Uckun FM. Deletion of 7p or monosomy 7 in pediatric acute lymphoblastic leukemia is an adverse prognostic factor: a report from the Children's Cancer Group. *Leukemia* 2004; 19: 939-47.
9. Cutting R, Taj M, Vora A. Childhood precursor B-cell acute lymphoblastic leukaemia and monosomy 7 with phenotypic shift at relapse; evidence for the stem cell origins of monosomy 7. *Br J Haematol* 2007; 140: 584-5.
10. Sun G, Wormsley S, Sparkes RS, Naeim F, Gale RP. Hybrid leukemia and the 5q-abnormality. *Leuk Res* 1991; 15: 351-6.
11. Matsumoto Y, Taki T, Fujimoto Y, Taniguchi K, Shimizu D, Shimura K, Uchiyama H, Kuroda J, Nomura K, Inaba T, Shimazaki C, Horjike S, Taniwaki M. Monosomies 7p and 12p and FLT3 internal tandem duplication: possible markers for diagnosis of T/myeloid biphenotypic acute leukemia and its clonal evolution. *Int J Hematol* 2009; 89: 352-8.
12. Aribi A, Bueso-Ramos C, Estey E, Estrov Z, O'Brien S, Giles F, Faderl S, Thomas D, Kebriaei P, Garcia-Manero G, Pierce S, Cortes J, Kantarjian H, Ravandi F. Biphenotypic acute leukaemia: a case series. *Br J Haematol* 2007; 138: 213-6.

13. Martín J, Alcoceba M, Colado E, Olazábal J, Díez M, Gutiérrez NC, Hernández-Rivas JM, Caballero MD, San Miguel JF, González M, García MA. Leucemia aguda mieloblástica y leucemia aguda linfoblástica T sincrónicas. *Haematologica (ed. española)* 2008; 93: 471-3.
14. Adolfsson J, Månsson R, Buza-Vidas N, Hultquist A, Liuba K, Jensen CT, et al. Identification of FLT3+ lympho-myeloid stem cells Licking erythro-megakaryocytic potencial: a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* 2005; 121: 295-306.
15. Nilsson L, Eden P, Olsson E, Mansson R, Astrand-Grundström I, Strömbeck B, et al. The molecular signature of MDS stem cells supports a stem-cell origin of myelodysplastic syndromes. *Blood* 2007; 110: 3005-14.
16. Coustan-Smith E, Mullighan CG, Onciu M, Behm FG, Raimondi SC, Pei D, et al. Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol* 2009; 10: 147-56.
17. Baldus CD, Burmeister T, Martus P, Schwartz S, Gökbuget N, Bloomfield C, Hoelzer D, Thiel E, Hofmann WK. High expression of the ETS transcription factor ERG predicts adverse outcome in acute T-lymphoblastic leukemia in adults. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4714-20.
18. Marcucci G, Maharry K, Whitman SP. 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.