

haematologica

ISSN 1138-0381

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

Volumen 95, Extraordinario n.º 1, Octubre 2010

www.aehh.org • www.seth.es

LII Reunión Nacional de la SEHH XXVI Congreso Nacional de la SETH

Las Palmas de Gran Canaria, 28-30 de octubre de 2010

PROGRAMA EDUCACIONAL

IX LECCIÓN CONMEMORATIVA RICARDO CASTILLO

XXIII LECCIÓN CONMEMORATIVA ANTONIO RAICHS

SIMPOSIOS

CASOS CLÍNICO-CITOLÓGICOS

LII Reunión Nacional de la SEHH XXVI Congreso Nacional SETH

Las Palmas de Gran Canaria, 28-30 de octubre de 2010

PROGRAMA EDUCACIONAL

IX LECCIÓN CONMEMORATIVA RICARDO CASTILLO

XXIII LECCIÓN CONMEMORATIVA ANTONIO RAICHS

SIMPOSIOS

CASOS CLÍNICO-CITOLÓGICOS

Editores: José García Laraña
Jesús Cesar

Agradecimientos

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

Abbott Científica, AD Diagnósticos, Alexion, Amgen, Astellas, Baxter, Bayer, Healthcare, Becton Dickinson, Binding Site, Boehringer Ingelheim, BQ Biosciences, Bristol Myers Squibb, Celgene, Cephalon, CSL Behring, Genzyme, Gilead, GlaxoSmithKline, Grífols, Grupo Ferrer, Janssen, Leo Pharma, Merck Sharp & Dohme, Miltenyi Biotech, Mundipharma Pharmaceuticals, Novartis, Novo Nordisk, Octapharma, Pall Médica, Pfizer, Pierre Fabre, Ratiopharm direct, Roche, Rovi, Sandoz, Sanofi-Aventis, Shering Plough, Shire Pharmaceuticals, Siemens, Swedish Orphan International

haematologica

Haematologica, Spanish Edition

Edición y Publicidad:

ACCIÓN MÉDICA, S.A.

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

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

publicaciones@accionmedica.com • www.accionmedica.com

nviou@accionmedica.com (publicidad)

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

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

bordonez@accionmedica.com (publicidad)

Publicación mensual (más dos números extraordinarios).

Tarifa de suscripción anual:

Personas físicas 127,63 €

MIR/estudiantes Consultar

Empresas e instituciones 285,17 €

Precios válidos sólo para España

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

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

Haematologica: se distribuye únicamente entre los profesionales de la medicina

Control voluntario de difusión realizado por

Impresa en España por: Impresos Izquierdo

Depósito legal:

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

LII Reunión Nacional de la SEHH XXVI Congreso Nacional SETH

Las Palmas de Gran Canaria, 28-30 de octubre de 2010

COMITÉ ORGANIZADOR

Presidenta: Teresa Molero Labarta
Vicepresidenta: Juan Manuel Díaz Cremades
Vocales: Ignacia Balda Aguirre
José Miguel Bosch Benítez
M.^a del Mar Caballero Gómez
Conrado Campo Adsuar
Fernando Fernández Fuertes
Rosa Fernández Martín
M.^a Teresa Gómez Casares
José David González San Miguel
Luisa Guerra Domínguez
Silvia de la Iglesia Íñigo
Santiago Jiménez Bravo de Laguna
Angelina Lemes Castellano
M.^a del Carmen Losada Castillo
Hugo Luzardo Henríquez
Jezabel López Brito
Manuel Negrín López
M.^a del Mar Perera Álvarez
Valeria Peri
José Antonio Ruano León
Santiago Soler Martínez
Alexia Suárez Cabrera
Josefa Suárez Hernández
Manuel Tapia Martín

COMITÉ CIENTÍFICO

Presidente: José García Laraña
Vicepresidente: Jesús Cesar

Presidente SEHH: José García Laraña
Vocales SEHH: Antonio Asensio Montoro
Emma Castro Izaguirre
Juan C. Cigudosa García
José L. Díez Martín
José A. García Marco
M.^a Teresa Gómez Casares
Javier López Jiménez
Rafael Martínez Martínez
José M.^a Raya Sánchez
Ángel Remacha Sevilla
Ramon Salinas i Argente
Alfonso Santiago Marí
Guillermo Sanz Santillana
Jesús Villarrubia Espinosa
Luis Hernández Nieto (Coordinador por la SEHH del programa educacional)

Presidente SETH: Jesús Cesar
Vocales SETH: Javier Batlle Fonrodona
Javier García Frade
Pascual Marco Vera
Joan Carles Reverter Calatayud
Juana Vallés Giner
Vicente Vicente García (Coordinador por la SETH del programa educacional)

SOCIEDAD ESPAÑOLA DE HEMATOLOGÍA Y HEMOTERAPIA

Presidente: Evarist Feliu Frasnado
Vicepresidenta 1.^a: María Fernanda López Fernández
Vicepresidenta 2.^a: Carmen Burgaleta Alonso de Ozalla
Secretario general: Alfonso José Santiago Marí
Secretario adjunto: Ramon Salinas i Argente
Tesorero: Rafael Martínez Martínez
Contador: Rafael de la Cámara de Llanza
Vocales: M.^a Luz Amigo Lozano
Lourdes Florensa Brichs
Fernando A. González Fernández
Ángel León Lara
Felipe Prósper Cardoso
Montserrat Rovira Tarrats
Marta Torrabadella Reynoso
Jesús Villarrubia Espinosa
Ex presidentes: Agustín Aznar Gerner
Ricardo Castillo Cofiño
Gonzalo Díaz de Iraola
Pedro Farreras Valentí
José M.^a Fernández Rañada
Jerónimo Forteza Bover
Manuel Giralt Raichs
Luis Hernández Nieto
Antonio López Borrasca
Juan Maldonado Eloy-García
Julio Outeriño Hernanz
Antonio Raichs Solé
Agustín Ríos González
Eduardo Rocha Hernando
Juan M. Rodríguez Fernández
Ciril Rozman Borstnar
Miquel Rutllant 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.^a Ángeles Dasí Carpio
Vocales: M.^a Isabel Díaz Ricart
Pere Domènech Santasusana
Saturnino Haya Guaita
Victor Jiménez Yuste
José Mateo Arranz
Juana Vallés Giner
Virtudes Vila Liante
Ex presidentes: Justo Aznar Lucea
Francisco Javier Batlle Fonrodona
Antonio López Borrasca
Fernando Martínez Brotons
Miguel Rutllant Bañeres
Carlos Villaverde Grote

Sumario

Programa educacional

Coordinadores: L. Hernández Nieto. Tenerife
V. Vicente García. Murcia

Nuevos fármacos quimioterápicos y riesgo tromboembólico: ¿cómo prevenirlo?

J.R. González-Porras, I. Alberca

5

Derivados plasmáticos *versus* productos recombinantes en el tratamiento de la hemofilia A: ¿tema resuelto?

J.A. Aznar, A. Moret, L. Abad-Franch, A. Cid, S. Haya

14

Talasemias: clasificación y diagnóstico

A. Villegas

23

Genómica en oncohematología. Aspectos actuales y su utilidad práctica

J.C. Cigudosa, S. Álvarez de Andrés

33

Lo que debe conocer un hematólogo en el manejo antitrombótico de la enfermedad cardiovascular

V. Roldán, F. Marín, V. Vicente

38

Factores pronósticos y tratamiento de primera línea del linfoma de Hodgkin

A. Sureda

43

Tratamiento del linfoma del manto en primera línea y en rescate

R. Arranz, A. García Noblejas

51

Terapia celular con progenitores hematopoyéticos en patología cardiovascular

C. Herrera Arroyo

58

JAK2, 5 años después. Situación actual de los inhibidores de V617F de JAK2 en las neoplasias mieloproliferativas crónicas Phi-negativas

C. Besses Raebel

65

The controversy of hydroxyurea-induced leukemia in polycythemia vera and essential thrombocythemia

T. Barbui

70

IX Lección Conmemorativa Ricardo Castillo

Coordinadores: P. Marco. Alicante
J. Cesar. Madrid

Hemostasis defects and bleeding in chronic liver disease: a paradigm is challenged

P.M. Mannucci

75

XXIII Lección Conmemorativa Antonio Raichs

Coordinadores: E. Feliu. Barcelona

J. García Laraña. Madrid

Clinical and biological heterogeneity of the leukaemic chronic lymphoproliferative disorders

E. Matutes

81

SIMPOSIOS

Aproximación de la automatización en hematimetría a la citometría de flujo

Coordinadores: J. Villarrubia. Madrid

T. Molero. Las Palmas de Gran Canaria

Utilización de anticuerpos monoclonales en los equipos de hematimetría con sistemas óptico y de fluorescencia

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

91

Nuevo método de referencia del Comité Internacional de Estandarización en Hematología (ICSH) para el diferencial manual leucocitario mediante citometría de flujo: evolución y publicación

J.M.^a Jou

95

Aplicación de la citometría de flujo al estudio de los parámetros y función de la plaqueta

J.E. O'Connor

97

Rastreo diagnóstico de hemopatías clonales y su incorporación a los contadores hematológicos <i>J. Almeida, S. Barrena, E. Arroyo, M.^aL. Sánchez, J. Flores, W. Nieto, E. Sobral da Costa, S. Quijano, A. López, C. Pedreira, C. Fernández, P. Bárcena, M. Lima, M.^aC. García-Macias, A. Órfão</i>	99	Avances en la profilaxis de la hemofilia en España <i>J.F. Lucía Cuesta</i>	170
		Actualización de la profilaxis primaria en hemofilia e inhibidores <i>M.^aF. López Fernández, C. Altisent</i>	179
Plaquetas y endotelio <i>Coordinadores: J. Vallés. Valencia G. Escolar. Barcelona</i>		Biología molecular de los SMPC (NMP). Novedades clínico-biológicas <i>Coordinadoras: D. Colomer. Barcelona M.^aT. Gómez. Las Palmas de Gran Canaria</i>	
Inherited abnormalities in platelets signaling mechanisms. Insights into platelet physiology <i>A.K. Rao, G. Jalagadugula, G. Mao, K. Aneja, G. Kaur</i>	109	Mecanismos moleculares responsables de la transformación en la leucemia mieloide crónica <i>J. León, M. Albajar</i>	187
Nuevos fármacos antiplaquetarios <i>M.I. Ruano Marco</i>	114	Atypical myeloproliferative disorders: new insights into pathogenesis <i>F. Grand, N.P. Cross</i>	196
Avances en la monitorización del tratamiento antiplaquetario <i>M.T. Santos, A. Moscardó, B. Cortina, I. Madrid, J. Vallés</i>	120	Diagnóstico molecular de las neoplasias mieloproliferativas Filadelfia negativas en la práctica diaria <i>M.T. Gómez Casares, C.E. López Jorge, M. Perera, T. Molero</i>	200
Synthetic thrombopoietin receptor agonists in primary immune thrombopenia <i>R. Stasi, A. Newland</i>	129		
Avances en leucemia aguda mieloblástica <i>Coordinadores: E. Anguita. Madrid R. Martínez. Madrid</i>		GECH: avances en las enfermedades linfoproliferativas con linfocitos vellosos circulantes <i>Coordinadores: A. Domingo. Barcelona J.M.^a Raya. Tenerife</i>	
Childhood acute lymphoblastic leukaemia. A paradigm for understanding carcinogenesis <i>C. Lutz, T. Enver</i>	137	Diagnostic criteria: morphology, immunophenotype and cytogenetics <i>E. Matutes</i>	211
Alteraciones de la transcripción <i>E. Anguita Mandly</i>	143	Nuevas entidades emergentes: criterios histológicos e inmunohistoquímicos diagnósticos <i>M.Á. Piris</i>	214
De la biología al tratamiento de la leucemia aguda mieloblástica <i>J. Serrano, J. Serrano-López, J. Sánchez, A. Torres</i>	147	Immunogenetic analysis of primary splenic small B cell lymphomas: ontogenic implications <i>K. Stamatopoulos</i>	215
Coagulopatías congénitas <i>Coordinadores: F.J. Batlle. A Coruña J.F. Lucía. Zaragoza</i>		Linfomas de linfocitos vellosos. Aspectos clínicos y nuevas aproximaciones terapéuticas <i>C. Montalbán</i>	217
New insights into inherited von Willebrand disease <i>A.B. Federici</i>	157	Avances en medicina transfusional <i>Coordinadores: E. Castro. Madrid R. Roig. Valencia</i>	
Estudio epidemiológico de la enfermedad de Von Willebrand en España <i>J. Batlle, A. Pérez-Rodríguez, J. Costa Pinto Prego, E. Lourés Fraga, A. Rodríguez Trillo, M.^aF. López-Fernández</i>	163	Estrategias para la reducción en el consumo de CS alogénicos <i>M. Corral Alonso, J.R. González Porras</i>	225

Protection against TA-GVHD due to platelet transfusion by using pathogen inactivation with the INTERCEPT Blood System™-gamma irradiation is not the only answer
L. Lin, L. Corash, J.C. Osselaer 230

Enfermedades infecciosas emergentes: potencial amenaza para la seguridad transfusional y medidas de control
E. Castro 237

El laboratorio en la hemostasia

Coordinadores: *J. Hermida. Pamplona*
J.C. Reverter. Barcelona

Nanotecnología en el laboratorio de hemostasia
F.J. Roncalés Mateo 245

Generación de trombina en pacientes con trombosis venosa profunda y niveles elevados de FVIII, FIX y FXI como única alteración trombofílica
C. Duboscq, J. Ceresetto, C. Shanley, G. Stemmelin, O. Rabinovich, C.G. Castedo, M. Melgar, E. Bullorsky 248

Utilidad de las pruebas de laboratorio de hemostasia para predecir las recidivas de la enfermedad tromboembólica venosa
P. Marco, J. Bernabeu 251

Nuevas fronteras en el trasplante hemopoyético

Coordinadores: *J.L. Díez-Martín. Madrid*
G. Bautista. Madrid

Tratamiento de la EICH con células mesenquimales: beneficios y dificultades
G. Bautista, C. Regidor, R. Gonzalo-Daganzo, R. Cabrera 257

Cyclophosphamide-induced tolerance following bone marrow transplantation from haploidentical donors
P.V. O'Donnell, E. Harrington, T.A. Gooley, J.M. Pagel, S.E. Pereira, M.E. Flowers, J.A. Hansen, L.M. Burroughs, B.M. Sandmaier, R.F. Storb, L. Luznik, R.J. Jones, H.J. Symons, Y.L. Kasamon, E.J. Fuchs 266

Trasplante alogénico con acondicionamiento de intensidad reducida (AIR) en pacientes pediátricos con hemopatías malignas
M.Á. Díaz, M. González Vicent 271

Gestión de calidad y acreditación de los programas de trasplante: retos y realidades
P. Balsalobre, C. Muñoz, J. Anguita, J. Gayoso, J.L. Díez-Martín 275

Avances en la biología y tratamiento de la leucemia linfática crónica

Coordinadores: *J.A. García Marco. Madrid*
A. Suárez. Las Palmas de Gran Canaria

Mecanismos moleculares de resistencia al tratamiento en la LLC
M.Á. Piris 281

Avances en la patogénesis, diagnóstico y tratamiento de los síndromes mielodisplásicos

Coordinadores: *C. del Cañizo. Salamanca*
G.F. Sanz. Valencia

Contribución de las nuevas técnicas de análisis genético al conocimiento de la patogénesis de los síndromes mielodisplásicos
J. Cervera, E. Such, A. Valencia, M. Ibáñez, I. Luna, I. Gómez, P. Montesinos, F. Moscardó, M.L. Senent, G.F. Sanz, M.A. Sanz 285

Nueva clasificación pronóstica de las anomalías cromosómicas para los SMD
F. Solé 290

Impacto de la citometría de flujo en el diagnóstico y pronóstico de los síndromes mielodisplásicos
A. Orfao, S. Matarraz, A. López, S. Barrena, C. Fernández, J. Flores, A. Rasillo, J.M.ª Sayagués, M.ªL. Sánchez, P. Bárcena, J.M.ª Hernández-Rivas, C. Salvador, N. Fernández-Mosteirín, M. Giralt, L. Perdiguer, P. Laranjeira, A. Paiva 294

Cómo tratar al paciente con SMD
R. Stone 300

Presente y futuro en el tratamiento del mieloma múltiple

Coordinador: *J.J. Lahuerta. Madrid*

Cómo tratar el mieloma múltiple en la encrucijada terapéutica actual
J. Bladé, L. Rosiñol, M.ªT. Cibeira, C. Fernández de Larrea 309

Mieloma múltiple y su estratificación de acuerdo con factores de riesgo
R. Fonseca 313

Perspectivas del mieloma múltiple ante la segunda generación de nuevos fármacos
E.M. Ocio, M.ªV. Mateos, J.F. San Miguel 315

Trombosis e hipercoagulabilidad

Coordinadores: *L. García Frade. Valladolid*
J.R. González. Salamanca

Nuevos factores genéticos implicados en el riesgo de trombofilia <i>J.M. Soria, A. Cárdenas, J.C. Souto</i>	329	El error en hematología y hemoterapia. Casuística real <i>E. Feliu, B. Xicoy, M.^a Rozman, J.T. Navarro, F. Millá, J. Juncà, J.M.^a Ribera, J.L. Aguilar, J.L. Vives Corrons, J. Rodríguez Villanueva, R. Govindarajan, Á. Urbano, C. Rozman</i>	375
Micropartículas en la trombosis asociada a cáncer <i>M.^aD. Tàssies, C. Font, J. Monteagudo, P. Gascón, J.C. Reverter</i>	340	La responsabilidad civil y penal del hematólogo ante el error o la negligencia <i>S. Romeo Malanda</i>	381
Trombosis venosa cerebral y trombofilia <i>Á. García Avello, J. Cesar</i>	344	La protección jurídica de la información genética, muestras biológicas y biobancos <i>P. Nicolás</i>	387
Optimal duration of anticoagulant therapy in thrombophilic patients with venous thromboembolism <i>A. Squizzato, W. Ageno, D. Imberti</i>	347	El consentimiento informado en hematología. Las claves de la información médica y el consentimiento del paciente en hematología y hemoterapia <i>A.J. Santiago Mari</i>	390
Tratamiento antitrombótico <i>Coordinadores: P. Marco. Alicante P. Domènech. Barcelona</i>			
Trombopprofilaxis en patologías no quirúrgicas <i>M. Monreal</i>	353	Células madre leucémicas: caracterización, biología y utilidad clínica <i>Coordinadores: J.C. Cigudosa. Madrid P. Menéndez. Granada</i>	
The new pharmaceutical antithrombotic agents (antiplatelet and/or anticoagulants) <i>M.M. Samama</i>	353	La célula madre leucémica en la LMC, su papel en la EMR y en el entorno de la terapia molecular <i>C. Vicente-Dueñas, I. González-Herrero, I. Romero-Camarero, I. Sánchez-García</i>	401
Linfoma de Hodgkin <i>Coordinadores: A. Sureda. Barcelona C. Montalbán. Madrid</i>		Etiología y origen celular de la leucemia linfoblástica aguda B del lactante con reordenamiento MLL-AF4 <i>C. Bueno, R.M. Montes, P. Catalina, R. Rodríguez, G.J. Melen, V. Ramos, P.J. Real, M. Arriero, Á. Lassaletta, J. García-Castro, R. García-Sanz, L. Martín, A. Orfão, P. Menéndez</i>	404
Advances on classical Hodgkin lymphoma biology <i>B. Sánchez-Espiridión, C. Montalbán, M.Á. Piris, J.F. García</i>	357	Célula madre leucémica en leucemia mieloide aguda <i>Ó. Quintana-Bustamante, J.C. Segovia</i>	409
New aspects in the treatment of Hodgkin lymphoma <i>A. Engert</i>	360	Caracterización inmunofenotípica de las células madre leucémicas <i>A. Órfão, M. Pérez Andrés, A. García Montero, S. Matarraz, B. Paiva, C. Fernández, J. Flores, A. López, J. Ciudad, J. Almeida</i>	414
Monitoring the treatment of Hodgkin lymphoma with FDG PET <i>M. Meignan, A. Gallamini</i>	360	Eritrocitosis secundarias y congénitas <i>Coordinadores: A. Remacha. Toledo L. Hernández-Nieto. Tenerife</i>	
Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos en el linfoma de Hodgkin. Papel de los nuevos fármacos en el tratamiento de la enfermedad refractaria <i>A. Sureda</i>	363	Clasificación y diagnóstico de las eritrocitosis <i>M.^aC. Fernández Jiménez, M.^aJ. Murga, Á.F. Remacha</i>	423
El hematólogo ante la ley. Diversas materias fundamentales de derecho para el adecuado ejercicio de la especialidad <i>Coordinadores: A. Santiago. Madrid E. Feliu. Barcelona</i>		Congenital erythrocytosis <i>M.F. McMullin</i>	429

Eritrocitosis asociadas a procesos tumorales
B. Arrizabalaga 431

Eritrocitosis primarias y secundarias de causa
"desconocida"
L. Hernández Nieto, J.M.^a Raya Sánchez 436

Aterotrombosis

Coordinadores: F. Velasco. Córdoba
Jesús M. Cesar. Madrid

Avances en la fisiopatología de la aterosclerosis:
papel emergente de las metaloproteasas
J.A. Páramo, J. Orbe, J.A. Rodríguez 445

Marcadores biológicos en aterotrombosis
V. Roldán, E. Jover, F. Marín 449

Tratamiento de la aterotrombosis
J. Mateo 454

CASOS CLÍNICO-CITOLÓGICOS

Coordinadores: A. Lemes. Las Palmas de Gran Canaria
L. García. Madrid

CASO 1

Leucemia aguda mieloblástica con
trombocitosis e hipercalcemia
A. Bermejo, A. Castañeda, D. López, R. Flores,
M.T. Palomo, A. Rodríguez, P. Massó,
J.C. Tardío, S. Álvarez 461

Caso 2

Células atípicas de serie mieloide neutrófila con
bastones de Auer y astillas en sangre periférica y
médula ósea de paciente con infección por VIH
M.M. Osmá, B. Muiña, A. Jerez, M.L. Amigo,
F.J. Ortuño, V. Vicente 465

CASO 3

Un problema polifacético
M.^aP. Ricard, S. Álvarez, K. Arribalzaga, M.^aJ. García,
P. Martínez, F.J. Peñalver Párraga, L. Villalón 469

CASO 4

Anemia hemolítica y fiebre
M. Gómez Calafat, B. Navarro, M. Tormo,
I. Benet, I. Marugán, A. Ferrández, C. Solano 474

CASO 5

Varón con adenopatías y linfocitos atípicos
en sangre
M. Morado, C. Larrocha, P. Pérez Piño,
M.A. Canales, A. Rodríguez de la Rúa 478

CASO 6

Neoplasia mieloproliferativa relacionada
con terapia (NMP-t), con rasgos de LMMC-1
y BCR/ABL p190 asociado a delección 5q
C. Sanzo, M. Mallo, M. González, L. Arenillas,
M. Salido, A.B. Galván, J. Fernández, L. Florensa,
F. Sole, E. Luño 482

PROGRAMA EDUCACIONAL

COORDINADORES: L. Hernández Nieto. Tenerife
V. Vicente García. Murcia

Programa educacional

COORDINADORES: L. HERNÁNDEZ NIETO. *Tenerife*
V. VICENTE GARCÍA. *Murcia*

Resumen

La elaboración de un Programa Educacional de la SEHH es un difícil reto. En los últimos años, la calidad de este clásico de nuestros congresos ha ido en aumento y son altas las expectativas que despierta. Se ha de tener en cuenta, además de evitar repetir demasiado (lo que no es fácil), unos principios básicos: el alto valor formativo de los contenidos, la categoría científica de los ponentes y su capacidad de comunicación. En esta ocasión hemos hecho un esfuerzo por cubrir estos requisitos de forma eficaz; esperamos y deseamos que los objetivos se cumplan.

“¡Thalassa, thalassa...!” (¡el mar, el mar...!) fue el grito que lanzaron los mercenarios griegos al finalizar la expedición de Los Diez Mil en una guerra fratricida contra los persas en el siglo V a.C. El grito era de alegría ante la anhelada proximidad del hogar, al avistar la costa sur del Mar Negro. Evocando esta frase recogida por Jenofonte, George Whipple en 1932 acuñó el nombre “talasemia” para las enfermedades que ocupan nuestra atención en la primera ponencia, por su frecuencia en los ribereños del Mediterráneo. Los síndromes talasémicos son importantes por su frecuencia en nuestro medio y actualmente por la alta población inmigrante. Las consecuencias de mutaciones puntuales de genes que codifican la cadenas globínicas originan cuadros clínicos muy variados, desde una mínima anemia microcítica a anemias graves con sobrecarga férrica conducentes a una merma de la calidad y duración de la vida, o a casos de *hidrops* y de muerte fetal. Es importante, pues, conocer las diversas formas y las bases y métodos del diagnóstico. La Dra. Ana Villegas parte de una descripción de las hemoglobinas fisiológicas para adentrarse en una clasificación descriptiva de las diversas formas de talasemia y aporta su frecuencia en nuestro país a partir del estudio directo del gen por biología molecular; documenta los principales efectos clínico-hematológicos de las distintas anomalías, señala los aspectos diagnósticos más relevantes y termina refiriéndose al diagnóstico molecular y su importancia tanto para el consejo genético como para el pronóstico y plan terapéutico.

La segunda ponencia acerca de genómica en oncohematología la presenta el Dr. Juan Cruz Cigudosa, investigador del CNIO. No es necesario insistir en la importancia que tiene el conocimiento de las alteraciones genéticas y moleculares para el diagnóstico, el pronóstico y tratamiento de los procesos hematológicos malignos. Lo importante es proporcionar herramientas formativas de calidad (como sin duda es esta ponencia) que satisfagan la inquietud de los jóvenes hematólogos por conocer y aplicar estos datos. Se presentan las modernas herramientas de estudio como los *microarrays* de expresión génica, de ADN genómico, y el papel de la genómica en la génesis de biomarcadores diagnósticos en las leucemias mieloides agudas.

Para finalizar la sesión de la mañana, se incluyen dos ponencias sobre sendos linfomas malignos: la primera sobre el de Hodgkin, cuya peculiaridad sin embargo no permite seguir manteniéndolo como una enfermedad a separar del resto de linfomas. A pesar de los grandes avances de los últimos 50 años, son muchos los interrogantes y las situaciones difíciles: el papel del PET en un momento precoz de la quimioterapia, las ventajas y limitaciones de los índices pronósticos de nuevo desarrollo, la actuación en las resistencias, la elección de la mejor terapia en la enfermedad de mal pronóstico y el lugar del trasplante. Anna Sureda, del Hospital de San Pablo de Barcelona, reconocida autoridad en este linfoma, se encarga de desarrollar los aspectos pronósticos y terapéuticos del mismo.

El otro linfoma que se trata en el presente simposio es el de células del manto, que, a pesar de su morfología celular, no resulta muy diferente a la de algún folicular, presenta un pronóstico infausto y se considera incurable. Preocupa la inexistencia de un estándar terapéutico, por lo que las investigaciones que in-

cluyen el trasplante autólogo como parte de una línea terapéutica inicial basada en inmunoterapia, deben valorarse con atención. La Dra. Reyes Arranz, del Hospital de La Princesa, con acreditada experiencia en el manejo clínico del linfoma, se ocupa de desarrollar el estado de los esfuerzos clínicos e investigacionales en busca de pautas más eficaces y seguras, incluyendo la aparición de nuevos fármacos.

La sesión de la tarde se inicia con la aportación de la Dra. Concha Herrera, del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba, acerca de terapia celular con progenitores hematopoyéticos (PH) en cardiopatía isquémica. El interés por el estudio de la biología de las células madre hematopoyéticas adultas, inicialmente orientado como arma terapéutica heroica para las hemopatías malignas, pasó a ser una terapéutica convencional en oncohematología. La experiencia de los hematólogos, y el conocimiento de la coexistencia en los inóculos de PH de células distintas, como las mesenquimales, capaces de generar tejidos adultos distintos (miocardio, sistema nervioso), dieron lugar a una nueva página de la historia del trasplante. Diversos centros en el mundo y de España pueden ofrecer a resultados alentadores, y uno de los más implicados es el Hospital Reina Sofía. La posibilidad de regenerar un miocardio tras un infarto isquémico es un avance espectacular, aunque su alcance último es desconocido. En la ponencia conoceremos el estado actual del tema, cómo el entusiasmo terapéutico no se ha correspondido siempre con la realidad biológica, la complejidad de los estudios por la variabilidad metodológica y la experiencia de la autora y su grupo.

Dos ponencias finales tratan sobre neoplasias mieloproliferativas crónicas distintas de la leucemia mieloide crónica. La primera, encomendada a Carles Besses, del Hospital del Mar, era absolutamente necesaria en este momento, justo a los 5 años del hallazgo de la mutación V617F del gen Jak2, como la primera clave importante conocida, en la patogenia de las NMPC Phi (-). En estos cinco años, hemos sido abrumados por numerosas publicaciones al respecto y sabemos que esta mutación es importante, pero quizá no el primer eslabón en la génesis de estas enfermedades. Se han activado laboratorios y grupos de investigación, se han detectado nuevas enfermedades (p. ej., eritrocitosis primaria con mutación de Jak en el exón 12), se han simplificado los factores pronósticos y, por supuesto, se están desarrollando fármacos inhibidores de Jak2. Esta efeméride nos pareció el momento más que oportuno para que el Dr. Besses, con la ponderación y desnuda seriedad científica que le caracterizan, nos transmitiera cuál es, a su juicio, el estado actual de los fármacos anti-Jak2 y cuál cree que va a ser el impacto de los mismos.

La última ponencia de esta sección corre a cargo del Prof. Tiziano Barbui, de los Ospedali Reuniti de Bergamo, y trata sobre otro tema relacionado con la NMPC Phi (-): la transformación mielofibrótica y a leucemia/síndrome mielodisplásico. El título de la ponencia ya habla de las incertidumbres de esta situación: ¿evolución natural de un síndrome preleucémico, o prefibrótico o consecuencia de alguno de los aún crudos tratamientos empleados para su control? De la ponencia, sin duda, surgirán nuevos datos y pautas de manejo de los fármacos más seguras, a partir de la amplia experiencia del ponente y de los resultados, entre otros, de los grupos de investigadores italianos al respecto. De este denso programa, sólo queda esperar el máximo aprovechamiento para todos, y sobre todo para nuestros pacientes.

Nuevos fármacos quimioterápicos y riesgo tromboembólico: ¿cómo prevenirlo?

J.R. GONZÁLEZ-PORRAS, I. ALBERCA

Servicio de Hematología. Hospital Universitario de Salamanca

Introducción

Las hemopatías malignas, en particular los linfomas y mielomas, presentan una incidencia de eventos tromboembólicos (ETE), incluyendo trombosis venosa profunda, embolismo pulmonar, ictus y cardiopatía isquémica, superior a la de la población general¹. Además, la quimioterapia es un factor de riesgo independiente para la aparición de trombosis².

El desarrollo de estas complicaciones tromboembólicas supone un impacto clínico negativo en la evolución de la enfermedad tumoral, debido a que pueden retrasar o interferir con el tratamiento antitumoral, precipitar o prolongar la hospitalización y aumentar el consumo de los recursos sanitarios. Una trombopprofilaxis eficaz y un tratamiento apropiado de la trombosis constituyen dos estrategias fundamentales para reducir la morbimortalidad y mejorar la calidad de vida de los pacientes oncológicos.

Combinaciones quimioterápicas clásicas basadas en L-asparaginasa o cisplatino se asocian con este riesgo aumentado de ETE. Por otro lado, los avances en el conocimiento de la biología tumoral han permitido la introducción de nuevos agentes biológicos con mecanismos de acción diferentes a la quimioterapia citotóxica convencional. Estas nuevas estrategias antitumorales incluyen los inhibidores de la angiogénesis, probados con éxito en diversos tumores sólidos y hematológicos. Sin embargo, la trombosis emerge como una toxicidad frecuente e impredecible con este tipo de drogas.

El propósito de este artículo es realizar una revisión clínica de la trombosis asociada a la quimioterapia con una especial consideración a los nuevos fármacos anticancerosos, tales como los inhibidores de la angiogénesis, para, después, abordar las estrategias óptimas que previenen la trombosis asociada a quimioterapia.

Cáncer y riesgo tromboembólico

La trombosis es una complicación bien reconocida en el cáncer³. La estrecha relación entre el cáncer y la activación de la coagulación fue descrita en 1865 por Armand Trousseau, quien fue el primero en describir la asociación clínica entre la trombosis venosa y el cáncer. Las manifestaciones clínicas varían desde

la enfermedad tromboembólica venosa (ETV), típica de los tumores sólidos, a la coagulación intravascular diseminada, más común en los tumores hematológicos y el cáncer metastásico⁴. Además, las complicaciones trombóticas arteriales son, también, más frecuentes en el cáncer. La patogénesis de la trombosis en el cáncer no es del todo conocida. El estado de hipercoagulabilidad asociada al cáncer es un proceso complejo que refleja la interacción de diferentes mecanismos que incluyen: a) la activación de la coagulación; b) la desregulación de la fibrinólisis; c) la perturbación del endotelio vascular; d) las interacciones celulares directas de la célula cancerígena con el endotelio, monocitos/macrófagos y plaquetas; y e) la presencia de factores no específicos como la generación de reactantes de fase aguda, la presencia de necrosis o proteínas aberrantes y el compromiso hemodinámico (estasis)⁵.

Quimioterapia y riesgo tromboembólico

Los pacientes con cáncer que reciben quimioterapia tienen un riesgo 6-7 veces superior de ETE que los que no la reciben. La liberación de sustancias procoagulantes provenientes de las células tumorales y de las células endoteliales dañadas por la quimioterapia son algunos de los mecanismos responsables de la trombosis asociada a la quimioterapia. Sin embargo, drogas anticancerosas como la L-asparaginasa y los inhibidores de la angiogénesis provocan ETE por mecanismos específicos. Los agentes quimioterápicos más frecuentemente asociados con ETE se presentan en la Tabla 1.

L-asparaginasa

La L-asparaginasa (L-asa) es un agente linfocitotóxico usado en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda (LLA), tanto infantil como en adultos. La L-asa es una enzima, derivada de *Escherichia coli* o de *Erwinia chrysanthemi*, que hidroliza el aminoácido esencial L-asparagina, convirtiéndolo en ácido L-aspártico. Por tanto, reduce los niveles de L-asparagina, un aminoácido esencial necesario para la síntesis proteica. De este modo, se inhibe el crecimiento de la población celular neoplásica. La depleción de este aminoácido

Tabla 1. Quimioterápicos asociados con trombosis
<i>L-asparaginasa</i>
Regímenes quimioterápicos que incluyen cisplatino
Terapia antihormonal:
· Tamoxifeno
· Inhibidores de la aromataasa
Otros quimioterápicos citotóxicos convencionales:
· Fluorouracilo
· Bleomicina
· Mitomicina
· Altas dosis de quimioterapia para trasplante de progenitores hematopoyéticos
Inmunocombinados:
· Gemtuzumab ozogamicina
Inhibidores de la angiogénesis:
· Talidomida y sus derivados:
- Lenalidomida
- Pomalidomida
· Antagonistas de VEGF o sus receptores:
- Bevacizumab
- Semaxibin
- Sorafenib
- Sunitinib
- Vatalanib
· Inhibidores de la metaloproteasa de la matriz extracelular:
- Prinomastat

se asocia, sin embargo, a una menor síntesis de otras proteínas, incluyendo diversos factores hemostáticos. Uno de los factores hemostáticos más afectados por la L-asa es la antitrombina (AT). Así, el déficit severo de AT podría explicar, en parte, por qué el tratamiento con L-asa se asocia con una incidencia aumentada de trombosis en la LLA, en torno a un 1-4% en niños y un 4-14% en adultos⁶. Esta incidencia de ETE es mayor si la L-asa se administra concomitantemente con prednisona. Existen datos que sugieren que la toxicidad, incluyendo las alteraciones hemostáticas, de la L-asa procedente de *Erwinia* es menor que la de la enzima obtenida a partir de *E. coli*⁷. Sin embargo, la actividad asparaginasa antitumoral de *Erwinia* es menor que la de *E. coli*⁸. Posiblemente, el riesgo tromboembólico de la L-asa se atenúa aumentando el intervalo de dosificación del fármaco y utilizando la vía subcutánea o intramuscular en lugar de la intravenosa⁹. La administración concomitante de concentrados de AT¹⁰ o dexametasona¹¹, en vez de prednisona, podrían, también, disminuir la incidencia de ETE asociadas a L-asa, pero estos hallazgos deben confirmarse en ensayos prospectivos. La L-asparaginasa pegilada (L-asa-peg) es una modifica-

ción de la molécula de L-asa. Consiste en la unión de la L-asa de manera covalente con polietilenglicol para disminuir su inmunogenicidad y alargar su vida media plasmática. Esta modificación no afecta de manera significativa a su eficacia antitumoral y fue aprobada en 2007 por la FDA para la LLA. Sin embargo, la incidencia de trombosis inducida por L-asa-peg (2,5-11%) se encuentra en valores muy similares a las L-asa no modificadas¹².

Regímenes quimioterápicos basados en cisplatino

El cisplatino es un agente antitumoral empleado frecuentemente en el tratamiento de diversos tumores. El cisplatino se asocia con un riesgo aumentado de eventos tromboembólicos. En un reciente análisis retrospectivo de 1.098 pacientes con tumores sólidos que recibieron regímenes quimioterápicos basados en cisplatino la incidencia de ETE fue del 18,3%¹³. El 90% de los ETE ocurrieron en los primeros 90 días tras recibir la primera dosis de cisplatino. Los factores de riesgo asociados a la aparición de trombosis por cisplatino fueron: a) tipo de tumor, más frecuente en cáncer pancreático; b) extensión del tumor, alta incidencia en tumores metastásicos; y c) el tipo de quimioterapia acompañante con el cisplatino, más frecuente en combinaciones con gemcitabina, docetaxel o bevacizumab.

El mecanismo por el cual el cisplatino promueve la aparición de trombosis no se conoce con exactitud. Estudios *in vitro* sugieren que el cisplatino incrementa la actividad del factor tisular de los monocitos¹⁴, la agregación plaquetaria¹⁵ y el daño endotelial, que podría explicar la trombosis arterial inducida por cisplatino¹⁶.

Otros quimioterápicos citotóxicos convencionales

Otros agentes quimioterápicos citotóxicos que aumentan el riesgo de complicaciones trombóticas son fluorouracilo, bleomicina, mitomicina y las altas dosis de quimioterapia empleadas en el régimen de acondicionamiento del trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH). Regímenes de acondicionamiento pretrasplante que incluyen busulfan o BCNU, en combinación con ciclofosfamida o radiación corporal total, se asocian con riesgo elevado de enfermedad venooclusiva hepática (EVOH)¹⁷. Otras complicaciones trombóticas, diferentes de la EVOH, son comunes en pacientes con neoplasias hematológicas que reciben un TPH. En dos estudios retrospectivos¹⁸⁻¹⁹ la incidencia de ETE asociados a TPH fue del 3,7% y 4,6%. Los factores de riesgo para el desarrollo de ETE fueron: a) utilización de un catéter

venoso central; b) antecedente de trombosis; c) desarrollo de enfermedad injerto contra huésped; y d) realización de un trasplante alogénico frente a un trasplante autólogo.

Gemtuzumab ozogamicina

Es un inmunocombinado, entre un anticuerpo anti-CD33 y un antibiótico antitumoral, la calicheamicina, utilizado en la leucemia aguda mieloblástica CD33 positiva. Este fármaco se ha relacionado con el desarrollo de enfermedad venooclusiva hepática cuando se asocia con quimioterapia (5%) o tras un TPH (19%)²⁰.

Terapia hormonal

El tratamiento con tamoxifeno o raloxifeno eleva el riesgo de ETE independientemente del tipo de tumor. Cuando se usa en monoterapia, el riesgo aumentado de ETE es de 2 a 7 veces, pero cuando se asocia a quimioterapia este riesgo se multiplica por 4. La edad y la menopausia aumentan el riesgo de trombosis asociadas a tamoxifeno. Los inhibidores de la aromatasa, cuyo principal agente es el anastrozol, inhiben la síntesis de estrógenos (estradiol) y son utilizados con éxito en el cáncer de mama avanzado en mujeres posmenopáusicas. El riesgo de trombosis asociadas a estos agentes es menor que con tamoxifeno pero superior al riesgo de ETE en mujeres sanas.

Inhibidores de la angiogénesis

Los inhibidores de la angiogénesis constituyen un relativo nuevo concepto en terapia antitumoral. La formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los

vasos preexistentes representa un hallazgo fundamental en el crecimiento y la progresión tumoral. Estos fármacos son capaces de suprimir la angiogénesis tumoral directamente, bloqueando la capacidad de las células endoteliales a proliferar, o indirectamente, bloqueando las proteínas proangiogénicas y sus receptores²¹. Los principales antiangiogénicos utilizados en oncología son la talidomida y sus análogos, así como los inhibidores del factor de crecimiento endotelial vascular o sus receptores.

Talidomida y sus derivados (IMiD)

La incidencia de ETV en pacientes con mieloma múltiple (MM) que reciben talidomida en monoterapia o en combinación con otros agentes queda reflejada en la Tabla 2²²⁻³³. Aunque la talidomida usada en monoterapia en pacientes con MM en recaída o refractarios tiene un bajo riesgo trombótico (incidencia de ETV \approx 2%), el porcentaje de ETV se incrementa significativamente cuando se administra conjuntamente con altas dosis de esteroides o quimioterapia, especialmente con regímenes que contienen doxorubicina. El desarrollo de ETV asociada a talidomida suele ser precoz (\approx 70% de los episodios trombóticos ocurren durante los 2 primeros ciclos de quimioterapia). Además, la trombosis inducida por talidomida es más frecuente en pacientes con MM de nuevo diagnóstico que en pacientes en recaída o refractarios. Estos hallazgos sugieren que los factores relacionados con la biología tumoral son más decisivos en la aparición de la trombosis que la acumulación tóxica de la droga en el organismo. ETE arteriales son frecuentes en pacientes con MM que reciben talidomida (5,9%). La presencia de hipertensión arterial, el tabaquismo y los altos niveles de FVIII:C se asocian de forma significativa con el desarrollo de trombosis arterial relacionada con talidomida³⁴.

Tabla 2. Incidencia de ETV en pacientes con MM tratados con diferentes regímenes de talidomida

Régimen	Incidencia de ETV (%)	Pacientes	Referencia
Talidomida	< 2-3	Recaída o refractarios	22-24
Talidomida	4	Nuevo diagnóstico	25
Talidomida + dexametasona	2-7	Recaída o refractarios	26-27
Talidomida + dexametasona	18-26	Nuevo diagnóstico	28-29
Talidomida + melfalan + prednisona	11	Enfermedad avanzada	30
Talidomida + melfalan + prednisona	23-58	Nuevo diagnóstico	30-31
Talidomida + regímenes quimioterápicos con doxorubicina	16	Recaída	32
Talidomida + regímenes quimioterápicos con doxorubicina	26-34	Nuevo diagnóstico	33

Tabla 3. Incidencia de ETV en pacientes con MM tratados con diferentes regímenes de lenalidomida

Régimen	Incidencia de ETV (%)	Pacientes	Referencia
Lenalidomida	3	Progresión	35
Lenalidomida + dexametasona	14-75	Nuevo diagnóstico	36-37
Lenalidomida + dexametasona	11	Recaída	38

La lenalidomida (CC-5013) es un derivado de la talidomida que fue diseñado para mejorar la respuesta de la talidomida y reducir sus efectos adversos como la neuropatía, la somnolencia, el estreñimiento, etc. La incidencia de ETV por lenalidomida aparece en la Tabla 3³⁵⁻³⁹. Aunque el porcentaje de ETV con lenalidomida en monoterapia es bajo, la incidencia de ETV es mayor cuando la lenalidomida se asocia con dexametasona o quimioterapia.

La pomalidomida (CC-4047) es el análogo de la talidomida más reciente que ha demostrado actividad en el MM. En un ensayo clínico en fase I que incluyó 24 pacientes con MM refractario o en recaída, la pomalidomida en monoterapia provocó un 16% de ETV³⁹. Sin embargo, en otro ensayo clínico en fase I más reciente, la utilización de pomalidomida a dosis diarias alternantes, en monoterapia o en combinación con dexametasona, no objetivó complicaciones trombóticas⁴⁰.

La patogenia de la trombosis asociada a la talidomida y sus análogos es desconocida. Se han propuesto numerosas teorías que incluyen el desarrollo de una resistencia a la proteína C adquirida (RPCa), niveles elevados de factor VIII y factor von Willebrand, activación endotelial y alteración de la trombomodulina⁴¹. La RPCa, no asociada con el factor V Leiden, es una alteración transitoria presente en el 10% de los pacientes con MM. El riesgo de TVP en pacientes con MM que reciben talidomida se incrementa del 16 al 66% cuando los pacientes presentan RPCa. La producción de autoanticuerpos contra la PC podría explicar el desarrollo de este fenómeno transitorio⁴². Recientemente, se ha comunicado una susceptibilidad genética para el desarrollo de trombosis asociada a talidomida. Variantes genéticas en XRRC5 podrían predecir tales eventos⁴³.

Antagonistas de VEGF o sus receptores

Estas drogas constituyen una nueva clase de inhibidores de la angiogénesis. El bevacizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, por sus siglas en inglés). El bevacizumab tiene la aprobación de la EMEA para el tratamiento de diversos tipos de tumores sólidos. Disponemos de los resultados de un metaanálisis reciente que incluye 15 ensayos clí-

cos aleatorizados controlados en los cuales se comparó, en tumores sólidos, el tratamiento antineoplásico estándar con o sin bevacizumab⁴⁴. Los pacientes tratados con bevacizumab tuvieron un incremento significativo del desarrollo de trombosis venosa con respecto a la población control (11,9% vs. 6,9%). El riesgo de ETE fue similar independientemente de la dosis de bevacizumab empleada. El uso de bevacizumab también se ha relacionado con la aparición de trombosis arterial (3,8%). La mayoría de estos episodios fueron infartos de miocardio e ictus. La presencia de episodios trombóticos arteriales previos al uso de bevacizumab y la edad superior a 65 años son factores de riesgo relacionados con la aparición de ETE arteriales. Por tanto, este agente debería ser utilizado con cautela en esta población.

El VEGF modula la función endotelial, incrementando la permeabilidad, proliferación y migración celular. Además, promueve la adhesión y activación plaquetaria junto con la liberación de factor von Willebrand, la expresión del factor tisular, trombo-modulina y activadores de la fibrinólisis. Así, la inactivación de VEGF podría, teóricamente, causar tanto trombosis como hemorragias. El riesgo hemorrágico aumentado ha sido demostrado en varios ensayos clínicos, con una incidencia de hemorragias de grado 3 o superior de un 4,4% comparado con el 0,7% en pacientes que no recibieron anti-VEGF⁴⁵.

Semaxibin, un inhibidor del receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular de tipo 1 y tipo 2 (VEGFr-1 y VEGFr-2), presenta una incidencia de ETE venosos en torno a un 10-15% en monoterapia cuando se emplea en cáncer prostático, mieloma múltiple o sarcomas. Sin embargo, el semaxibin ha demostrado una toxicidad cardiovascular inaceptable cuando se asocia a quimioterapia. Por ejemplo, un ensayo clínico en fase I que combinó el semaxibin con gemcitabina y cisplatino fue interrumpido prematuramente tras la aparición de 9 episodios trombóticos en los 19 primeros pacientes reclutados (42%). Otros inhibidores utilizados en la clínica son el sunitinib y el sorafenib. Las complicaciones trombóticas asociadas a sunitinib o sorafenib, tanto arteriales como venosas, fueron menores que con semaxibin (< 10%). Un nuevo fármaco inhibidor tirosín-cinasa, el valatanib, con resultados esperanzadores en diversos tumores sólidos, ha demostrado un porcentaje de ETE bajo, incluso cuando el valatanib se asocia con quimioterapia.

Por último, el prinomastat (AG3340) es un inhibidor de la metaloproteasa de la matriz extracelular (MPME) que inhibe la angiogénesis. Las MPME son enzimas fundamentales en una de las etapas clave del proceso metastásico: la degradación de la matriz extracelular adyacente a las células tumorales, que posibilita su migración y diseminación. El prinomastat inhibe la activación de la MPME de tipo 2. Esta droga combinada con quimioterapia, radioterapia o anti-VEFR se ha relacionado hasta con un 43% de ETE.

¿Podemos prevenir la trombosis asociada a la quimioterapia?

Si bien el cáncer y la quimioterapia son factores de riesgo de ETE, ello no implica la administración sistemática o rutinaria de la profilaxis antitrombótica, debiendo siempre considerarse si concurren determinadas situaciones de riesgo.

En el momento actual, las guías internacionales (ASCO, ESMO y NCCN)⁴⁶⁻⁴⁸ recomiendan profilaxis antitrombótica, en ausencia de hemorragias o contraindicaciones, de forma rutinaria en el paciente con cáncer que está ingresado o tras una intervención quirúrgica. En pacientes oncológicos que reciben quimioterapia en régimen ambulatorio sólo se recomienda la tromboprofilaxis de forma rutinaria en aquellos pacientes diagnosticados de MM que reciben análogos de la talidomida.

Los regímenes tromboprofilácticos disponibles se muestran en la Tabla 4. Un metaanálisis que compara heparinas de bajo peso molecular (HBPM) con heparinas no fraccionadas (HNF) demostró una eficacia similar con ambos regímenes, pero una reducción significativa de las complicaciones hemorrágicas con las HBPM⁴⁹. Por tanto, los fármacos de elección serían las HBPM o el pentasacárido sintético. El ácido acetilsalicílico tiene valor en un determinado grupo de pacientes con MM que reciben análogos de la talidomida. Las técnicas mecánicas de profilaxis antitrombótica (medias de compresión gradual o compresión neu-

mática intermitente) deben ser consideradas en pacientes con contraindicación para la anticoagulación.

A pesar del alto riesgo trombótico en pacientes hospitalizados con cáncer que reciben quimioterapia, la tromboprofilaxis en este contexto clínico sigue estando infrautilizada, con tasas comunicadas inferiores al 30%. En el caso de hemopatías malignas no existen estudios o guías específicamente diseñados para la prevención de la trombosis asociada a la quimioterapia. La utilización de la tromboprofilaxis en este contexto es más que anecdótica. Además, el riesgo aumentado de hemorragia por la trombocitopenia o por la invasión local tumoral (por ejemplo, gastrointestinal por linfomas) representa un obstáculo para la indicación de anticoagular. Por tanto, necesitamos identificar qué pacientes con cáncer, incluyendo hemopatías malignas, tienen un alto riesgo trombótico asociado a quimioterapia, para que puedan beneficiarse de la anticoagulación. En este sentido, el antecedente de una trombosis previa, la edad superior a 65 años, el deterioro del estado general y la presencia de comorbilidades o mutaciones protrombóticas (factor V Leiden o mutación G20210A del gen de la protrombina) se han asociado con un riesgo aumentado de trombosis en cáncer⁵⁰. La determinación (previa a quimioterapia) de diversos biomarcadores puede predecir el riesgo de trombosis asociada al cáncer. Estos biomarcadores son los niveles altos de P-selectina soluble, dímero-D, complejo trombina-antitrombina, proteína C reactiva y factor tisular⁵⁰. No obstante, estas variables clínicas y biomarcadores se han evaluado, principalmente, en tumores sólidos, por lo que es difícil extrapolar los resultados a la población con hemopatías hematológicas.

Recientemente, se ha propuesto un modelo predictivo de trombosis venosa asociada a quimioterapia en pacientes con cáncer que reciben quimioterapia de forma ambulatoria (Tabla 5). Según este modelo, 5 variables son capaces de estratificar a los pacientes en 3 grupos de riesgo: a) bajo riesgo (tasa de trombosis < 1%); b) riesgo intermedio (1-2%); y c) alto riesgo (> 7%)⁵¹. Curiosamente, los linfomas formaron parte del desarrollo de este modelo predictivo. Este sistema de puntuación pronóstica puede ser de ayuda para identificar pacientes de alto riesgo trombótico en los que la tromboprofilaxis podría estar justificada. Por otra parte, este modelo identifica neoplasias con muy bajo riesgo de trombosis asociada a la quimioterapia y, por tanto, la profilaxis antitrombótica no debería realizarse. No obstante, la utilidad de este modelo predictivo debe confirmarse en ensayos prospectivos.

Un estudio reciente en pacientes con leucemia aguda tratados con diversos regímenes quimioterápicos mostró una incidencia acumulada a los 2 años de ETE del 5,2% en leucemia mieloblástica aguda (LMA) y

Tabla 4. Profilaxis antitrombótica en pacientes con cáncer

Fármaco	Dosis
HNF (H. cálcica)	5.000 U s.s. cada 8 horas
Dalteparina	5.000 U s.c./día
Enoxaparina	40 mg/día s.c.
Fondaparinux	2,5 mg/día s.c.
Tinzaparina	4.500 U o 75 U/kg/día s.c.
Bemiparina	3.500 U/día s.c.
Ácido acetilsalicílico*	81-325 mg/día

* El ácido acetilsalicílico tiene valor en un determinado grupo de pacientes con MM que reciben análogos de la talidomida

Característica del paciente	Puntuación
Localización del tumor:	
· Muy alto riesgo (estómago, páncreas)	2
· Alto riesgo (pulmón, linfomas, ginecológico, vejiga y testículo)	1
Cifra de plaquetas pre-quimioterapia ($\geq 350 \times 10^9/L$)	1
Cifra de hemoglobina ($< 10 \text{ mg/dL}$) o uso de AEE	1
Cifra de leucocitos pre-quimioterapia ($> 11 \times 10^9/L$)	1
IMC $\geq 35 \text{ kg/m}^2$	1

AEE: agentes estimulantes de la eritropoyesis; IMC: índice de masa corporal
Riesgo alto: ≥ 3 puntos; riesgo intermedio: 1-2 puntos; riesgo bajo: 0 puntos

del 4,5% en leucemia linfoblástica aguda. Los factores de riesgo relacionados con la aparición de ETE asociados a LMA fueron sexo femenino, edad superior a 60 años, número de comorbilidades y presencia de un catéter central, mientras que para LLA los factores de riesgo fueron la presencia de un catéter central, número de comorbilidades y edad superior a 60 años. La aplicación de medidas profilácticas en esta población de riesgo podría ser de interés⁵². Dos estudios^{53,54} han evaluado la profilaxis anticoagulante en pacientes con hemopatías malignas que recibieron quimioterapia a través de un catéter venoso central. La profilaxis antitrombótica no demostró aumento de las hemorragias, pero los resultados de eficacia, en cuanto a reducción de trombosis relacionada con el catéter, fueron contradictorios.

A diferencia de lo que ocurre en leucemias y linfomas, en el mieloma múltiple sí se han empleado diversos regímenes trombotrópicos, debido al alto riesgo trombotico con la talidomida y sus análogos, en especial cuando se asocian a quimioterapia. Se han utilizado eficazmente ácido acetilsalicílico, heparinas de bajo peso molecular y antivitaminas K (AVK) para reducir las complicaciones tromboticas asociada a IMID por debajo del 10%. Sin embargo, desconocemos cuál es la mejor estrategia profiláctica, pues ninguno de ellos ha sido evaluado en ensayos clínicos aleatorizados bien diseñados. Recientemente, se han comunicado los resultados de un estudio prospectivo y aleatorizado que evaluó la profilaxis con enoxaparina *versus* ácido acetilsalicílico *versus* AVK en pacientes con MM tratados con diferentes combinaciones de talidomida, corticoides o bortezomib⁵⁵. En este estudio no hubo diferencias significativas en episodios cardiovasculares (5%) entre las tres ramas profilácticas.

Sin embargo, se reconocen dos posibles limitaciones a este estudio: a) la profilaxis sólo fue realizada durante el tratamiento de inducción; y b) los regímenes que contienen bortezomib podrían disminuir el potencial trombotico de la talidomida. En MM que reciben talidomida o sus análogos, y ante la ausencia de ensayos clínicos aleatorizados, se recomienda una estrategia profiláctica basada en un modelo de riesgos propuesto por un grupo internacional de expertos en MM (Tabla 6)⁵⁶.

El uso de los nuevos anticoagulantes orales, principalmente los inhibidores directos del factor Xa o de la trombina, puede ser muy atractivo en cáncer porque presentan menos interacciones farmacológicas y no requieren monitorización. Estos fármacos han demostrado ser eficaces y con un perfil de seguridad equiparable al de las HBPM en la prevención de la trombosis venosa en pacientes sometidos a cirugía ortopédica de cadera o rodilla, en la prevención del ictus en pacientes con fibrilación auricular y en la prevención secundaria de la ETV. Hasta la fecha, sólo disponemos de los resultados de un ensayo clínico en fase II del inhibidor del factor Xa, apixaban, en pacientes con cáncer metastásico y tratamiento quimioterápico⁵⁷. A pesar de necesitar ensayos clínicos prospectivos que evalúen la seguridad y eficacia de es-

Tabla 6. Estrategia trombotrófica en pacientes con MM que reciben talidomida o sus análogos según un modelo basado en riesgos

Factores de riesgo	Recomendación
Factores de riesgo individual	Si ≤ 1 factor de riesgo:
· Obesidad	Ácido acetilsalicílico 81-325 mg/día
· Tromboembolismo previo	
· Catéter venoso central	Si ≥ 2 factores de riesgo
· Comorbilidad:	HBPM a dosis profilácticas
- Enfermedad cardíaca	AVK (INR 2-3)
- Enfermedad renal crónica	
- Diabetes	
- Infección aguda	
- Inmovilización	
· Cirugía	
· Medicación:	
- Agentes estimulantes de la eritropoyesis	
· Trombocitopenia congénita	
Factores de riesgo relacionados con el mieloma	
· Enfermedad al diagnóstico	
· Hiperviscosidad	
Factores de riesgo relacionados con el tratamiento	
· Altas dosis de dexametasona	HBPM a dosis terapéuticas
· Quimioterapia con doxorubicina	AVK (INR 2-3)

tos nuevos agentes anticoagulantes en cáncer, es difícil que éstos se desarrollen hasta que no obtengan la indicación en la prevención o tratamiento de ETE en pacientes no oncológicos. Aunque el cáncer supone un riesgo aumentado de trombosis, también existe un riesgo aumentado de hemorragias que podría suponer un retraso en la aprobación de estos nuevos fármacos para otras indicaciones⁵⁵.

Conclusión

La quimioterapia y los nuevos agentes antiangiogénicos aumentan el riesgo de ETE en pacientes con cáncer, incluyendo leucemias, linfomas o mielomas. Con excepción de la talidomida y sus análogos en el mieloma múltiple, la tromboprolifaxis en hemopatías malignas que reciben quimioterapia es complicada debido al riesgo hemorrágico y a la ausencia de estudios o guías disponibles. Una estrategia de alerta activa y una tromboprolifaxis individualizada en pacientes con factores de riesgo trombótico concurrentes al cáncer y a la quimioterapia podría contribuir a reducir la incidencia de ETE, pero esta conclusión requiere nuevos ensayos clínicos.

Bibliografía

- Blom JW, Doggen CJ, Osanto S, Rosendaal FR. Malignancies, prothrombotic mutations, and the risk of venous thrombosis. *JAMA*. 2005;293:715-22.
- Haddad TC, Greeno EW. Chemotherapy-induced thrombosis. *Thromb Res*. 2006;118:555-68.
- Rickles FR, Edwards RL. Activation of blood coagulation in cancer: Trousseau's syndrome revisited. *Blood* 1983;62:14-31.
- Tallman MS, Kwaan HC, Hakimian D, Rickles FR. New insights into the pathogenesis of coagulation dysfunction in acute promyelocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 1993;11:27-36.
- Rickles FR, Falanga A. Molecular basis for the relationship between thrombosis and cancer. *Thromb Research* 2001;102:215-24.
- Lee AY, Levine MN. The thrombophilic state induced by therapeutic agents in the cancer patient. *Semin Thromb Hemost*. 1999;25:137-45.
- Eden OB, Shaw MP, Lilleyman JS, Richards S. Non-randomised study comparing toxicity of Escherichia coli and Erwinia asparaginase in children with leukaemia. *Med Pediatr Oncol*. 1990;18:497-502.
- Duval M, Suci S, Ferster A, Riolland X, Nelken B, Lutz P, et al. Comparison of Escherichia coli-asparaginase with Erwinia-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organization for Research and Treatment of Cancer-Children's Leukemia Group phase 3 trial. *Blood*. 2002;99:2734-9.
- Priest JR, Ramsay NK, Bennett AJ, Krivit W, Edson JR. The effect of L-asparaginase on antithrombin, plasminogen, and plasma coagulation during therapy for acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr*. 1982;100:990-5.
- Mitchell L, Andrew M, Hanna K, Abshire T, Halton J, Wu J, et al. Trend to efficacy and safety using antithrombin concentrate in prevention of thrombosis in children receiving l-asparaginase for acute lymphoblastic leukemia. Results of the PAARKA study. *Thromb Haemost*. 2003;90:235-44.
- Hernández-Espinosa D, Miñano A, Ordóñez A, Mota R, Martínez-Martínez I, Vicente V, et al. Dexamethasone induces a heat-stress response that ameliorates the conformational consequences on antithrombin of L-asparaginase treatment. *J Thromb Haemost*. 2009;7:1128-33.
- Fu CH, Sakamoto KM. PEG-asparaginase. *Expert Opin Pharmacother*. 2007;8:1977-84.
- Moore RA, Adel NG, Bhutani M, Tabbara NE, Landau H, Nimer SD, et al. Cisplatin-based chemotherapy is associated with an unacceptably high incidence of thromboembolic events: a large retrospective analysis. *Blood* 2009;114:456
- Walsh J, Wheeler HR, Geczy CL. Modulation of tissue factor on human monocytes by cisplatin and adriamycin. *Br J Haematol*. 1992;81:480-8.
- Togna GI, Togna AR, Franconi M, Caprino L. Cisplatin triggers platelet activation. *Thromb Res*. 2000;99:503-9.
- Licciardello JT, Moake JL, Rudy CK, Karp DD, Hong WK. Elevated plasma von Willebrand factor levels and arterial occlusive complications associated with cisplatin-based chemotherapy. *Oncology*. 1985;42:296-300.
- McDonald GB, Hinds MS, Fisher LD, Schoch HG, Wolford JL, Banaji M, et al. Venous occlusive disease of the liver and multiorgan failure after bone marrow transplantation: a cohort study of 355 patients. *Ann Intern Med*. 1993;118:255-67.
- Gerber DE, Segal JB, Levy MY, Kane J, Jones RJ, Streiff MB. The incidence of and risk factors for venous thromboembolism (VTE) and bleeding among 1514 patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation: implications for VTE prevention. *Blood*. 2008;112:504-10.
- Gonsalves A, Carrier M, Wells PS, McDiarmid SA, Huebsch LB, Allan DS. Incidence of symptomatic venous thromboembolism following hematopoietic stem cell transplantation. *J Thromb Haemost*. 2008;6:1468-73.

20. Zakarija A, Kwaan HC. Adverse effects on hemostatic function of drugs used in hematologic malignancies. *Semin Thromb Hemost.* 2007;33:355-64.
21. Caine GJ, Lip GY. Thromboembolism associated with new anti-cancer treatment strategies in combination with conventional chemotherapy: new drugs, old risks? *Thromb Haemost.* 2003;90:567-9.
22. Barlogie B, Desikan R, Eddlemon P, Spencer T, Zeldis J, Munshi N, et al. Extended survival in advanced and refractory multiple myeloma after single-agent thalidomide: identification of prognostic factors in a phase 2 study of 169 patients. *Blood.* 2001;98:492-4.
23. Tosi P, Zamagni E, Cellini C, Ronconi S, Patriarca F, Ballerini F, et al. Salvage therapy with thalidomide in patients with advanced relapsed/refractory multiple myeloma. *Haematologica.* 2002;87:408-14.
24. Kumar S, Gertz MA, Dispenzieri A, Lacy MQ, Geyer SM, Iturria NL, et al. Response rate, durability of response, and survival after thalidomide therapy for relapsed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc.* 2003;78:34-9.
25. Rajkumar SV, Gertz MA, Lacy MQ, et al. Thalidomide as initial therapy for early-stage myeloma. *Leukemia* 2003;17:775-9.
26. Palumbo A, Bertola A, Falco P, et al. Efficacy of low dose thalidomide and dexamethasone as first salvage regimen in multiple myeloma. *Hematol J* 2004;5:318-24.
27. Dimopoulos MA, Zervas K, Kouvatsos G, Galani E, Grigoraki V, Kiamouris C, et al. Thalidomide and dexamethasone combination for refractory multiple myeloma. *Ann Oncol.* 2001;12:991-5.
28. Rajkumar SV, Hayman S, Gertz MA, Dispenzieri A, Lacy MQ, Greipp PR, et al. Combination therapy with thalidomide plus dexamethasone for newly diagnosed myeloma. *J Clin Oncol.* 2002;20:4319-23.
29. Cavo M, Zamagni E, Cellini C, Tosi P, Cangini D, Cini M, et al. Deep-vein thrombosis in patients with multiple myeloma receiving first-line thalidomide-dexamethasone therapy. *Blood.* 2002;100:2272-3.
30. Oakervee H, Brownell A, Cervi P, et al. A study of the safety and efficacy of thalidomide combined with vincristine, adriamycin and dexamethasone (T-VAD) in the treatment of younger patients with multiple myeloma: a UK Myeloma Forum Pilot Study. *Br J Haematol* 2002;117(suppl. 1):65.
31. Palumbo A, Bringhen S, Caravita T, Merla E, Caparella V, Callea V, et al. Italian Multiple Myeloma Network, GIMEMA. Oral melphalan and prednisone chemotherapy plus thalidomide compared with melphalan and prednisone alone in elderly patients with multiple myeloma: randomised controlled trial. *Lancet.* 2006;367:825-31.
32. Zangari M, Siegel E, Barlogie B, Anaissie E, Saghafifar F, Fassas A, et al. Thrombogenic activity of doxorubicin in myeloma patients receiving thalidomide: implications for therapy. *Blood.* 2002;100:1168-71.
33. Zangari M, Barlogie B, Anaissie E, Saghafifar F, Eddlemon P, Jacobson J, et al. Deep vein thrombosis in patients with multiple myeloma treated with thalidomide and chemotherapy: effects of prophylactic and therapeutic anticoagulation. *Br J Haematol.* 2004;126:715-21.
34. Libourel EJ, Sonneveld P, van der Holt B, de Maat MP, Leebeek FW. High incidence of arterial thrombosis in young patients treated for multiple myeloma: results of a prospective cohort study. *Blood.* 2010 Mar 25. [Epub ahead of print]
35. Richardson PG, Blood E, Mitsiades CS, Jagannath S, Zeldenrust SR, Alsina M, et al. A randomized phase 2 study of lenalidomide therapy for patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood.* 2006;108:3458-64.
36. Zonder JA, Barlogie B, Durie BG, McCoy J, Crowley J, Hussein MA. Thrombotic complications in patients with newly diagnosed multiple myeloma treated with lenalidomide and dexamethasone: benefit of aspirin prophylaxis. *Blood.* 2006;108:403.
37. Niesvizky R, Martínez-Baños DM. Aspirin as thromboprophylaxis in myeloma. *Leuk Lymphoma.* 2008;49:1646-7.
38. Dimopoulos M, Spencer A, Attal M, Prince HM, Harousseau JL, Dmoszynska A, et al. Multiple Myeloma (010) Study Investigators. Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2007;357:2123-32.
39. Schey SA, Fields P, Bartlett JB, Clarke IA, Ashan G, Knight RD, et al. Phase I study of an immunomodulatory thalidomide analog, CC-4047, in relapsed or refractory multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 2004;22:3269-76.
40. Streetly MJ, Gyertson K, Daniel Y, Zeldis JB, Kazmi M, Schey SA. Alternate day pomalidomide retains anti-myeloma effect with reduced adverse events and evidence of in vivo immunomodulation. *Br J Haematol.* 2008;141:41-51.
41. Gieseler F. Pathophysiological considerations to thrombophilia in the treatment of multiple myeloma with thalidomide and derivatives. *Thromb Haemost.* 2008;99:1001-7.
42. Jiménez-Zepeda VH, Domínguez-Martínez VJ. Acquired activated protein C resistance and thrombosis in multiple myeloma patients. *Thromb J.* 2006;4:11.

43. Tewari P, Kenny E, Staines A, Chanock S, Browne P, Lawler M. Genetic variants in XRRC5 may predict development of venous thrombotic events in myeloma patients on thalidomide. *Blood*. 2009;113:5691-2.
44. Nalluri SR, Chu D, Keresztes R, Zhu X, Wu S. Risk of venous thromboembolism with the angiogenesis inhibitor bevacizumab in cancer patients: a meta-analysis. *JAMA*. 2008;300:2277-85.
45. Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2006;355:2542-50.
46. Lyman GH, Khorana AA, Falanga A, Clarke-Pearson D, Flowers C, Jahanzeb M, et al. American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology guideline: recommendations for venous thromboembolism prophylaxis and treatment in patients with cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25:5490-505.
47. Mandalà M, Falanga A, Roila F; ESMO Guidelines Working Group. Management of venous thromboembolism in cancer patients: ESMO clinical recommendations. *Ann Oncol*. 2009;20 Suppl 4:182-4.
48. Wagman LD, Baird MF, Bennett CL, Bockenstedt PL, Cataland SR, Fanikos J, et al. National Comprehensive Cancer Network. Venous thromboembolic disease. NCCN. Clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2008;6:716-53.
49. Mismetti P, Laporte-Simitsidis S, Tardy B, Cucherat M, Buchmüller A, Juillard-Delsart D, et al. Prevention of venous thromboembolism in internal medicine with unfractionated or low-molecular-weight heparins: a meta-analysis of randomised clinical trials. *Thromb Haemost*. 2000;83:14-9.
50. Connolly GC, Khorana AA. Risk stratification for cancer-associated venous thromboembolism. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2009;22:35-47.
51. Khorana AA, Kuderer NM, Culakova E, Lyman GH, Francis CW. Development and validation of a predictive model for chemotherapy-associated thrombosis. *Blood*. 2008;111:4902-7.
52. Ku GH, White RH, Chew HK, Harvey DJ, Zhou H, Wun T. Venous thromboembolism in patients with acute leukemia: incidence, risk factors, and effect on survival. *Blood*. 2009;113:3911-7.
53. Cortezzi A, Moia M, Falanga A, Pogliani EM, Agnelli G, Bonizzoni E, Gussoni G, Barbui T, Mannucci PM; CATHEM Study Group. Incidence of thrombotic complications in patients with haematological malignancies with central venous catheters: a prospective multicentre study. *Br J Haematol*. 2005;129:811-7.
54. Couban S, Goodyear M, Burnell M, Dolan S, Wasi P, Barnes D, Macleod D, Burton E, Andreou P, Anderson DR. Randomized placebo-controlled study of low-dose warfarin for the prevention of central venous catheter-associated thrombosis in patients with cancer. *J Clin Oncol*. 2005 Jun 20;23(18):4063-9.
55. Palumbo A, Cavo M, Bringhen S, Cavalli M, Patriarca F, Rossi D, et al. A Phase III Study of Enoxaparin vs Aspirin vs Low-Dose Warfarin as Thromboprophylaxis for Newly Diagnosed Myeloma Patients Treated with Thalidomide Based-Regimens. *Blood* 2009; 114:492.
56. Palumbo A, Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Richardson PG, San Miguel J, Barlogie B, et al. International Myeloma Working Group Prevention of thalidomide- and lenalidomide-associated thrombosis in myeloma. *Leukemia*. 2008 Feb;22(2):414-23.
57. Levine MN, Deitchman D, Julian. A randomized phase II trial of a new anticoagulant, apixaban, in metastatic cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27:15S.
58. Levine MN. New antithrombotic drugs: potential for use in oncology. *J Clin Oncol*. 2009;27:4912-8.

Derivados plasmáticos versus productos recombinantes en el tratamiento de la hemofilia A: ¿tema resuelto?

J.A. AZNAR, A. MORET, L. ABAD-FRANCH, A. CID, S. HAYA

Unidad de Hemostasia y Trombosis. Servicio de Hematología y Hemoterapia.

Hospital Universitario La Fe. Valencia

Introducción

La hemofilia A es una enfermedad hemorrágica, hereditaria, monogénica, recesiva ligada a una anomalía en el cromosoma X, que conlleva una deficiencia del factor VIII de la coagulación sanguínea (FVIII). Las hemorragias constituyen sus manifestaciones clínicas predominantes, siendo las cerebrales las de mayor riesgo vital y las músculo-esqueléticas las de mayor morbilidad.

Hasta la década de los sesenta sólo se disponía para su tratamiento de sangre total, plasma fresco y crioprecipitados. Durante la década de los setenta ya se dispuso en la mayoría de los países desarrollados de concentrados de factor VIII provenientes del plasma humano (pdCFVIII), lo cual permitió instaurar programas de autotratamiento domiciliario y tratamientos profilácticos para retrasar la evolución de artropatía y programas de tratamiento de inmunotolerancia (TIT) para erradicar los inhibidores. Todo ello permitió disminuir la morbilidad y la mortalidad de la hemofilia así como aumentar la calidad y las expectativas de vida del paciente hemofílico. En la década de los ochenta este optimista panorama se ensombreció tras la aparición del SIDA y la constatación de la transmisión de las hepatitis virales a la población hemofílica a través de los concentrados de factor VIII (CFVIII).

Evolución de la producción de los CFVIII plasmáticos y recombinantes

La comunidad científica y la industria farmacéutica reaccionaron frente a la tragedia de la contaminación viral de los pacientes hemofílicos y, a mediados de los ochenta, la seguridad de los pdCFVIII mejoró mucho debido a la utilización en su producción de técnicas de inactivación viral (calor y/o solvente-detergente) o de reducción de su potencial carga viral (cromatografía), lo cual permitió reimplantar los programas de profilaxis y de TIT.

El impacto emocional del SIDA en la población hemofílica fue tan intenso que, a pesar de la alta seguridad que proporcionan los concentrados plasmáticos sometidos a técnicas de inactivación/eliminación viral, una parte de la industria farmacéutica productora de concentrados de coagulación, aprovechando

el importante progreso de la biotecnología durante la década de los ochenta, se concentró en la obtención de los productos recombinantes. Para ello se benefició de los avances biotecnológicos que permitieron la secuenciación del gen de los factores VIII y IX, la fragmentación del ADN (mediante enzimas de restricción) y la separación del gen que codifica el factor VIII y IX y su transferencia a células de hámster, su cultivo y la producción de factores recombinantes VIII y IX a escala industrial^{1,2}. Estos concentrados presentaban en teoría la ventaja de una producción ilimitada así como tener una altísima seguridad reduciendo al máximo el riesgo de la transmisión de patologías de origen viral al paciente hemofílico. Sin embargo, estos factores recombinantes de primera generación todavía contenían en su formulación final proteínas de origen animal o humano que, al menos teóricamente, les conferían un hipotético riesgo de presentar contaminación viral. La presencia de proteínas y/o células animales o humanas en los concentrados de FVIII recombinante (rCFVIII) se presentaba en tres puntos críticos de su producción industrial: nutrientes proteicos para el crecimiento de las células de hámster durante su cultivo, anticuerpos murinos utilizados en las columnas de inmunoafinidad y, por último, la utilización de estabilizadores del FVIII (albúmina) en la formulación final (Figura 1). Posteriormente, estas técnicas de producción industrial de productos recombinantes han ido mejorando hasta llegar al momento actual, en que disponemos de algunos rCFVIII con escasa o nula contaminación proteica y celular animal o humana y, por tanto, con un riesgo bajísimo de transmisión de patologías virales o priónicas. A pesar de esta altísima seguridad, a es-

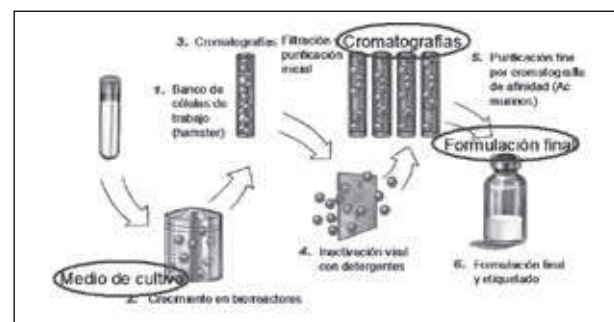


Figura 1. Esquema del fraccionamiento industrial típico de rCFVIII.

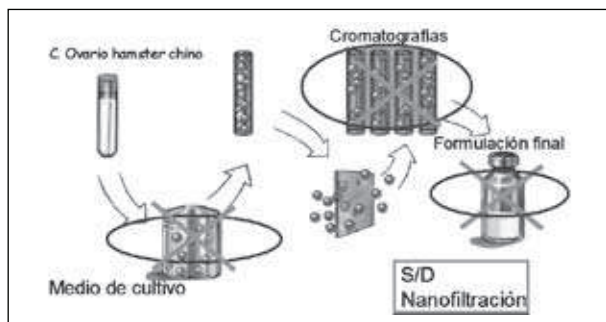


Figura 2. Esquema del fraccionamiento de rCFVIII de última generación. Libre de proteínas de origen animal en el medio de cultivo, cromatografías y formulación animal.

tos concentrados se les somete a procedimientos de inactivación viral (solvente-detergente) y, en algunos casos, se les añade la nanofiltración, por lo que podemos afirmar que estos rCFVIII de última generación son posiblemente uno de los elementos más seguros dentro del campo de la terapia transfusional (Figura 2). Sin embargo, no podemos olvidarnos de que para la producción del FVIII recombinante seguimos utilizando células de hámster y, por tanto, el riesgo de transmisión viral o priónica, a través de estos concentrados recombinantes, todavía no llega a ser riesgo cero.

Criterios para la elección del tipo de CFVIII

En la actualidad disponemos de productos plasmáticos y recombinantes de altísima calidad, por lo que la elección del tipo de CFVIII más adecuado para el tratamiento de la hemofilia deberá ser individualizado para cada paciente en función de su situación clínica y de la eficacia, seguridad e inmunogenicidad del producto escogido.

Eficacia de los CFVIII

Ambos tipos de CFVIII (plasmáticos y recombinantes) han demostrado en múltiples ensayos clínicos que presentan similares características tanto en lo que se refiere al rendimiento, farmacocinética y vida media de los mismos como a su respuesta clínica³⁻⁵.

Seguridad de los CFVIII

Los CFVIII de origen plasmático o recombinante son altamente seguros ya que, después de la aplicación en su producción de las técnicas de inactivación viral, no ha habido evidencia de transmisión de patolo-

gías virales a través de los mismos^{6,7}. El alto grado de seguridad de los concentrados de factor VIII de origen plasmático (pdCFVIII) se puede atribuir a la rigurosa selección de los donantes, al análisis serológico y por biología molecular de la sangre donada que ha minimizado el periodo ventana, a la disminución de la carga viral o priónica durante el fraccionamiento industrial del plasma y a la aplicación de las técnicas de inactivación viral. Sin embargo, sabemos que hay virus de envoltura no lipídica como son: el parvovirus B19, RV4 y RV5, que son resistentes a las actuales técnicas de inactivación viral y, por tanto, son transmisibles a través de los concentrados plasmáticos, por lo que debemos estar vigilantes sobre las repercusiones clínicas derivadas de esta posible transmisión viral⁸⁻¹⁰.

En la última década se han demostrado 4 casos de infección en humanos de la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vCJD) (3 con clínica de la vCJD y 1 asintomático) a través de las transfusiones de sangre total, aunque en la población hemofílica no hay evidencia, hasta la fecha, de haberse transmitido esta patología a través de los pdCFVIII. En este sentido, hay que señalar que, incluso ante la posibilidad de que una unidad de plasma contaminada por priones tipo Creutzfeldt-Jakob formase parte de *pool* de plasma destinado a la producción de un lote industrial de factor VIII, la contaminación priónica de ese lote sería prácticamente nula ya que, en primer lugar, se supone que el donante en el momento de su donación estaría clínicamente sano y, por tanto, la carga priónica de su sangre en ese momento sería mínima; luego esa mínima carga priónica quedaría muy diluida al mezclarla en los *pools* de muchos litros de plasma necesarios para el fraccionamiento industrial, y después esta mínima carga priónica sufriría otra nueva disminución en cada una de las fases del fraccionamiento industrial para la producción de CFVIII. No obstante lo anteriormente expuesto, recientemente Peden ha publicado un estudio¹¹ en el que practican biopsia y/o necropsia a 17 pacientes hemofílicos (sin sintomatología neurológica), tratados con pdCFVIII provenientes de *pools* de plasma del Reino Unido (UK), para analizar la proteína priónica resistente a la proteasa (PrPres) mediante técnica de Western blot. En uno de los pacientes, de 73 años de edad, heterocigoto (metionina/valina) en el codón 129 del gen de la proteína priónica, se detectó positividad frente a la PrPres. Este paciente había recibido 9.000 UI de un lote de pdCFVIII, fraccionado de un *pool* de 400.000 UI que incluía una bolsa positiva a la PrPres. La causa de la positividad a PrPres en el paciente no queda clara, ya que el mismo tenía varios factores de riesgo independientes del pdCFVIII referido, ya que había recibido 14 unidades de concentrado de hematíes y había sido sometido a varias

intervenciones quirúrgicas y a técnicas endoscópicas y por residir en UK tenía riesgo por alimentación. Además, otros pacientes habían recibido este lote contaminado y ninguno había desarrollado sintomatología neurológica, ni presentado positividad para el PrPres. Por todo lo anteriormente expuesto, aunque el riesgo de transmisión de esta patología a través de los CFVIII sea extremadamente bajo, debemos efectuar un riguroso seguimiento sobre cualquier manifestación clínica que pueda estar relacionada con esta patología¹².

La seguridad de los productos recombinantes constituye su punto fuerte, ya que al ir eliminando las proteínas de origen animal también se va reduciendo el riesgo de transmisión viral o priónica, llegando al máximo de seguridad en las últimas generaciones de los rCFVIII, en los que la eliminación proteica animal es total. Sin embargo, hay que recordar que para producir productos recombinantes es imprescindible la utilización de células de origen animal (hámster), por lo que no podemos afirmar que esté totalmente descartado el riesgo de contaminación viral o priónica de estos productos.

Inmunogenicidad de los CFVIII

Hoy día la complicación más grave y costosa del tratamiento de la hemofilia A es la aparición de anticuerpos (inhibidores) con capacidad para bloquear el potencial hemostático del FVIII infundido. El riesgo de aparición de estos anticuerpos en los pacientes graves que no han sido tratados previamente con concentrados de FVIII (PUP, *previously untreated patients*) es muy alto, alrededor del 30%¹³. La aparición de los inhibidores es más frecuente tras las primeras exposiciones a los concentrados del FVIII, lo cual suele suceder tras una media de 10-12 días de exposición (D/E). Esta incidencia, aunque va declinando tras las sucesivas administraciones de factor, se mantiene elevada hasta los 50 D/E de CFVIII; por esta razón, es en todo este periodo cuando la búsqueda de la presencia de inhibidores ha de ser más insistente^{14,15}.

La generación de un inhibidor anti-FVIII en un paciente hemofílico está regulada por un complejo proceso multifactorial en el que intervienen facto-

res propios del paciente y otros medioambientales relacionados con las características del tratamiento sustitutivo¹⁶.

Factores endógenos relacionados con el desarrollo de inhibidores

Entre los factores endógenos hay que destacar la magnitud del defecto genético, ya que los pacientes con un defecto grave del gen del FVIII tienen mayor facilidad para desarrollar inhibidores que aquellos que presentan defectos genéticos leves¹⁷⁻¹⁹. Sin embargo, a pesar de la evidencia de estos hechos, la realidad clínica hace que nos planteemos la siguiente pregunta: ¿Por qué algunos de estos pacientes con mutaciones graves desarrollan anticuerpos y otros no? En este sentido, el *Malmö International Brother Study* demostró que la concordancia de inhibidores entre hermanos con la misma mutación era sólo del 40%²⁰; incluso, en hemofílicos gemelos univitelinos con defectos genéticos graves no se detecta una total concordancia para desarrollar inhibidores²¹. Por tanto, es evidente que otros factores endógenos influyen en la aparición de los inhibidores en los hemofílicos (Tabla 1).

Otros factores endógenos a considerar son los antecedentes familiares, ya que en estos pacientes aumenta mucho el riesgo de la aparición de inhibidores²⁰. También son importantes los factores étnicos, ya que se ha detectado que los hemofílicos afroamericanos de raza negra tienen mayor propensión para desarrollar inhibidores²². Otros estudios han demostrado una asociación entre el desarrollo de inhibidores y la presencia de dos polimorfismos específicos en la región promotora de la interleucina 10 y los genes alfa del factor de necrosis tumoral alfa^{23,24}. Por otra

Tabla 1. Factores de riesgo para la aparición de inhibidores

Endógenos	Exógenos
Raza, Etnia	Procedimientos invasivos
Gravedad de la hemofilia	Administración de FVIII coincidente con un sistema inmune estimulado: enfermedades concomitantes, vacunaciones, hemorragias, sinovitis...
Historia familiar de inhibidores	Terapia de reemplazo con FVIII:
Mutación en el gen del factor VIII:	· Tipo de concentrado
· Grandes deleciones	· Tratamiento intensivo (> 50 UI/kg > 5 DE)
· Mutaciones <i>nonsense</i>	· Modalidad de tratamiento: profilaxis vs. demanda
· Inversión intrón 22	· Número de exposiciones a FVIII
· Inversión intrón 1	· Edad de la primera exposición
Polimorfismos en receptores y citocinas moduladoras del sistema inmune: IL-10, TNF- α , CTLA4	

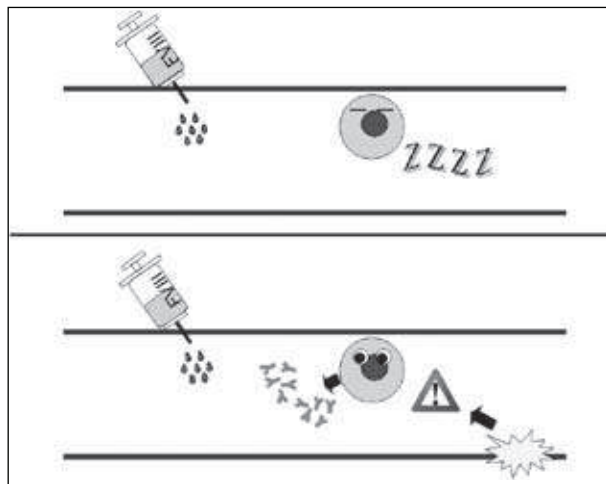


Figura 3. Esquema del modelo de peligro de Mazingher. Ante la falta de otros estímulos inmunológicos, el sistema inmune está "dormido" y la administración exógena de CFVIII no provoca una respuesta anamnéstica permitiendo la tolerancia al FVIII.

Sin embargo, con un sistema inmune estimulado (daño vascular, inflamación, infección, etc.), la administración simultánea de CFVIII provoca una respuesta anamnéstica.

parte, se ha referido el efecto protector de un polimorfismo en la región promotora del gen de la proteína 4 asociado al linfocito citotóxico T²⁵.

Factores medioambientales relacionados con el desarrollo de inhibidores

Uno de los factores medioambientales más influyentes en el desarrollo de inhibidores es el modo de iniciar el tratamiento con factor VIII en un paciente hemofílico. El posible impacto de la profilaxis temprana en la disminución del riesgo del desarrollo de inhibidores en la hemofilia A fue sugerido en estudios retrospectivos realizados en España, Italia y el Reino Unido²⁶⁻²⁸. Este efecto protector de la profilaxis temprana sobre el desarrollo de los inhibidores se confirmó en el estudio CANAL²⁹. Este estudio también aportó otras conclusiones muy clarificadoras sobre la influencia que otros factores medioambientales ejercen sobre el aumento o la disminución de la aparición de inhibidores, ya que se demostró que, en PUP graves, el tratamiento intensivo (> 50 UI/kg durante > 5 dosis) por eventos hemorrágicos graves o la cirugía aumenta la presencia de inhibidores. También se señalaba en este estudio que otros factores medioambientales que pueden incrementar el riesgo de la aparición de inhibidores son la vacunación y la infección cuando están asociadas a la administración de factor VIII.

Entre los factores exógenos o medioambientales que pueden influir en la aparición de los inhibido-

res, uno de los más estudiados es el origen del FVIII (plasmático o recombinante). Los primeros trabajos que comparaban la aparición de inhibidores según el tipo de producto usado señalaban que la incidencia acumulada era 2 veces más alta en aquellos pacientes que habían sido tratados con rCFVIII que en los tratados con pdCFVIII³⁰⁻³². En este sentido, Goudemand³³, usando una combinación de datos prospectivos y retrospectivos, mostró un riesgo superior (2,4 veces) para la formación de inhibidores en los PUP tratados con rCFVIII que aquellos que habían sido tratados con pdCFVIII. También en el estudio retrospectivo organizado por el United Kingdom Haemophilia Centre Doctor's Organization (UKHCDO) Paediatric Working Party los análisis univariantes mostraron que los rCFVIII generaban mayor incidencia de inhibidores que los pdCFVIII; sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas en el análisis multivariante³⁴.

En sentido contrario, en el estudio Canal, donde se analizaron 316 pacientes afectados de hemofilia grave durante sus 50 primeros días/exposición, no se evidenció que existiesen diferencias significativas de aparición de inhibidores entre los pacientes tratados con rCFVIII o con pdCFVIII^{29,35}.

Interacción de los factores medioambientales y el sistema inmune central

Durante muchos años los inmunólogos defendieron que el objetivo del sistema inmune era discriminar entre lo propio y lo extraño al paciente³⁶. Matzinger introdujo una nueva teoría, basada en el *danger model*, que postula que el primer objetivo del sistema inmune es detectar y defenderse de peligros externos. Según esta teoría, el sistema inmune puede ser activado por alarmas indicativas de destrucción tisular aumentando su capacidad de detectar proteínas extrañas³⁷. En el caso de la HA, la aparición de inhibidores tras las primeras infusiones de FVIII podría aumentarse si coincide con otros factores medioambientales detectados por el sistema inmune como peligrosos (Figura 3). Esta teoría explica muchos de los hallazgos del estudio CANAL, ya que tras la cirugía, traumas o hemorragias graves se generan importantes lesiones celulares que pueden activar el sistema inmune central facilitando el reconocimiento del FVIII infundido para su tratamiento como una proteína extraña y la generación de anticuerpos contra la misma. Por el contrario, la infusión de FVIII en régimen de profilaxis no asociada a factores de peligro no es capaz de estimular el sistema inmune, y el paciente puede hacerse tolerante al FVIII³⁸.

Recientemente, Kurnick, basado en la teoría anterior, publica sus resultados sobre la prevención de la aparición de inhibidores mediante el inicio, antes de la aparición de eventos hemorrágicos graves, de una profilaxis con una dosis de FVIII de 25 UI/kg a la semana. La eficacia de este protocolo fue excelente, ya que de los 26 PUP sometidos a esta modalidad de profilaxis semanal sólo uno de ellos desarrolló inhibidores. Según este autor, la infusión del FVIII no debe ir unida a señales de peligro, como son las hemorragias graves, cirugía, infecciones o vacunaciones, concluyendo que la profilaxis temprana, con una dosis baja de FVIII a la semana, no ligada a situaciones de alarma, es el tratamiento ideal para prevenir la aparición de inhibidores, ya que permite la tolerancia del FVIII en los PUP hemofílicos graves³⁹.

Metaanálisis de A. Iorio et al.

Recientemente, Iorio ha publicado un metaanálisis⁴⁰ que incluye 2.094 PUP afectados de hemofilia A en el que plantea el objetivo de conocer la incidencia de inhibidores en este tipo de pacientes, según hayan sido tratados con pdCFVIII o rCFVIII. Hay que resaltar la importancia de este metaanálisis ya que incluye el mayor número de pacientes estudiados hasta la fecha sobre la inmunogenicidad del FVIII, aportando 1.468 más que la otra gran revisión efectuada por Wigth y Paisley en el año 2003³². También es destacable de este trabajo la utilización de un completo estudio multivariante que aporta nuevos conocimientos sobre la incidencia de inhibidores, que son independientes del tipo de CFVIII usados en el tratamiento de los PUP.

Iorio estudia 1.167 pacientes tratados con pdCFVIII y 927 con rCFVIII, con una media de edad de 9,6 meses, de los cuales 887 eran graves, 1.965 graves-moderados, 41 leves y 88 de gravedad no documentada.

Este trabajo recopila 24 trabajos prospectivos o retrospectivos, publicados desde 1970 hasta 2009, requiriéndose de los mismos que estudiaran, al menos, 10 pacientes de cualquier gravedad y a los que se les hubiese efectuado un seguimiento de la presencia y

el título de los inhibidores que permitiese clasificarlos como de alto o bajo título o si eran permanentes o transitorios.

El estudio de la población total detectó la presencia de inhibidores de cualquier tipo en 420 pacientes, por lo que su incidencia fue del 20,05%.

Cuando analiza la aparición de inhibidores en la población total tratada con pdCFVIII *versus* rCFVIII se observa que la incidencia de inhibidores en los pacientes tratados con pdCFVIII fue del 14,3%, y en los tratados con rCFVIII fue del 27,4% ($p < 0,001$). Si sólo incluimos los estudios prospectivos, la incidencia fue del 9,1% para los tratados con pdCFVIII y del 23,7% para los tratados con rCFVIII ($p < 0,001$).

Cuando analizamos por grupos –pacientes graves, pacientes graves y moderados, altos respondedores, inhibidores no transitorios–, se sigue observando mayor incidencia en los pacientes tratados con los concentrados de rCFVIII, pero la significación estadística disminuye o incluso desaparece, según los casos (Tabla 2).

Iorio estudia la influencia de otras variables distintas de la fuente del FVIII (la frecuencia de la determinación de los inhibidores, la duración del seguimiento, o la fecha de realización del estudio) mediante estudios de metarregresión y análisis de varianza, que demostraron una mayor presencia de inhibidores en los estudios retrospectivos y, dentro de estos, en aquellos estudios realizados más recientemente, así como en aquellos en los que la detección de inhibidores se efectuaba más frecuentemente; también demostró que la incidencia variaba según fuese la duración del estudio. Este análisis multivariante demostró la in-

Tabla 2. Metaanálisis de incidencia del desarrollo de inhibidor en PUP: pdCFVIII vs. rCFVIII (A. Iorio et al.) * Estadísticamente significativo; ** No significativo

Análisis principal			
	FVIII plasmático	FVIII recombinante	Estadístico P (pdCFVIII vs. rCFVIII)
	Incidencia (IC 95%)	Incidencia (IC 95%)	(Cohran Q)
Todos los estudios	14,3 (10,4-19,4)	27,4 (23,6-31,5)	< 0,001*
Análisis por grupos			
Estudios prospectivos			
Todos los pacientes	9,1 (5,6-14,4)	23,7 (18,5-29,7)	< 0,001*
Sólo graves y altos respondedores	6,0 (1,1-27,7)	19,4 (9,0-36,9)	0,195**
Altos respondedores			
Todos los pacientes	9,3 (6,2-13,7)	17,4 (14,2-21,2)	0,004*
Sólo graves	9,0 (4,0-19,2)	18,2 (13,9-23,5)	0,009*
Inhibidores no transitorios			
Todos los pacientes	11,8 (6,9-19,6)	19,8 (15,3-25,3)	0,076**
Sólo graves	16,3 (0,8-30,1)	25,8 (13,5-43,7)	0,317**

fluencia de estas nuevas variables restando importancia a la significancia estadística que encontrábamos cuando sólo utilizábamos la variable del tipo de factor utilizado en el tratamiento de estos pacientes. En este estudio no fue posible estudiar la influencia de la intensidad del tratamiento, la cirugía o el cambio de producto sobre la aparición de inhibidores.

Este estudio demuestra que, aunque los pacientes tratados con rCFVIII se asocian con una mayor incidencia de aparición de los inhibidores, cuando se analizan todas las variables en conjunto, este hecho pierde potencia estadística, o incluso desaparece, al analizar únicamente los pacientes inhibidores no transitorios. También señala que la pureza del factor plasmático no afecta significativamente a la incidencia de la aparición de los inhibidores.

Finalmente, los autores analizan únicamente los datos pertenecientes a estudios con cohortes paralelas de pdCFVIII y rCFVIII. Este análisis recoge un total de 1.259 pacientes y muestra un riesgo relativo de aparición de inhibidor significativo al utilizar rCFVIII respecto al pdCFVIII. Esto ocurre tanto en inhibidores de alto título [riesgo relativo: 1,7 (1,3-2,7; $p < 001$)] como en inhibidores de bajo título [riesgo relativo: 2,0 (1,5-2,6; $p < 0,001$)].

Este estudio es importante por el elevado número de PUP que incluye, pero también porque es el primero que demuestra, con significación estadística, que las variables frecuencia del testado, fecha reciente de realización del estudio y duración del seguimiento influyen en la incidencia de aparición de inhibidores con independencia de la fuente del FVIII utilizado en el tratamiento de los PUP.

Sin embargo, hay que destacar que este estudio tiene fallos, ya que incluye trabajos con diferentes metodologías, con diferencias de la frecuencia del *screening* de inhibidores y la no consideración de otros factores de riesgo conocidos, endógenos y medioambientales, que conocemos influyen en el desarrollo de los inhibidores.

Inmunogenicidad de los pdCFVIII con factor von Willebrand

La mayor tendencia (sin evidencia estadística) para la aparición de inhibidores en los PUP tratados con rCFVIII que se recoge en la mayoría de los trabajos publicados recientemente vendría apoyada por algunos trabajos experimentales. En este sentido, datos *in vitro* sugieren que el factor von Willebrand existente en altas proporciones en algunos concentrados plasmáticos de factor VIII, al unirse al dominio C2 de la molécula del FVIII, reduce la inmunogenicidad del mismo al dificultar la endocitosis del FVIII por las células presentadoras de antígeno del sistema inmu-

ne y que los péptidos derivados de su digestión puedan ser presentados a los linfocitos CD4, impidiendo finalmente la formación de anticuerpos⁴¹. Otra explicación sobre la posible menor inmunogenicidad de los concentrados de origen plasmático se basa en que la actividad inmunomoduladora de las citocinas presentes en estos concentrados podrían disminuir el riesgo de aparición de inhibidores. Estas acciones moduladoras de los CFVIII sobre el sistema inmune se han demostrado en experimentación animal comprobando el efecto protector del FVW para impedir el desarrollo de inhibidores⁴¹⁻⁴³.

Aunque algunos trabajos experimentales y clínicos sugieren la hipótesis de que los factores pdCFVIII son menos inmunógenos, no hay una inequívoca evidencia al respecto. Por todo ello, sugerimos la conveniencia de llevar a cabo estudios prospectivos controlados que permitan conocer si la inmunogenicidad de los CFVIII plasmáticos o recombinantes es diferente y, por tanto, si el riesgo de aparición de inhibidores puede variar según sea el tipo de FVIII elegido para el tratamiento de los PUP.

En relación con el TIT de rescate, Astermark, en un documento de consenso entre expertos, señala que los concentrados de FVIII con alto contenido de FVW deben utilizarse en tratamiento de rescate cuando la TIT con productos purificados sin contenido de factor von Willebrand ha fallado (grado B; evidencia III)⁴⁴.

Estudio SIPPET (Survey of Inhibitors in Plasma-Product Exposed Toddlers)

Por todo lo anteriormente expuesto, se deduce que la controversia sobre la inmunogenicidad de los CFVIII, con o sin factor von Willebrand, se mantiene abierta. Por ello, la comunidad internacional ha desarrollado un ensayo clínico prospectivo que pretende aportar luz sobre estas discrepancias. El estudio *SIPPET* es un ensayo clínico internacional, multicéntrico, prospectivo, controlado, aleatorizado y abierto⁴⁵. Se trata de un estudio independiente, coordinado por el Centro de Hemofilia y Trombosis Angelo Bianchi Bonomi y patrocinado por la Fundación Angelo Bianchi Bonomi de Milán. Participan en el mismo un total de 80 hospitales de 24 países de Europa, Asia, América y África, con el objetivo de incluir un total de 250-300 pacientes. En España se han registrado para participar en este estudio tres centros, habiéndose incluido hasta la fecha un paciente en nuestra Unidad de Hemostasia y Trombosis del Hospital Universitario La Fe de Valencia.

La finalidad de este estudio es determinar la frecuencia de aparición de inhibidores en pacientes hemofílicos graves PUP o mínimamente tratados con hemoderivados (MBCCTP, *minimally blood component-*

treated patients), tras ser expuestos a CFVIII de origen recombinante o plasmático con contenido de factor von Willebrand. Por tanto, se pretende comparar la inmunogenicidad de dos clases de productos basándose en la hipótesis aún no probada de que los rCFVIII son más inmunogénicos que los pdCFVIII ricos en FVW/FVIII.

El objetivo principal del estudio es evaluar la inmunogenicidad de los pdCFVIII ricos en FVW/FVIII *versus* rCFVIII, determinando la incidencia acumulada de aparición de inhibidores en los primeros 50 DE en PUP y MBCTP. El desarrollo de inhibidores se define como la aparición de al menos dos títulos positivos ($\geq 0,6$ unidades Bethesda). Como objetivos secundarios se evaluará el pico máximo del título de inhibidores, la modalidad de aparición de los inhibidores (número de días de exposición, título al inicio...), los factores de riesgo clínicos potencialmente asociados a la aparición de inhibidores (edad del primer tratamiento, gravedad de los episodios hemorrágicos, cirugía, tratamiento intensivo, modalidad de tratamiento, relación entre los tratamientos y las vacunaciones, concurrencia de infecciones virales y/o medicaciones, modalidad de nacimiento, lactancia materna, tipo de leche) y finalmente los factores analíticos potencialmente asociados al desarrollo de inhibidores (alteraciones genéticas, nivel de FVIII antigénico, fenotipo HLA, IL-10, genotipo TNF α). Se realizará un análisis uni y multivariante.

Se incluirán en este estudio pacientes con hemofilia A grave (actividad del FVIII:C $< 1\%$), menores de 6 años de edad, de cualquier raza y que no hayan recibido previamente ningún hemoderivado (PUP) o que hayan recibido menos de 5 DE a hemoderivados (MBCTP), principalmente sangre completa, crioprecipitados, hematíes o plaquetas. Los pacientes deberán presentar un test negativo para inhibidores en la visita de selección, y los padres deberán otorgar su consentimiento informado por escrito.

Los pacientes que se incluyan en cada centro serán aleatorizados para ser tratados exclusivamente con un concentrado de FVIII (rCFVIII o pdCFVIII con factor von Willebrand) y se seguirán hasta que aparezca un inhibidor, hasta que alcancen 50 días de exposición o los 3 años de participación en el estudio (lo que suceda primero).

Los concentrados de factor que se emplearán en el estudio serán recombinantes de segunda o tercera generación (con molécula intacta o con depleción del dominio B) y plasmáticos FVW/FVIII con al menos doble inactivación viral y con doble inactivación viral. Los productos recombinantes disponibles a nivel mundial para el estudio serán los siguientes: Advate (Baxter), Kogenate SF (Bayer), Refacto-AF (Pfizer), Recombinate (Baxter). Los de origen plasmático serán: Fanhdi (Grifols SP), Emoclot (Kedrion), Facta-

ne (LFB), Alphanate (Grifols US). Cada país dispondrá exclusivamente de un recombinante y un plasmático, siendo en nuestro país Refacto-AF y Fanhdi los tratamientos asignados para la aleatorización de los pacientes. La modalidad de tratamiento (a demanda o profilaxis) así como las dosis de factor a emplear serán a criterio del investigador, según su práctica clínica habitual.

Derivados plasmáticos *versus* productos recombinantes: ¿tema resuelto?

Volviendo al título de la ponencia, podemos afirmar que las controversias relacionadas con la elección de factores plasmáticos o recombinantes sólo están parcialmente resueltas, ya que:

1. Ambos productos presentan un rendimiento, una farmacocinética, una vida media y una eficacia clínica similares.

2. Desde la utilización de procedimientos de inactivación en el fraccionamiento industrial del factor VIII, y según criterios de medicina basada en la evidencia, no se ha demostrado la transmisión viral o priónica a través de los CFVIII plasmáticos o recombinantes. Otro enfoque diferente para la elección del tipo de tratamiento podría estar basado en la eliminación del riesgo para transmitir enfermedades víricas o priónicas. En este sentido, hay que señalar que los rCFVIII de última generación sitúan este riesgo a niveles cercanos a "riesgo cero". Por otra parte, estos productos confieren mayor seguridad en cuanto a la hipotética posibilidad de transmisión de virus desconocidos sin envoltura lipídica.

3. En relación con la inmunogenicidad, la mayoría de los trabajos publicados, cuando aplican análisis estadísticos univariados, revelan una mayor incidencia de inhibidores en los pacientes tratados con rCFVIII, aunque cuando aplicamos análisis multivariado esta significación estadística desaparece. Dado que la generación de un inhibidor anti-FVIII en un paciente hemofílico está regulada por un complejo proceso multifactorial en el que intervienen múltiples factores endógenos o medioambientales, la comunidad internacional deberá colaborar en la realización de ensayos clínicos prospectivos aleatorizados que nos permitan conocer si existen o no diferencias entre la inmunogenicidad de los rCFVIII *versus* pdCFVIII.

Conclusiones

En este trabajo hemos revisado los aspectos relacionados con la eficacia, seguridad e inmunogenicidad de los CFVIII plasmáticos y recombinantes utilizados en el tratamiento de los pacientes hemofílicos, desta-

cándose que ambos CFVIII son dos alternativas terapéuticas óptimas.

Algunas de las controversias relacionadas con ambos tipos de productos siguen sin resolverse, por lo que para su esclarecimiento deberemos colaborar en la realización de estudios internacionales prospectivos aleatorizados, como el estudio *SIPPET*.

Por último, es importante destacar que el facultativo responsable de la asistencia del paciente hemofílico dispone en la actualidad de excelentes CFVIII de origen plasmático o recombinante para tratar al paciente hemofílico, debiendo elegir la opción terapéutica más adecuada en función de la situación clínica y de las características de cada paciente.

Bibliografía

- Gitschier J, Wood W, Goralka T et al. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* 1984; 312:326-30.
- Choo KH, Gould KG, Rees DJ et al. Molecular cloning of the gene for human antihemophilic factor IX. *Nature* 1982; 299: 178-80.
- Kreuz W, Gill JC, Rothschild D et al. Safety and efficacy of full-length sucrose-formulated recombinant FVIII in the treatment of previously untreated or minimally treated young children with severe hemophilia A: results of an international clinical investigation with KOGENATE FS/KOGENATE Bayer. *Thromb and Haemost* 2005;93: 457-67.
- Ewenstein BM, Cillins P, Tarantino MD et al. Clinical evaluation of an advanced category antihemophilic factor prepared using a plasma/albumin-free method: pharmacokinetics, efficacy, and safety in previously treated patients with hemophilia A. *Haemophilia* 2004 ;10:428-37.
- Recht M., Nemes L., Matysiak M et al. Clinical evaluation of moroctocog alfa (AF-CC), a new generation of B-domain deleted recombinant factor VIII (BDDrFVIII) for treatment of hemophilia A: demonstration of safety, efficacy, and pharmacokinetic equivalence to full-length recombinant factor VIII. *Haemophilia* 2009; 15: 869-880.
- Mannucci PM. Treatment of hemophilia: recombinant factors only? No. *J Thromb Haemost* 2003;1: 216-7.
- Giangrande PLF. Treatment of hemophilia: recombinant factors only? Yes. *J Thromb Haemost* 2003;1: 214-15.
- Ludlam CA, Powderly WG, Bozzette S et al. Clinical perspectives of emerging pathogens in bleeding disorders. *Lancet* 2006;367:252-61.
- Pipe SW, Tupper ML, Ironside JW et al. Implications of emerging pathogens in the management of hemophilia. *Haemophilia* 2006; 12(Suppl 1):1-28.
- Fryer JF, Kapoor A, Minor PD et al. Novel parvovirus and related variant in human plasma. *Emerg Infect Dis* 2006; 12:151-54.
- Peden A, McCardle L, Head M.W et al. Variant CJD infection in the spleen of a neurologically asymptomatic UK adult patient with hemophilia. *Haemophilia* 2010; 16: 296-304.
- Farrugia A, Ironside JW and Giangrande P. Variant Creutzfeldt-Jakob disease transmission by plasma products: assessing and communicating risk in and era of scientific uncertainty. *Vox Sang* 2005; 89: 186-92.
- Wight J, Paisley S. The epidemiology of inhibitors in hemophilia A. A systematic review. *Haemophilia* 2003; 9:418-435.
- Bray GL, Gomperts ED, Courter S et al. A multicenter study of recombinant factor VIII (recombinate): safety, efficacy and inhibitor risk in previously untreated individuals with hemophilia A. The recombinant study group. *Blood* 1994; 83: 2428-2435.
- Lusher JM, Spira J, Rodriguez C. A four year update of safety and efficacy of an albumin- free formulated B-domain deleted factor VIII (BDDrFVIII, rVIIIISQ) in previously untreated severe hemophilia A patients. *Thromb. Haemost* 1999; 82: 1493.
- Astermark J, Lacroix-Desmaces S, Reding MT. Inhibitor development. *Haemophilia* 2008; 14 (suppl.3): 36-42.
- Oldenburg J, Paulova A. Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. *Haemophilia* 2006; 12 (suppl.6): 15-22.
- Palmer E. Negative selection-clearing out the bad apples from the Tcell-repertoire. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:383-91.
- Siggs OM, Makaroff LE, Liston A. The why and how the thymocyte negative selection. *Curr Opin Immunol* 2006; 18: 175-83.
- Astermark J, Oldenburg J, Escobar M, White GC, 2nd, Bernthorpe E. The Malmo International Brother Study (MIBS). Genetic defects and inhibitor development in siblings with severe hemophilia A. *Haematologica* 2005;90(7):924-931.
- European Study Group of Factor VIII Antibody. Development of factor VIII antibody in hemophilic monozygotic twins. *Scand J Haematol* 1979;23 (1):64-68.
- Aledort LM, Dimichele DM. Inhibitors occur more frequently in African-American and Latino hemophiliacs. *Haemophilia* 1998;4:68.
- Astermark J, Oldenburg J, Carlson J, et al. Polymorphisms in the TNFA gene and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood* 2006;108 (12):3739-3745.
- Astermark J, Oldenburg J, Pavlova A et al. Polymorphisms in the IL10 but not in the IL1beta and IL4 genes are associated with inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood* 2006;107(8):3167-3172.
- Astermark J, Wang X, Oldenburg J et al. Polymorphisms in the CTLA-4 gene and inhibitor development in patients with severe hemophilia A. *J Thromb Haemost* 2007;5(2):263-265.
- Morado M, Villar A, Jiménez-Yuste V et al. Prophylactic treatment effects on inhibitor risk: experience in one centre. *Haemophilia* 2005;11(2):79-83.
- Santagostino E, Mancuso ME, Rocino A, et al. Environmental risk factors for inhibitor development in children with hemophilia A: a case-control study. *Br J Haematol* 2005;130(3):422-427.
- Yee TT, Beeton K, Griffioen A et al. Experience of prophylaxis treatment in children with severe hemophilia. *Haemophilia* 2002; 8(2):76-82.
- Gouw SC, van der Bom JG, Auerswald G et al. Recombinant versus plasma-derived factor VIII products and the development of inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A: the CANAL cohort study. *Blood* 2007;109: 4693-4697.
- Guerois C, Laurian Y, Rothschild C et al. Incidence of factor VIII inhibitor development in severe hemophilia A patients treated only with one brand of highly purified plasma-derived concentrate. *Thromb Haemost* 1995;73:215-18.
- Peerlinck K, Rosendaal FR, Vermynen J. Incidence of inhibitor development in a group of young hemophilia A patients treated exclusively with lyophilized cryoprecipitate. *Blood* 1993; 81:3332-5.
- Wight J, Paisley S. The epidemiology of inhibitors in hemophilia A: a systematic review. *Haemophilia* 2003;9:418-35.
- Goudemand J, Rothschild C, Demiguel V et al. Influence of the type of factor VIII concentrate on the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A. *Blood* 2006;107(1):46-51.
- Chalmers EA, Brown SA, Keeling D et al. Early factor VIII exposure and subsequent inhibitor development in children

- with severe haemophilia A. *Haemophilia* 2007; 13: 149-155.
35. Gouw SC, van der Bom JG, van den Berg HM. Treatment-related risk factors of inhibitor development in previously untreated patients with hemophilia A: the CANAL cohort study. *Blood* 2007; 109: 4648-54.
36. Bretscher P, Cohn M. A theory of self-nonsel discrimination. *Science* 1970; 169: 1042-49.
37. Matzinger P. Tolerance, danger and the extended family. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 991-1045.
38. Van den Berg HM, Chalmers EA. Clinical prediction models for inhibitor development in severe haemophilia A. *J Thromb Haemost* 2009; 7 (suppl. 1): 98-102.
39. Kurnick K, Bidlingmaier C, Engl W et al. New early prophylaxis regimen that avoids immunological danger signals can reduce FVIII inhibitor development. *Haemophilia* 2010; 16:256-262.
40. Iorio A, Halimeh S, Holzhauser S et al. Rate of inhibitor development in previously-untreated hemophilia A patients treated with plasma-derived or recombinant factor VIII concentrates. A systematic review. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 1256-1265.
41. Dasgupta S, Repesse Y, Bayry J et al. VWF protects FVIII from endocytosis by dendritic cells and subsequent presentation to immune effectors. *Blood* 2007; 109:610-2.
42. Waters B, Qadura M, Burnett E et al. Anti CD3 prevents factor VIII inhibitor development in hemophilia A mice by a regulatory CD4+CD25+ dependent mechanism and by shifting cytokine production to favour a Th1 response. *Blood* 2009; 113: 193-203.
43. Qadura M, Waters B, Burnett E et al. Recombinant and plasma-derived factor VIII products induce distinct splenic cytokine microenvironments in hemophilia A mice. *Blood* 2009; 114: 871-80.
44. Astermark J, Morado M, Rocino A et al. Current European practice in immune tolerance induction therapy in patients with haemophilia and inhibitors. *Haemophilia* 2006;12:363-371.
45. Mannucci P, Gringeri A, Peyvany F et al. Factor VIII products and inhibitor development: the SIPPET study (survey of inhibitors in plasma-product exposed toddlers). *Haemophilia* 2009; 13: 65-8.

Talasemias: clasificación y diagnóstico

A. VILLEGAS

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

Introducción

Las talasemias constituyen un grupo de anemias hemolíticas hereditarias que se caracterizan por una disminución de síntesis de una o más cadenas de globina. Como consecuencia, se va a producir una anemia microcítica e hipocroma, que es la característica clínica fundamental de los síndromes talasémicos¹.

En el momento actual existen más de 250 millones de individuos en el mundo con esta enfermedad. De ellos, 15 millones corresponden a la forma severa homocigota de β -talasemia. Las formas menos severas representan el defecto genético más frecuente en el mundo, mientras que las formas graves, aunque menos frecuentes, causan significativa morbilidad y mortalidad en los individuos que la padecen.

La β -talasemia es frecuente en poblaciones de origen mediterráneo, norte de África, Oriente Medio o India; mientras que la α -talasemia se concentra en el subcontinente asiático, China, Malasia, Indochina, Mediterráneo y en África.

Las talasemias se producen por mutaciones del ADN que afectan a la síntesis de la hemoglobina, la metaloproteína encargada del transporte de oxígeno a los tejidos.

Hemoglobinas humanas

En el adulto, en condiciones normales, la producción de cadenas de globina α y β se realiza de forma equilibrada, permitiendo la formación de tetrámeros α_2 y β_2 que constituyen la Hb A. Además, las células rojas contienen otras dos hemoglobinas en menor cantidad, Hb A₂ ($\alpha_2 \delta_2$), que representa el 2-3% del total de la hemoglobina, y la Hb F ($\alpha_2 \gamma_2$), que supone alrededor del 1%. La Hb F es la hemoglobina que predomina durante los 2 últimos trimestres de la gestación. Se produce predominantemente durante el estadio hepático de la eritropoyesis, y su transición a Hb A coincide con la formación eritropoyética en la médula ósea. El recién nacido presenta alrededor del 80% de Hb F y un 20% de Hb A. A partir del nacimiento existe una inversión en la síntesis de cadenas de globina, se anula la síntesis de cadena γ y se incrementa la de las células β , de tal manera que antes de un año toda la Hb es A (95%).

La primera hemoglobina embrionaria se produce en el "saco de Yolk" y corresponde a la Hb Gower 1

($\zeta_2 \epsilon_2$). Posteriormente se formarán otras dos hemoglobinas embrionarias Gower 2 ($\alpha_2 \epsilon_2$) y Portland ($\zeta_2 \gamma_2$).

Los genes que codifican estas cadenas de globina se encuentran situados en dos genes diferentes. La llamada familia de genes α se localiza en el brazo corto del cromosoma 16 y la forman 4 genes (2α , ζ_2 y θ_1), ordenados en una zona próxima al telómero, y 3 pseudogenes. Éstos son genes inactivos que no codifican ninguna proteína.

La familia de genes β se sitúa en el cromosoma 11 y la forman el gen β y el δ , muy próximos entre sí, 2 genes γ y el ϵ y un pseudogén $\psi\beta$ (Figura 1).

Clasificación de las talasemias

Las talasemias pueden clasificarse según el defecto genético que las origina, o según sus manifestaciones clínicas.

Desde el punto de vista genético, las talasemias se clasifican según la cadena de globina que está disminuida o ausente. Por tanto, existen α , β , δ , $\delta\beta$, $\gamma\delta\beta$ y $\epsilon\gamma\delta\beta$ -talasemias. También son frecuentes las asociaciones de dos de ellas (α y β -talasemias, $\delta\beta$ y β -talasemias), y es común la asociación entre talasemia y hemoglobinopatías estructurales (Hb S, Hb C, Hb E, etc.) (Tabla 1).

Las α , β y δ -talasemias, a su vez, se subdividen en α^0 , β^0 y δ^0 , si no existe síntesis de la cadena afecta, y α^+ , β^+ y δ^+ , si existe síntesis pero en cantidades reducidas^{1,2}.

Al estar formada la Hb A por un tetrámero con 2 cadenas α y otras 2 cadenas β , las talasemias más frecuentes en el mundo son la α y la β ².

De acuerdo con las manifestaciones clínicas, hay cuatro tipos de α y β -talasemia: a) portador silente o persona que presenta la mutación, pero no tiene ninguna anomalía hematológica; b) rasgo talasémico en el que puede observarse moderada anemia microcítica e hipocroma; c) talasemia mayor u homocigoto, con severa anemia transfusión-dependiente y, finalmente, c) un cuadro clínico muy heterogéneo con mayor sintomatología clínica que el rasgo talasémico, pero en la mayoría de los casos no transfusión-dependiente, que constituye la talasemia intermedia (Tabla 2)^{3,4}.

En todas estas mutaciones se va a producir microcitos e hipocromia. La hipocromia es una característica propia de estas enfermedades, dado que la síntesis de cadenas α (α tal) o cadena β (β tal) está disminuida, y el contenido es inferior a 30 pg. Lo mismo su-

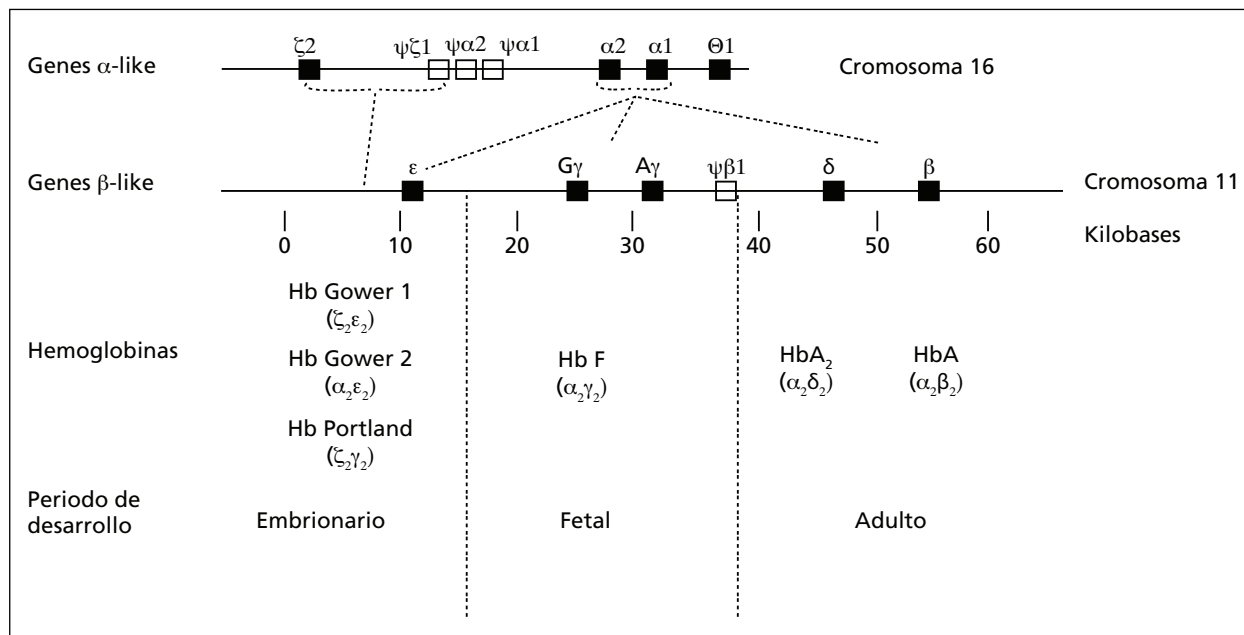


Figura 1. Genes de Hb y tipos de hemoglobina.

α-talasemia	γδβ-talasemia
β-talasemia	εγδβ-talasemia
δβ-talasemia	
δ-talasemia	
Hemoglobinopatías estructurales con fenotipo talasémico	

cede con el volumen corpuscular medio de hematíes, inferior a 80-75 fL².

La constitución genética de un individuo, es decir, si es hetero u homocigoto, así como la naturaleza del defecto genético, van a determinar la deficiencia en la síntesis de la hemoglobina.

En la etiopatogenia de la enfermedad juega un papel fundamental en el grado de imbalance de las cadenas α/β de la globina. El exceso de cadenas no apareadas formará agregados e inclusiones intracelulares, que ocasionarán la destrucción de los eritroblastos en la médula ósea –eritropoyesis ineficaz– o en el territorio circulante –anemias hemolíticas–. Estos dos componentes, eritropoyesis ineficaz y hemólisis, son los dos pilares sobre los que se asienta la fisiopatogenia de las talasemias⁵.

Talasemia mayor
Talasemia intermedia
Talasemia menor. Rasgo talasémico
Talasemia silente

α-talasemia

La frecuencia de α-talasemia en España, diagnosticada mediante análisis directo del gen con técnicas de biología molecular, es del 4,79%. La mayoría corresponde a portador silente y rasgo talasémico.

Las α-talasemias están causadas por la deficiencia o ausencia de síntesis de cadenas α. Como sucede en las β-talasemias, existe una gran heterogeneidad de lesiones moleculares que pueden originar el cuadro de una α-talasemia, si bien las formas más comunes se producen por delección genética. La pérdida de un gen α produce la α⁺-talasemia heterocigótica, en la cual existe un defecto parcial de síntesis de cadenas α. La pérdida de dos genes α en el mismo cromosoma o α⁰-talasemia heterocigótica se manifiesta por una abolición total de la síntesis de cadenas α. La pérdida de un gen α en cada cromosoma (α⁺-talasemia homocigótica) produce un cuadro clínico similar al anterior, denominado rasgo talasémico¹.

La α⁺-talasemia generalmente resulta de delecciones de 3,7 kb a 4,2 kb de ADN, que suprimen uno de los genes α (–α).

La α⁰-talasemia se produce por unas delecciones más amplias, que abarcan desde 5,2 kb a más de 100 kb, que suprimen los dos genes α y se extienden incluso a toda la familia de genes α. La pérdida de tres genes α (– – / – α) caracteriza a la enfermedad de la HbH, y la pérdida de cuatro genes α o α⁰-talasemia homocigótica (– – / – –) define la hidropesía fetal por Hb Bart. La enfermedad de la HbH se debe a la doble heterocigosis de α⁰/α⁺-talasemia (Tabla 3). En ocasiones, se produce por la interacción de la α⁰-

Tabla 3. Tipos de α -talasemia

Tipo de lesión	Genotipo	Fenotipo
Delección		
Talasemia α^+ -heterocigota	$-\alpha / \alpha\alpha$	Portador silente
Talasemia α^0 -heterocigota	$-- / \alpha\alpha$	Rasgo talasémico
Talasemia α^+ -homocigoto	$-\alpha / -\alpha$	Rasgo talasémico
Enfermedad de la HbH	$(-\alpha / --)$	Enfermedad de la HbH
Enfermedad fetal por Hb Bart (α^0 -talasemia homocigoto)	$(-- / --)$	Hidropesía fetal por Hb Bart
No delección		
Mutaciones que afectan a: Procesamiento del ARNm y la transcripción	$\alpha\alpha^I / \alpha\alpha, \alpha\alpha^I / \alpha\alpha^I$ $-\alpha / \alpha^I\alpha, -- / \alpha\alpha^I$	Portador silente, rasgo talasémico Enfermedad de la HbH
Asociación de formas de delección y no delección		

talasemia con la Hb Constant Spring, o con α -talasemia no delección.

β -talasemia

En España la frecuencia de β -talasemia (del 0,1 al 2%) es muy inferior a la de otros países mediterráneos. La distribución no es homogénea, con frecuencias mayores en la comunidad gitana o en la isla de Menorca (> 2%).

Las β -talasemias también están constituidas por cuatro cuadros clínicos de severidad creciente: portador silente, rasgo talasémico, talasemia intermedia y talasemia mayor.

Desde el punto de vista molecular, son de una extraordinaria heterogeneidad genética. El portador silente es completamente normal, con valores hemocromáticos dentro de la normalidad.

El rasgo β -talasémico o de talasemia menor o heterocigota suele ser asintomático y presentar una anemia moderada, cuyo diagnóstico diferencial debe establecerse con la anemia ferropénica.

La talasemia intermedia produce un cuadro con una amplia variabilidad clínica, de menor gravedad que la talasemia mayor y con menores requerimientos transfusionales. A nivel molecular, resulta de la combinación de diferentes mutaciones genéticas; de ahí su amplio espectro fenotípico.

Las formas severas de β -talasemia o β -talasemia mayor constituyen uno de los problemas más importantes de salud pública en el mundo por su morbimortalidad. Fue descrita por Cooley en el año 1925 y se manifiesta a partir de los primeros meses de vida, con severa anemia, hepatoesplenomegalia, retardo del crecimiento y deformidades óseas.

Sin tratamiento, los enfermos fallecen en los primeros años de vida, por complicaciones derivadas de la anemia y de las infecciones interrecurrentes.

δ -talasemias

Son aquellas talasemias que se relacionan con el gen δ^6 .

Desde el punto de vista clínico, son totalmente silentes y no se asocian con ningún cambio hematológico. Solamente pueden tener interés cuando se heredan conjuntamente en "trans" con β -talasemias heterocigotas, porque pueden dificultar el diagnóstico de éstas, dado que no se produce elevación de la Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$).

También pueden clasificarse como δ^0 o δ^+ -talasemias. Han sido descritas en el Mediterráneo, Grecia, Chipre, Italia o menos frecuentemente en otras poblaciones como China, Japón o Bélgica.

En el estado heterocigoto tienen una disminución de Hb A₂, y en el estado homocigoto la Hb A₂ es de cero.

Su importancia radica en que pueden enmascarar el diagnóstico de una β -talasemia cuando se heredan conjuntamente y dificultar el adecuado consejo genético.

$\delta\beta$ -talasemias

Son menos comunes que las β -talasemias. Son también muy heterogéneas a nivel molecular, lo que da lugar a una gran variabilidad de fenotipos clínicos.

Resultan de la delección de los genes β y δ , pero sin afectar a los genes γ . Se ha descrito esta mutación en India, Japón, España ($\delta\beta$ -talasemia "Spanish"), Tailandia, Sicilia, Turquía, etc. La variante española es la más extensa de estas mutaciones, abarcando más de 100 kb (114 kb).

El estado homocigoto se caracteriza por un cuadro clínico de talasemia intermedia con moderada esplenomegalia, aunque puede agravarse en situaciones de estrés, como infecciones o en el embarazo.

El fenotipo heterocigoto es similar al rasgo β -talasémico.

Dentro de este apartado también se estudian las talasemias causadas por Hb Lepore resultante de un entrecruzamiento homólogo de los genes δ y β , que da lugar a un cuadro talasémico similar a las $\delta\beta$ -talasemias por defecto de síntesis de cadena β . Tiene la particularidad de que en la electroforesis se observa Hb Lepore².

$\gamma\delta\beta$ -talasemias

Son un tipo de talasemias poco frecuentes, con una delección extensa de la región donde se encuentran localizados los genes de la familia β , y que suprime los genes β , δ , γA y γG . Como consecuencia de esta larga mutación, no se puede sintetizar Hb F. Los homocigotos de esta lesión no son compatibles con la vida, y en los heterocigotos se observa en el recién nacido una anemia hemolítica severa con hiperbilirrubinemia. Si sobreviven este periodo neonatal, los pacientes pueden tener un desarrollo y crecimiento normales, y en la infancia y edad adulta presentar un cuadro clínico similar al de la β -talasemia heterocigoto con moderada anemia con Hb F y Hb A₂ normales. El desbalance de la síntesis de cadenas de globina α /no α globina es de alrededor de 2.

$\epsilon\gamma\delta\beta$ -talasemias

Son también talasemias raras, con una delección extensa del *cluster* de genes β , en el que se delecionan los genes ϵ , γ , δ y β .

El estado homocigoto no es compatible con la vida².

En el estado heterocigoto presentan al nacer anemia hemolítica transitoria con hematíes hipocromos. Muchos de estos niños requieren transfusiones en el periodo neonatal, y varios de ellos fallecen.

En el adulto el cuadro clínico es similar al rasgo talasémico β , con cifra normal de Hb A₂.

Se desconoce la razón por la cual este cuadro es tan severo en el periodo neonatal.

α -talasemias (mutación HS 40) y β -talasemia (mutación LCR)

Las mutaciones que delecionan las regiones críticas reguladoras HS 40 del *cluster* α y LCR del *cluster* β , situadas a 40 y 60 kb respectivamente, 5' de los genes α y β , producen una desregulación de los genes α y β y ocasionan α^0 y β^0 -talasemias^{5,7}.

Es posible que existan otras regiones regulatorias que controlen la expresión de los genes de globina, que pueden estar situadas en los cromosomas 16 o 11, o bien incluso en otros cromosomas diferentes.

El descubrimiento de α -talasemia ligada a retraso mental, debido a una lesión en el cromosoma X, sugiere que otros lugares reguladores pueden estar involucrados en la génesis de algunos casos no totalmente esclarecidos de síndromes talasémicos.

Diagnóstico de los síndromes talasémicos

El diagnóstico de la talasemia en la mayoría de los casos es sencillo y fácil de realizar.

En el hemograma se pone de manifiesto una anemia microcítica (VCM < 80 fL) e hipocroma (HCM < 27 pg). El índice de distribución de los hematíes (ADE o RDW) también tiene un gran valor en el diagnóstico de la talasemia. Es normal en el rasgo α y β -talasemia, mientras que está aumentado en la anemia ferropénica, sobre todo cuando está en tratamiento con hierro, en la enfermedad de la Hb H y en las talasemias homocigotas.

α -talasemia

La hidropesía fetal por Hb Bart corresponde al estado homocigoto de α^0 -talasemia. Los niños afectados no producen cadena α (– – / – –) y, por lo tanto, no pueden formar ni Hb F, ni Hb A.

Los niños nacen a las 28-40 semanas con palidez, gran hepatoesplenomegalia y edemas generalizados y fallecen a las pocas horas del nacimiento.

Presentan anemia severa de 6-8 g/dL de Hb, y en la sangre periférica se observa una gran anisocitosis microcítica e hipocroma, con numerosos eritroblastos.

La electroforesis de Hb demuestra un 80% de Hb Bart ($\gamma 4$) y alrededor del 20% de Hb Portland ($\zeta_2 \gamma_2$). Puede observarse Hb H.

En la madre este síndrome se asocia con toxemia durante el embarazo y dificultades obstétricas, por la presencia de una placenta aumentada de tamaño y frágil.

Ambos padres son portadores del rasgo talasémico α^0 .

No ha sido descrito en nuestro país y sí es frecuente en poblaciones de Asia, China, Tailandia y Filipinas.

Enfermedad de la Hb H

La Hb H es un tetrámero formado por cuatro cadenas β ($\beta 4$). Este tipo de α -talasemia se debe a la pérdida de 3 genes α , aunque también puede produ-

cirse por asociaciones de α^0 -talasemia con α -talasemia no deleción o con la Hb denominada *Constant Spring* (cadena α elongada).

Los recién nacidos con enfermedad de la Hb H presentan moderada anemia microcítica e hipocroma con 15-25% de Hb Bart. Posteriormente, se produce disminución de esta Hb embrionaria y el paso hacia la Hb H.

En el adulto, los pacientes tienen un cuadro de talasemia intermedia moderada y, en ocasiones, esplenomegalia. En el hemograma se observa anemia (7-10 g de Hb) con microcitosis (VCM < 60) e hipocromia (HCM < 20), reticulocitos moderadamente elevados y ADE aumentado. No es infrecuente la presencia de una anemia hemolítica más o menos grave tras una infección, la ingestión de fármacos oxidantes o en el embarazo. Esto sucede porque los hematíes con Hb H son más sensibles al estrés oxidativo, por ej., sulfonamidas sobre todo, los hematíes más viejos y la Hb H precipita en las células y se produce su destrucción en la circulación.

En la electroforesis se observa la Hb H, que migra más rápidamente que la Hb A, y que representa el 3-30% del total de la Hb. También pueden observarse trazas de Hb Bart⁸.

Los depósitos de Hb H pueden ser vistos *in vitro* cuando se incuban los hematíes con azul de cresil brillante durante 1 hora, observándose células con aspecto de morulas por precipitados en su interior de Hb H.

Se observan en más del 80% de los eritrocitos de los pacientes con Hb H. La síntesis de cadenas de globina en los reticulocitos demuestra una ratio α /no α de 0,5.

Rasgo α -talasémico (α^0 y $-\alpha/-\alpha$ -talasemias)

El rasgo de talasemia α es muy similar al de la β . Los pacientes presentan una moderada anemia microcítica e hipocroma con VCM < 70 y HCM < 25. Los reticulocitos son normales.

La síntesis de cadenas de globina en los reticulocitos tiene una ratio α/β disminuida de alrededor de 0,7 en los casos α^0 -heterocigotos, y levemente más elevada en los dobles heterocigotos ($-\alpha/-\alpha$), de 0,74 (Figura 2). También el VCM y HCM y la Hb total son levemente inferiores en los casos α^0 .

En la sangre del cordón umbilical presentan el 5-15% de Hb Bart, que desaparece posteriormente en el niño y en el adulto.

En la electroforesis de Hb no se observa Hb H ni Hb Bart; tanto la Hb A₂ como la F son normales. La Hb F puede estar levemente aumentada en los casos α^0 . También en estos pacientes se observan ocasionales cuerpos de inclusión de Hb H; sin embargo, son raros en los homocigotos para la α^+ -talasemia^{1,8}.

Portador silente

Son los individuos que carecen de un gen α ($-\alpha/\alpha$). En el periodo neonatal pueden observarse cifras de Hb Bart del 2-3%, aunque pueden presentar también cifras normales.

Los niños y jóvenes pueden ser diagnosticados por presentar hipocromia con HCM inferior a 27 pg. Posteriormente en la vida adulta suelen ser completamente normales, tanto desde el punto de vista clínico como hematológico.

Su diagnóstico debe realizarse por técnicas de biología molecular.

Síndrome α -talasemia con retraso mental (síndrome ATR y ATRX)

Constituye una forma rara de α -talasemia en la que se observa un espectro amplio de alteraciones dismórficas junto con un cuadro clínico similar al de Hb H. Este síndrome se produce por una amplia deleción que elimina todo el *cluster* de genes α con pérdida de 1-2 megabases de ADN (ATR 16).

El síndrome más común es el ATRX, con mayor grado de retraso mental, en el que los genes α están intactos, pero son inactivos debido a un gen localizado en el brazo largo del cromosoma X (Xq 13.3, gen ATRX)⁹. La herencia está ligada al cromosoma X, y puede haber varios miembros de la familia con este síndrome. La forma clínica es de una moderada α -talasemia, con la presencia de una pequeña proporción de cuerpos de Hb H.

Enfermedad de la Hb H adquirida

Se observa en síndromes clonales mieloproliferativos y sobre todo en síndromes mielodisplásicos. El hallazgo de Hb H se produce en el curso evolutivo de la enfermedad. La anemia es más severa, con marcada anisocitosis y doble población de hematíes. Los cuer-

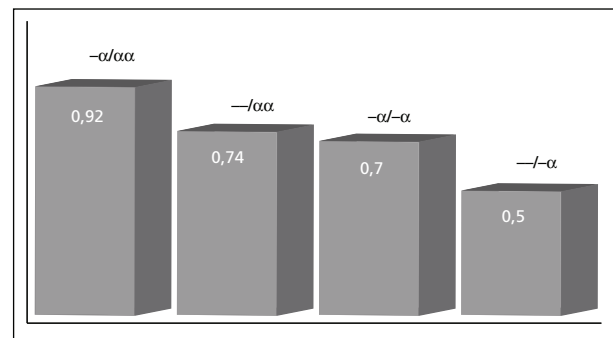


Figura 2. α -talasemia. Relación α/β .

pos de inclusión pueden observarse en más del 70% de los hematíes. La síntesis de cadenas α /no α de globina es de 0,1-0,2, y en la electroforesis puede observarse un 80% de Hb H.

El análisis de los genes es normal; sin embargo, estudios con *microarrays* demuestran que en la α -talasemia síndrome mielodisplásico, al igual que en el síndrome ATRX hereditario, se observa una mutación en el gen ATRX, lo que da lugar a una proteína mutante ATRX, que actúa como un factor transcripcional modificando la activación de los genes α ^{5,10,11}.

β -talasemia

β -talasemia mayor

Son niños con un cuadro clínico severo de palidez y hepatoesplenomegalia, con anemia severa de 3 a 7 g/dL de hemoglobina. Se acompaña de microcitosis VCM < 60 fL e hipocromia HCM < 20 pg. El ADE supera el 20%. Generalmente se diagnostican a partir del 6.º mes de nacimiento y durante el 1.º o 2.º año de vida. Los reticulocitos, debido a la intensa eritropoyesis ineficaz, son característicamente bajos, de alrededor del 1%. En ocasiones están ligeramente incrementados².

En la morfología de la sangre periférica, se observa una gran anisocitosis con hematíes totalmente vacíos de hemoglobina, dianocitos, eritroblastos circulares, y punteado basófilo.

Los leucocitos y las plaquetas pueden estar moderadamente elevados.

En el examen de médula ósea se observa una marcada hiperplasia eritroide, con hemoglobinización deficiente de los normoblastos. La relación mieloide-eritroide es de 20:1. La proporción de megacariocitos y de serie granulocítica es normal. Se observan precipitados intracitoplásmicos de cadenas α de globina y aumento depósito de Fe en médula.

El hierro sérico está muy aumentado; la transferrina, levemente elevada, con un índice de saturación de la transferrina generalmente superior al 80%. Los

valores de ferritina sérica también se encuentran elevados con relación a la edad del paciente.

Al diagnóstico, y dependiendo del genotipo específico del paciente, el patrón de hemoglobinas, antes de transfundir, demuestra una Hb F incrementada de 30 a 100%, con ligero aumento de Hb A₂, y de 0 a 70% de Hb A.

El estudio hematológico debe completarse con estudios bioquímicos, radiológicos, hepáticos, cardiacos, endocrinos y el fenotipado de los eritrocitos en orden al futuro tratamiento transfusional.

El estudio debe finalizarse con el análisis del genotipo, para caracterizar la lesión molecular².

Rasgo β -talasémico

Los portadores heterocigotos de β -talasemia pueden ser diagnosticados por una moderada anemia de 10-12 g/dL de Hb, con microcitosis VCM < 80 e hipocromia VCM < 25, con ADE normal (12-14%). El recuento de reticulocitos es también normal.

El patrón de hemoglobina demuestra incremento de Hb A₂ > 3,5% (3,5-6%), con leve elevación de la Hb F (1-4%) en el 50% de los casos⁸ (Tabla 4).

En el caso de asociación con δ -talasemia eritroide, la Hb A₂ no se encuentra incrementada. La asociación de α y β -talasemia da lugar a un cuadro hematológico con anemia más moderada y VCM y HCM superiores al patrón estándar de β -talasemia heterocigota. Sin embargo, la Hb A₂ permanece elevada.

El portador silente de β -talasemia es de difícil diagnóstico, dado que son aparentemente normales, tanto clínica como hematológicamente, o desde el punto de vista del patrón de hemoglobinas. Su diagnóstico debe sospecharse por estudios familiares, y confirmarse por el diagnóstico de síntesis de cadenas de globina α/β , y mediante técnicas de biología molecular. Son mutaciones que preferentemente afectan a la región promotora del gen β .

El diagnóstico debe establecerse con la anemia ferropénica, también microcítica e hipocromia. En éstos el índice de saturación de la transferrina es < 16%, y la ferritina, baja.

Tabla 4. Diagnóstico de β -talasemia, $\delta\beta$ y Hb Lepore

	Homocigota		Heterocigota	
β -talasemia	Hb F	30-100%	Hb F	1-5%
	Hb A ₂	2-3%	Hb A ₂	3,5-6%
$\delta\beta$ -talasemia	Hb F	100%	Hb F	5-15%
	Hb A ₂	↓	Hb A ₂	N o ↓
Hb Lepore	Hb F	80%	Hb F	2-5%
	Hb A ₂	0%	Hb A ₂	N o ↓
	Hb Lepore	20%	Hb Lepore	5-15%

$\beta\delta$ -talasemia

La talasemia homocigota se reconoce como una talasemia intermedia, con moderada esplenomegalia y anemia.

Sólo producen Hb F; de ahí que se comporte como una talasemia menos severa que la talasemia mayor. Su hemoglobina oscila alrededor de 9 o 10 g de Hb, con microcitosis, hipocromia y ancho de distribución de hematíes elevado. Los individuos heterocigotos para esta delección presentan una moderada anemia microcítica e hipocroma, con VCM y HCM descendidos y ADE incrementado (> 18%). La Hb F se encuentra en cifras de 5-15%, está distribuida de forma heterogénea en el interior de los hematíes, y está compuesta por cadenas G γ y A γ . La Hb A₂ es baja o normal.

En la talasemia por Hb Lepore la forma homocigota se caracteriza por un cuadro clínico de talasemia intermedia, con 80% de Hb F, aproximadamente el 20% de Hb Lepore y no se observa Hb A ni Hb A₂¹².

En el heterocigoto el cuadro clínico y hematológico es similar al de la $\delta\beta$ -talasemia menor, con leve anemia y un patrón electroforético en el que se demuestra un 5-15% de Hb Lepore, ligero aumento de Hb F (no superior al 5%) y Hb A₂ normal (Tabla 4).

$\gamma\delta\beta$ y $\epsilon\gamma\delta\beta$ -talasemias

Las formas homocigotas son incompatibles con la vida. Las formas heterocigotas son difíciles de diagnosticar, tanto en la época neonatal como en la edad adulta.

En el recién nacido se observa anemia hemolítica severa, con hematíes microcíticos e hipocromos. El estudio de hemoglobinas demuestra Hb F y A.

Disminución de la síntesis de cadenas β y γ , con una ratio α /no α aumentada.

A medida que el niño crece, desaparece la anemia hemolítica, y su fenotipo se convierte en el de una β -talasemia heterocigota.

En el adulto se observa anemia moderada microcítica e hipocroma, con Hb A₂ y F normales. Se desconocen las razones por las que se produce esta anemia hemolítica tan severa en la edad neonatal.

Diagnóstico molecular

Una vez realizado el diagnóstico hematológico de una talasemia, hay que confirmarlo e identificar la mutación mediante técnicas de biología molecular^{12,13}.

La gran variabilidad clínica que se observa en los síndromes talasémicos deriva en numerosas ocasiones de un diferente genotipo, pero no siempre es

Tabla 5. Análisis molecular: técnicas de estudio

α-talasemia:
· PCR - Gap
· PCR - Enzimas de restricción
· MLPA
· Southern blot
· Secuenciación
β-talasemia:
· PCR - ARMS
· PCR - Enzimas de restricción
· Secuenciación

así. En ocasiones también genotipos iguales pueden producir cuadros fenotípicos diferentes. Es debido a otros factores genéticos o no genéticos, que pueden modificar el cuadro clínico, modulando el fenotipo, como sucede en el incremento o descenso de cadenas γ o α en la β -talasemia.

Es necesario tener en cuenta todos estos aspectos, tanto para programar eficazmente el tratamiento como para realizar un adecuado consejo genético, y resultan imprescindibles para el diagnóstico prenatal de fetos, en los que ambos progenitores son portadores de la enfermedad, o bien de una doble heterocigosis para β -talasemia y hemoglobinopatía estructural de la cadena β .

Dentro de las técnicas de biología molecular, el descubrimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha venido a simplificar considerablemente el estudio de las mutaciones de α y β -talasemia.

El análisis molecular de la α -talasemia se realiza mediante dos grupos de técnicas fundamentales.

En el caso de grandes delecciones, el método de Southern blot, es decir, el mapeo genético con enzimas de restricción, ha sido un método muy útil que nos ha permitido identificar un gran número de portadores de α -talasemia^{1,8}, del rasgo talasémico y de la enfermedad de la Hb H. En la actualidad, el análisis *high resolution ligation-dependent probe amplification* (MLPA)¹⁴ está desplazando al Southern por ser un método más sencillo y más rápido.

En el caso de pequeñas delecciones de α -talasemia, en la actualidad la PCR se utiliza más que el Southern blot. Para las delecciones 3.7 y 4.2, se emplea la PCR-Gap¹⁵, y para identificar las mutaciones de α -talasemia, no delección PCR y digestión con enzimas de restricción. Para nuevas mutaciones no descritas, la técnica de elección es la secuenciación automática del ADN (Tabla 5).

En la β -talasemia los estudios moleculares se realizan con las técnicas PCR-ARMS¹⁶, PCR con digestión con enzimas de restricción y en ocasiones secuenciación automática del ADN (Tabla 5).

A diferencia de lo que sucede en la α -talasemia, donde más del 90% de las alteraciones genéticas son

Tabla 6. α -talasemia deleción

α^+-talasemia heterocigota:	
· - $\alpha^{3.7}$:	872
· - $\alpha^{4.2}$:	14
· - $\alpha^{3.5}$:	2
α^+-talasemia homocigota:	
· - $\alpha^{3.7} / - \alpha^{3.7}$:	233
· - $\alpha^{4.2} / - \alpha^{4.2}$:	1
· - $\alpha^{3.7} / - \alpha^{4.2}$:	6
· - $\alpha^{3.7} / - \alpha^{3.5}$:	1

Tabla 7. α -talasemia

α^0 -talasemia:	
--MEDI:	1 familia
--MEDII:	1"
--SEA:	11"
--SPAN:	4"
--CAL:	5"
--CANT:	1"
--MA:	1"
--BR:	15"
--CI:	1"
--THAI:	1"
--FIL:	3"
(aa) CMO:	1"
Truncación del telómero:	2"
ATRA-16:	1"

Tabla 8. α -talasemia no deleción

Codón iniciación (α^{Nco} α):	ATG \rightarrow ACG
IVS-1 (-5 nt) donador (α^{Hph} α):	GGTGAGGCT \rightarrow GGCT
Hb Plasencia [α_2 125 (H8) leu-arg]:	CTG \rightarrow CCG
Alpha2 IVS-II-142:	AA \rightarrow AG
Codón de terminación α 142 (Hb C-S):	TAA \rightarrow ACG
Hb Agrinio [α^2 29 (B10) Leu > Pro]:	CTC \rightarrow CCG

debidas a deleciones, en la β -talasemia, la mayoría se deben a mutaciones puntuales con pérdida de la regulación de la síntesis de cadenas $\beta^{1,5,8}$.

Hasta el momento actual se han caracterizado alrededor de 200 lesiones moleculares, afectando a la cadena β , y aproximadamente otras 100 que involucran a los genes α^5 .

En nuestro laboratorio de biología molecular del Servicio de Hematología del Hospital Clínico San Carlos, hemos estudiado de acuerdo con nuestra estadística y con el número de trabajos publicados más de 2.000 casos de α -talasemia y más de 500 de β -talasemia.

Recogemos en las siguientes tablas algunos de estos estudios realizados.

En la Tabla 6 se especifican los diferentes tipos de mutaciones de α -talasemia, en 1.129 pacientes con α^+ -talasemia hetero y homocigoto. Observamos que la deleción más frecuente en nuestro medio es la pérdida de 3,7 kb de ADN, aunque también, en menor proporción, se observa la deleción 4.2, mutación que es frecuente en poblaciones asiáticas⁸.

En cuanto al haplotipo α^0 , recogemos en la Tabla 7 el estudio de 48 familias con pérdida de dos genes α en el mismo cromosoma, 20 de los cuales presentan enfermedad de la Hb H. Algunas de estas deleciones son comunes con otras poblaciones, como Med, SEA, THAI, FIL o CAL, mientras que otras solamente han sido descritas en una sola familia o en alguna más, como CANT, MA, SPAN o BR¹⁷.

Se comprueba en estos casos que la síntesis de cadenas de globina, relación α/β , es menor en los casos de enfermedad de la Hb H, y próxima a 1 en los sujetos con pérdida aislada de un gen α .

La α -talasemia no deleción se detecta en un 7,7% de los pacientes con α -talasemia. Las mutaciones más frecuentes se sitúan en el codón de iniciación del gen α_2 (cambio ATG \rightarrow ACG), y en el intrón I, con pérdida de 5 nucleótidos en el gen α_2 (-TGAGG). En menor frecuencia se han observado también otras mutaciones (Tabla 8 y Figura 3).

En cuanto a la β -talasemia, hemos caracterizado 15 diferentes alteraciones moleculares. En un trabajo en el cual se evalúan 308 cromosomas pertenecientes a 294 sujetos no relacionados entre sí, 11 son homocigotos (22 alelos), 3 dobles heterocigotos (6 alelos), y los 280 restantes heterocigotos (280 alelos)⁸.

Las dos mutaciones más frecuentes (Tabla 9) corresponden a la mutación sin sentido del codón 39 (CD39), y mutación en las secuencias de consenso IVS1-nucleótido 1 (nt1), seguida de la mutación del CD8/9, en donde se modifica el marco de lectura del código genético o las mutaciones en los intrones IVS-1 nt6 e IVS-nt110¹⁸.

Estos resultados se comparan con los hallazgos descritos por otros grupos españoles y por investigadores de la cuenca mediterránea, en donde también las mutaciones IVS-1 int 1, CD39 e IVS-1 nt110 son habituales (Tabla 10).

En conclusión, los estudios moleculares son esenciales para el diagnóstico y manejo de los pacientes con talasemia. Permiten realizar consejo genético. Son indispensables para realizar el diagnóstico prenatal en las primeras semanas de gestación y pueden utilizarse como técnicas preimplantacionales. En definitiva, nos sirven para conocer mejor la etiopatogenia y la fisiopatología de la enfermedad, lo que puede traducirse en un futuro en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

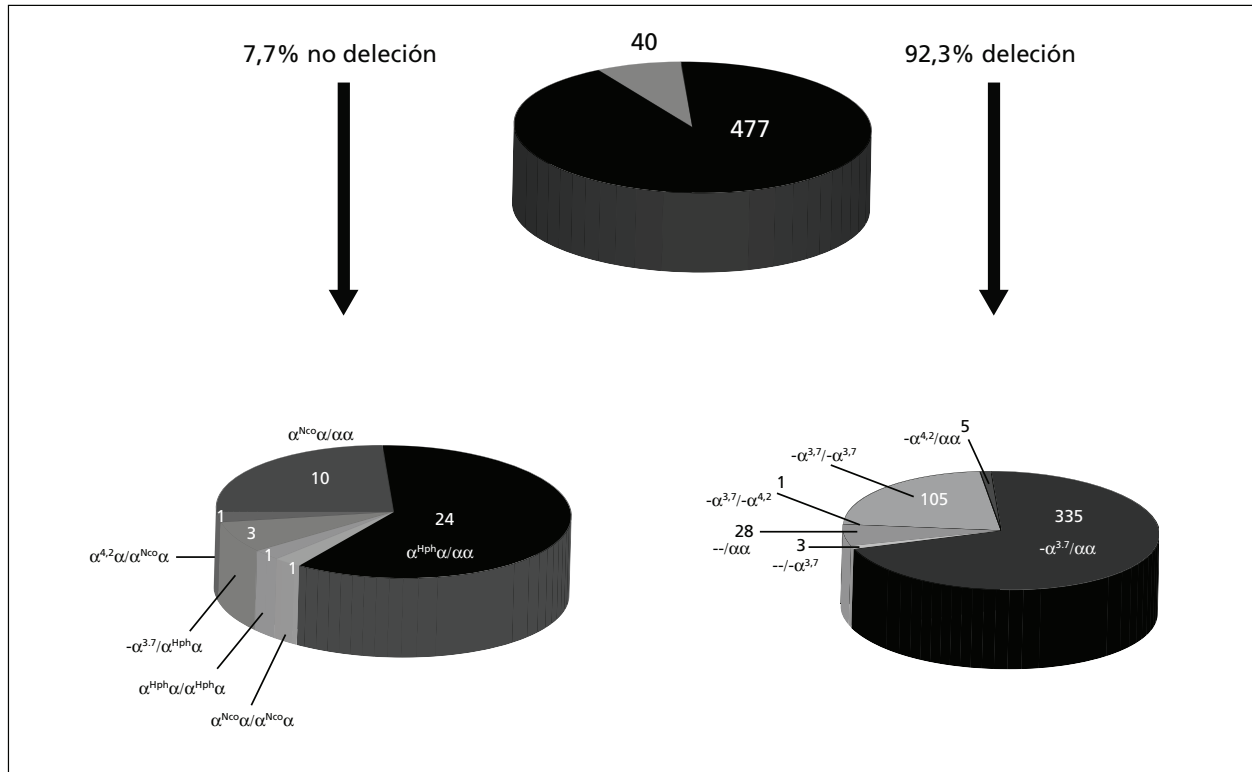


Figura 3. Alteraciones moleculares en el cluster α .

Tabla 9. Caracterización molecular de la β -talasemia en la región central española

Se caracterizan 15 mutaciones diferentes en un estudio de 308 cromosomas pertenecientes a 294 sujetos no relacionados entre sí, 11 son homocigotos (22 alelos), 3 doblemente heterocigotos (6 alelos) y los restantes 280 son heterocigotos (280 alelos)

Mutaciones	N.º alelos	%	Fenotipos
1. Transcripción		1,3	(β^0 , β^+)
-86	4	1,3	
2. Procesamiento ARN		50	+
a) Secuencias de consenso:			
IVS-1-nt1	91	29,5	0
IVS-1-nt5	3	1,0	+
IVS-1-nt6	26	8,4	+
IVS-2-nt1	1	0,3	0
IVS-2-nt848	2	0,7	+
b) Mutaciones en intrones:			
IVS-1-nt110	25	9,4	+
IVS-1-nt116	1	0,3	0
IVS-2-nt745	5	1,7	+
3. Traducción mRNA. Unión y poliadenilación		44,2	
a) Mutaciones sin sentido:			
CD37	1	0,3	0
CD39	96	31,2	0
b) Alteraciones del marco de lectura:			
CD5	8	2,7	0
CD6	1	0,3	0
CD8	1	0,3	0
CD8/9	29	8,1	0
4. Desconocidos	14	4,5	

Fuente: Villegas et al., 2001.

Tabla 10. Caracterización molecular de la β -talasemia en España								
Mutaciones	Andalucía oriental	Cataluña	Delta Ebro	España	Huelva	Comunidad Valenciana	Mallorca	Centro España
IVS-1-nt1	22.3	13.0		3.5	55.6	9.3	3.1	29.5
CD39	31.1	43.2	5.9	64.0	33.3	44.2	45.9	31.2
IVS-1nt6	8.9	10.2		15.5	5.6	16.3		8.4
IVS-1-nt110	26.7	8.8		8.5		4.7	24.4	9.4
CD8/9								8.1
IVS-2nt745	2.1	21.9						1.7
CD37			94.1	1.7		4.7		0.3
CD6		2.9		5.9		18.6	20.4	0.3
Otras	8.9			1.8				6.6
Desconocido					5.6	2.3	6.1	4.5
Total	45	215	34	58	18	43	98	308
Ref.	Molina	Font	Font	Amselem	Benito	Pérez-Sirvent	De Luna	Villegas

Fuente: Villegas et al., 2001.

Bibliografía

- Higgs DR, Vickers MA, Wilkie AO, Pretorius IM, Jarman AP, Weatherall DJ. A review of the molecular genetics of the human alpha-globin gene cluster. *Blood* 1989; 73(5): 1081-1084.
- Weatherall DJ, Clegg JB. *The Thalassemia syndromes* (ed. 4). Oxford: Blackwell Science. 2001.
- Thein SL. Genetic insights into the classical diversity of beta thalassaemia. *Br J Haematol* 2004; 126:264-274.
- Gallanello R, Cao A. Relationship between genotype and phenotype in thalassemia intermedia. *Ann NY Acad Sc* 1998; 850: 325-333.
- Higgs DR. Gene regulation in Hematopoiesis: New lessons from thalassemia. Ham Wasserman lecture. *Hematology ASH* 2004; 3: 1-13.
- Giambona A, Passarello C, Ruggeri G, Ronda D, Teresi P, Anzà M, Maggio A. Analysis of delta globin gene alleles in the Sicilian population: identification of five new mutations. *Haematologica* 2006; 91 (II): 1681 – 1684.
- Jarman AP, Wood WG, Sharpe JA, Gourdon G, Ayyub H, Higgs DR. Characterization of the major regulatory element upstream of the human alpha-globin gene cluster. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 4679 – 4689.
- Villegas A, Ropero P, González FA, Anguita E, Espinós D. The thalassemia syndromes: molecular characterization in the Spanish population. *Hemoglobin* 2001; 25(3): 273 – 283.
- Argentaro A, Yang JC, Chapman L, Kowalczyk MS, Gibbons RJ, Higgs D et al. Structural consequences of disease-causing mutations in the ATRX–DNMT3–DNM T3L (ADD) domain of the chromatin-associated protein ATRX. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104: 11939 – 11944.
- Steensna DP, Higgs DR, Fisher CA, Gibbons RJ. Acquired somatic ATRX mutations in myelodysplastic syndrome associated with alpha thalassemia (ATMDS) convey a more severe hematologic phenotype than germline ATRX mutations. *Blood* 2004; 103: 2019 – 2026.
- Nelson ME, Thurmes PJ, Hoyer JD, Steensma DP. A novel S ATRX mutation with splicing consequences in acquired α thalassemia-myelodysplastic syndrome. *Haematologica* 2005; 90 (11): 1463 – 1470.
- Ithantet Molecular diagnosis procedures. Diagnosis of known mutation. <http://portal.ithantet.eu>
- Old JM. DNA-based diagnosis of haemoglobin disorders: In *Disorders of Hemoglobin*. Eds MH. Steinberg. BG, Forget, DR Higgs, RN Nagel. Cambridge University Press. Cambridge UK. 2001.
- Harteveld CL, Voskamp A, Phylipsen M, Akkermans N, den Dunnen JT, White SJ, Giordano PC. Nine unknown rearrangements in 16p 13.3 and 11p 15.4. Causing alpha and beta-thalassaemia characterised by high resolution multiplex ligation-dependent probe amplification. *J Med Genet* 2005; 42(12): 922-31.
- Foglietta E, Deidda G, Grazian B, Modiano G, Bianco I. Detection of α -globin gene disorders by a simple PCR methodology. *Haematologica* 1996; 81: 387 – 396.
- Newton CR, Graham A and Heptinstall LE. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS) *Nucl Acids Res* 1989; 17: 2503 – 2516.
- Flint J, Craddock CF, Villegas A, Bentley DP, Williams HJ, Gallanello R et al. Healing of broken human chromosomes by addition of telomere repeats. *Am J Hum Genet* 1994; 55(3): 505-12.
- Ropero P, González FA, Calvo-Villas JM, Paul R, Villegas A. The novo 4 bp deletion in the codons 20/21 (-TGGA) at the first exon of the β -globin gene causing a β 0-thalassemia in a Spanish male. *Ann Hematol* 2008; 87: 63 – 65.

Genómica en oncohematología. Aspectos actuales y su utilidad práctica

J.C. CIGUDOSA, S. ÁLVAREZ DE ANDRÉS

Grupo de Citogenética Molecular. Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO). Madrid

Introducción: la genómica como origen de biomarcadores

El diagnóstico de una leucemia mieloide crónica (LMC), cuyas células hematopoyéticas presentaban el marcador cromosómico Philadelphia (Ph+), conllevaba, hasta el reciente año 2000, un pronóstico fatal dilatado en un periodo de no más de 5 años. Esta situación cambió radicalmente tras la rápida inclusión del inhibidor específico de la actividad tirosín-cinasa (imatinib mesilato) como terapia de primera línea en pacientes con LMC Ph+^{1,2}. Esta situación no es aislada en la práctica de la oncohematología; ya pertenece al dominio de conversación común, entre los profesionales y entre los pacientes, que las leucemias tienen casi siempre alteraciones genéticas y que estas alteraciones pueden emplearse para dirigir u orientar el tratamiento. Asumimos, por tanto, que el cáncer es una enfermedad celular de origen genético³. Esta frase, sencilla y simple, tiene un impacto de enormes dimensiones sobre cualquier tipo de aproximación, científica o clínica, que las ciencias biosanitarias han de seguir para estudiar el fenómeno oncológico. La principal consecuencia de la definición del cáncer como enfermedad genética es que, de forma casi excluyente, la investigación oncológica ha de estar basada en herramientas de análisis genético.

Si asumimos este origen genético del cáncer, **¿cómo se investiga la relación gen-enfermedad?** El esquema de investigación habitualmente seguido para caracterizar esa relación consiste, en esencia, en estudiar un gen y su efecto en el modelo biológico estudiado, en determinar las relaciones con otros genes y, por último, en diseñar modificaciones (inhibidores o activadores) de su expresión para regular su efecto en condiciones patológicas. Este sistema ha sido muy útil pero se adivina un tanto insuficiente si tenemos en cuenta que el número de genes es de unos 30.000, que se traducen en unas 100.000 proteínas y que las interacciones gen-gen, proteína-proteína y gen-proteína, por simple combinatoria, alcanzan cantidades casi inimaginables.

En los últimos años, las herramientas de análisis genético han sufrido una revolución técnica comparable a la incorporación del microscopio en los laboratorios. Han aparecido sistemas de análisis genómico masivo que permiten analizar en un solo experimento el estado de miles de genes. Es decir, ahora, es-

tudiar la relación gen-enfermedad no está basado en analizar un gen único y sus efectos, sino en analizar el comportamiento de miles de genes de forma simultánea. Estos sistemas, denominados genéricamente micromatrices, *arrays*, *microarrays* o biochips, están cambiando nuestra forma de plantear problemas y extraer conclusiones de los experimentos, ya que nos ofrecen una foto compleja del conjunto del genoma. Este conjunto de datos sobre expresión génica y relaciones entre genes tratados de forma sistemática mediante herramientas de análisis masivo constituye el cuerpo esencial de lo que denominamos genómica. La genómica intenta proporcionar a los investigadores en biología el equivalente de la Tabla Periódica de los Elementos, es decir, un inventario de todos los genes que contribuyen y se coordinan para explicar la existencia y funcionalidad de cualquier ser vivo. Este inventario estará asociado a un sistema de clasificación que genere bloques o subconjuntos de genes que se comportan de forma coordinada. Aplicar estos avances a la investigación en oncohematología, realizar con cuidado este inventario, detallarlo al máximo, hacerlo corresponder de forma exquisita a los diferentes estados patológicos, tiene como objetivo no sólo aumentar nuestra capacidad para predecir el pronóstico y la respuesta al tratamiento de estos pacientes, sino para facilitar y promover el desarrollo de terapias dirigidas frente a estas dianas moleculares.

Sin duda, la mayor contribución de los estudios con *microarrays* reside en la taxonomía de las enfermedades. Clasificar un determinado tumor con un nombre y apellidos de la forma menos ambigua posible permite ajustar el diagnóstico y el tratamiento casi de forma individual. **Es la base, la piedra angular, de la medicina individualizada.** Sin embargo, como todos sabemos, realizar una filiación adecuada de un caso real depende de muchas variables: las circunstancias de recogida de la muestra (hospital, laboratorio), el rigor en la descripción inicial de todas las condiciones (anamnesis, datos de laboratorio), la disponibilidad de herramientas de diagnóstico adecuadas y, finalmente, la experiencia del profesional. Conjugar todos estos elementos tendría que tener como final el desarrollo de una clasificación de los tumores que sea universal y efectiva. Es importante remarcar otra vez la paralogía de la genómica con el descubrimiento y la caracterización de biomarcado-

res. En primer lugar, se produce el reconocimiento de una diferencia morfológica de una manera reproducible y sistemática. En segundo lugar, se intenta establecer la relación entre las características del tumor (sus biomarcadores) y las del tejido normal del que se origina. En tercer lugar, se buscan y se tratan de establecer asociaciones entre la evolución del paciente o la respuesta al tratamiento y los biomarcadores propuestos, de forma que éstos tengan una utilidad clínico-terapéutica. La tecnología de *microarrays* puede usarse para derivar clasificaciones basadas en biomarcadores, establecer asociaciones con la línea celular de origen y ayudar en el pronóstico, pero con la ventaja añadida de ser capaz de identificar los genes que determinan esa clasificación⁴.

Tecnología genómicas: su origen, tipos y utilidades

Los *microarrays* de expresión génica

Los ensayos de hibridación en *microarrays*, descritos a finales de los años ochenta, se basan en la disposición de material genético sobre un sustrato (plástico, cristal, membranas), en posiciones conocidas. En la actualidad existen en el mercado científico herramientas de análisis genómico (matrices o *microarrays*) diseñadas a partir de ácidos nucleicos en forma de cDNA (DNA monocatenario y complementario al RNA mensajero que contiene la secuencia codificante de un gen), secuencias cortas de nucleótidos (oligonucleótidos), o DNA de doble cadena. En todos los casos, cada material genético que se coloca en el *array* está referido a una región del genoma cuya situación y características son conocidas o predichas con cierta verosimilitud. Es decir, cada uno de los puntos del *microarray* puede representar un gen y la información que nos genera se refiere al estatus de ese gen en la muestra analizada. Los *microarrays* más extendidos y utilizados son los dos primeros tipos (cDNA y oligos) y los experimentos en los que son empleadas son, casi exclusivamente, estudios sobre análisis masivo o global de la expresión genética de organismos.

El material obtenido de la muestra problema, convenientemente tratado y marcado con una molécula que permite su identificación o lectura (fluorescencia) se pone en contacto con el *array*, hibridando en aquellas posiciones en que se complementa con las sondas. El patrón de hibridación es revelado empleándose un escáner, y la imagen resultante se convierte a valores numéricos que constituyen los resultados del ensayo. En el ejemplo más frecuente de los *microarrays* de expresión, este sistema permite la cuantificación de expresión génica diferencial. El nivel de

expresión de un gen se refleja en el número de copias de mRNA presentes en la muestra problema y, por tanto, es proporcional al nivel de señal detectado.

Una de las ventajas significativas es que, debido a la miniaturización del sistema, la alta concentración del material permite la identificación de muestras presentes en un bajo número de copias. Además, las técnicas de revelado por fluorescencia ofrecen una elevada relación señal/ruido incluso en casos de transcritos poco abundantes.

El alto grado de integración del *array* permite, en un solo ensayo, obtener multitud de valores de expresión génica relativa para distintas condiciones biológicas, lo que convierte a esta técnica en una herramienta de alto rendimiento para trabajos en el área de la genómica funcional. El gran volumen de datos generados debe ser tratado con herramientas y métodos bioinformáticos.

Los *microarrays* de DNA genómico

Aunque la aplicación más conocida de los biochips de DNA es la determinación de perfiles de transcripción, el formato *microarray* también ha sido utilizado de manera eficaz, al menos en otros dos tipos de experimentos: los *microarrays* diseñados para la detección masiva y simultánea en una muestra problema de cientos de miles de polimorfismos de un único nucleótido (*single nucleotide polymorphisms* o SNPs); y los *microarrays* de DNA genómico diseñados para el estudio de las alteraciones en el número de copias de DNA (*copy number variations* o CNV) presentes en la muestra a estudio.

Los *microarrays* de DNA genómico diseñados para detectar CNV han surgido como la evolución en clave genómica de la técnica conocida como hibridación genómica comparada (*comparative genomic hybridization* o CGH), desarrollada en 1992⁵. La técnica de CGH se ha aplicado extensamente durante los últimos años a los más diversos tipos de neoplasias, mostrando su gran utilidad en la búsqueda de regiones cromosómicas. La CGH está basada en la hibridación sobre cromosomas y, por lo tanto, tiene una capacidad de resolución limitada, por lo que los cambios que impliquen segmentos inferiores a 7-10 megabases no son detectados. Segmentos de ese tamaño pueden contener decenas de genes cuyo comportamiento se escapa al análisis. Esta limitación se ha salvado mediante la introducción de los *microarrays* como plataforma para hibridar las muestras problema. Esta aproximación se denomina **array de CGH o CGH array**. La hibridación se realiza sobre segmentos de DNA de menor tamaño clonados en forma de: 1) cromosomas artificiales bacterianos o plasmídicos (BAC o PAC, respectivamente); 2) cDNA correspondien-

Tabla 1. Resumen de características de los tres tipos de plataformas genómicas

Tipo array	Muestra	Objetivo	Ventajas	Inconvenientes
Expresión	RNA	Detecta el perfil de expresión de todos los genes incluidos en el array	<ol style="list-style-type: none"> 1. Representa una foto global de la actividad de la célula 2. Permite obtener firmas moleculares del tumor 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Muy dependiente de las condiciones de recogida de las muestras 2. Muy dependiente de la validación por otras técnicas 3. No detecta polimorfismos germinales ni su posible efecto
CGH array	DNA	Detecta ganancias y pérdidas de regiones del genoma	<ol style="list-style-type: none"> 1. Explica el fenotipo en base a deleciones y amplificaciones 2. Independiente de las condiciones del material biológico 3. No muy dependiente de desarrollos de <i>software</i> 4. Trasladable a la práctica clínica con facilidad 5. Detecta polimorfismos genéticos germinales 6. Validación muy accesible 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Las variaciones genéticas del número de copias pueden no tener repercusión clara en el fenotipo: la regulación de la expresión está en un nivel superior, es decir, podemos tener ganancias o pérdidas sin efecto patológico 2. No detecta las regiones con pérdidas de heterocigosidad si no van acompañadas de una deleción
SNP array	DNA	Detecta el genotipo (secuencia) de los marcadores polimórficos incluidos en el array	<ol style="list-style-type: none"> 1. Puedes explicar el fenotipo en base 2. Independiente de las condiciones del material biológico 3. Detecta las regiones con pérdidas de heterocigosidad 4. Detecta ganancias y pérdidas de regiones del genoma 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Los cambios detectados pueden ser neutrales en términos de expresión, es decir, podemos tener ganancias o pérdidas sin efecto patológico 2. Es poco sensible a los cambios en número de copias 3. Dependiente del desarrollo de <i>software</i> para su interpretación

tes a genes de interés (como si fueran *microarrays* de expresión; o 3) oligonucleótidos de unos 60 pares de bases sintetizados de forma exclusiva para su inclusión en el *microarray* y que pueden contener variantes de tipo SNP. Estos segmentos de DNA son secuencias genómicas conocidas cuya localización en el genoma es conocida y cuyo contenido génico es más o menos conocido. En esta nueva situación el nivel de resolución pasa, por tanto, de megabases (cromosómico) a kilobases (oligonucleótidos). La técnica se alimenta de la gran cantidad de datos aportados por el proyecto genoma humano, sobre la ubicación, secuencia y contenido de genes de estos fragmentos de DNA son, en buena medida, conocidos.

Los *microarrays* diseñados para el genotipado masivo de SNP han sido los últimos en aparecer en el campo de la genómica aplicada, pero su desarrollo tiene muchos visos de ser imparable. Estos *microarrays* están diseñados para detectar, en una muestra problema, la presencia o ausencia de un determinado SNP. Por lo tanto, permiten conocer simultáneamente la secuencia de cientos de miles (con frecuencia más de un millón) de variantes génicas presentes en la muestra. Esta tecnología se denominan **array de SNP o SNP array**. Ofrece una gran ventaja respecto a las pruebas genéticas empleadas hasta ahora para determinar el genotipo de una serie de marcadores: es una prueba global, que no selecciona previamente los genes a estudiar sino

que realiza un escaneo general del genoma en busca de genotipos de interés. Supone el paso de la farmacogenética a la farmacogenómica. Además, estos tipos de *arrays* también pueden ser empleados (aunque con algo menos de eficiencia) para detectar los CNV en una muestra, por lo que también pueden ser considerados como CGH *arrays*. En la Tabla 1 se presentan las características generales y la comparación de los tipos de *microarrays* descritos.

La genómica como generadora de biomarcadores en oncohematología: su aplicabilidad en leucemias mieloides

La generación de un biomarcador, ya sea de tipo diagnóstico, pronóstico o predictivo, y su traslado a la práctica clínica es un proceso secuencial compuesto de, al menos, cuatro etapas que incluyen e implican a investigadores (básicos y aplicados/clínicos), reguladores y agentes de empresas de biotecnología.

En general, el proceso (que se articula según la Tabla 2) se puede aplicar a cualquier tipo de biomarcador generado por técnicas analíticas o por técnicas genéticas o genómicas. En esta sección vamos a describir el proceso basado en técnicas genómicas, ya que los biomarcadores basados en otro tipo de técnicas analíticas (bioquímica esencialmente) no requieren un tratamiento de los datos tan complejo y tan

Tabla 2. Esquema general de desarrollo de biomarcadores tumorales

Etapa	Actividad	Quién la realiza
Fase 0	Desarrollo de la tecnología previa y de los reactivos	Investigadores básicos y empresas biotecnología
Fase 1	Desarrollo de ensayo dirigido a los biomarcadores seleccionados	Investigadores aplicados/clínicos
Fase 2	Evaluación inicial de la prevalencia y del uso clínico	Investigadores aplicados/clínicos
Fase 3	Confirmación prospectiva en una serie independiente	Investigadores aplicados/clínicos
Fase 4	Desarrollo comercial	Empresas biotecnología

falto de desarrollo e implementación. Aplicando este proceso secuencial, a continuación se describe de forma general la situación actual de los biomarcadores en la leucemia mieloide aguda.

La leucemia mieloide aguda (LMA) tiene su origen en una acumulación de alteraciones genéticas que se suceden en las células progenitoras hematopoyéticas y que resultan en una proliferación anormalmente acelerada y un bloqueo en la diferenciación^{6,7}. Se trata de una neoplasia heterogénea cuyos marcadores moleculares y citogenéticos señalan diferentes pronósticos y comportamientos clínicos. De hecho, los marcadores citogenéticos y moleculares no son excluyentes mutuamente sino que, a menudo, coexisten en una población de células leucémicas y, concurrentemente, afectan a la expresión de genes diana que codifican proteínas implicadas en redes biológicas complejas que sustentan la leucemogénesis. En este contexto, admitimos que los estudios de perfiles de expresión global mediante *microarrays* son los indicados para identificar y conformar patrones específicos (firmas) de activación o silenciamiento (o ambos) de múltiples genes. Esas firmas son el reflejo de la biología de los diferentes subtipos de leucemias. Pueden llevar asociado cierto potencial como biomarcadores diagnósticos y pronósticos; asimismo, por la información sobre la expresión de genes que conlleva, pueden proporcionar nuevos objetivos o dianas terapéuticas. En concreto, hay estudios recientes que demuestran un elevado grado de reproducibilidad entre laboratorios (en condiciones estándar) al emplear estudios de expresión mediante *microarrays* en muestras leucémicas^{8,9}. En este punto hay que mencionar el estudio cooperativo europeo sobre estandarización y aplicación de *microarrays* de expresión para el diagnóstico de leucemias mieloides agudas (MILE, *Microarray Innovations in Leukemia study*). Este grupo acaba de publicar recientemente un trabajo⁹ que recoge el análisis de 3.334 casos de leucemias y mielodisplasias recogidos en 11 laboratorios de tres conti-

nentes. En concreto, estudian 542 LMA y confirman, mediante *microarrays* de expresión, un 91% de los diagnósticos de los subtipos definidos otros eventos genéticos o citogenéticos.

En general, podemos analizar los avances que los estudios genómicos han supuesto en el manejo clínico de las LMA en tres grandes áreas: diagnóstico, pronóstico y descripción de nuevas dianas. Evaluaremos esos avances en términos de descripción de nuevos biomarcadores, basándonos en tres grandes revisiones publicadas en 2009^{6,7,10} y en los últimos estudios cooperativos publicados más recientemente^{8,9,11}.

Respecto al potencial diagnóstico, es evidente que, con la generalización y el aumento de disponibilidad de tecnología genómica, los resultados son muy confirmatorios. Los subtipos de LMA con marcadores citogenéticos favorables, t(8;21), t(15;17) o inv(16), se predicen mediante *microarray* con una eficacia cercana al 100% (casi libre de falsos positivos y/o negativos). La identificación de casos de LMA positivos para mutaciones en NPM1 es algo menos eficaz (70% de sensibilidad y 99% de fiabilidad) y para CE-BPA (95% de sensibilidad y 97% de fiabilidad). Otros subtipos moleculares y genéticos, como los casos con mutaciones FLT3, RAS, alteraciones 3q, MLL, -5/5q-, -7/7q-, cariotipos complejos, no pueden ser clasificados sin ambigüedad. En conclusión, los *microarrays* de expresión nos permiten predecir de forma fiable los subtipos caracterizados por genes de fusión (translocaciones), pero la detección de mutaciones y otras alteraciones cromosómicas todavía requiere métodos moleculares tradicionales.

En cuanto al potencial pronóstico, hasta ahora los estudios se han limitado a definir subgrupos dentro de los grupos pronóstico aceptados de forma general (los basados en algunos marcadores citogenéticos y mutaciones en genes de conocido impacto como FLT3 o NPM1). Se han intentado hacer subgrupos dentro de los pacientes con translocaciones de los llamados *core-binding factors* (CBF) y dentro de los casos con cariotipo normal. En este último subgrupo se ha definido una firma de peor pronóstico en base a 20 genes asociada a la presencia de mutaciones por duplicación en tándem del gen FLT3 (y, por lo tanto, asociada a un marcador molecular definido previamente). Esta firma tiene una validez pronóstica moderada, ya que sólo tiene asociada una fiabilidad del 60% respecto al test molecular convencional.

Otras técnicas genómicas con potencial y su aplicación al campo de las leucemias mieloides

Entre las tecnologías genómicas emergentes, existen tres tipos de plataformas o aproximaciones relevan-

tes de cuya aplicabilidad clínica sólo es posible intuir algunos detalles.

En primer lugar, las plataformas que determinan la presencia de metilación aberrante en el genoma. Si bien hasta la fecha los estudios de epigenética se han centrado en estudiar el estado de metilación de las islas de dinucleótidos CpG en las regiones que condicionan la transcripción de un determinado gen, la incorporación de tecnología genómica permiten hacer esta determinación con un carácter global (incluyendo todo el genoma). Este tipo de análisis, denominado epigenómica, ya ha producido datos relevantes en el campo de las neoplasias mieloides¹²⁻¹⁴. En segundo lugar, las plataformas de expresión de microRNA también están proporcionando datos de interés biológico, todavía en el campo de la investigación. Y finalmente, la expresión máxima de los avances en genómica, la secuenciación de genomas completos, también ha sido recientemente aplicada a dos casos independientes de LMA *de novo*^{15,16}.

Conclusiones

Esta ponencia, en primer lugar, introduce históricamente el papel de la genómica en la investigación de los tumores hematológicos. Después presenta esquemas razonados sobre el proceso de definición de biomarcadores de origen genómico, resume los principales tipos de plataformas genómicas con sus ventajas y peculiaridades. También analiza la situación y disponibilidad actual de biomarcadores genómicos en la práctica clínica oncohematológica. Finalmente, se apuntan los problemas más frecuentes en la incorporación de este tipo de análisis genómicos en la rutina de la actividad clínica y se indican las posibilidades de desarrollos futuros en este campo.

Bibliografía

1. Goldman JM, Melo JV. Targeting the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2001 Apr 5;344(14):1084-6.
2. O'Hare T, Corbin AS, Druker BJ. Targeted CML therapy: controlling drug resistance, seeking cure. *Curr Opin Genet Dev*. 2006 Feb;16(1):92-9.
3. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*. 2004 Aug;10(8):789-99.
4. Miller LD, Long PM, Wong L, Mukherjee S, McShane LM, Liu ET. Optimal gene expression analysis by microarrays. *Cancer Cell*. 2002 Nov;2(5):353-61.
5. 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.
6. Mrozek K, Radmacher MD, Bloomfield CD, Marcucci G. Molecular signatures in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol*. 2009 Mar;16(2):64-9.
7. Wouters BJ, Lowenberg B, Delwel R. A decade of genome-wide gene expression profiling in acute myeloid leukemia: flashback and prospects. *Blood*. 2009 Jan 8;113(2):291-8.
8. Kohlmann A, Kipps TJ, Rassenti LZ, Downing JR, Shurtleff SA, Mills KI, et al. An international standardization programme towards the application of gene expression profiling in routine leukaemia diagnostics: the Microarray Innovations in LEukemia study prephase. *Br J Haematol*. 2008 Sep;142(5):802-7.
9. Haferlach T, Kohlmann A, Wiczorek L, Basso G, Te Kronnie G, Bene MC, et al. Clinical Utility of Microarray-Based Gene Expression Profiling in the Diagnosis and Subclassification of Leukemia: Report From the International Microarray Innovations in Leukemia Study Group. *J Clin Oncol*. Apr 20.
10. Bacher U, Kohlmann A, Haferlach C, Haferlach T. Gene expression profiling in acute myeloid leukaemia (AML). *Best Pract Res Clin Haematol*. 2009 Jun;22(2):169-80.
11. Verhaak RG, Wouters BJ, Erpelinck CA, Abbas S, Beverloo HB, Lugthart S, et al. Prediction of molecular subtypes in acute myeloid leukemia based on gene expression profiling. *Haematologica*. 2009 Jan;94(1):131-4.
12. Bullinger L, Armstrong SA. HELP for AML: methylation profiling opens new avenues. *Cancer Cell*. Jan 19;17(1):1-3.
13. Bullinger L, Ehrich M, Dohner K, Schlenk RF, Dohner H, Nelson MR, et al. Quantitative DNA methylation predicts survival in adult acute myeloid leukemia. *Blood*. Jan 21;115(3):636-42.
14. Figueroa ME, Lugthart S, Li Y, Erpelinck-Verschueren C, Deng X, Christos PJ, et al. DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. Jan 19;17(1):13-27.
15. Ley TJ, Mardis ER, Ding L, Fulton B, McLellan MD, Chen K, et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature*. 2008 Nov 6;456(7218):66-72.
16. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med*. 2009 Sep 10;361(11):1058-66.

Lo que debe conocer un hematólogo en el manejo antitrombótico de la enfermedad cardiovascular

V. ROLDÁN¹, F. MARÍN², V. VICENTE¹

¹ Servicio de Hematología y Oncología Médica. Hospital Universitario Morales Meseguer. Murcia

² Servicio de Cardiología. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. Murcia

La trombosis arterial está representada por la enfermedad cardiovascular, la cual constituye la principal causa de mortalidad en los países desarrollados. Surge de dos procesos fisiopatológicos: la aterosclerosis y la trombosis. Mientras que la trombosis es un evento agudo desencadenado por la interacción del factor tisular con el factor VII activado, provocado por la ruptura de una placa aterosclerótica, la aterosclerosis es consecuencia de cambios progresivos en la pared del vaso, resultado de la acción crónica sobre ella de determinados factores medioambientales, fundamentalmente tabaquismo, hipertensión arterial, diabetes mellitus y dislipemia. Entre los distintos síndromes que comprende, los que mayor morbimortalidad generan son el infarto agudo de miocardio y el ictus isquémico. Otras formas se dan en el territorio periférico, que incluye las arterias renales, las arterias de los miembros inferiores y el territorio mesentérico. La trombosis intravascular está influenciada por una compleja interrelación de factores procoagulantes, anticoagulantes, fibrinolíticos e inflamatorios, así como el daño endotelial^{1,2}, aunque el grado de participación de la placa de ateroma y la formación de trombo es variable entre los distintos síndromes.

Control de los factores de riesgo

Diversos ensayos tanto en prevención primaria como secundaria, han mostrado que actuar sobre los factores de riesgo ateroscleróticos no sólo reduce las tasas de mortalidad sino también la incidencia de síndrome coronario agudo (SCA), ictus isquémico y otros eventos cardiovasculares. Tan es así que la mayoría de los factores de riesgo para la aterosclerosis cerebral y/o coronaria son capaces de promover la aterogénesis a nivel del sistema arterial periférico. Por tanto, la reducción de la tensión arterial, del colesterol, un buen control de la diabetes y del síndrome metabólico y el cese del hábito tabáquico reducirán drásticamente el riesgo cardiovascular³⁻⁵. Las guías actuales de prevención de la enfermedad coronaria insisten en la estimación del riesgo individual cardiovascular para orientar el tratamiento de los pacientes, ya que la mayoría de los pacientes que van a desarrollar cualquier manifestación de enfermedad aterosclerótica son portadores de varios factores de riesgo que

interaccionarán entre sí para desencadenar el evento. Por ejemplo, las tablas SCORE recomendadas por la Sociedad Europea de Cardiología predicen el riesgo con las variables de sexo, edad, estatus de fumador, presión arterial sistólica y colesterol total. Los sujetos cuyo riesgo de eventos cardiovasculares excede del 2% por año requieren una intervención farmacológica. Los diabéticos son considerados de entrada sujetos de muy alto riesgo y escapan de estas tablas⁶.

Terapia antiplaquetaria

La fisura o rotura de la placa aterosclerótica expone componentes de la matriz vascular que inducen la adhesión, la activación y la agregación de las plaquetas (trombo), lo cual puede derivar en la aparición de un evento isquémico coronario. Debido al papel esencial de las plaquetas en los síntomas clínicos, la terapia antiplaquetaria, ya sea dirigida a inhibir o bloquear las vías de señalización y/o activación de las plaquetas, constituye el pilar fundamental para el tratamiento de la enfermedad aterotrombótica, ya sea de forma aguda como en la prevención secundaria⁷.

Ácido acetilsalicílico

El ácido acetilsalicílico (AAS) es el agente antitrombótico más utilizado en la práctica clínica, siendo el estándar para comparar el resto de agentes antiplaquetarios. El AAS actúa bloqueando de forma irreversible la prostaglandin-H sintetasas 1 y 2 (también denominadas COX-1 y COX-2), cuya función es catalizar la conversión del ácido araquidónico en prostaglandina H₂, que es el precursor de una diversidad de prostaglandinas, incluyendo el tromboxano A₂ (TXA₂) y la prostaciclina. El mecanismo molecular consiste en la acetilación selectiva e irreversible del grupo hidroxilo de un único residuo de serina en la posición 529 (Ser529) dentro de la cadena polipeptídica de la prostaglandin-H sintetasa plaquetaria evitando el acceso del sustrato al punto catalítico de la enzima. El TXA₂ es un potente inductor de la agregación y vasoconstricción plaquetaria⁸. El AAS, administrado una vez al día, está recomendado en todas las condiciones clínicas en las que la profilaxis antiplaquetaria tiene un perfil beneficio/riesgo favorable. Como preven-

ción de eventos cardiovasculares, la eficacia y seguridad del AAS ha sido ensayado en más de 70 ensayos aleatorizados que incluyeron más de 115.000 pacientes, tanto en prevención primaria como secundaria. El tratamiento a largo plazo con AAS da lugar a una reducción del 20-25% de riesgo en pacientes de riesgo intermedio-alto (angina estable, infarto de miocardio previo, accidente isquémico transitorio e ictus isquémico). Un metaanálisis de 4 estudios clínicos de prevención primaria sugiere que el tratamiento con AAS es seguro y recomendable cuando el riesgo de sufrir un episodio coronario es superior al 1,5%⁹. La tendencia actual es limitar el uso de AAS en prevención primaria, de tal forma que ya no se recomienda en hipertensos y se está abandonando su uso en diabéticos.

Clopidogrel

La ticlopidina y el clopidogrel son agentes antiplaquetarios derivados de las tienopiridinas que inhiben la agregación plaquetaria inducida por el ADP. Ambos son profármacos y por ello deben ser metabolizados por el hígado (por el citocromo hepático P450, CYP3A4) para convertirse en fármacos activos con propiedades antiplaquetarias. El metabolito activo se une de manera covalente al residuo cisteína de uno de los receptores del ADP (P2Y₁₂), lo que conduce a una modificación irreversible del receptor durante toda la vida de la plaqueta. El clopidogrel se absorbe rápidamente y se metaboliza a su metabolito SR 26334, cuya vida media de eliminación plasmática es aproximadamente de 8 horas. La inhibición de la agregación plaquetaria es detectable tras una dosis de 300 mg a las 2 horas. Con la administración de bajas dosis diarias, se produce una inhibición acumulativa de la función plaquetaria con un retorno a la normalidad de aproximadamente 7 días después de la última dosis. A dosis de 75 mg/día es una alternativa adecuada en pacientes de alto riesgo que presenten alguna contraindicación para el AAS. El uso de la ticlopidina ha sido desplazado por el clopidogrel debido a que este último tenía menos efectos secundarios. Su papel es fundamentalmente como tratamiento anti-trombótico adyuvante para la prevención de eventos tras un SCA, sobre todo si se ha implantado un dispositivo intracoronario o stent⁹.

Se ha comparado la eficacia y seguridad del clopidogrel con el AAS en un único estudio de fase II muy amplio en prevención secundaria (*CAPRIE: Clopidogrel versus Aspirin in Patients at Risk of Ischemic Events*), que incluía pacientes con ictus isquémico, infarto agudo de miocardio o enfermedad arterial periférica. El uso de clopidogrel se asoció a una reducción del riesgo relativo de un 9% para el evento combina-

do de muerte vascular, infarto agudo de miocardio o ictus isquémico¹⁰.

Antagonistas de los receptores de la glicoproteína IIb/IIIa

Se trata básicamente de anticuerpos monoclonales que bloquean de forma irreversible el punto de unión de la GP IIb/IIIa al fibrinógeno, como es el abciximab, o bien son pequeñas moléculas que impiden la unión del fibrinógeno al receptor: eptifibatide y tirofiban. Los tres fármacos se administran por vía intravenosa, y ensayos clínicos de gran escala han demostrado su claro beneficio clínico y un buen perfil de seguridad en pacientes de alto riesgo sometidos a intervencionismo coronario percutáneo (ICP). Su uso hoy en día se restringe para pacientes con SCA agudo que son programados a intervencionismo, y queda a criterio del hemodinamista, ante lesiones altamente trombogénicas⁸.

Nuevos antiagregantes

Prasugrel

Como el clopidogrel, prasugrel es un antagonista específico e irreversible del receptor plaquetario ADP P2Y₁₂. También es un profármaco pero su metabolización es más eficiente (tan sólo requiere de un paso metabólico) y por ello produce una inhibición plaquetaria más pronunciada, con dosis inferiores y una menor variabilidad de respuesta, de tal forma que sus dos principales ventajas son un inicio de acción más rápido y menos interferencias farmacológicas. Acaba de ser aprobado para pacientes con SCA sometidos a terapia de revascularización percutánea. La dosis de carga es de 60 mg, y la de mantenimiento, de 10 mg al día. La aprobación se basa, entre otros, en los resultados del ensayo *TRITON-TIMI 38*, un estudio comparativo de superioridad que evaluó la seguridad y eficacia de prasugrel frente a clopidogrel en la reducción de episodios aterotrombóticos en 13.608 pacientes con SCA sometidos a tratamiento de revascularización percutánea. El estudio mostró que prasugrel fue superior a clopidogrel (ambos en combinación con AAS) en la reducción del riesgo relativo de sufrir un nuevo evento entre los incluidos en la variable combinada de muerte cardiovascular, infarto agudo de miocardio no mortal e ictus no mortal. Sin embargo, el riesgo de hemorragia mayor no relacionada con cirugía de revascularización coronaria fue superior con prasugrel (2,2 vs. 1,7%) aunque el beneficio neto favorece al prasugrel⁽¹¹⁾. Se han identificado 3 grupos en los que el riesgo hemorrágico fue mayor: pacientes con peso

inferior a 60 kg, pacientes con edad igual o superior a 75 años y pacientes con antecedentes de accidente isquémico cerebral transitorio o ictus. En los pacientes con peso inferior a 60 kg la dosis recomendada de prasugrel es de 5 mg al día. En pacientes mayores, no se recomienda el uso, (aunque, si el tratamiento es imprescindible, reducir también la dosis a 5 mg). Los pacientes con antecedentes de ictus directamente no deben ser tratados con prasugrel.

Ticagrelor

Ticagrelor es un inhibidor oral, reversible y directo del receptor plaquetario ADP P2Y₁₂ que produce una inhibición del mismo más rápida y pronunciada que el clopidogrel. Su uso ha sido evaluado en el ensayo *PLATO*, un ensayo multicéntrico, aleatorizado, que comparó ticagrelor frente a clopidogrel en 18.624 pacientes con SCA (con y sin elevación del segmento ST). Ticagrelor fue más eficaz a la hora de prevenir muerte cardiovascular, infarto agudo de miocardio o ictus isquémico a los 12 meses. Respecto a la seguridad, en el brazo de ticagrelor tan sólo fue ligeramente superior la tasa de hemorragias mayores no relacionadas con cirugía (lo que incluía las hemorragias intracraneales) sin diferencias en la tasa global¹².

Tratamiento de la trombosis arterial aguda

La forma de presentación más frecuente de la trombosis arterial son los SCA con y sin ascenso del segmento ST. El objetivo fundamental del tratamiento es la reperfusión de vaso obstruido y la estabilización de la lesión coronaria. De forma secundaria, hay que tratar la isquemia residual y realizar una prevención secundaria a largo plazo. La reperfusión coronaria se puede realizar bien mediante fibrinólisis sistémica o bien mediante terapia de revascularización percutánea. Los fármacos antitrombóticos utilizados como tratamiento adyuvante son los antiagregantes plaquetarios (AAS, clopidogrel o prasugrel), heparina no fraccionada, heparina de bajo peso molecular o pentasacárido, inhibidores directos de la trombina (bivalirubina) y los inhibidores de la GP IIb/IIIa. La terapia antiagregante se mantiene a largo plazo para prevenir nuevos eventos tromboticos o la progresión de la oclusión coronaria. Por supuesto, después del evento, es imprescindible un control estricto de los factores de riesgo ateroscleróticos^{13,14}. Las guías de práctica clínica recomiendan la estrategia invasiva (coronariografía sistemática y revascularización cuando esté anatómicamente indicada) en el SCA sin elevación del ST y, en general, se acepta que la angioplastia es

superior a la fibrinólisis como tratamiento de reperfusión en el infarto agudo de miocardio.

La trombolisis intravenosa con activador tisular del plasminógeno recombinante (rtPA) sólo está indicada en las 3 primeras horas tras el infarto cerebral, siempre y cuando el paciente no cumpla una serie de criterios de exclusión como son cirugía previa, tratamiento con antitrombóticos, hipertensión arterial no controlada, hiperglucemia, presencia de sangrado intracraneal. Tras la fibrinólisis, el tratamiento anti-trombótico (básicamente antiagregante) debe demorarse 24 horas. La dosis recomendada son 0,9 mg/kg, 10% en bolo y el resto en una perfusión de 1 hora. Posteriormente, en la fase de prevención secundaria, el tratamiento recomendado son los antiagregantes plaquetarios (AAS preferiblemente), y se indica la anticoagulación oral con antivitaminas K en el caso de que el origen del ictus sea cardioembólico¹⁵.

En el caso del tratamiento de una isquemia aguda de miembro inferior, las maniobras terapéuticas van desde la infusión intravenosa de heparina no fraccionada, fibrinólisis seguida de tratamiento quirúrgico hasta la amputación si fuera necesario. La anticoagulación posterior evita la propagación del trombo y reduce la incidencia de nuevos eventos^{16,17}.

Prevención de eventos tromboembólicos arteriales

Fibrilación auricular

La fibrilación auricular (FA) es la arritmia cardíaca más frecuente, con una prevalencia global cercana al 1% de la población, llegando a estar presente en más de un 10% de las personas de edad avanzada. La FA se asocia a una elevada morbimortalidad, siendo la complicación más temida el ictus isquémico. El riesgo embólico en la FA no es homogéneo, de forma que se ha identificado la presencia de diversos factores de riesgo que han sido identificados en diversos estudios aleatorizados. Los factores de riesgo clínicos son los más importantes: edad avanzada, sexo femenino, embolismo previo, hipertensión arterial, diabetes, insuficiencia cardíaca y cardiopatía isquémica. Varios ensayos aleatorizados han demostrado la eficacia de la anticoagulación oral con antivitaminas K para la prevención del ictus. Actualmente la indicación del tratamiento antitrombótico se basa en una estimación del riesgo embólico, fundamentada en escalas clínicas. La más conocida y utilizada en la práctica clínica es la escala CHADS₂ (la cual otorga un punto a la presencia de insuficiencia cardíaca, hipertensión, diabetes, edad superior a 75 años y 2 puntos a la existencia de un ictus previo), aunque existen muchas otras. La guía ACCP, por ejem-

plo, recomienda la anticoagulación oral en pacientes con 2 o más factores de riesgo y, en el caso de ictus previo, la anticoagulación oral se recomienda directamente. En todos los casos el INR diana es de 2,5 (2,0-3,0)^{18,19}. Los pacientes clasificados como de bajo riesgo tienen la opción del AAS en vez de los anticoagulantes orales.

Tras la publicación del ensayo *RE-LY (Randomized Evaluation of Long-Term Anticoagulant Therapy)*, esperamos en breve disponer de los nuevos anticoagulantes orales para la prevención del ictus en FA, concretamente de dabigatrán etexilato, que es un inhibidor directo y reversible de la trombina. Dicho ensayo ha demostrado cómo la dosis de 110 mg/12 horas de dabigatrán tiene una eficacia similar a la de la warfarina (criterio de no inferioridad), pero con una tasa significativamente menor de hemorragias (criterio de superioridad), mientras que la dosis de 150 mg ha resultado superior a la warfarina en los criterios de eficacia con similar tasa de hemorragias. El beneficio clínico fue significativamente mayor en el brazo de dabigatrán 150 mg ($p = 0,04$). Respecto a los efectos secundarios, la dispepsia fue el más frecuente. En este ensayo tampoco la toxicidad hepática fue significativa²⁰.

Enfermedad valvular cardíaca

Mientras no existan otros factores de riesgo que obliguen a una anticoagulación sistémica (presencia de FA, insuficiencia cardíaca congestiva), los pacientes portadores de válvulas cardíacas biológicas no requieren de anticoagulación a largo plazo, pudiendo así ser tratados con antiagregantes plaquetarios. En cambio, los pacientes portadores de válvulas cardíacas metálicas precisan anticoagulación con antivitaminas K a largo plazo manteniendo el INR en torno a 3,0²¹. Los pacientes con estenosis mitral sólo tienen la opción de la antiagregación si están en ritmo sinusal y el diámetro de la aurícula derecha es inferior a 55 mm²².

Triple terapia (anticoagulación oral junto con doble antiagregación)

Existe escasa evidencia publicada sobre cuál es la estrategia óptima para el manejo de pacientes con indicación a largo plazo de anticoagulación oral que tienen que ser sometidos a terapia de revascularización percutánea. Las guías actualmente vigentes recomiendan doble antiagregación tras la implantación de un stent coronario, especialmente en el caso de dispositivos recubiertos de drogas, donde el tratamiento debe prolongarse hasta los 12 meses, y el cese prematuro del mismo se asocia un alto riesgo de trombosis del stent²³. Por tanto, en pacientes que necesariamen-

te deberían estar anticoagulados, se recomienda el uso de dispositivos sin fármacos y mantener la triple terapia sólo durante el primer mes. Tan sólo en casos estrictamente necesarios se podría utilizar stents recubiertos, preferiblemente aquellos que han demostrado ser menos trombogénicos, para así no prologar la triple terapia más allá de los 6 meses²⁴.

Complicaciones hemorrágicas. Escalas de estratificación de sangrado

La utilización de fármacos antitrombóticos cada vez más potentes incrementa el riesgo de complicaciones hemorrágicas. En el caso de los SCA, diversos registros tales como el ACUITY (Acute Catheterization and Urgent Intervention Triage Strategy)²⁵, el OASIS-5 (Organization to Assess Strategies in Acute Ischemic Syndromes)²⁶, CRUSADE (Can Rapid Stratification of Unstable Angina Patients Suppress Adverse Outcomes with Early Implementation of the ACC/AHA Guidelines)²⁷ demostraron el impacto en la mortalidad de los sangrados en el curso del SCASEST. Este último registro ha elaborado una escala clínica que puntúa entre 1 y 100 para prevenir el riesgo hemorrágico. En el caso de la FA, basándose en el registro European Heart Survey on Atrial Fibrillation, acaba de ser publicada la escala de sangrado HAS-BLED –Hypertension, Abnormal renal/liver function, Stroke, Bleeding history or predisposition, Labile INR, Elderly (>65), Drugs/alcohol concomitantly²⁸, la cual ha demostrado ser una herramienta eficaz a la hora de predecir el sangrado, sobre todo en pacientes bajo tratamiento anticoagulante oral.

Bibliografía

1. Ross R. Atherosclerosis and inflammatory disease. *N Eng J Med* 1999; 340:115-126.
2. Lee K, Lip G. Acute coronary syndromes: Virchow's triad revisited. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003; 14: 1-21.
3. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure: The JNC-7 Report. *JAMA* 2003; 289:2560-72.
4. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002; 106:3143-3421.
5. Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 1998; 352:837-853.
6. Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, De Backer G et al. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J* 2003;24:987-1003.

7. Badimon L, Vilahur G. Coronary atherothrombotic disease: progress in antiplatelet therapy. *Rev Esp Cardiol* 2008; 61:501-13.
8. Patrono C, Baigent C, Hirsh J, Roth G. Antiplatelet Drugs: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest* 2008; 133(Suppl 6):199S-233S.
9. Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* 2002; 324:71-86.
10. CAPRIE Steering Committee. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *Lancet*. 1996; 348:1329-1339.
11. Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, Montalescot G, Ruzyllo W, Gottlieb S, et al.; TRITON-TIMI 38 Investigators. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2007; 357:2001-2015.
12. Wallentin L, Becker RC, Budaj A, Cannon CP, Emanuelsson H, Held C, et al.; PLATO Investigators. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2009; 361:1045-1057.
13. Antman EM, Anbe DT, Armstrong PW, Bates ER, Green LE, Hand M, et al. ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Revise the 1999 Guidelines for the Management of Patients with Acute Myocardial Infarction) 2004. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 671-719.
14. Task Force for Diagnosis and Treatment of Non-ST-Segment Elevation Acute Coronary Syndromes of European Society of Cardiology, Bassand JP, Hamm CW, Ardissino D, Boersma E, Budaj A, Fernández-Avilés F, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. *Eur Heart J* 2007; 28:1598-1660.
15. Albers GW, Amarencu P, Easton JD, Sacco RL, Teal P; American College of Chest Physicians. Antithrombotic and thrombolytic therapy for ischemic stroke: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice guidelines (8th Edition). *Chest* 2008; 133 (Suppl 6):630S-669S.
16. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG; TASC II Working Group. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2007; 33 (Suppl 1):S1-75.
17. Sobel M, Verhaeghe R. Antithrombotic therapy for peripheral artery occlusive disease: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest* 2008; 133 (Suppl 6):815S-843S.
18. Fuster V, Rydén LE, Cannon DS, Crijns HJ, Curtis AB, Ellenbogen KA, et al.; Task Force on Practice Guidelines, American College of Cardiology/American Heart Association; Committee for Practice Guidelines, European Society of Cardiology; European Heart Rhythm Association; Heart Rhythm Society. ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for the management of patients with atrial fibrillation-executive summary: 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 (Writing Committee to Revise the 2001 Guidelines for the Management of Patients with Atrial Fibrillation). *Eur Heart J* 2006; 27:1979-2030.
19. Singer DE, Albers GW, Dalen JE, Fang MC, Go AS, Halperin JL, et al. Antithrombotic Therapy in Atrial Fibrillation: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest* 2008; 133 (Suppl 6):546S-592S.
20. Connolly SJ, Ezekowitz MD, Yusuf S, Eikelboom J, Oldgren J, Parekh A, et al; RE-LY Steering Committee and Investigators. Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2009; 361:1139-1151.
21. Sun JC, Davidson MJ, Lamy A, Eikelboom JW. Antithrombotic management of patients with prosthetic heart valves: current evidence and future trends. *Lancet* 2009; 374:565-576.
22. Salem DN, O'Gara PT, Madias C, Pauker SG. Valvular and Structural Heart Disease: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest* 2008; 133 (Suppl 6):593S-629S.
23. Grines CL, Bonow RO, Casey DE Jr, Gardner TJ, Lockhart PB, Moliterno DJ, et al.; American Heart Association; American College of Cardiology; Society for Cardiovascular Angiography and Interventions; American College of Surgeons; American Dental Association; American College of Physicians. Prevention of premature discontinuation of dual antiplatelet therapy in patients with coronary artery stents: a science advisory from the American Heart Association, American College of Cardiology, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, American College of Surgeons, and American Dental Association, with representation from the American College of Physicians. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49:734-739.
24. Lip GYH, Huber K, Andreotti F, Arnesen H, Airaksinen JK, Cuisset T, et al. Antithrombotic management of atrial fibrillation patients presenting with acute coronary syndrome and/or undergoing coronary stenting: executive summary--a Consensus Document of the European Society of Cardiology Working Group on Thrombosis, endorsed by the European Heart Rhythm Association (EHRA) and the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI). *Eur Heart J* 2010; doi: 10.1093/eurheartj/ehq117.
25. Mehra NR, Pocock S, Stone G, Clayton T, Dangas GD, Feit F, et al. Associations of major bleeding and myocardial infarction with the incidence and timing of mortality in patients presenting with non-ST-elevation acute coronary syndromes: a risk model from AUCITY trial. *Eur Heart J* 2009; 30:1457-1466.
26. Budaj A, Eikelboom JW, Mehta S, Afzal R, Chrolavicius S, Bassand JP, et al. Improving clinical outcomes by reducing bleeding in patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes. *Eur Heart J* 2009; 30:655-661.
27. Subherwal S, Bach RG, Chen A, Gage B, Rao S, Newby K, et al. Baseline risk of major bleeding in non-ST elevation myocardial infarction. *Circulation* 2009; 119:1873-1882.
28. Pisters R, Lane DA, Nieuwlaar R, de Vos CB, Crijns HJ, Lip GY. A novel user-friendly score (HAS-BLED) to assess one-year risk of major bleeding in atrial fibrillation patients: The Euro Heart Survey. *Chest*. 2010 Mar 18. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20299623.

Factores pronósticos y tratamiento de primera línea del linfoma de Hodgkin

A. SUREDA

Departament d'Hematologia. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona

Linfoma de Hodgkin en estadios iniciales

La estrategia terapéutica óptima para el tratamiento del linfoma de Hodgkin (LH) en estadios iniciales está aún sujeta a un intenso debate. El punto clave está en la posibilidad actualmente abierta de disminuir la intensidad de tratamiento sin comprometer los excelentes resultados terapéuticos obtenidos y, por lo tanto, en la posibilidad de reducir también los efectos secundarios que aparecen de manera tardía.

La clasificación de Ann Arbor junto con la modificación de Costwold permite separar los estadios iniciales de los estadios avanzados (Tabla 1). El Índice Pronóstico Internacional es utilizado en el momento actual en todos los ensayos aleatorizados para aquellos pacientes en estadios avanzados. Recientemente, también ha sido utilizado en pacientes en estadios iniciales. Sin embargo, en el momento actual, los pacientes en estadios iniciales son subclasificados en dos categorías diferentes (favorable y desfavorable) para poder definir el tratamiento (Tabla 2). Básicamente, se recomiendan más ciclos de tratamiento para aquellos pacientes desfavorables y la mayor

parte de los estudios que utilizan quimioterapia (QT) sola sólo incluyen pacientes en estadios favorables.

Aparte de los factores clínicos habituales, algunos investigadores han analizado factores biológicos que pueden aportar información pronóstica adicional a estos modelos clínicos. Posibles candidatos son la proteína p53 así como la proteína humana asociada al centro germinal^{1,2}. El poder predictivo independiente de estos marcadores es aún controvertido y ninguno de ellos ha sido aceptado de manera generalizada dentro de ensayos clínicos.

Modalidad terapéutica con tratamiento combinado

Entre los años 50 y los 80, el tratamiento estuvo basado en la utilización de radioterapia (RT) en campos muy extensos puesto que se consideraba que la RT era la única modalidad terapéutica curativa y tenía menores efectos secundarios que el esquema MOPP. Desde entonces, diferentes estudios han demostrado la superioridad del tratamiento combinado frente a la RT sola³⁻⁵. (Tabla 3). En el estudio HD7 del *German Hodgkin's Lymphoma Study*

Tabla 1. Clasificación de Ann Arbor y modificación de Costwold

Estadio	Definiciones
I	Afectación de una sola región adenopática (I) o existencia de una sola región extraganglionar afecta (I _e)
II	Afectación de dos o más regiones adenopáticas al mismo lado del diafragma (II) o existencia de una sola región extraganglionar afecta y una o más regiones adenopáticas al mismo lado del diafragma (II _e)
III	Afectación de regiones adenopáticas a ambos lados del diafragma (III), que puede acompañarse de afectación esplénica (III _s) o existencia de una afectación extraganglionar afecta (III _e) o ambas (III _{es})
IV	Afectación difusa o diseminada de uno o más tejidos extralinfáticos, con o sin afectación ganglionar asociada

Estadio	Definiciones
I	Afectación de una sola región adenopática o estructura linfoide (bazo, timo, anillo de Waldeyer)
II	Afectación de dos o más regiones adenopáticas al mismo lado del diafragma (el mediastino se considera una sola región, los hilios pulmonares se consideran dos regiones lateralizadas). El número de regiones afectas debe indicarse con un sufijo
III	Afectación de regiones adenopáticas o estructuras a ambos lados del diafragma
III ₁	Con o sin afectación esplénica, hiliar, celíaca o portal
III ₂	Con afectación de adenopatías paraaórticas, iliacas y mesentéricas
IV	Afectación extranodal, más allá de lo designado por la letra E

A: no sintomatología B; B: fiebre, sudores nocturnos, pérdida de peso; X: enfermedad bulky, ensanchamiento mediastínico > 1/3 a nivel de T5-T6, diámetro mayor de la masa > 10 cm; E: afectación extranodal, contigua o próxima a una afectación nodal; EC: estadio clínico; EP: estadio patológico.

	EORTC/GELA	O. GHSG
Factores de riesgo		
	A. Masa mediastínica voluminosa	A. Masa mediastínica voluminosa
	B. Edad ≥ 50 años	B. Afectación extranodal
	C. VSG elevada*	C. VSG elevada*
	D. ≥ 4 regiones ganglionares afectas	D. ≥ 3 regiones ganglionares afectas
Grupos de tratamiento		
PLN	PLN, estadios I-II supradiaphragmáticos, no FR	PLN, estadios I-II, no FR
Estadios iniciales favorables	Estadios I-II supradiaphragmáticos, no FR	Estadios I-II, no FR
Estadios iniciales desfavorables	Estadios I-II supradiaphragmáticos, ≥ 1 FR	Estadios I-IIA, ≥ 1 FR;
Estadios avanzados	Estadios III-IV	Estadio IIB con C/D pero no A/B
		Estadio IIB con A/B
		Estadios III-IV

EORTC/GELA: Organización Europea para el Estudio y Tratamiento del Cáncer/Grupo Francés para el Estudio de los Linfomas del Adulto; GHSG: Grupo Alemán para el Estudio del Linfoma de Hodgkin; * Velocidad de sedimentación globular (≥ 50 sin o ≥ 30 con síntomas B); PL: predominio linfocítico; PLN: predominio linfocítico nodular; FR: factores de riesgo.

Estudio	Tratamiento	SLR o SLFT	SG (%)	SG (años)
HD7 GHSG (n = 617)	RTCE	75	94	5
	ABVD (x2) + RTCE	91	94	
		p < 0,001	p = ns	
H7F EORTC (n = 333)	ILST	78	92	10
	EBVP (x 6) + RTCA	88		
		p < 0,0113	p = ns	
H8F EORTC/GELA (n = 543)	ILST	80		4
	MOPP/ABV	99		
SWOG #133 (n = 326)	ILST	81	96	3
	AV (x3) + ILST	94	98	
		p < 0,001	p = ns	

SLR: supervivencia libre de recaída; SLFT: supervivencia libre de fracaso terapéutico; SG: supervivencia global; GHSG: German Hodgkin's lymphoma Study Group; EORTC/GELA: Organización Europea para el Estudio y Tratamiento del Cáncer/Grupo Francés para el Estudio de los linfomas del Adulto; ILST: irradiación linfoide subtotal; RTCE: radioterapia en campo extenso; RTCA: radioterapia en campo afecto; SWOG: Southwest Oncology Group.

Reducción en los campos de radioterapia

Varios estudios han demostrado que la reducción de los campos de RT desde una irradiación linfoide subtotal (ILST) a una RT en campo extenso (RTCE) o RT en campo afecto (RTCA) ha conseguido resultados similares pero con menores efectos indeseables a largo plazo. En el estudio aleatorizado del grupo de Milán⁷ se demostró que ABVD seguido de RTCE o RTCA conseguía iguales resultados. El estudio HD8 del GHSG demostró resultados similares: menos toxicidad aguda hematológica y extrahematológica e incluso una tendencia a una menor incidencia de neoplasias secundarias (NS) en el brazo de la RTCA en relación al brazo de la RTCE⁸. Un subanálisis considerando pacientes de edad avanzada demostró también que estos pacientes se beneficiaban más de RTCA.

Group (GHSG)^{5,3} los pacientes que recibieron tratamiento combinado tuvieron una mejor supervivencia libre de fracaso terapéutico (SLFT) que los pacientes tratados con radioterapia sola. En los estudios H7F y H8F del *Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte (GELA)/European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC)*^{5,6} los resultados fueron muy similares. En el momento actual está muy claro que el tratamiento combinado no sólo mejora la supervivencia libre de progresión (SLP) sino que también reduce la necesidad de administrar RT complementaria en localizaciones de enfermedad subclínica.

La tentación de omitir la radioterapia

Con más del 90% de pacientes curados con el tratamiento de primera línea, la supervivencia de los pacientes a largo plazo está básicamente influenciada por los efectos secundarios a largo plazo y, en concreto, por las NS. La utilización de volúmenes más pequeños y mejor definidos permitió la utilización de RT más dirigida basada en una mejoría de las técnicas de imagen y, en aquellos casos en donde estaba indicado, en la utilización de herramientas como la RT con intensidad modulada. Sin embargo, y hasta el momento actual, no se ha podido demostrar

una reducción significativa en los efectos secundarios a largo plazo para aquellos largos supervivientes con un LH clásico⁹. En un metaanálisis recientemente publicado comparando RTCA vs. RTCE (19 estudios, 3.221 pacientes incluidos) no se demostraron diferencias estadísticamente significativas en el riesgo a desarrollar NS, a pesar de que hubo más neoplasias de mama en el grupo de pacientes tratados con RTCE¹⁰.

Debido a este riesgo aumentado de desarrollar toxicidades secundarias, diversos grupos han propuesto en estos pacientes la utilización de esquemas de quimioterapia, fundamentalmente ABVD, sin RT complementaria (Tabla 4)¹¹⁻¹⁸. En cuatro de estos estudios se ha utilizado quimioterapia que ofrece resultados más pobres que ABVD y, por tanto, no pueden ser utilizados como comparadores adecuados. Además, algunos de estos estudios incluyeron un número demasiado pequeño de pacientes para poder detectar diferencias estadísticamente significativas.

Los dos estudios más grandes sí tenían poder suficiente para poder detectar diferencias significativas. En el estudio H9F de la EORTC/GELA¹⁷, los pacientes eran aleatorizados a recibir RTCA 36 Gys, RTCA 20 Gys o no RT después de recibir 6 ciclos de EBVP (epirubicina, bleomicina, vinblastina y prednisona). La inclusión de pacientes en el brazo sin RT tuvo que ser detenida de manera prematura, debido a la detección de una tasa de recaídas superior a la permitida dentro del ensayo. En el estudio desarrollado por el *National Cancer Institute of Canada*¹⁸, la SLP fue superior en pacientes tratados con terapia combinada que en aquellos tratados con ABVD solo, a pesar de que no se observaron diferencias estadísticamente significativas ni en supervivencia libre de eventos (SLEv) ni en supervivencia global (SG). En un subanálisis realizado en el subgrupo de pacientes desfavorables, la SLP también fue superior para aquellos que fueron tratados con terapia combinada.

Tabla 4. Estudios aleatorizados que comparan tratamiento combinado con quimioterapia sola en pacientes en estadios iniciales

Estudio	Diseño	N	Resultados
Longo ¹¹	MOPP vs. MOPP + RTCE	106	No diferencia
Biti ¹²	MOPP vs. MOPP + RTCE	99	No diferencia
Pavlosky ¹³	CVPP vs. CVPP + RTCA	277	No diferencia en el subgrupo favorable
Strauss ¹⁴	ABVD vs. ABVD + RTCE o RTCA	152	No diferencia
Laskar ¹⁵	ABVD vs. ABVD + RTCA	99	No diferencia
Nachman ¹⁶	CVP-ABV vs. CVP-ABV + RTCA	362	No diferencia
Egbali ¹⁷	EBVP vs. EBVP + RTCA	578	SLEv p < 0,001
Meyer ¹⁸	INST +/- ABVD vs. ABVD	399	SLE p = 0,006

RTCE: radioterapia en campo extenso; RTCA: radioterapia en campo afecto; INST: irradiación nodal subtotal; SLEv: supervivencia libre de eventos; SLE: supervivencia libre de enfermedad.

Estudios actuales

En el momento actual, el GHSG tiene en marcha su estudio HD13 para el grupo de pacientes favorables que los aleatoriza en cuatro grupos: ABVD (x 2 ciclos) vs. ABV (x 2 ciclos) vs. ABD (x 2 ciclos) vs. AV (x 2 ciclos), todas las ramas seguidas de 30 Gys de RTCA. Las ramas AV y ABD fueron cerradas prematuramente por un número excesivo de recaídas de la enfermedad de base. En el grupo de pacientes desfavorables, el protocolo HD11 también del GHSG aleatoriza 4 ciclos de ABVD vs. 4 ciclos de BEACOPP basal seguidas ambas ramas de 20 o 30 Gys de RTCA. El análisis definitivo no demuestra ninguna ventaja de la utilización de BEACOPP basal frente a ABVD. En Estados Unidos, los pacientes favorables están siendo aleatorizados a 6 ciclos de ABVD, seguidos de RTCA vs. Stanford V, seguido de RT en zonas ≥ 5 cm.

El papel de la tomografía por emisión de positrones en el tratamiento adaptado al riesgo terapéutico

Finalmente, es de destacar también el papel de las nuevas técnicas de imagen (tomografía por emisión de positrones, FDG-PET) en la reevaluación temprana de los pacientes y la posibilidad de modificar el tratamiento administrado. En este sentido, hay que hacer especial mención a tres estudios:

1. En un estudio retrospectivo desarrollado por Mikhaeel *et al.*¹⁹, se realizó un FDG-PET a un grupo de 85 pacientes con LH clásico después de 2-3 ciclos de quimioterapia. En 63 pacientes el resultado fue negativo, en 9 mínimamente positivo y positivo en los otros 13. La SLP a los 5 años fue del 92, 88 y 42%, respectivamente.

2. Estos hallazgos fueron confirmados en un grupo de 77 pacientes incluidos en un estudio prospectivo.

La negatividad del FDG-PET realizado después de 2 ciclos de quimioterapia se asoció a una mejoría significativa no sólo de la SLP, sino también de la SG²⁰.

3. Finalmente, en el estudio realizado por Gallamini *et al.*²¹, el objetivo final era el valor predictivo positivo de un PET interino realizado después de los dos primeros ciclos de quimioterapia en la SLP a los 2 años. El valor predictivo positivo del PET en esta situación fue del 90% y el valor predictivo negativo del 97%. La SLP a los 2 años para los dos grupos de pacientes (PET negativo y PET positivo) fue del 96 y 6%, respectivamente.

Tabla 5. Factores de riesgo independientes dentro del Índice Pronóstico Internacional

Factor	Riesgo relativo	p
Albúmina sérica < 4 g/dL	1,49	< 0,001
Hemoglobina < 10,5 g/dL	1,35	0,006
Sexo masculino	1,35	0,001
Estadio IV	1,26	0,011
Edad ≥ 45 años	1,39	0,001
Leucocitos ≥ 15.000/mm ³	1,41	0,001
Linfocitos < 600/mm ³ o < 8% de la fórmula leucocitaria	1,38	0,002

En resumen, las recomendaciones actuales para los pacientes con LH que debutan en estadios iniciales es el tratamiento combinado con ABVD y RTCA. En el estudio HD10 del GHSG centrado en pacientes con LH en estadios iniciales y pronóstico favorable, la administración de 2 ciclos de ABVD con RT complementaria posterior (20 o 30 Gys) ofreció iguales resultados en términos de SLFT que la administración de 4 ciclos del mismo esquema. En estadios iniciales pero pronóstico desfavorable la administración de 4 ciclos de ABVD no fue inferior a la administración de 4 ciclos de BEACOPP basal. Debido a los excelentes resultados obtenidos con esta aproximación terapéutica y la incidencia posterior de NS, los estudios futuros irán dirigidos a disminuir aún más la cantidad de tratamiento administrada al paciente y a la modificación del mismo en función de la respuesta precoz.

Linfoma de Hodgkin en estadios avanzados

Existe mucha información en la literatura acerca de los factores pronósticos válidos para el LH en estadios avanzados y algunos grupos desarrollaron índices pronósticos para la SG según datos obtenidos de grupos de pacientes de tamaño moderado. Más recientemente, se ha utilizado *The International Database on Hodgkin's Disease* para desarrollar un modelo paramétrico que permitía predecir la supervivencia en pacientes en estadios avanzados al diagnóstico²². Para la construcción de este índice pronóstico se utilizaron datos de 5.141 pacientes con LH en estadios avanzados y tratados con QT con o sin RT complementaria procedentes de 25 centros y grupos cooperativos. El índice pronóstico fue definido como el número de factores pronósticos adversos presentes al diagnóstico. Se identificaron siete factores con un efecto pronóstico adverso independiente similar (Tabla 5). La adición de un factor pronóstico adverso suponía la reducción en un 7 a 8% de la curva de SLP, siendo ésta del 84% para aquellos pacientes sin factores de

mal pronóstico al diagnóstico (7% de la población global) y 42% para aquellos pacientes con cinco o más factores de mal pronóstico (7% también de la población global) (Figura 1). De todas maneras y a pesar de lo pensado inicialmente, este índice pronóstico no es capaz de identificar un subgrupo de pacientes de especial mal pronóstico potencialmente subsidiarios de terapéuticas diferenciadas.

El LH en estadios avanzados era considerado una neoplasia fatal a finales de los años 60, antes del desarrollo de los esquemas de poliquimioterapia de los que se dispone en la actualidad. Con el primer esquema desarrollado, el esquema MOPP (mostaza nitrogenada, vincristina, procarbina y prednisona), aproximadamente el 80% de los pacientes en estadios avanzados tratados conseguían una RC y el 55% de ellos estaban vivos y libre de enfermedad a los 10 años²³. En un intento de evitar las resistencias al MOPP y reducir los efectos secundarios agudos relacionados con este régimen, los investigadores del grupo de Milán²⁴ desarrollaron el esquema ABVD (adriamicina, bleomicina, vinblastina, dacarbacina). Aproximadamente el 46% de los pacientes resistentes al MOPP conseguía una RC con el ABVD. Teniendo en cuenta la capacidad de rescate del ABVD para pacientes resistentes al MOPP y viceversa, se desarrolló el esquema alternante MOPP/ABVD en un intento de incorporar dos regímenes quimioterápicos sin resistencia cruzada en mismo esquema terapéutico. Los hallazgos iniciales de este estudio del grupo italiano demostraron la superioridad del régimen alternante frente al MOPP convencional para pacientes con LH en estadio IV²⁵.

En 1985, el grupo de Vancouver²⁶ reportó los resultados del esquema híbrido MOPP/ABV, en el que MOPP era administrado en los días 1 a 7 y el ABV en el día 8. Un 88% de los pacientes conseguía RC y la SG actuarial a los 4 años era del 90%. En este mismo momento, se iniciaron otros estudios prospectivos aleatorizados que comparaban el esquema híbrido MOPP/ABV con los protocolos secuenciales (MOPP Æ ABVD) y alternantes (MOPP/ABVD). Los resultados de estos estudios demostraban que el esquema híbrido MOPP/ABV es tan efectivo como el esquema alternante MOPP/ABVD y más efectivo que el tratamiento secuencial^{27,28}.

El trabajo que más recientemente analiza el papel de los diferentes esquemas terapéuticos en el tratamiento del LH en estadios avanzados es el publicado por Duggan²⁹. Se aleatorizaron 856 pacientes entre ABVD y MOPP/ABV; la tasa de RC (76 vs. 80%, p = 0,16), la SLE a los 5 años (63 vs. 61%, p = 0,42) y la SG a los 5 años (82 vs. 81%, p = 0,82) fueron similares para ABVD y MOPP/ABV, respectivamente.

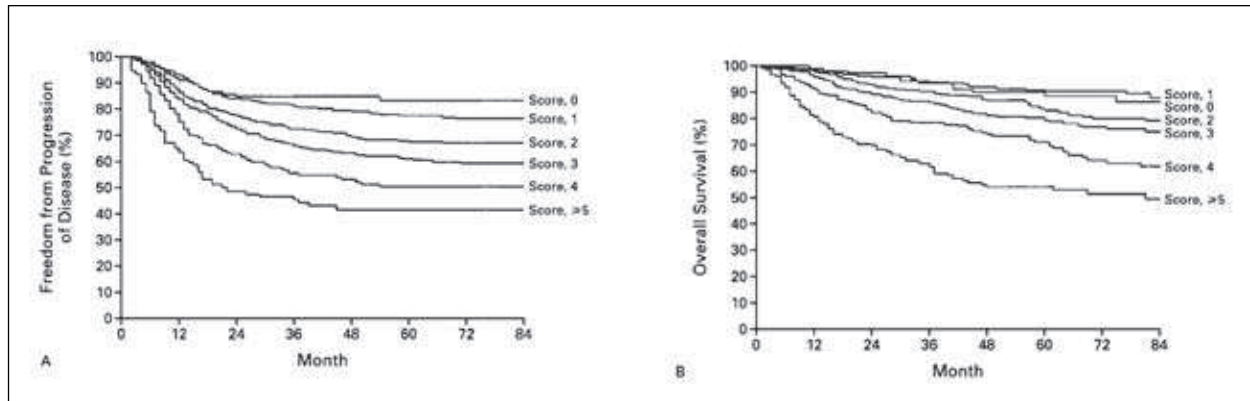


Figura 1. Índice pronóstico para pacientes con LH en estadios avanzados tratados con QT. A: utilización del índice pronóstico para predecir la supervivencia libre de progresión en 1.618 pacientes con LH avanzada. B: supervivencia global en el mismo grupo de pacientes (Hasenclever & Diehl, NEJM, 1998).

Sin embargo, las toxicidades hematológica y pulmonar significativas clínicamente fueron más comunes con el esquema híbrido MOPP/ABV. No hubo diferencias en relación con la toxicidad cardíaca; sin embargo, la mortalidad relacionada directamente con el tratamiento fue superior en la rama de MOPP/ABV ($n = 15$) con respecto a la rama de ABVD ($n = 9$) y la incidencia de SMD y LA secundarias también fue significativamente superior en los pacientes tratados con el esquema híbrido en relación con los tratados con el ABVD.

Todos estos estudios presentados anteriormente indican que los resultados del ABVD son similares a los de los esquemas híbridos o alternantes, pero llevan asociados una significativa menor toxicidad a corto y largo plazo. Hasta el momento, el ABVD se considera el tratamiento estándar de los pacientes con LH que debutan en estadios avanzados y éste debe ser el régimen frente al que se deberían comparar las nuevas propuestas terapéuticas con regímenes más intensificados.

Regímenes con intensificación de dosis

A principios de los años 90, se iniciaron diferentes estudios clínicos diseñados con el objetivo de analizar los resultados de la intensificación de dosis en pacientes con LH en estadios avanzados. El esquema de poliquimioterapia Stanford V de 12 semanas de duración, solo o combinado con RT sobre áreas de enfermedad voluminosa, fue desarrollado en 1988 con el objetivo de mejorar e incrementar la tasa de RC y minimizar los efectos secundarios a corto y largo plazo³⁰. Las características más destacadas de este esquema terapéutico incluyen un periodo de tratamiento corto, aumento de dosis o mantenimiento de la misma en determinados fármacos, reducción en las

dosis acumulativas de bleomicina y adriamicina con respecto al ABVD estándar o a los esquemas híbridos y marcada reducción en la mostaza nitrogenada con reducción de la dosis total de procarbacin. La RT complementaria a dosis de 36 Gy quedaba restringida a áreas voluminosas o a enfermedad esplénica macroscópica, evitando la irradiación de axilas y región cervical alta a menos que existiera enfermedad voluminosa a ese nivel. La actualización de los resultados clínicos de este protocolo³¹ con un seguimiento mediano de 5,4 años incluyendo un total de 142 pacientes demuestra una SLP a los 5 años del 89% con una SG del 90%. Ningún paciente progresó bajo tratamiento y la mortalidad relacionada con el procedimiento fue del 0%. La SLP fue significativamente superior en aquellos pacientes con 0-2 factores de mal pronóstico, según el índice de Hasenclever y Diehl, en relación con aquellos que presentaban un *score* de 3 o superior (94 vs. 75%, $p = 0,0001$). No se objetivaron NS y hubo 42 embarazos después de la finalización del tratamiento.

El GHSG desarrolló un modelo matemático de crecimiento tumoral y efectos de la QT para intentar cuantificar esta dependencia. El modelo permitía estimar la distribución de los tiempos de latencia (tiempo que necesita el tumor para crecer desde una célula hasta el desarrollo de manifestaciones clínicas) y la distribución de la quimiosensibilidad en una población de pacientes, basándose en datos clínicos de control tumoral y QT administrada. Este modelo matemático se utilizó para simular el efecto de diferentes estrategias de intensificación y escalada de dosis. Basándose en estas simulaciones, se llegó a la conclusión de que la reducción de los intervalos entre ciclos de cuatro a tres semanas sólo supondría pequeños beneficios en términos de control tumoral (aproximadamente un 3% de tasa de control tumoral a los 5 años); en cambio, un incremento de un 30% en la dosis to-

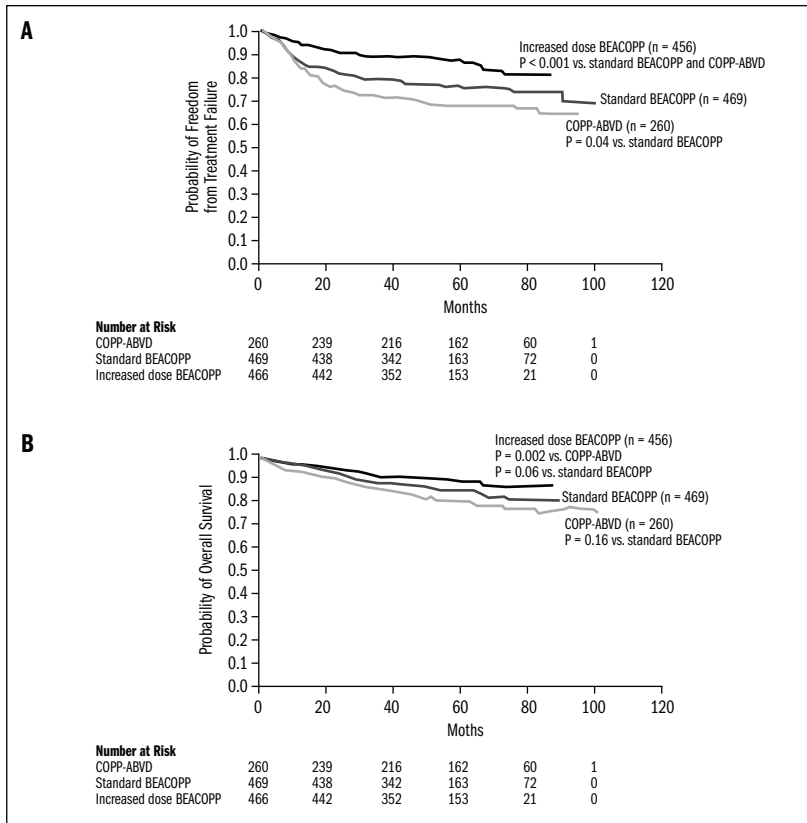


Figura 2. COPP/ABVD versus BEACOPP basal versus BEACOPP escalado como tratamiento de primera línea en pacientes con LH en estadios avanzados. Resultados del protocolo HD9 del German Hodgkin's Study Group. Supervivencia libre de fracaso terapéutico y supervivencia global. Diehl et al. NEJM, 2003.

tal de QT administrada en relación con el tratamiento estándar podía suponer un beneficio del 10% en el control tumoral a los 10 años. Ésta fue la base teórica para el desarrollo del protocolo HD9 del GHSG^{33,34}. El objetivo del HD9 fue el evaluar si un incremento moderado de dosis y/o una aceleración en la poli-QT estándar podía mejorar los resultados a largo plazo en pacientes con LH en estadios avanzados. Se compararon dos variantes de un nuevo esquema terapéutico compuesto por bleomicina, etopósido, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, procarbacin y prednisona (BEACOPP en su versión basal y en su versión escalada) con el esquema habitual utilizado en estos pacientes por el GHSG: el COPP/ABVD³⁵. Desde febrero de 1993 a marzo de 1998, 1.201 pacientes elegibles fueron aleatorizados a recibir 8 ciclos del esquema alternante COPP/ABVD, el esquema BEACOPP en dosificación basal (x 8 ciclos) o en su versión escalada (x 8 ciclos). En todos los casos, se administró RT complementaria si estaba indicado desde el punto de vista clínico. La inclusión de pacientes en el grupo de COPP/ABVD se detuvo en septiembre de 1996 tras el primer análisis interino debido a los resultados significativamente inferiores conseguidos con este esquema terapéutico. A partir de aquí,

se continuó con el reclutamiento de pacientes para los dos grupos restantes hasta conseguir un total de 500 pacientes en cada uno de los grupos. Doscientos sesenta pacientes fueron aleatorizados al brazo de COPP/ABVD, 469 en el brazo del BEACOPP estándar y 466 en el brazo del BEACOPP escalado. No hubo diferencias significativas entre los tres grupos de pacientes. Los resultados en términos de control de la enfermedad fueron significativamente superiores para aquellos pacientes que recibieron el BEACOPP en su versión escalada (Figura 2). La tasa de recaídas también fue significativamente inferior en los pacientes tratados con el BEACOPP escalado en comparación con los tratados con COPP/ABVD o con la versión basal del BEACOPP. Todos los pacientes con masas voluminosas iniciales o con enfermedad residual tras ocho ciclos de tratamiento fueron candidatos a recibir RT complementaria: 30 Gy en el caso de las masas voluminosas iniciales y 40 Gy para aquellas zonas de enfermedad visible. Un 71% de

los pacientes tratados con los esquemas BEACOPP recibieron RT complementaria mientras que esta proporción fue sólo del 64% en los pacientes tratados con COPP/ABVD.

Estos resultados han hecho que el GHSG considere el BEACOPP como el tratamiento estándar de los pacientes con LH en estadios avanzados. Recientemente, han desarrollado una variante del mismo en el que se administran los mismos fármacos a iguales dosis pero en intervalos de 14 días³⁶. Los resultados de este estudio indican que la administración del esquema BEACOPP en intervalos de 14 días con G-CSF concomitante es posible y efectiva desde el punto de vista terapéutico con una toxicidad aguda moderada.

A pesar de que estos resultados extremadamente prometedores del esquema BEACOPP en términos de tasa de respuestas y supervivencia posterior han hecho que la comunidad científica eventualmente considere este protocolo como el tratamiento estándar de los pacientes con LH en estadios avanzados, es necesario tener en cuenta dos aspectos importantes: en primer lugar, que la validación externa de un determinado protocolo no siempre ofrece los resultados que puede aportar el grupo original, tal como ha pasado hasta el momento con el Stanford V y, por otro

lado, que los efectos secundarios tanto a corto como a largo plazo de este esquema terapéutico deben ser aún evaluados detenidamente para determinar el beneficio final.

En primer lugar, la toxicidad hematológica es significativamente superior en el grupo de pacientes tratados con BEACOPP escalado en relación con los pacientes tratados con COPP/ABVD o el BEACOPP en su versión basal. Otro aspecto a considerar es la toxicidad a largo plazo del tratamiento administrado que está básicamente representada por la incidencia de NS en el grupo de pacientes a analizar. Se ha contabilizado un caso de LA secundaria, incluyendo SMD previos en el grupo de pacientes tratados con el COPP/ABVD, cuatro en el grupo del BEACOPP basal y nueve en el grupo del BEACOPP escalado. La tasa actuarial de LA secundarias a los cinco años del desarrollo del LH fue del 0,4% en el grupo COPP/ABVD, 0,6% en el del BEACOPP basal y 2,5% en el del BEACOPP escalado ($p = 0,03$). Esta complicación debe sopesarse con la tasa inferior de recaídas y progresiones tempranas y la elevada tasa de SLP y SG a los 5 años, y con el hecho de que en muchas ocasiones las LA secundarias aparecen años más tarde como resultado de los tratamientos administrados en pacientes en recaída. Se han detectado tumores sólidos secundarios en tres, ocho y dos pacientes, respectivamente, y LNH secundarios en siete, cuatro y cinco pacientes pertenecientes a los tres grupos terapéuticos. Parece claro que la incidencia de SMD y LA secundarias es claramente superior tras la utilización del BEACOPP escalado, mientras que parece más frecuente el desarrollo de segundas neoplasias sólidas y LNH en la rama del COPP/ABVD (2,7 vs. 0,6%, $p = 0,050$).

Todas estas consideraciones que hacen referencia a efectos secundarios a corto y largo plazo, así como un incremento significativo en los costes económicos que suponen este nuevo tipo de tratamiento intensificado, hacen que el esquema BEACOPP no esté aún considerado en la actualidad dentro de la comunidad científica como el tratamiento estándar del LH en estadios avanzados, por lo menos de manera generalizada. En este sentido, la EORTC ha finalizado recientemente un estudio prospectivo multicéntrico y aleatorizado que pretende comparar la SLP a los tres años entre pacientes con LH diagnosticados en estadios avanzados y con tres o más factores de mal pronóstico según el *score* de Hasenclever y Diehl tratados con ABVD (x 8 ciclos), considerado como el tratamiento estándar de este subgrupo de pacientes y aquellos tratados con BEACOPP (x 4 ciclos en su forma basal + x 4 ciclos en su forma escalada). Se permite la RT complementaria en aquellos pacientes en que exista enfermedad residual tras finalizar el tratamiento y se plantean como objetivos secundarios, la SG entre ambos grupos de pacientes, la incidencia

de neoplasias NS, estudios de fertilidad después del tratamiento, estudios de calidad de vida y de fármaco-economía. Es probable que los resultados definitivos de un estudio prospectivo de estas características permitan considerar de manera definitiva el esquema BEACOPP como el tratamiento estándar para este grupo de pacientes de elevado riesgo.

Papel de la RT en el tratamiento de los LH en estadios avanzados

Un aspecto importante en el tratamiento del LH en fases avanzadas es la eficacia añadida y la toxicidad tardía de la RT complementaria después de un esquema de QT que contiene antraciclinas. En un estudio de la EORTC recientemente publicado³⁷, los pacientes que conseguían una RC después de seis a ocho ciclos de MOPP/ABV eran aleatorizados a recibir RT sobre campo afecto o no más tratamiento. El análisis de 739 pacientes demostró que la administración de RT adicional no mejoró ni la SG ni la SLP de aquellos pacientes que ya habían conseguido una RC con el esquema quimioterápico. Sorprendentemente, aquellos pacientes en remisión parcial (RP) tras la QT y tratados con RT adicional conseguían una SG a los 5 años del 85-90%, comparable a la de aquellos pacientes que conseguían ya una RC con QT sola.

Bibliografía

1. Natkuman Y, His ED, Aoun P, et al. Expression of the human germinal centre-associated lymphoma (HGAL) protein identifies a subset of classic Hodgkin's lymphoma of germinal centre derivation and improved survival. *Blood* 2007; 109: 298-305.
2. Sup SJ, Alemany CA, Pohlman B, et al. Expression of bcl-2 in classical Hodgkin's lymphoma: an independent predictor of poor outcome. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3773-9.
3. Press OW, LeBlanc M, Lichter AS, et al. Phase III randomized intergroup trial of subtotal lymphoid irradiation versus doxorubicin, vinblastin and subtotal lymphoid irradiation for stage IA to IIA Hodgkin's disease. *J Clin Oncol* 2001; 19: 4238-44.
4. Sieber M, Franklin J, Tesch H, et al. Two cycles of ABVD plus extended field radiotherapy is superior to radiotherapy alone in early stage Hodgkin's disease: results of the German Hodgkin's Study Group Trial HD7. *Blood* 2002; 100: A341.
5. Noordijk EM, Carde P, Dupouy N, et al. Combined-modality therapy for clinical stage I or II Hodgkin's lymphoma: long term results of the European Organization for Research and Treatment of Cancer H7 randomized controlled trials. *J Clin Oncol* 2006; 24: 3128-35.
6. Engert A, Schiller P, Josting A, et al. Involved-field radiotherapy is equally effective and less toxic compared with extended-field radiotherapy after four cycles of chemotherapy in patients with early-stage unfavourable Hodgkin's lymphoma: results of the HD8 trial of the German Hodgkin's Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3601-8.
7. Bonadonna G, Bonfante V, Viviani S, et al. ABVD plus subtotal nodal versus involved-field radiotherapy in early-stage

- Hodgkin's disease: long-term results. *J Clin Oncol* 2004; 22: 2835-41.
8. Klimm B, Eicht TT, Haverkamp H, et al. Poorer outcome of elderly patients treated with extended-field radiotherapy compared with involved-field radiotherapy after chemotherapy for Hodgkin's lymphoma: and analysis from the German Hodgkin's Lymphoma Study Group. *Ann Oncol* 2007; 18: 357-63.
 9. Dores GM, Metayer C, Curtis RE, et al. Second malignant neoplasms among long term survivors for Hodgkin's disease: a population-based evaluation over 25 years. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3484-94.
 10. Franklin J, Pluetschow A, Paus M, et al. Second malignancy risk associated with treatment of Hodgkin's lymphoma: meta-analysis of the randomized trials. *Ann Oncol* 2006; 17: 1749-60.
 11. Longo DL, Glatstein E, Duffey PL, et al. Radiation therapy versus combination chemotherapy in the treatment of early-stage Hodgkin's disease: seven-year results of a prospective randomized trial. *J Clin Oncol* 1991; 9: 906-17.
 12. Biti GP, Cimino G, Carton C, et al. Extended-field radiotherapy is superior to MOPP chemotherapy for the treatment of pathologic stage I-IIA Hodgkin's disease: eight-year update of an Italian prospective randomized study. *J Clin Oncol* 1992; 10: 378-82.
 13. Pavlovsky S, Maschio M, Santarelli MT, et al. Randomized trial for chemotherapy versus chemotherapy plus radiotherapy for stage I-II Hodgkin's disease. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80: 1466-73.
 14. Straus DJ, Portlock CS, Qin J, et al. Results of a prospective randomized clinical trial of doxorubicin, bleomycin, vinblastine, and dacarbazine (ABVD) followed by radiation therapy (RT) versus ABVD alone for stages I, II, and IIIA nonbulky Hodgkin's disease. *Blood* 2004; 104: 3483-9.
 15. Laskar S, Gupta T, Vimal S, et al. Consolidation radiation after complete remission in Hodgkin's disease following six cycles of doxorubicin, bleomycin, vinblastine and dacarbazine chemotherapy: is there a need? *J Clin Oncol* 2004; 22: 62-8.
 16. Nachman JB, Spoto R, Herzog P, et al. Randomized comparison of low-dose involved-field radiotherapy and no radiotherapy for children with Hodgkin's disease who achieve a complete response to chemotherapy. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3765-71.
 17. Eghbali H, Brice P, Creemers GY, et al. Comparison of the three radiation dose levels after EBVP regimen in favourable supradiaphragmatic clinical stages (CS) I-II Hodgkin's lymphoma (HL): Preliminary results of the EORTC-GELA H9-F Trial. *Blood* 2005; 106: A106.
 18. Meyer RM, Gospodarowicz MK, Connors JM, et al. Randomized comparison of ABVD chemotherapy with a strategy that includes radiation therapy in patients with limited-stage Hodgkin's lymphoma: National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group and the Eastern Co-operative Oncology Group. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4634-42.
 19. Mikhael NG, Hutchings M, Fields PA, et al. FDG-PET after two to three cycles of chemotherapy predicts progression-free and overall survival in high-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 2005; 16: 1514-23.
 20. Hutchings M, Loft A, Hansen M, et al. FDG-PET after two cycles of chemotherapy predicts treatment failure and progression-free survival in Hodgkin's lymphoma. *Blood* 2006; 107: 52-9.
 21. Gallamini A, Rigacci L, Merli F, et al. The predictive value of positron emission tomography scanning performed after two courses of standard therapy on treatment outcome in advanced stage Hodgkin's disease. *Haematologica* 2006; 91: 471-81.
 22. Hasenclever D, Diehl V. A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 1998; 339: 1506-14.
 23. De Vita VT, Simon RM, Hubbard SM, et al. Curability of advanced Hodgkin's disease with chemotherapy. *Ann Intern Med* 1980; 92: 587-95.
 24. Bonadonna G, Zucali R, Monfardini S, et al. Combination chemotherapy of Hodgkin's disease with adriamycin, bleomycin, vinblastine, and imidazole carboxamide versus MOPP. *Cancer* 1975; 36: 252-9.
 25. Bonadonna G, Valagussa P, Santoro A. Alternating non-cross resistant combination chemotherapy or MOPP in stage IV Hodgkin's disease. A report of 8-year results. *Ann Intern Med* 1986; 104: 739-46.
 26. Klimo P, Connors JM. MOPP/ABV hybrid program: combination chemotherapy based on early introduction of seven effective drugs for advanced Hodgkin's disease. *J Clin Oncol* 1985; 3: 1174-82.
 27. Connors JM, Klimo P, Adams G, et al. Treatment of advanced Hodgkin's disease with chemotherapy: Comparison of MOPP/ABV hybrid regimen with alternating courses of MOPP and ABVD. A report of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 1997; 16: 1638-45.
 28. Santoro A, Bonadonna G, Valagussa P, et al. Long-term results of combined chemotherapy-radiotherapy approach in Hodgkin's disease: Superiority of ABVD plus radiotherapy versus MOPP plus radiotherapy. *J Clin Oncol* 1987; 5: 27-37.
 29. Duggan DB, Petroni GR, Johnson JL, et al. Randomized comparison of ABVD and MOPP/ABV hybrid for the treatment of advanced Hodgkin's disease: Report of an Intergroup trial. *J Clin Oncol* 2003; 21: 607-14.
 30. Bhatia S, Robison LL, Oberlin O, et al. Breast cancer and other second neoplasms after childhood Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 1996; 334: 745-51.
 31. Horning SJ, Hoppe RT, Breslin S, Barlett NL, Brown BW, Rosenberg SA. Stanford V and radiotherapy for locally extensive and advanced Hodgkin's disease: Mature results of a prospective trial. *J Clin Oncol* 2002; 20: 630-7.
 32. Hasenclever D, Loeffler M, Diehl V. Rationale for dose escalation of first line conventional chemotherapy in advanced Hodgkin's disease. *Ann Oncol* 1996; 7 (supl 4): 595-8.
 33. Diehl V, Sieber M, Rüffer U, et al. BEACOPP: An intensified chemotherapy regimen in advanced Hodgkin's disease. *Ann Oncol* 1997; 8: 143-8.
 34. Diehl V, Franklin J, Hasenclever D, et al. BEACOPP, a new dose-escalated and accelerated regimen, is at least as effective as COPP/ABVD in patients with advanced-stage Hodgkin's lymphoma: Interim report from a trial of the German Hodgkin's Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol* 1997; 16: 3810-21.
 35. Diehl V, Franklin J, Freundsuh M, et al. Standard and increased-dose BEACOPP chemotherapy compared with COPP/ABVD for advanced Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 2003; 348: 2386-95.
 36. Sieber M, Bredenfeld H, Josting A, et al. 14-day variant of the bleomycin, etoposide, doxorubicin, cyclophosphamide, vincristine, procarbazine, and prednisone regimen in advanced-stage Hodgkin's lymphoma: Results of a pilot study of the German Hodgkin's lymphoma study group. *J Clin Oncol* 2003; 21: 1734-9.
 37. Aleman BM, Raemaekers JM, Tirelli U, et al. European Organization for Research and Treatment of Cancer Lymphoma Group. Involved-field radiotherapy for advanced Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 2003; 348: 2396-406.

Tratamiento del linfoma del manto en primera línea y en rescate

R. ARRANZ, A. GARCÍA NOBLEJAS

Servicio de Hematología. Hospital Universitario de La Princesa. Madrid

Tratamiento del linfoma de células del manto

El planteamiento terapéutico en el LCM debe sustentarse sobre los siguientes conceptos:

1. Es un linfoma agresivo e incurable en la mayoría de los casos, con excepción de la entidad recientemente reconocida, el LCM *in situ*, compatible con una supervivencia de 8-10 años, similar a la del linfoma folicular. Por este motivo, la indicación terapéutica suele hacerse precozmente. Sin embargo, un pequeño porcentaje de los casos se podría beneficiar de una política de vigilancia expectante. En un estudio de Martin *et al.* se observa que en un 32% de los pacientes puede demorarse el tratamiento más de 3 meses, y en un 16% de éstos no es preciso tratamiento en ningún momento del estudio que tiene una mediana de seguimiento de 41 meses¹. Los problemas que plantea este estudio a la hora de la aplicación clínica es que se trata de un estudio observacional con una recogida de datos retrospectiva, en el que ni el MIPI, la expresión de Ki-67 ni la delección p53 se asocian con una necesidad precoz de tratamiento. Por ahora, no disponemos de marcadores para poder seleccionar a estos pacientes en los que puede demorarse el inicio del tratamiento.

2. No existe tratamiento estándar. Las estrategias terapéuticas han evolucionado de forma similar a las realizadas en otras entidades B, con peores resultados. Los primeros estudios tras el reconocimiento de la entidad evidenciaron supervivencias de 2-3 años, sin detectar diferencias entre los esquemas de monoterapia y poliquimioterapia con y sin antraciclinas².

3. Es un linfoma quimiosensible al diagnóstico, pero la duración de la respuesta es corta y el pronóstico es adverso tras la recaída por su habitual refractariedad.

4. La baja incidencia de este linfoma –en España de 0,5-1 por 100.000 habitantes/año– y la edad media de la población afectada dificultan la realización de ensayos con óptimo nivel de evidencia. La mayoría de estos ensayos son de fase II, y el objetivo principal de eficacia es la tasa de respuestas globales y completas.

5. A pesar de las dificultades que plantea esta entidad, la supervivencia se ha duplicado en la última década³. Durante los últimos años han mejorado los tratamientos de primera línea y particularmente los

tratamientos de rescate, con la posibilidad de aplicación de nuevos agentes, cuyo desarrollo es actualmente un área de gran actividad de investigación en este linfoma.

Tratamiento de primera línea

Quimioinmunoterapia

El esquema más empleado es el CHOP, con el que se comunican tasas de remisiones completas (RC) del 7-50%, con una duración media de 1 año⁴. Con análogos de las purinas, hay menos estudios. Con fludarabina en monoterapia, la tasa de RC es baja⁵. Más prometedores parecen los esquemas en combinación con rituximab y/o ciclofosfamida. En general, los esquemas que contienen análogos de las purinas se han utilizado preferentemente en segunda línea. La mieloinmunosupresión que inducen y la dificultad para la movilización de progenitores tras su administración han condicionado su uso.

La incorporación del anti-CD20 mejora significativamente los resultados. En un estudio que compara CHOP *versus* R-CHOP, la tasa de RC se incrementa desde el 7% al 34%, y el tiempo de fracaso terapéutico prácticamente se duplica, hasta los 2 años, sin que se observe un impacto favorable en la supervivencia con el seguimiento realizado en este caso².

Quimioterapia intensiva en primera línea/Trasplante autólogo (ASCT) de consolidación de la remisión

Son las estrategias que logran incrementar significativamente las RC, la SLP y la supervivencia global. Desgraciadamente, sólo está disponible para menos del 50% de los pacientes con LCM, ya que la mediana de edad de estos pacientes es de 70 años y algunos de menor edad no están exentos de comorbilidades.

Los primeros datos de ASCT en el LCM datan del año 2000, con series pequeñas de pacientes y con estados de la enfermedad muy heterogéneos. Destaca por su número el del EBMT⁶, en el que se observaba una SLP y global a 5 años del 33% y 50%, respectivamente. Este estudio concluyó que el ASCT debía realizarse como consolidación de la primera respues-

Tabla 1. Resumen de los resultados de las estrategias de primera línea con quimioterapia intensiva y/o trasplante autólogo (ASCT) en pacientes con linfoma de células del manto

Referencia	Esquema	N	RC (%)	SLP	Seguimiento (mediana)
Lefrère <i>et al.</i> Leukemia 2002	CHOP/DHAP-ASCT	28	86	83%	4
Gianni <i>et al.</i> Blood 2003	Doxo/platino × 2-3 R-CTX-Ara C-ASCT	28	100	89%	3
Khoury <i>et al.</i> Cancer 2003	HyperCVAD/Mtx-Ara C- ASCT	33	100	43%	4
Romaguera <i>et al.</i> JCO 2005	R-HyperCVAD/ R-Mtx-Ara C	97	87	64%	3
Geisler <i>et al.</i> Blood 2008	R-MaxiCHOP/ R-Ara C-R-ASCT	160	90	66%	4

RC: remisión completa; SLP: supervivencia libre de progresión

ta para obtener buenos resultados. Los otros estudios también detectaban poca eficacia en fases posteriores de la enfermedad.

Dreyling y cols. exploraron de forma aleatorizada el papel del ASCT como tratamiento de consolidación de la RC y parcial tras CHOP frente a mantenimiento con interferón (IFN), y con diseño cruzado, pues los pacientes del brazo IFN podían recibir ASCT si acontecía progresión. Con una mediana de seguimiento de 2,8 años, la SLP fue del 73% para los trasplantados frente al 43% para los no trasplantados, sin observarse impacto en la supervivencia. Sin embargo, los pacientes trasplantados en RC tenían un pronóstico especialmente más favorable. Considerando este estudio, el momento de la indicación del ASCT puede ser un tema debatible, aunque la mayoría de las evidencias indican que es eficaz cuando se administra tras haber conseguido la RC⁷.

Las estrategias intensivas son diversas. Se ha utilizado ASCT (mayoritariamente con el esquema BEAM) como consolidación tras la inducción de la respuesta, pero también se han desarrollado esquemas con quimioterapia a dosis altas administradas de forma secuencial (Gianni y cols.)⁸ o en forma alterna^{9,10} (Romaguera y cols., Geisler y cols.), con y sin infusión de progenitores autólogos.

En la Tabla 1 se resumen los resultados de estas estrategias. Con ellas podemos ofrecer tasas de RC que oscilan entre el 81% y el 100%, y una SLP a 5 años del 65-85%, significativamente superiores a las obtenidas con la quimioterapia a dosis convencionales.

¿Cuál puede considerarse la mejor estrategia?

Se han realizado comparaciones históricas entre tratamientos de inducción con Hyper CVAD cor-

to *versus* CHOP, seguidos en ambos casos de ASCT. El primero resultaba superior para la SLP y la supervivencia. En este sentido, uno de los estudios más esclarecedores para conocer cuál podría ser el mejor tratamiento de inducción es el estudio del Grupo Nórdico¹⁰. En este estudio, se comparan los resultados obtenidos con MaxiCHOP (ciclofosfamida 1.200 mg/m² y doxorubicina 75 mg/m²) por 4 ciclos seguidos de BEAM-ASCT, con otro desarrollado en una cohorte consecutiva, en el que se introducen

pre-BEAM-ASCT, dosis altas de citarabina y anti-CD20. La tasa de respuestas completas obtenidas con ambas estrategias varía de un 27% a un 55%. Con una mediana de seguimiento de 4 años, la tasa de SLP y la supervivencia global es del 73% y 81% con la nueva estrategia, significativamente superiores al 37% y 55% detectados anteriormente. Por tanto, la adición de anti-CD20 y dosis altas de citarabina en el tratamiento de inducción parecen esenciales para optimizar los resultados. Además, este estudio detecta por primera vez la posibilidad de alcanzar una meseta tardía en la supervivencia.

Otro dato que sustenta la utilización de antimetabolitos en el tratamiento de primera línea es el resultado obtenido con esquemas Hyper CVAD modificados. Uno de estos estudios, en el que se administra R-HyperCVAD cada 28 días (obviando el Mtx-ARAC) y mantenimiento con anti-CD20, obtiene tasas de RC y SLP inferiores a las del esquema clásico (64% y 37 meses de mediana vs. 87% y mediana no alcanzada a 3 años¹¹).

Otras estrategias

Conseguida la RC, el problema en el LCM es la recaída, la incapacidad de erradicar la enfermedad mínima residual. Por ello, se están estudiando las estrategias de consolidación y mantenimiento y la incorporación de nuevos fármacos a los esquemas tradicionales, que representen las nuevas líneas de estudio.

La **radioinmunoterapia** está siendo explorada en el LCM como tratamiento de consolidación tras quimioterapia convencional, la intensiva o incorporada a los esquemas de acondicionamiento del ASCT. Los radiofármacos son una opción atractiva dada la ra-

diosensibilidad de los linfomas. En Europa está aprobado el ybritumomab-tiuxetan, anti-CD20 murino unido por un quelante al ytrio 90, emisor beta, que se administra de forma ambulatoria sin necesidad de dosimetría. La dosis estándar es de 0,4 mCi/kg, que debe ajustarse según nivel de plaquetas y grado de infiltración medular.

Tras la quimioterapia con R-CHOP, R-FCM o R-FC, la administración de ybritumomab incrementa significativamente las RC. Tras esquemas agresivos de tipo R-HyperCVAD/metrotexato-Ara C o insertado en el acondicionamiento con BEAM, la tasa de RC es muy alta, y se precisa más seguimiento para ver el impacto en la SLP, que es superior al 70% en ambos casos ⁽¹²⁾.

Mantenimiento: los datos del papel del anti-CD20 en mantenimiento en LCM son escasos. Se ha comunicado que puede incrementar la SLP. En pacientes en recaída no se ha visto que prolongue la SLP, a diferencia de lo observado en el linfoma folicular^{11,13}. Actualmente, se está estudiando su utilidad tras esquemas intensivos o con los nuevos esquemas de inducción. También están activos los estudios de tratamiento de mantenimiento con los nuevos agentes, bortezomib y lenalidomida.

Tratamiento de la recaída

Prácticamente el 100% de los pacientes con LCM requerirán tratamientos alternativos a lo largo de su evolución. Se abre un abanico de alternativas terapéuticas con resultados y toxicidades diferentes. La elección dependerá de las características biológicas del paciente, de la historia previa de la enfermedad y de la disponibilidad de tratamientos. Actualmente, se van incorporando nuevos fármacos al tratamiento de segunda línea, pero sólo unos pocos han conseguido la indicación, por lo que el uso de la vía del compasivo o dentro de ensayo clínico es práctica habitual.

Trasplante alogénico

Esta opción ha sido explorada en los pacientes más jóvenes con enfermedad refractaria o en recaída, incluso tras tratamientos intensivos. Es difícil realizar comparaciones entre los estudios, muy heterogéneos en pacientes, estado de la enfermedad al trasplante y acondicionamiento y profilaxis de la EICH de los procedimientos. En los últimos años, los trasplantes de intensidad reducida (Alo-TIR) se han impuesto por su menor toxicidad temprana.

Salvo el estudio del registro del EBMT, la mayoría son estudios unicéntricos de series pequeñas. En la Tabla 2 se resumen los resultados de algunos estudios publicados con trasplante alogénico en pacientes con LCM refractario o en recaída¹⁴⁻¹⁷.

El trasplante alogénico es considerado actualmente como la única estrategia potencialmente curativa en el LCM. Se comunican SLP claramente superiores a las que se obtienen con otros tratamientos en situación de enfermedad en recaída. Como siempre, los mejores resultados se observan en los estudios unicéntricos. Los resultados del grupo GELTAMO en una serie de 21 pacientes son muy buenos, con una SLP y global del 80%, siendo la edad superior a 60 años el único factor adverso para la supervivencia. Su indicación está restringida a pacientes no mayores de 60 años y con buena salud. La mortalidad del Alo-TIR alcanza el 30% a 3 años, sobre todo derivados del EICH crónico y sus complicaciones.

La inmunoterapia que ofrece el trasplante alogénico es esencial para erradicar la enfermedad mínima residual. De hecho, la SLP obtenida con estrategias de trasplante que realizan depleción T es peor. También se ha descrito el efecto antitumoral de las infusiones de linfocitos del donante en pacientes en recaída tras el Alo-TIR.

En resumen, el Alo-TIR de donante HLA compatible es posiblemente la mejor opción de rescate para los pacientes jóvenes.

Tabla 2. Resumen de los resultados con trasplante alogénico en pacientes con linfoma de células del manto refractarios o en recaída

Ref	n	Tipo	Profilaxis EICH	MRT (precoz /1 año)	SLP	Supervivencia
Khouri <i>et al.</i> , 1999	16	Mieloablato	FK + Mtx	ND/38%	55% a 3 años	55% a 3 años
Vandenberghe <i>et al.</i> , 2003	22	Mieloablato	ND	ND	50% a 2 años	62% a 2 años
Armitage <i>et al.</i> , 2002	212	Mieloablato	ND	ND	< 20% a 2 años	40% a 2 años
Robinson <i>et al.</i> , 2006	180	Alo-TIR	CsA ± Mtx ± ATG (55)/anti-CD52 (40)	13%/32%	29% a 4 años	31% a 5 años
Tam <i>et al.</i> , 2009	35	Alo-TIR	FK + Mtx + ATG o anti-CD52 si DNE	0%/9%	46% a 6 años	53% a 6 años
Gayoso <i>et al.</i> , 2009 (abs)	21	Alo-TIR	CsA-Mtx	10%/20%	ND	80% a 5 años

EICH: enfermedad injerto contra huésped; MRT: mortalidad relacionada con el trasplante; SLP: supervivencia libre de progresión; ND: no disponible.

Estrategias de rescate distintas al trasplante

Quimioterapia convencional y nuevos fármacos

Tampoco existe tratamiento estándar para el LCM en recaída o refractariedad. Ya hemos comentado anteriormente que la elección depende de las características del paciente y de la disponibilidad de los tratamientos. Algunos sólo están disponibles dentro del ensayo clínico y otros precisan la autorización del Ministerio (uso compasivo).

Los esquemas con fludarabina se emplean mucho en esta etapa. En combinación con ciclofosfamida y mitoxantrone, el esquema R-FCM del grupo alemán induce un 60% de respuestas, 29% completas; con una SLP de 8 meses de mediana¹³. Son frecuentes las citopenias prolongadas, y si la intención es consolidar con TASPE debe considerarse la dificultad de movilización después de este tratamiento.

Actualmente, los análogos de la citidina, como la **gemcitabina** están ganando terreno, por su buen perfil de toxicidad. La mediana de edad de los pacientes previamente multitratados e incluidos en los estudios de fase II es de 69 años. Los resultados observados son similares, con respuestas que oscilan entre el 36% y el 85%, y SLP de 8-12 meses. Habitualmente, se administran a dosis de 1.000 mg/m² los D1 y D8 o D15 en asociación con rituximab 375 mg/m² y oxaliplatino a dosis que oscilan entre 70 y 100 mg/m²¹⁸.

Está irrumpiendo con fuerza la **bendamustina** por su buen perfil de toxicidad y eficacia. Desde el primer estudio de fase II y asociada con rituximab se observó una tasa de RC en el grupo de pacientes con LCM del 50%, similar a las obtenidas en las otras entidades indolentes de mejor pronóstico. Además, la SLP fue de 24 meses, significativamente superior a la obtenida previamente¹⁹. La bendamustina ha sido aprobada por la FDA para el tratamiento de la LLC y las recaídas de linfomas indolentes en los primeros 6 meses tras un esquema terapéutico que contenga rituximab. Un nuevo estudio de fase III realizado en 513 pacientes con histologías indolentes demuestra la superioridad de este esquema frente al R-CHOP en el tratamiento de primera línea²⁰. Las respuestas globales y completas son del 31% y 40% respectivamente, pero la SLP es significativamente superior en los pacientes tratados con R-bendamustina. La dosis más habitual es de 90 mg/m² los D 1 y 2 de ciclos de 28 días. El perfil de toxicidad es bueno, con menos efectos adversos graves que el esquema convencional CHOP-R y menos neutropenias severas, además de una menor tasa de alopecia (15%). Los otros efectos adversos más frecuentes fueron las reacciones cutáneas de tipo rash o urticariales.

Inhibidores del mTOR: temsirolimus

Los inhibidores del mTOR son los agentes más conocidos de la vía PI3K/Akt intracelular, muy importante para la regulación de la traslación de las proteínas, entre otras la de la ciclina D1, a través de la activación del RNAm.

El temsirolimus (CCI-779) es el agente recientemente aprobado por la EMEA para el tratamiento del LCM refractario o en recaída. Los primeros estudios de fase II en monoterapia en pacientes con mediana de edad de 70 años obtuvieron unos resultados muy similares en respuestas globales 40% con una SLP de 6-8 meses²¹. El hecho de que se obtuvieran resultados similares con dosis oscilantes entre 250 y 25 mg propició el estudio de fase III publicado recientemente y en el que 162 pacientes se aleatorizan para recibir temsirolimus 175 mg i.v. cada semana durante 3 semanas, seguidos de 75 mg/semana *versus* 175 mg seguidos de 25 mg semanales *versus* monoterapia opcional del investigador²².

Los pacientes del primer grupo tuvieron una tasa de respuestas (22%) y SLP (mediana: 5 meses) significativamente superiores a las observadas en los otros grupos, con un impacto casi significativo ($p = 0,07$) en la supervivencia global, de 11 meses. La toxicidad más frecuente fue la trombopenia, que precisó frecuentes ajustes de dosis, siendo las otras toxicidades, la astenia, la anemia y la diarrea.

Inhibidores de los proteasomas: bortezomib

La racionalidad de la utilización de un inhibidor de proteasomas como el bortezomib en el LCM proviene de su acción sobre varias de las dianas terapéuticas identificadas en esta entidad. La inhibición del proteosoma inhibe la degradación de inhibidores de ciclinas p21 y p27, frenadoras del ciclo celular. Los pacientes con menor detección de la proteína p27 tienen un pronóstico significativamente más adverso²³. También se inhibe la degradación de la p53, de especial importancia en los pacientes con entidades blastoides o en fases avanzadas, o la inactivación de la proteína IκB, favoreciendo la inhibición del NF-κB y por tanto la apoptosis.

El bortezomib está aprobado por la FDA desde diciembre de 2006 para el tratamiento del LCM en recaída. Sin embargo, en España, su única indicación continúa siendo el mieloma múltiple. Varios estudios de fase II han sustentado esta aprobación^{24,25}, incluido el considerado pivotal²⁶. Estos estudios han sido realizados en pacientes con LCM refractarios o en recaída y con una media de 2-3 tratamientos previos. La tasa de respuestas globales es del 33-54%, con RC de 8-20%, y la me-

diana de SLP de 6 meses y de 12-14 meses en los pacientes respondedores.

Las dosis que se han empleado oscilan entre 1,3 y 1,5 mg/m² i.v., con las pautas conocidas, los días 1, 4, 8 y 11, cada 21 días. La toxicidad hematológica y la neuropatía sensitiva son las toxicidades más frecuentes.

Los estudios abiertos son múltiples, mayoritariamente en asociación con la quimioinmunoterapia convencional pero también incorporado en el ASCT y con los nuevos agentes tales como lenalidomida, inhibidores de deacetilasas, radioinmunoterapia, etc., o como tratamiento de mantenimiento. También la investigación se dirige hacia la primera línea. Está activado el estudio de fase III LYM-3002, que permitirá conocer la eficacia de bortezomib en primera línea, en asociación con R-CHOP, sustituyendo a la vincristina.

Los "IMids": talidomida y lenalidomida

No se conoce con exactitud el mecanismo de acción de estos agentes de acciones pleiotrópicas a través de la modulación de citocinas. Son tumorocidas, induciendo la activación de genes supresores de tumor, activando la vía de las caspasas, induciendo apoptosis, etc., e incrementan la inmunocompetencia del huésped mediante la activación de la citotoxicidad T/NK. Los primeros estudios en el LCM se realizaron con **talidomida** 200 mg/día con incremento de dosis a 400 mg el día 15 y en asociación con rituximab (375 mg/m²), cuatro dosis²⁷. En pacientes previamente multitratados y mayoritariamente sin rituximab previo, la respuesta global fue del 81%, con un 31% de RC y una SLP de 20,4 meses. La toxicidad habitual de este fármaco fue aceptable.

La eficacia preliminar de la talidomida ha propiciado la investigación de la **lenalidomida**, con un perfil de toxicidad más favorable. Recientemente, conocemos los resultados de los estudios de fase II exploratorios en 217 pacientes con linfomas agresivos, mediana de 3 líneas previas, 57 de los cuales LCM. La dosis fue de 25 mg D1-D21 en ciclos de 28 días. La tasa de RC/RCi fue del 21%, con una mediana de SLP de 5,7 meses. Como en los anteriores agentes, la duración de la respuesta era significativamente más larga para los pacientes respondedores^{28,29}. La toxicidad más frecuente es la hematológica.

Hay datos preliminares que indican que los pacientes con más probabilidades de respuesta son aquellos que mantienen la inmunocompetencia y con baja masa tumoral. Estudios *in vitro* evidencian que la lenalidomida incrementa la formación de las sinapsis inmune, facilitando las acciones efectoras de los linfocitos T/NK sobre células de LCM.

Actualmente, se están realizando dos estudios en fase III que evidenciarán el papel de la lenalidomida en el LCM. El estudio MCL-002 Sprint explora la eficacia de la lenalidomida de rescate en monoterapia frente a otras monoterapias convencionales a elección del investigador y el MCL-003 Renew, que estudia el papel del tratamiento de mantenimiento de la lenalidomida tras la respuesta obtenida en primera línea.

Otros agentes

Las posibilidades terapéuticas que se están testando en el LCM son múltiples. Con un desarrollo más preliminar que los anteriores, oiremos hablar de los **inhibidores de las cinasas dependientes de ciclina: flavopiridol**, como agente más representativo, que en monoterapia mostró resultados pobres, pero que parece muy prometedor en asociación con fludarabina y rituximab en pacientes previamente multitratados^{30,31}. **Los inhibidores de las deacetilasas de histonas** también se perfilan como buenos *partners* para combinar con otros agentes, dadas sus múltiples acciones frente a varias de las dianas frecuentemente alteradas en el LCM. Inhiben el ciclo celular, inducen la expresión de genes supresores de tumor e inducen apoptosis³².

¿Cuáles pueden ser las futuras directrices?

La tendencia será ir hacia un tratamiento adaptado al riesgo. Disponemos del índice MIPI para valorar el riesgo de los pacientes tratados con quimioinmunoterapia estándar. Su valor, sin embargo, es cuestionado en aquellos pacientes tratados de forma intensiva. La positividad del Ki-67 se perfila como variable muy predictora de supervivencia, pero falta su estandarización. Se precisa aunar esfuerzos para dirimir un índice pronóstico discriminativo y reproducible.

Respecto al tratamiento, es llamativo el ámbito de investigación que tiene esta entidad actualmente. Las estrategias actuales y futuras pasan por el estudio de múltiples y nuevas combinaciones (ver www.clinicaltrials.gov) y la incorporación gradual de los agentes eficaces en LCM refractarios o en recaída a los tratamientos ya establecidas para eventualmente llegar a la primera línea. Se valorará si es mejor la estrategia de utilizar los nuevos agentes juntos o de forma secuencial y en qué pacientes. En definitiva, con una metodología cuidadosa será posible mejorar, más y en poco tiempo, la supervivencia de los pacientes con LCM.

Tabla 3. Resumen de los resultados con esquemas de segunda línea y nuevos fármacos en pacientes con linfoma de células del manto refractarios o en recaída

Tratamiento	N	Respuesta	RC/RCi	SLP/DR (en meses)	Referencias
Temsirolimus (aprobado EMEA)	162	22%	2%	SLP: 4,8 DR: 7,1	Hess <i>et al.</i> , JCO, 2009
Bortezomib (aprobado FDA)	141	33%	8%	SLP: 6 DR: 9,2	Fisher <i>et al.</i> , JCO, 2006
Bendamustina + rituximab	16	75%	50%	SLP: 18 meses DR: ND	Rummel <i>et al.</i> , JCO, 2005
Gemcitabina + R ± oxaliplatino	14	78%	64%	SLP: 10	Rodríguez <i>et al.</i> , Leukemia & Lymph 2007
R-FCM	24	58%	29%	SLP: 8 DR: ND	Forstpointner <i>et al.</i> , Blood, 2004
Lenalidomida	57	42%	21%	SLP: 5,7 DR: 10,6	Witzig <i>et al.</i> ,ASH, 2009 #1676

RC: remisión completa; RCi: remisión completa incierta; SLP: supervivencia libre de progresión (en todos los pacientes del estudio); DR: duración de la respuesta (en los pacientes respondedores); ND: no disponible.

Bibliografía

- Martin P, Chadburn A, Christos P, et al. Outcome of Deferred Initial Therapy in Mantle-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol.* 2009; 27 (8): 1209-1213.
- Lenz G, Dreyling M, Hoster E, et al. Immunochemotherapy with rituximab and cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone significantly improves response and time to treatment failure, but not long-term outcome in patients with previously untreated mantle cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *J Clin Oncol.* 2005; 20;23(9):1984-92.
- Herrmann A, Hoster E, Zwingers T et al. Improvement of overall survival in advanced stage mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2009. 27:511-518.
- Lenz G, Dreyling M, Hiddemann W. Mantle cell lymphoma: established therapeutic options and future directions *Ann Hematol.* 2004;83(2):71-77.
- Zinzani PL, Magagnoli M, Moretti L et al. Randomized trial of fludarabine versus fludarabine and idarubicin as frontline treatment in patients with indolent or mantle-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2000;18(4):773-39.
- Vandenbergh E, Ruiz de Elvira C, Loberiza FR, et al. Outcome of autologous transplantation for mantle cell lymphoma: a study by the European Blood and Bone Marrow Transplant and Autologous Blood and Marrow Transplant Registries. *Br J Haematol* 2003;120(5):793-800.
- Dreyling M, Lenz G, Hoster E, et al. Early consolidation by myeloablative radiochemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in first remission significantly prolongs progression-free survival in mantle-cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the European MCL Network *Blood* 2005 1;105(7):2677-84.
- Gianni AM, Magni M, Martelli M, et al. Long-term remission in mantle cell lymphoma following high-dose sequential chemotherapy and in vivo rituximab-purged stem cell autografting (R-HDS regimen). *Blood.* 2003 15; 102(2):749-55.
- Romaguera JE, Fayad L, Rodriguez MA, et al. High rate of durable remissions after treatment of newly diagnosed aggressive mantle-cell lymphoma with rituximab plus hyper-CVAD alternating with rituximab plus high-dose methotrexate and cytarabine. *J Clin Oncol.* 2005 1;23(28):7013-23.
- Geisler CH, Kolstad A, Laurell A, et al. Long-term progression-free survival of mantle cell lymphoma after intensive front-line immunochemotherapy with in vivo-purged stem cell rescue: a nonrandomized phase 2 multicenter study by the Nordic Lymphoma Group. *Blood* 2008 1;112(7):2687-93.
- Kahl BS, Longo WL, Eickhoff JC, et al. Maintenance rituximab following induction chemoimmunotherapy may prolong progression-free survival in mantle cell lymphoma: a pilot study from the Wisconsin Oncology Network. *Ann Oncol.* 2006 ;17(9):1418-23.
- Arranz R, Ga Noblejas A, Grande C, et al. Feasibility and Toxicity of Induction Treatment with Rituximab-HCVAD and Metotrexate/Citarabine, Followed by Consolidation with Y-90 Ibritumomab Tiuxetan in patients with mantle cell lymphoma (Phase II GELTAMO-LCM 04-02 study). *Blood* 2009. 114:1703 (a).
- 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 (10): 3064-71.
- Kiss et al. Stem cell transplantation for mantle cell lymphoma: if, when and how?. *Bone Marrow Transplant.* 2005. 36: 655-661.
- Robinson et al. Reduced-intensity conditioning and allogeneic stem cell transplantation in mantle cell lymphoma: an update from the Lymphoid Working Party of the EBMT. *Bone Marrow Transplant.* 2006; 37 Suppl 1:236 (a).
- Tam et al. Mature results of the M. D. Anderson Cancer Center risk-adapted transplantation strategy in mantle cell lymphoma. *Blood.* 2009 Apr 30;113(18):4144-52.
- Gayoso J, Martino R., Balsalobre P., et al (GELTAMO). Long-term results of fludarabine/melphalan as reduced-intensity conditioning regimen in mantle cell lymphoma: age matters. *Bone Marrow Transplantation* 2009; # 753.
- Rodríguez J, Gutierrez A, Palacios A, et al. Rodríguez et al. Rituximab, gemcitabine and oxaliplatin: an effective regimen in patients with refractory and relapsing mantle cell lymphoma. *Leuk Lymphoma,* 2007. 48 (11): 2172-78.
- Rummel MJ, Al-Batran SE, Kim SZ, et al. Bendamustine plus rituximab is effective and has a favorable toxicity profile in the treatment of mantle cell and low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* 2005 20;23(15):3383-89.
- Rummel MJ, Niederle N, Maschmeyer G et al. Bendamustine Plus Rituximab Is Superior in Respect of Progression

- Free Survival and CR Rate When Compared to CHOP Plus Rituximab as First-Line Treatment of Patients with Advanced Follicular, Indolent, and Mantle Cell Lymphomas: Final Results of a Randomized Phase III Study of the StiL (Study Group Indolent Lymphomas, Germany). *Blood*, 2009. 114: 405 (a).
21. Witzig TE, Geyer SM, Ghobrial I, et al. Phase II trial of single-agent temsirolimus (CCI-779) for relapsed mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2005 10; 23(23):5347-56.
 22. Hess G, Herbrecht R, Romaguera J, et al. Phase III study to evaluate temsirolimus compared with investigator's choice therapy for the treatment of relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2009 Aug 10; 27(23):3822-29.
 23. Chiarle R, Budel LM, Skolnik J, et al. Increased proteasome degradation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 is associated with a decreased overall survival in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2000 15; 95(2):619-26.
 24. Goy A, Bernstein SH, Kahl BS, et al. Bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma: updated time-to-event analyses of the multicenter phase 2 PINNACLE study. *Ann Oncol* 2009. 20: 520-25.
 25. O'Connor O, Moskowitz C, Portlock C, et al. Patients with chemotherapy-refractory mantle cell lymphoma experience high response rates and identical progression-free survivals compared with patients with relapsed disease following treatment with single agent bortezomib: results of a multicentre Phase 2 clinical trial. *Br J Hematol* 2009. 145: 34-39.
 26. Fisher RI, Bernstein SH, Kahl BS, et al. Multicenter phase II study of bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma *J Clin Oncol* 2006. 24: 4867-74.
 27. Kaufmann H, Raderer M, Wöhrer S, et al. Antitumor activity of rituximab plus thalidomide in patients with relapsed/refractory mantle cell lymphoma. *Blood*. 2004 15; 104 (8):2269-71.
 28. Wiernik PH, Lossos IS, Tuscano JM, et al. Lenalidomide monotherapy in relapsed or refractory aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2008 20;26(30):4952-57.
 29. Witzig et al. Durable Responses After Lenalidomide Oral Monotherapy in Patients with Relapsed or Refractory (R/R) Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma (a-NHL): Results From An International Phase 2 Study (CC-5013-NHL-003). *Blood*, 2009. 114: 1676 (a).
 30. Kouroukis CT, Belch A, Crump M, et al. Flavopiridol in untreated or relapsed mantle-cell lymphoma: results of a phase II study of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group *J Clin Oncol*. 2003 1;21 (9):1740-45.
 31. Lin TS, Blum KA, Fischer DB, et al. Flavopiridol, fludarabine, and rituximab in mantle cell lymphoma and indolent B-cell lymphoproliferative disorders *J Clin Oncol*. 2010 20; 28(3):418-23.
 32. Watanabe T, Kato H, Kobayashi Y, et al. Potential efficacy of the oral histone deacetylase inhibitor vorinostat in a phase I trial in follicular and mantle cell lymphoma. *Cancer Sci*. 2010;101(1):196-200.

Terapia celular con progenitores hematopoyéticos en patología cardiovascular

C. HERRERA ARROYO

Unidad de Terapia Celular. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba

La patología cardiovascular comprende un conjunto amplio y diverso de enfermedades que, si bien son en general bien conocidas desde hace tiempo, siguen careciendo en muchos casos de tratamiento efectivo, como lo prueba la elevada morbimortalidad que conllevan en las sociedades occidentales, en las que constituyen la primera causa de muerte. En particular, en el infarto agudo de miocardio (IAM), aunque la introducción de las técnicas de reperfusión precoz en el tratamiento estándar ha mejorado extraordinariamente el pronóstico, la morbimortalidad a medio plazo sigue siendo elevada por la imposibilidad de regenerar el tejido miocárdico lesionado.

La terapia celular ha surgido en el siglo XXI como una opción muy atractiva para el tratamiento de diversas enfermedades que afectan a casi todos los órganos y sistemas. En el terreno concreto del sistema cardiovascular, el desarrollo clínico de este tipo de terapia basada en células troncales adultas ha adquirido un extraordinario desarrollo, siendo más de 1.500 pacientes en todo el mundo los que han recibido este tratamiento experimental hasta el momento presente. El gran entusiasmo despertado ha llevado a la realización de demasiados ensayos clínicos sin excesivo fundamento biológico, en los que los resultados han sido muchas veces de difícil interpretación, así como a la gran heterogeneidad de condiciones tratadas, de tipos celulares administrados y de dosis y vías de administración empleadas, lo que ha dificultado la obtención de conclusiones definitivas respecto al alcance del beneficio proporcionado por la terapia celular en patología cardiovascular.

Hay que buscar el fundamento biológico de la aplicación de células de la médula ósea (MO) a la regeneración del sistema cardiovascular en una serie de hallazgos iniciales, y de estudios preclínicos a continuación, que sugieren fuertemente el papel fisiológico de la MO y del llamado eje miocardio-MO en la regeneración del tejido miocárdico. Desde este punto de vista, la terapia celular trata únicamente de explorar terapéuticamente un mecanismo fisiológico de reparación que se ve excedido en las situaciones de catástrofe como el infarto agudo de miocardio (IAM). La posibilidad de que el miocardio se regenere en condiciones fisiológicas a partir de células de MO parte del hallazgo de cardiomiocitos que presentaban cromosoma Y en mujeres trasplantadas de MO a partir de donante varón¹ e igualmente en co-

razones de donantes femeninos trasplantados en varones². Estos hallazgos sugieren de forma inequívoca que existe un origen extracardiaco de células con capacidad de regeneración miocárdica, y que ese origen está con toda probabilidad en la MO. Además, se ha podido demostrar que en los días siguientes a un IAM se produce una movilización fisiológica de progenitores hematopoyéticos (Lin⁻/c-kit⁺) a la sangre periférica. Esta movilización se debe a una activación de células c-kit⁺ de la MO en respuesta a la liberación de kit ligando (KitL) que requiere la activación de metaloproteinasa⁹ (MMP9)³. Igualmente, se ha demostrado la movilización de células CXCR4⁺ en respuesta a la expresión de SDF1 en el miocardio infartado y el consiguiente cambio de gradiente fisiológico de SDF1 entre la MO, la sangre periférica y el miocardio⁴.

La MO contiene un conjunto complejo de células progenitoras que incluye, además de los progenitores hematopoyéticos (PH), la llamada *side population* (SP), que presenta un transportador de membrana ATPBCG2 por el que excluye los colorantes Hoechst, células progenitoras mesenquimales (MSC), células progenitoras endoteliales (EPC) y las MAPC (*multipotent adult progenitor cells*). Varias de estas poblaciones de células mononucleadas de la MO (MO-CMN) y de células circulantes pueden derivarse en cultivo a cardiomiocitos, fibra muscular lisa y célula endotelial, con lo que, en principio, ofrecen un notable potencial de reparación del tejido miocárdico en su conjunto. Sin embargo, *in vivo* los resultados de modelos animales de trasplante son contradictorios, puesto que mientras que varios estudios demuestran una amplia diferenciación *in situ* de las células de MO trasplantadas a cardiomiocitos y estructuras vasculares, otros apenas encuentran tal diferenciación y, lo que es más, parece que la propia anidación de las células en el miocardio es mínima y transitoria. Es necesario, por tanto, pensar que algún otro mecanismo de acción diferente de la regeneración o generación *de novo* de cardiomiocitos y vasos sanguíneos a partir de las células infundidas es responsable de la mejoría en la función ventricular constatada en la mayoría de los estudios. Si las células no permanecen en el tejido infartado y sólo mínimamente se diferencian a cardiomiocitos, es necesaria una explicación para los beneficios que parecen evidentes tanto en modelos animales como en ensayos clínicos. La

hipótesis más consistente es el efecto paracrino a nivel local. De hecho, varios estudios han demostrado que las células de MO secretan timosina $\beta 4$ y el antagonista Wnt SRFP-2 (*secreted frizzled-related protein-2*) que ejercen un efecto protector de los cardiomiocitos frente a la apoptosis inducida por hipoxia. Además, diversos estudios sobre la expresión génica de las células progenitoras, tanto de MO como de otras fuentes, coinciden en la capacidad secretora de diversos factores que comparten una capacidad de reducir la inflamación, inhibir la apoptosis, inducir angiogénesis, reclutar otras células progenitoras residentes específicas del tejido y reducir la fibrosis⁵. Independientemente de la controversia acerca de la diferenciación o no *in vivo*, parece evidente que el efecto beneficioso de las células de MO trasplantadas incluye una robusta estimulación de la angiogénesis que favorece la perfusión del tejido isquémico. Se ha demostrado que la subpoblación CD34+/CD133+/VEGFR2+ de la médula ósea que forma parte de las EPC contribuye tanto de forma directa como indirecta a la neovascularización, promoviendo la angiogénesis y la perfusión tisular⁶.

Por las razones que acabamos de citar, la MO constituye en principio la fuente ideal para tratar de regenerar el tejido miocárdico infartado, pero existen otras fuentes que se han testado tanto en modelos animales como en ensayos clínicos, entre las cuales cabe citar las MSC y los mioblastos esqueléticos. El trasplante de MSC en diversos modelos animales de IAM sistemáticamente mejora la función contráctil de VI, disminuyendo en algunos estudios la mortalidad a pesar de que la diferenciación a cardiomiocitos es muy limitada, por lo que parece que el efecto sobre la función depende de la capacidad angiogénica y trófica sobre las *stems* residentes. Sin embargo, el trasplante de MSC ha producido núcleos de osificación y calcificación en algunos modelos animales, lo que constituye un serio inconveniente para su aplicación clínica. En un estudio publicado recientemente se compararon MO-CMN vs. MSC en un modelo canino de isquemia crónica. Las MO-CMN produjeron una significativa disminución del tamaño del infarto, un descenso de los niveles plasmáticos de péptido natriurético, un aumento en la contractilidad y en la elasticidad telesistólica asociados a un incremento relativo de la densidad de arteriolas en el corte histológico. Por el contrario, los animales tratados con MSC no mostraron ninguno de estos cambios, al igual que el grupo de animales a los que se administró placebo⁸. Paralelamente a la publicación de estos resultados, se han iniciado tres ensayos clínicos con MSC derivadas de MO en uno de ellos (Prospective Randomized Study of Mesenchymal Stem Cells Therapy in Patients undergoing cardiac surgery [PROMETHEUS trial] www.clinicaltrials.gov

NCT00785990) y de tejido adiposo en los otros dos (A Randomized Clinical Trial of Adipose-Derived Stem cells in the Treatment of Patients with ST-elevation Myocardial Infarction [APOLLO trial] www.clinicaltrials.gov NCT00442806 y Randomized Clinical Trial of Adipose-derived Stem Cells in Treatment on Nonvascularizable Ischemic Myocardium [PRECISE trial] www.clinicaltrials.gov NCT00426868). Estos ensayos clínicos están actualmente en curso, por lo que es preciso esperar para conocer sus resultados.

El tercer tipo celular más usado en regeneración miocárdica son los mioblastos esqueléticos o células satélite, que se encuentran en la membrana basal de la fibra muscular estriada, de donde se obtienen fácilmente a través de una pequeña biopsia muscular. Tienen similitudes obvias con los cardiomiocitos, proliferan extensamente *in vitro* y son resistentes a la apoptosis inducida por hipoxia, lo que en principio hace de ellos unos candidatos ideales para la regeneración miocárdica. En estudios animales han demostrado ser capaces de producir una mejoría de la contractilidad regional y global del miocardio, engrosamiento de la pared ventricular afectada y disminución del remodelado ventricular. Sin embargo, la ausencia en los mioblastos cultivados de las moléculas de adhesión Cx-43 y N-cadherina impide que se puedan acoplar electromecánicamente en el tejido miocárdico, y la formación de nuevo tejido muscular no acoplado desde el punto de vista eléctrico al miocardio circundante ha producido en la mayoría de los modelos animales arritmias severas que limitan su uso amplio en clínica humana⁹. La experiencia clínica con mioblastos esqueléticos se reduce a unos cuantos estudios iniciales destinados a evaluar la factibilidad del procedimiento, en los cuales los beneficios eran bastante limitados. Lo mismo ha ocurrido en el principal ensayo aleatorizado, el MAGIC, en el que no se ha encontrado mejoría de la función ventricular post-AMI en los pacientes tratados respecto a los que recibieron placebo¹⁰.

Experiencia clínica con MO-CMN en IAM

La mayoría de los ensayos clínicos llevados a cabo hasta el momento han empleado MO-CMN para el tratamiento del IAM y de cardiopatía isquémica crónica. La rapidez con que se han iniciado los ensayos clínicos en terapia celular usando como fuente la MO depende en buena parte de la experiencia acumulada durante más de 40 años en trasplante de médula ósea y del excelente perfil de seguridad que presentan las MO-CMN. En la mayoría de los protocolos, las MO-CMN se obtienen mediante centrifugación en gradiente de Ficoll (un único ensayo utiliza la se-

dimentación) y se administran sin ninguna otra manipulación ni cultivo *in vitro*. Con este procedimiento, el injerto celular administrado a los pacientes consiste en una mezcla heterogénea de células que contiene HP, SP, CMN, MSC y EPC junto con monocitos y linfocitos maduros. También se han publicado ensayos clínicos en los que se han utilizado subpoblaciones celulares seleccionadas mediante métodos de separación mediados por anticuerpos dirigidos contra ciertos marcadores de superficie, particularmente CD34 y CD133 por su capacidad de generación de EPC, y más recientemente se ha publicado un estudio en que las células seleccionadas coexpresaban el marcador CD34 y el receptor de quimiocinas CXCR4. En términos generales, los resultados de esos estudios con poblaciones seleccionadas son similares a los obtenidos con la infusión de MO-CMN sin seleccionar, no habiéndose constatado ninguna ventaja adicional con la purificación celular¹¹.

Las vías de administración empleadas en los diversos ensayos clínicos han sido muy diversas: intracoronaria, sistémica, retrógrada a través de las venas coronarias e intramiocárdica directa, bien transendocárdica percutánea o bien transepicárdica en cirugía abierta¹². La infusión intracoronaria es en principio el método más sencillo y tiene la ventaja de que las células se vehiculizan rodeadas de oxígeno y nutrientes hasta el territorio afectado por el IAM. Sin embargo, es preciso un proceso de extravasación y diapédesis que probablemente no resulta muy eficaz porque el porcentaje de células que anidan en el miocardio es inferior al 5%. Sin embargo, lo mismo ocurre con la infusión directa intramiocárdica tanto transepicárdica como transendocárdica; aunque teóricamente esta vía asegura que las células llegan a la zona del infarto, la supervivencia de las mismas a las 72 horas no supera el 7-11%, probablemente en relación con la dificultad de anidar y sobrevivir en un territorio isquémico¹². La factibilidad y seguridad de la inyección intramiocárdica de MO-CMN por vía transepicárdica fue demostrada en un pequeño estudio de 8 pacientes en los que el procedimiento se practicó en el acto quirúrgico de un *bypass* coronario, dado que esta vía de administración se limita a pacientes sometidos a cirugía cardíaca abierta¹³. Los avances en las técnicas de cateterización percutánea han hecho posible la administración intramiocárdica por vía transendocárdica, si bien los estudios en este sentido son escasos y la mayor parte de ellos se han practicado en pacientes con cardiopatía isquémica crónica¹³.

La otra vía de abordaje que inicialmente suscitó un interés notable es la sistémica, entendiéndose como tal la movilización de progenitores de MO a la sangre periférica mediante la administración de G-CSF, con el objetivo de alcanzar el territorio del infarto a través de la circulación general. El procedimiento es teórica-

mente muy atractivo, e inicialmente pareció mostrar cierta eficacia en modelos animales y en los ensayos clínicos FIRSTLINE_AMI y Rigenera¹⁴. Sin embargo, ni en ensayos clínicos posteriores, como STEMMI, G-CSF-STEMMI y REVIVAL-2, ni en varios metaanálisis se ha demostrado ningún beneficio, entendiéndose como tal la mejoría de la FEVI en comparación con los controles¹⁴. Las razones de estas aparentes contradicciones radican en las diferencias en cuanto a dosis, esquema y tiempo de administración de G-CSF tras el IAM en los distintos ensayos clínicos. Parece ser que el procedimiento consigue mejorar la función ventricular en pacientes con fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) inferior al 50% en los que la administración de G-CSF se inició 37 horas tras la revascularización mecánica de la arteria responsable del infarto, siendo muy escasa o nula la eficacia del método de movilización en los pacientes en los que no se dan estas circunstancias¹⁴. Por otra parte, es preciso tener en cuenta que el primer ensayo con G-CSF post-IAM tuvo que ser prematuramente finalizado por la constatación angiográfica de reestenosis de la arteria responsable del infarto en varios pacientes incluidos. Otros estudios posteriores no han evidenciado esta complicación, lo que puede deberse de nuevo, al menos en parte, al esquema diferente de administración de G-CSF, ya que en ese primer ensayo la administración era previa a la intervención cardiovascular percutánea, mientras que en los demás estudios el tratamiento se inició con posterioridad¹⁴.

A la vista de los resultados que acabamos de revisar respecto a diversas estrategias y vías de abordaje, cada vez parece más evidente que la vía de administración de elección es la intracoronaria, ya que reúne un elevado perfil de seguridad (no se han comunicado efectos adversos dependientes de esta vía de administración) con una eficacia demostrada en los ensayos aleatorizados que incluyen mayor número de pacientes.

Los primeros estudios clínicos piloto de administración intracoronaria de MO-CMNS, diseñados principalmente para testar la factibilidad y seguridad del procedimiento, fueron los de Strauer y cols.¹⁵, TOP-CARE-AMI¹⁶, BOOST¹⁷ y Fernández-Avilés¹⁸ y cols. En todos ellos las CMN de MO autóloga se administraban a través de la coronaria responsable del IAM entre 5 y 7 días tras intervención cardiovascular percutánea, y la variable principal era la FEVI a los 3 o 6 meses de seguimiento. En ninguno de estos ensayos piloto se encontraron efectos adversos sobre la FEVI, aparición de arritmias, aumento de la necesidad de revascularización de la arteria tratada o de la incidencia de reinfarcto, a la vez que se constataba un incremento global de la FEVI de entre el 6 y el 9%. La demostración inicial de la seguridad del procedimiento en estos ensayos piloto y los indicios obser-

vados de eficacia condujeron a la realización de tres ensayos clínicos aleatorizados diseñados específicamente para testar la eficacia de la infusión intracoronaria de MO-CMN sobre la recuperación de la FEVI. El estudio de Janssens y cols.¹⁹ no demostró mejoría de la FEVI global pero sí de la contractilidad regional y una reducción del tamaño del infarto en el grupo tratado con MO-CMN. Por el contrario, el estudio ASTAMI²⁰ es el único entre los que incluyen un elevado número de pacientes que no encuentra ningún beneficio funcional tras la administración de CMN por vía intracoronaria. Las razones de estos resultados contradictorios no están totalmente claras, pero parecen incluir diferencias en el método de preparación celular (el ensayo ASTAMI es el único que utiliza un protocolo de preparación celular que se ha demostrado que afecta a la capacidad funcional de las células), técnica de inyección, tiempo de administración y dosis celular administrada. De hecho, las dosis de células infundidas varían de $0,7 \times 10^6$ CD34+ en ASTAMI hasta $9,5 \times 10^6$ CD34+ en BOOST. El estudio aleatorizado que incluye un mayor número de pacientes tratados con infusión intracoronaria de MO-CMN tras IAM hasta la fecha es el REPAIR-AMI²¹, en el que se confirman los resultados previos en cuanto a una mejoría significativamente mayor de la función ventricular en el grupo de pacientes tratados en comparación con los controles. Los volúmenes telesistólicos no se modificaron en el grupo de pacientes tratados, mientras que aumentaron significativamente en el grupo control. Es importante hacer notar que REPAIR-AMI es el único ensayo que, además de la FEVI, estudia la mejoría en términos de variables clínicas. La variable combinada de mortalidad, recurrencia de infarto y necesidad de hospitalización por insuficiencia cardiaca en el año siguiente al tratamiento resultó significativamente mejor en los pacientes tratados que en los controles. El elevado número de pacientes incluidos en este ensayo ha permitido también evaluar otros aspectos secundarios respecto a qué subgrupo de pacientes se benefician más del tratamiento. Los pacientes con una FEVI inicial inferior al 48,9% muestran una recuperación 3 veces superior al resto de los pacientes, y aquellos que reciben la infusión celular entre 4 y 8 días tras la reperfusión percutánea mejoran significativamente más que los tratados en los 4 primeros días.

En resumen, se puede afirmar que, en términos generales, el tratamiento del IAM con reperfusión precoz seguida de infusión intracoronaria de MO-CMN produce un incremento moderado de la FEVI en comparación con los controles en la gran mayoría de los ensayos clínicos publicados hasta el momento y en todos los metaanálisis practicados respecto a esta modalidad de intervención²²⁻²⁵. De los metaanálisis disponibles nos interesa particularmente el

de Martin-Rendon y cols.²⁴ por haberse publicado en las revisiones sistemáticas de la Cochrane Library y formar parte, por tanto, de la medicina basada en la evidencia. Tras un cuidadoso proceso de selección, en base a estrictos criterios metodológicos, entre todos los ensayos publicados hasta el momento, se practica el metaanálisis sobre 13 ensayos aleatorizados que incluyen un total de 811 pacientes. En los pacientes tratados mejora significativamente la FEVI en el 2,99% ($p = 0,0007$), se reduce el volumen telesistólico en 4,74 mL ($p = 0,003$) y se reduce el área del infarto un 3,51% ($p = 0,004$) con respecto a los pacientes en el grupo control. El análisis de subgrupos revela que la mejoría es significativamente superior en los pacientes que reciben el tratamiento después de 7 días post-AMI en comparación con los que lo reciben en los 7 primeros días, y que la dosis celular administrada $> 1 \times 10^8$ MO-CMN induce una mayor mejora de la FEVI en comparación con dosis inferiores. En este sentido, la apreciación del efecto dosis-respuesta ya había sido reconocido en el estudio de Meluzin *et al.*²⁶, y desde nuestro punto de vista es un factor muy importante a considerar. Los resultados de nuestro grupo²⁷, incluidos en el metaanálisis de Martin-Rendon *et al.*, son los que reportan un incremento mayor de la FEVI (14%), lo que se explica por reunir las condiciones de una dosis celular elevada (9×10^8 MO-CMN), administración del tratamiento después del día +7 post-IAM y una FEVI basal muy deprimida ($37 \pm 5\%$).

Experiencia clínica en cardiopatía isquémica crónica

El escenario en cardiopatía isquémica crónica (CIC) es completamente diferente, ya que los dos principales mecanismos de acción invocados de las MO-CMN en IAM, es decir, neoangiogénesis y citoprotección por mecanismo paracrino, no es probable que sean eficaces en una zona fibrótica cicatricial como es el caso de los infartos antiguos. En esta situación se requiere la formación de nuevos cardiomiocitos como único posible mecanismo de acción eficaz. Por este motivo, la gran mayoría de los estudios clínicos de terapia celular en CIC han empleado mioblastos esqueléticos con objeto de reemplazar el tejido infartado, siendo los resultados publicados hasta el momento poco concluyentes. La eficacia de MO-CMN en CIC ha sido testada en un limitado número de ensayos piloto con reducido número de pacientes. Los resultados de esos ensayos, incluido uno llevado a cabo por nuestro grupo²⁸, demuestran cierto grado de beneficio en términos de mejora de la FEVI, de la clase funcional de la New York Heart Association (NYHA), de los episodios de angina y de la toleran-

cia al ejercicio, sin incidencia de efectos indeseables. Dado lo limitado de la experiencia acumulada, por el momento no es posible extraer conclusiones definitivas respecto a la eficacia de este tipo de tratamiento en CIC.

Miocardopatía dilatada

La experiencia de terapia celular en miocardiopatía dilatada (MD) es aún más limitada. Sin embargo, los resultados de los tres estudios piloto reportados hasta el momento²⁹⁻³¹ (dos por vía intracoronaria y uno intramiocárdica) son alentadores, observándose en todos ellos una mejoría significativa de la función ventricular y de la clase funcional de la NYHA.

Nuestro grupo lleva a cabo en la actualidad un ensayo clínico no controlado en el que se incluirán 30 pacientes afectados de MD idiopática (www.clinicaltrials.gov NCT00629096). Hasta el momento se han incluido 20 pacientes en los que no se han apreciado efectos adversos, y la FEVI al seguimiento parece mejorar.

Enfermedad arterial periférica

La enfermedad arterial periférica (EAP) afecta a un 3-10% de la población, y su incidencia en las sociedades occidentales aumenta vertiginosamente debido al envejecimiento de la población y a la creciente incidencia de sus principales factores de riesgo (obesidad y diabetes). En su forma más severa, conocida como isquemia crónica crítica (ICC), la enfermedad se manifiesta con dolor en reposo, ulceraciones distales y gangrena del miembro afecto. El tratamiento de elección de la ICC es la revascularización quirúrgica o endovascular del miembro, si bien hasta un 30% de los pacientes en la mayoría de las series no son candidatos a este tipo de tratamiento por presentar enfermedad vascular difusa o muy distal, lo que impide la revascularización mecánica. Para este grupo de pacientes no existe ningún tratamiento eficaz y sólo es posible aplicar medidas paliativas en el mejor de los casos, siendo la supervivencia media del 50% a los 5 años.

Desde los años 90 se conoce que la neovascularización posnatal se produce no sólo por proliferación de células progenitoras endoteliales residentes, sino también por la diferenciación *in situ* de EPC procedentes de la MO y de la sangre periférica, y que en diversas condiciones fisiológicas y fisiopatológicas las EPC de la MO son movilizadas a la sangre periférica contribuyendo a la neovascularización de distintos tejidos⁶. A partir de estos hallazgos se iniciaron estudios en diversos modelos animales de isquemia cuyos re-

sultados sugerían que la neovascularización mediada por EPC podía tener significado clínico y relevancia a nivel terapéutico. Lógicamente, a los modelos animales siguieron enseguida los primeros ensayos clínicos en pacientes con ICC, que demostraron resultados muy prometedores.

Hasta el momento, se han publicado alrededor de 30 ensayos clínicos de terapia celular con células de MO o sangre periférica en pacientes con EAP^{32,33}, de los que tan sólo dos son estudios controlados que incluyen un total de 48 pacientes. Las conclusiones del análisis de estos estudios permiten afirmar que el procedimiento es factible y seguro, y parece que efectivamente promueve la neovascularización del miembro isquémico, lo que se traduce clínicamente en la mejoría del índice tobillo/brazo, en el aumento de la presión transcutánea de oxígeno y en la disminución del dolor en reposo.

Los resultados de estos estudios no controlados se están intentando confirmar en la actualidad en ensayos aleatorizados en todo el mundo, 8 de ellos controlados con placebo (www.clinicaltrials.gov: NCT00371371, NCT00434616, NCT00468000, NCT00498069, NCT00539266, NCT00616980, NCT00721006 y NCT00904501). Los resultados de estos ensayos estarán disponibles en los próximos 2 años.

En el contexto de la EAP merece especial consideración la arteriopatía diabética, por sus connotaciones fisiopatológicas diferentes y por su especial severidad. Nuestro grupo lleva a cabo en la actualidad un ensayo clínico aleatorizado (www.clinicaltrials.gov: NCT00987363) en el que se han incluido hasta la fecha 40 pacientes de un total previsto de 60 diabéticos de tipo 1 o 2 afectados de ICC, en los que administramos por vía intraarterial MO-CMN autólogas en tres grupos de dosis crecientes. Los resultados disponibles hasta el momento parecen muy prometedores. También en el campo de la arteriopatía diabética en nuestro país, el grupo PETHEMA lleva a cabo un estudio piloto (www.clinicaltrials.gov: NCT00765050) en el que se estudia la administración intramuscular de células CD133 de sangre periférica movilizada, cuyos resultados estarán disponibles en los próximos meses.

Conclusiones

1. El tratamiento del IAM mediante infusión intracoronaria de MO-CMN produce un incremento moderado de la FEVI significativamente superior al de los controles en todos los metaanálisis llevados a cabo a partir de todos los estudios aleatorizados publicados hasta la actualidad. Además de la mejoría de la FEVI, el procedimiento produce una reducción de los

volúmenes telesistólico y telediastólico y una reducción del tamaño del infarto, sin incremento del riesgo de necesidad de revascularización posterior de la arteria afecta o recurrencia del IAM.

2. La dosis óptima de células sigue siendo desconocida, pero existe un efecto dosis-respuesta demostrado en un ensayo aleatorizado y en dos metaanálisis. Además de la dosis celular, la FEVI basal deprimida y la infusión celular después del día +7 son factores predictivos de mejor respuesta funcional al tratamiento.

3. El mecanismo de acción por el cual las MO-CMN infundidas mejoran la FEVI post-IAM sigue siendo desconocido, aunque la inducción local de angiogénesis y el reclutamiento de progenitores residentes parecen tener un papel fundamental.

4. El efecto de la infusión intracoronaria de MO-CMN en CIC y en MD parece beneficioso en pequeños ensayos piloto no controlados.

5. La neovascularización mediada por MO-CMN en EAP parece probada en modelos animales y ensayos clínicos piloto que actualmente se intentan ratificar en diversos ensayos aleatorizados de los que aún no hay resultados disponibles.

6. Las cuestiones más básicas en terapia celular cardiovascular, como el mejor tipo de células, la dosis más eficaz, el momento más adecuado o la vía de administración idónea, siguen sin resolver y garantizan la investigación en este campo *from bench to bedside and back*.

Bibliografía

1. Deb A, Wang S, Skelding KA, Miller D, Simper D and Caplice NM. Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: A study of gender mismatched bone marrow transplantation patients. *Circulation* 2003;107:1247-1249.
2. Laflamme MA, Myerson D, Saffitz JE and Murry CE. Evidence for cardiomyocyte repopulation by extracardiac progenitors in transplanted human hearts. *Circ. Res.* 2002; 90, 634-640.
3. Fazel S, Chen L, Angoulvant D, Li SH, Weisel RD, Keating A, and Li RK. Activation of c-kit is necessary for mobilization of reparative bone marrow progenitor cells in response to cardiac injury. *FASEB J.* 2008; 22: 930-940.
4. Askari A, Unzek S, Popovic ZB, Goldman CK, Forudi F, Kiedrowski M, et al. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* 2003; 362: 697-703.
5. Gnecci, M, Zhang Z, Ni A, and Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circulation Research* 2008;103, 1204-1219.
6. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhardt D, Wang J, et al. (2001). Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat. Med.* 2001;7: 430-436.
7. Breitbach, M., Bostani, T., Roell, W., Xia, Y., Dewald, O., Nygren, J. M., et al. Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood* 2007;110: 1362-1369.
8. Mathieu M, Bartunek J, El Oumeiri B, Touihri K, Hadad I, Thoma P et al. Cell therapy with autologous bone marrow mononuclear stem cells is associated with superior cardiac recovery compared with use of nonmodified mesenchymal stem cells in a canine model of chronic myocardial infarction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009;138:646-53.
9. Fernandes S, Amirault JC, Lande G, Nguyen JM, Forest V, Bignolais O, et al. Autologous myoblast transplantation after myocardial infarction increases the inducibility of ventricular arrhythmias. *Cardiovascular Research* 2006;69: 348-358.
10. Menasché P, Alfieri O, Janssens S, McKenna W, Reichenspurner H, Trinquart L, et al. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation* 2008;117:1189-2000.
11. Chavakis E, Koyanagi M, Dimmeler S. Enhancing the Outcome of Cell Therapy for Cardiac Repair. *Circulation* 2010; 121:325-335.
12. Perin EC, Lopez J. Methods of stem cell delivery in cardiac diseases. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006; 3:S110-3.
13. Tse H, Kwong Y, Chan J, Lo G, Ho C, Lau C. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *The Lancet* 2003;361:47-49.
14. Abdel-Latif A, Bolli R, Zuba-Surma EK, Tleyjeh IM, Hornung CA, Dawn B. Granulocyte colony-stimulating factor therapy for cardiac repair after acute myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Am Heart J* 2008; 156:216-26.
15. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kosterling M, Hernandez A, Sorg RV et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002; 106: 1913-1918.
16. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Döbert N et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOP-CARE-AMI). *Circulation* 2002; 106: 3009-3017.
17. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomized controlled clinical trial. *Lancet* 2004; 364:141-148.
18. Fernández-Avilés F, San Román JA, García-Frade J, Fernández ME, Peñarrubia MJ, de la Fuente L et al. Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction. *Circ Res* 2004; 95:742-748.
19. Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, et al. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2006; 367:113-121.
20. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; 355:1199-209.
21. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, et al. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; 355:1210-1221.
22. Abdel-Latif A, Bolli R, Tleyjeh IM, Montori VM, Perin EC, Hornung CA et al. Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair. *Arch Intern Med* 2007; 167:989-97.
23. Lipinski MJ, Biondi-Zoccai GGL, Abbate A, Khianey R, Sheiban I, Bartunek J et al. Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50:1761-7.
24. Martin-Rendon E, Brunskill S, Dorée C, Hyde C, Watt S, Mathur A, Stanworth S. Stem cell treatment for acute myocardial infarction. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008 Oct 8; (4): CD006536.

25. Lasala GP, Minguell JJ. Bone marrow-derived stem/progenitor cells: their use in clinical studies for the treatment of myocardial infarction. *Heart Lung Circ* 2009; 18:171–80.
26. Meluzín J, Mayer J, Groch L, Janousek S, Hornáček I, Hlinomaz O, et al. Autologous transplantation of mononuclear bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction: the effect of the dose of transplanted cells on myocardial function. *Am Heart J* 2006;152:975.e9-15.
27. Suárez de Lezo J, Herrera C, Pan M, Romero M, Pavlovic D, Segura J, et al. Tratamiento regenerativo en pacientes con infarto agudo anterior revascularizado y función ventricular deprimida. *Rev Esp Cardiol* 2007; 60:357–365.
28. Suárez de Lezo J, Herrera C, Romero M, Pan M, Jiménez R, Noguera S, et al. Recuperación funcional tras terapia celular en pacientes con infarto crónico anterior y depresión severa de la función ventricular. *Rev Esp Cardiol* 2010 (in press).
29. Fischer-Rasokat U, Assmus B, Honold J et al. Selective intracoronary infusion of bone marrow-derived progenitor cells in patients with non-ischemic dilated cardiomyopathy: Initial results of the TOPCARE-DCM trial. *Circulation* 2005; 112 (Suppl. S):2751.
30. Kalil RAK, Ott DR, Sant 'Anna RT et al. Intramyocardial bone marrow stem cells transplantation for non-ischemic dilated cardiomyopathy. *J Amer Coll Cardiol* 2006; 47 (Suppl. A): 158A.
31. Traini JC, Lago NE, Alvarez M et al. Mononuclear bone marrow stem cells implant as an alternative treatment in non-ischemic dilated cardiomyopathy. *J Amer Coll Cardiol* 2006; 47 (Suppl. A): 80A.
32. Sprengers RW, Lips DJ, Moll FL, Verhaar MC. Progenitor Cell Therapy in Patients With Critical Limb Ischemia Without Surgical Options. *Ann Surg* 2008; 247: 411–420.
33. Fadini GP, Agostin Ci, Avogaro A. Autologous stem cell therapy for peripheral arterial disease. Meta-analysis and systematic review of the literature. *Atherosclerosis* 2010; 209: 10–17.

JAK2, 5 años después. Situación actual de los inhibidores de V617F de JAK2 en las neoplasias mieloproliferativas crónicas Phi-negativas

C. BESSES RAEBEL

Servicio de Hematología Clínica. Hospital del Mar-Parc de Salut Mar. Barcelona

Introducción

El descubrimiento de la mutación JAK2V617F en 2005 constituyó un gran avance en el conocimiento de la patogenia de las neoplasias mieloproliferativas (NM) clásicas: policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (TE) y mielofibrosis primaria (MFP). Su repercusión se tradujo, en primer lugar, en una revisión de los criterios diagnósticos de la OMS de 2001, al incorporar la detección de JAK2V617F u otras alteraciones moleculares como las mutaciones en el exón 12 de JAK2 o del receptor de la trombopoyetina (c-MPL) en los nuevos criterios diagnósticos de la OMS de 2008. En segundo lugar, la presencia o ausencia de la mutación JAK2V617F en los pacientes con NM ha permitido también establecer diferencias clínicas, evolutivas y pronósticas según el estado mutacional. Finalmente, y de forma análoga a lo sucedido en la leucemia mielóide crónica, donde el tratamiento de la proteína quimérica BCR-ABL1 por diversas tirosina-cinasas (TK) ha modificado la historia natural de la enfermedad, las expectativas de poder aplicar también un tratamiento dirigido contra una diana molecular específica como JAK2V617F han surgido de forma inevitable. En los últimos años han aparecido, después de los correspondientes estudios preclínicos, diversos inhibidores de JAK2, que muestran mayor o menor selectividad y eficacia y que son objeto de la presente ponencia.

JAK2 y neoplasias mieloproliferativas

Las proteínas cinasas Janus o JAK (*Janus kinases*) son TK que en condiciones normales desempeñan un papel fundamental en las vías de transducción de señales activadas por receptores celulares en respuesta a diversos factores de crecimiento como eritropoyetina (EPO), trombopoyetina (TPO), factor estimulante de colonias granulomonocíticas (GM-CSF), interferones y diversas citocinas. Las JAK regulan, a través de receptores celulares específicos, numerosos aspectos de la hematopoyesis, la inmunidad, la inflamación y el crecimiento celular¹. En la especie humana la familia de JAK está constituida por cuatro proteínas: JAK1, JAK2, JAK3 y Tyk2 (tirosina-cinasa 2) con diferentes funciones. JAK1 transmite señales mediante diferentes receptores para: a) interleucinas (IL) como IL-6, IL-11, IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, entre

otras; b) interferón (IFN)-alfa, beta y gamma y, c) factor estimulante de colonias granulocíticas. Asimismo, JAK1 juega un papel principal en la señalización de diversas citocinas proinflamatorias. La activación de señales de JAK1 requiere la presencia de otras JAK como JAK2, JAK3 o Tyk2 para que se produzca la activación de determinados receptores. JAK2, a diferencia de JAK1, no precisa la presencia de otras JAK para la transducción de señales de los receptores activados de EPO, TPO y GM-CSF, pero en cambio necesita Tyk2 para IL-12 y IL-23, y JAK1 para las señales de IFN-gamma². En el contexto de las NM, cabe recordar que los factores de crecimiento EPO, TPO, GM-CSF, SCF (*stem cell factor*), IL-3 e IGF-1 (*insulin growth factor-1*), a los que los progenitores hematopoyéticos son hipersensibles, utilizan todos JAK2 para la señalización celular. JAK3 se expresa únicamente en linfocitos y en modelos murinos que carecen completamente de ella; se observa un bloqueo del desarrollo de los linfocitos B y graves defectos funcionales de los linfocitos T. Por último, Tyk2 actúa conjuntamente con JAK1 y JAK2 y desempeña un papel importante en la respuesta inmune².

Las JAK presentan siete dominios homólogos (JH), localizándose el dominio de la cinasa funcional o activa (JH1) y el dominio de la pseudocinasa (JH2) en el extremo carboxiterminal. La mutación somática activante (*gain of function*) JAK2V617F de las NM se produce en el dominio de la pseudocinasa JH2 (dominio autorregulador negativo) que actúa de forma inhibitoria como estabilizador del dominio activo JH1. La mutación, por tanto, desregula la función inhibitoria normal de JH2 sobre el dominio activo JH1 de la cinasa JAK2. En condiciones normales, los receptores de factores de crecimiento o de citocinas carecen de actividad intrínseca y ésta sólo aparece cuando se une el ligando o factor de crecimiento o citocina a su receptor específico. En las NM, como consecuencia de la mutación V617F en el dominio autoinhibitorio de la pseudocinasa JH2, se activa de forma constitutiva la vía de transducción de señales (Figura 1). La activación constitutiva de la vía en el caso de la mutación V617F es continua y no autorregulada (a diferencia de la estimulación que se produce en condiciones normales). Como consecuencia de la activación, se produce la fosforilación-activación de STAT (*signal transducers and activators of transcription*), las cuales a su vez inducen la activación de múltiples

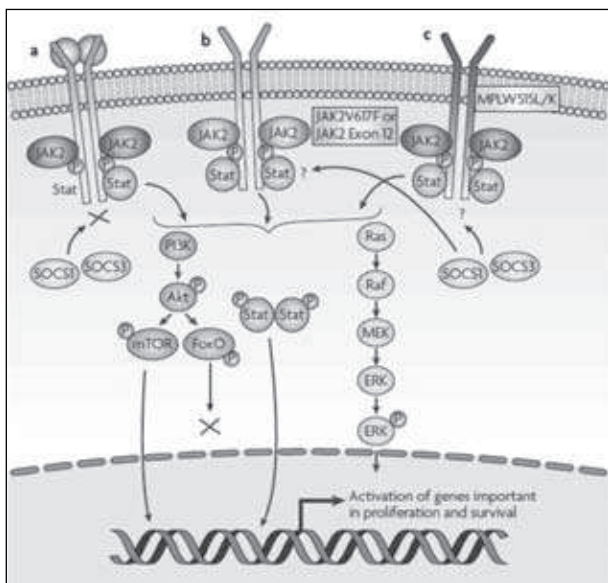


Figura 1. Mecanismo de activación de JAK2; a) activación del receptor en condiciones normales; b) activación de la vía de transducción de señales en presencia de la mutación JAK2V617F o de mutaciones en el exón 12 de JAK2; c) activación de la vía de transducción de señales en presencia de mutaciones en el receptor de la trombopoyetina. Fuente: modificado de Levine¹.

vías de señales que incluyen las vías de MAPK (*mitogen activated protein kinase*) y PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*)-Akt. Las STAT penetran en el núcleo de la célula interviniendo en los mecanismos de proliferación y diferenciación, regulación celular y apoptosis, modificando el comportamiento de la célula. La regulación negativa de la vía activada de señales de JAK está mediada por las proteínas SOCS (*suppressor of cytokine signalling*) que se unen a las cinasas JAK e inhiben su actividad catalítica (Figura 1). Existen evidencias de que JAK2V617F puede escapar al *feedback* o regulación negativa de SOCS3. En definitiva, la activación de JAK2 en las NM no obedece al mecanismo fisiológico secuencial de: factor de crecimiento o citocina que se liga a su receptor, activación del mismo, fosforilación de JAK2 y activación de STAT, sino que la mutación, independientemente de la presencia del factor de crecimiento o citocina correspondiente, determina un estado de activación y transducción de señales permanente que se escapa de la regulación normal de la célula.

Características de los inhibidores de JAK2

Desde un punto de vista conceptual y para una mejor comprensión de la posible o potencial selectividad de los fármacos o moléculas anti-JAK2, es importante destacar que la mutación V617F no se encuentra situada en el sitio de unión al ATP (*ATP binding-site*) de

JAK2. Esto implica que debido a la falta de inhibición selectiva de JAK2 de los inhibidores actuales, que son ATP-competitivos y que se fijan al sitio de unión del ATP, se produce también una inhibición de la JAK2 no mutada, con la consiguiente repercusión en la hematopoyesis normal (potencial mielodepresión)³. Desde un punto de vista estructural, parece ser que la geometría espacial del sitio de unión al ATP es relativamente más estrecha o tortuosa que en otros tipos de TK, lo que dificultaría el acoplamiento necesario para que se produjese la acción selectiva de las moléculas anti-JAK2. No obstante, entre los sitios activos de las cuatro JAK existen diferencias, observadas a partir de modelos obtenidos de estructuras cristalinas y de la secuencia de aminoácidos, lo cual podría utilizarse teóricamente para intentar lograr una mayor selectividad de acción. De igual forma, los potenciales electrostáticos de superficie que rodean los sitios de unión al ATP son diferentes entre unas JAK y otras, lo que también podría constituir una posible estrategia para lograr una mayor selectividad⁴.

La mayoría de los inhibidores ATP-competitivos de JAK2 experimentados en líneas celulares y en modelos murinos reducen o inhiben la proliferación y la supervivencia celular de líneas celulares y de células de pacientes JAK2V617F-positivos. Asimismo, las células JAK2V617F-positivas son más sensibles a los inhibidores que las células que expresan la forma no mutada de JAK2. Algunos inhibidores son más selectivos para JAK2 que para JAK1, JAK3 y Tyk2, y algunos muestran acción sobre otras cinasas, como el receptor del factor de crecimiento de los fibroblastos, el receptor del factor de crecimiento de plaquetas, el receptor del factor de crecimiento del endotelio y también sobre FLT3⁵. Las diferencias comparativas en cuanto a actividad sobre las otras JAK expresadas en número de veces respecto a los valores de IC50 de JAK2 se muestran en la Tabla 1. No obstante, las diferencias de la teórica actividad *in vitro* de un inhibidor de JAK2 respecto al resto de JAK deben contrastarse en ensayos clínicos, pues se ha observado que las diferencias observadas en experimentos celulares no son tan grandes como lo que las pruebas bioquímicas muestran².

Experiencia clínica con inhibidores de JAK2

La información sobre la experiencia clínica de los inhibidores de JAK2 proviene en su mayoría de *abstracts* de congresos internacionales y de publicaciones sobre un número de pacientes relativamente escaso. La enfermedad en la que se han experimentado de forma mayoritaria los inhibidores de JAK2 ha sido la mielofibrosis primaria y la mielofibrosis post-policitémica (MF post-PV) y post-trombocitémica (MF

Tabla 1. Selectividad de inhibidores de JAK2

Inhibidor	JAK2 (nM)	JAK1	JAK3	TYK2
INCB 18424	4,5	0,6	72	4
TG 101348	3	35	332	135
CEP-701	1	–	3	–
SB1518	22	58	24	–
CYT387	18	0,6	9	–

Valores de IC50 (nM) para JAK2. Los valores de IC50 para JAK1, JAK2 y TYK2 se muestran en actividad en número de veces respecto a los valores IC50 de JAK2. Fuente: modificado de Hitoshi²

post-TE). La mielofibrosis ha sido el primer modelo clínico escogido por varias razones. En primer lugar, por su corta supervivencia cuando se compara a la de los pacientes con PV y TE; en segundo lugar, porque sus características clínicas (anemia, esplenomegalia, síntomas constitucionales) determinan un conjunto de manifestaciones que afectan de forma importante la calidad de vida de los pacientes y, finalmente, porque el tratamiento actual del que se dispone (a excepción del trasplante de progenitores hematopoyéticos) es únicamente paliativo. A continuación, se detalla la experiencia clínica de los principales inhibidores de JAK2 en diferentes fases de ensayos clínicos (Tabla 2).

INCB-018424

INCB-018424 o ruxolitinib es un inhibidor de JAK2 que ha mostrado ser un potente inhibidor de las TK JAK2 y JAK1 en la fase preclínica. Por el contrario, no parece afectar a JAK3, pues necesita unas concentraciones dos logaritmos superiores en comparación a JAK2 para inhibirla, lo que determina que la linfopoyesis permanezca intacta. La acción inhibitoria sobre JAK1 es especialmente importante en los pacientes con mielofibrosis, pues es la TK involucrada en la producción de diversas citocinas inflamatorias como IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), citocinas que se detectan en elevadas concentraciones en la mielofibrosis. Dichas citocinas están vinculadas al estado hiperatabólico y a los síntomas constitucionales como fatiga y pérdida de peso. INCB-018424 inhibe la fosforilación de JAK2V617F, STAT5 y ERK1/2, resultando en una reducción de la proliferación celular y en la inducción de apoptosis. Asimismo, inhibe la proliferación *ex vivo* de progenitores eritroides obtenidos de pacientes con PV JAK2V617F-positivos. En un modelo murino en el que se inocularon células Ba/F3-EpoR-JAK2V617F, INCB-018424 redujo la esplenomegalia producida por el inóculo, recuperó la arquitectura linfoide esplénica y prolongó la supervivencia. INCB-018424 también ha demostrado reducir las concentraciones de citocinas proinflamatorias

como IL-6 y TNF- α y preservar la linfopoyesis, pues no inhibe JAK3⁶.

Durante la reunión de ASH de diciembre de 2009 se comunicaron los resultados de este inhibidor en dos grupos de pacientes, el primero con MFP y MF post-PV y MF post-TE, y el segundo, en pacientes con PV y TE resistentes a hidroxiurea^{7,8}. El primer

estudio reunió 153 pacientes con mielofibrosis (53% MFP, 32% MF post-PV y 15% MF post-TE), con una mediana de edad de 65 años y con 2/3 de los pacientes pertenecientes a la categoría de riesgo alta según criterios del International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment (IWG-MRT). La mediana del número de tratamientos previos era de 2, un 82% de los pacientes eran JAK2V617F-positivos, y un tercio tenían historia previa de transfusiones. Con una mediana de tratamiento de 15 meses, el 75% del total de pacientes se mantuvieron en tratamiento activo. La dosis de INCB-018424 fue variable, optimizándose a un inicio de 15 mg 2 veces al día y escalándose a 25 mg de acuerdo con la respuesta y la toxicidad. La toxicidad hematológica fue variable y dosis-dependiente; con 25 mg se observó anemia de grado (G) 3 y G4 en un 21% y 3% de pacientes, respectivamente, mientras que sólo fue de G3 en un 8% cuando la dosis fue de 15 mg. Con esta dosis no se apreció trombocitopenia valorable, mientras que ésta fue de G3 en un 23% y de G4 en un 6% con dosis de 25 mg. Se observó una mediana de reducción del tamaño esplénico por palpación del 50%, mantenida a lo largo del tratamiento, e independiente del estado mutacional de JAK2V617F o del tipo de mielofibrosis. Por otra parte, la mayoría de los pacientes redujeron en más del 50% los síntomas constitucionales como sudación nocturna, prurito, molestias abdominales y dolores óseos. La mejoría de síntomas se asoció a una importante reducción de las concentraciones de citocinas inflamatorias como proteína C reactiva, IL-6

Tabla 2. Inhibidores de JAK

Molécula	Enfermedad y fase de estudio	Diana biológica
INCB018424 (Incyte)	MF: fase I/II, III TE/PV: fase II	JAK1 y JAK2
TGC101348 (Targe Gen)	MF: fase I	JAK2
CEP-701 (Cephalon)	MF: fase II TE/PV: fase II	JAK2 y FLT3
SB1518 (S* Bio)	MF: fase I	JAK2 y FLT3
AZD1480 (Astra Zeneca)	MF: fase I	JAK2

y TNF- α , entre otras. La dosis de 25 mg 2 veces al día demostró ser la más efectiva para reducir la esplenomegalia y mejorar los síntomas constitucionales. Desde el punto de vista hematológico, se redujo de forma moderada la carga alélica de JAK2V617F (18% a los 2 años) y se apreció una disminución mantenida de la leucocitosis y de la trombocitosis, así como de las células CD34+ en sangre periférica. El número de transformaciones agudas fue inferior al esperable, y la supervivencia global fue mejor que la teórica según el grupo de riesgo del IWG⁷. En resumen, INCB-018424 es un inhibidor de JAK2 y JAK1 eficaz en las manifestaciones proliferativas de la mielofibrosis, que consigue una importante mejoría sintomática y funcional de los pacientes.

El segundo estudio incluyó 73 pacientes (34 PV y 39 TE) refractarios o intolerantes a hidroxiurea. La dosis utilizada fue de 10 mg en PV y de 25 mg en TE, 2 veces al día. Un 74% y un 10% de los pacientes con PV y TE presentaban esplenomegalia, respectivamente, y la mediana de carga alélica de JAK2V617F en PV y TE era del 70% y 33%, respectivamente. Un 45% y un 52% de los pacientes con PV consiguieron una respuesta completa (RC) y parcial (RP), respectivamente, de acuerdo con los criterios del European Leukemia Net (ELN). En TE, con un 90% de respuestas globales (RG), un 13% y un 77% consiguieron RC y RP, respectivamente, según criterios del ELN. La toxicidad hematológica fue escasa, sin observarse toxicidad G4, y tan sólo un 3-5% presentó toxicidad G3. Todos los pacientes con PV eliminaron la necesidad de flebotomías a partir de la tercera semana de tratamiento, normalizándose el hematocrito y la cifra de plaquetas y de leucocitos. En la mayoría de los pacientes con PV se redujo la esplenomegalia palpable en más del 50%, y prácticamente en todos desapareció el síntoma prurito. En TE, la eficacia del tratamiento fue inferior a la de la PV, disminuyendo, no obstante, la cifra de plaquetas a $< 600 \times 10^9/L$ a los 6 meses y normalizándose la cifra de leucocitos en todos los casos. Asimismo, un gran porcentaje de pacientes con TE redujeron los síntomas constitucionales. Un 92% del total de los pacientes permanecen en el estudio, con diferentes dosis y con una mediana de tratamiento de 10 meses. Un aspecto importante de este estudio fue la escasa toxicidad hematológica y la nula toxicidad extrahematológica⁸.

TG 101348

TG 101348 es un inhibidor oral con muy alta selectividad para JAK2 que se ha evaluado en fase I en el tratamiento de la mielofibrosis. En los primeros ensayos se administraron dosis escaladas de 30 a 800 mg, con una dosis máxima tolerada de 680 mg. La toxicidad

limitante de dosis fue amilasemia/lipasemia G3-4, asintomática y reversible². En la última actualización de ASH se presentaron datos de 59 pacientes, 28 en la fase de escalado de dosis y 31 en fase de confirmación⁹. El 86% de los pacientes eran JAK2V617F-positivos. Después de una mediana de tratamiento de 12 semanas, el 69% del total de los pacientes continuaban el tratamiento. La toxicidad hematológica de los pacientes que recibieron dosis ≥ 680 mg ($n = 33$) fue anemia G3-4 en un 42%-8%, neutropenia de G3-4 en un 15%-0% y trombocitopenia de G3-4 en un 20%-10%, siendo, por tanto, la anemia el efecto mielodepresor observado más importante. La toxicidad extrahematológica fue principalmente gastrointestinal, hepática y renal e hiperamilasemia. Una reducción superior al 50% del tamaño esplénico inicial se observó en el 67% de los pacientes, y en un 27% la esplenomegalia desapareció. La disminución mediana de la carga alélica fue del 48%, y en los pacientes que recibieron dosis ≥ 680 mg, la mitad presentó una reducción $\geq 50\%$. Asimismo, se objetivó una gran mejoría clínica o incluso desaparición de los síntomas constitucionales en una mayoría de pacientes, aunque el inhibidor no modificó las concentraciones de citocinas proinflamatorias.

CEP-701

CEP-701 (lestaurtinib) es un potente inhibidor de FLT3 que se ensayó, en primer lugar, en pacientes con leucemia aguda mieloide portadores de la mutación. Posteriormente, se observó su capacidad de inhibir el crecimiento *in vitro* de progenitores eritroides JAK2V617F-positivos de pacientes con PV y de la línea celular HEL92.1.7 homocigota para JAK2V617F, mientras que no inhibía el crecimiento de progenitores eritroides en sujetos sanos¹⁰.

Un estudio de fase II en 22 pacientes con mielofibrosis, utilizando dosis de 80 mg 2 veces al día, consiguió mejoría clínica en 6 pacientes (27%), con reducción de la esplenomegalia en 3 e independencia transfusional en 2. La mediana de tiempo para la respuesta fue de 3 meses, y la duración de la misma, de 14 meses. Los efectos secundarios más importantes fueron mielosupresión G3-4 y alteraciones gastrointestinales (diarrea, náusea, vómito) de diverso grado en una gran mayoría de pacientes. No se observó mejoría en la fibrosis medular, ni en las alteraciones citogenéticas, ni tampoco disminución de la carga alélica de JAK2V617F, aunque sí en la expresión de STAT3 fosforilado. Tampoco se apreciaron diferencias en las concentraciones de citocinas proinflamatorias entre los pacientes que respondieron o los que no lo hicieron¹¹. Lestaurtinib también ha demostrado actividad en 27 PV y 12 TE de alto riesgo que en su mayoría

habían recibido hidroxiurea previamente. El objetivo del estudio fue analizar la reducción de la carga alélica de JAK2V617F en neutrófilos. Después de 18 semanas de tratamiento, la mayoría de los pacientes redujeron la esplenomegalia y el prurito, aunque la reducción de flebotomías fue tardía, a los 6 meses. De forma paradójica, no sólo no disminuyeron las plaquetas y los leucocitos, sino que incluso aumentaron durante el tratamiento. La reducción de la carga alélica fue $\geq 15\%$ a las 18 semanas. Cinco pacientes presentaron episodios trombóticos¹².

SB1518

SB1518 (ONX 0803) es un inhibidor oral ATP-competitivo selectivo de JAK2, tanto de la forma mutada como de la forma no mutada y de FLT3. Este inhibidor también muestra actividad en pacientes con linfoma refractario o en recaída. Inhibe la fosforilación de STAT3 y STAT5 de forma dosis-dependiente tanto en progenitores eritroides de pacientes con PV como en sujetos sanos con la forma nativa (no mutada) de JAK2¹³. En un estudio muy reciente en fase I sobre 20 pacientes con mielofibrosis, se ha observado que la principal toxicidad es gastrointestinal (diarrea) y que la dosis a evaluar en estudios de fase II es de 400 mg, dosis única diaria, en ciclos de 28 días¹⁴.

Conclusiones

Los resultados de los estudios clínicos con los actuales inhibidores ATP-competitivos de JAK2 muestran que, aunque son eficaces en pacientes con mielofibrosis por la mejora conseguida en su calidad de vida, su acción no es selectiva sobre la mutación JAK2V617F, pues, en mayor o menor grado, su repercusión sobre la hematopoyesis normal provoca una mielodepresión variable según el inhibidor utilizado. Aunque esto supone, desde el punto de vista teórico, un inconveniente, la acción sobre JAK1, implicada en la respuesta inflamatoria, supone una clara ventaja en los pacientes con mielofibrosis. El diseño de nuevas moléculas selectivas de JAK2V617F o de otras mutaciones presentes en las NM proporcionaría una acción clínica óptima eliminando la hematopoyesis clonal y preservando la hematopoyesis normal. No obstante, y aparte de las limitaciones técnicas del diseño farmacológico de nuevos inhibidores, todavía quedan por resolver diversas cuestiones, como: a) ¿por qué un inhibidor de JAK2 es eficaz clínicamente en pacientes JAK2V617F-negativos?; b) ¿puede limitarse la toxicidad extrahematológica?; c) ¿es necesario un tratamiento combinado para lograr una eficacia clínica mayor y más duradera?;

d) ¿la duración del tratamiento debe ser indefinida?; e) ¿es factible la disminución de la fibrosis medular? Estas y otras cuestiones constituyen el escenario clínico que los actuales y futuros inhibidores deberán resolver en los próximos años.

Bibliografía

- Levine RL, Pardanani A, Tefferi A, Gilliland G. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev Cancer* 2007;7:673-683.
- Hitoshi Y, Lin N, Payan DG, Markovtsov V. The current status and the future of JAK2 inhibitors for the treatment of myeloproliferative diseases. *Int J Hematol* 2010;91:189-200.
- Verstovsek S. Therapeutic potential of JAK2 inhibitors. *Hematology* 2009. ASH Education Program Book; 636-642.
- Haan C, Behrmann I, Haan S. Perspectives for the use of structural information and chemical genetics to develop inhibitors of Janus kinases. *J Cell Mol Med* 2010;14:504-527.
- Verstovsek S. Therapeutic potential of Janus-activated kinase-2 inhibitors for the management of myelofibrosis. *Clin Cancer Res* 2010;16:1988-1996.
- Quintás-Cardama A, Vaddi K, Liu P, Manshouri T, Li J, Scherle PA et al. Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitor INCB018424: therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2010;115:3109-3117.
- Verstovsek S, Kantarjian H, Mesa RA, Cortes-Franco J, Pardanani A, Thomas DA et al. Long-term follow-up and optimized dosing regimen of INCB18424 in patients with myelofibrosis: durable clinical, functional and symptomatic responses with improved hematological safety. *Blood* 2009;114:315 (abstract 756).
- Verstovsek S, Passamonti F, Rambaldi A, Barosi G, Rosen P, Levy R et al. A phase II study of INCB18424, an oral, selective JAK1/JAK2 inhibitor, in patients with advanced polycythemia vera (PV) and essential thrombocythemia (ET) refractory to hydroxyurea. *Blood* 2009;114:132 (abstract 311).
- Pardanani AD, Gotlib JR, Jamieson C, Cortes J, Talpaz M, Stone R et al. A phase I evaluation of TG101348, a selective JAK2 inhibitor in myelofibrosis: clinical response is accompanied by significant reduction in JAK2V617F allele burden. *Abstract 755. Blood* 2009; 114:314.
- Hexner EO, Serdikoff C, Jan M, Swider CR, Robinson C, Yang S et al. Lestaurtinib (CEP701) is a JAK2 inhibitor that suppresses JAK2/STAT5 signaling and the proliferation of primary erythroid cells from patients with myeloproliferative disorders. *Blood* 2008;111:5663-5671.
- Santos FPS, Kantarjian HM, Jain N, Manshouri T, Thomas DA, Garcia-Manero G et al. Phase 2 study of CEP-701, an orally available JAK2 inhibitor, in patients with primary or post-polycythemia vera/essential thrombocythemia myelofibrosis. *Blood* 2010;115:1131-1136.
- Molitero AR, Hexner E, Roboz GJ, Carroll M, Luger S, Mascarenhas J et al. An open-label study of CEP-701 in patients with JAK2V617F-positive PV and ET: update of 39 enrolled patients. *Abstract 753. Blood* 2009 114:313.
- Goh KC, Hart S, Tan YC, Chithra A, Ong KH, Wood J. The effects of SB1518, a novel oral JAK2 inhibitor on ex vivo expanded PV erythroid progenitors correlate with clinical observations. *Abstract 2913. Blood* 2009;114:1138.
- Seymour F, To B, Goh A, Meadows L, Ethirajulu A, Wood A et al. First report of the phase-I study of the novel oral JAK inhibitor SB1518 in patients with myelofibrosis. *Haematologica* 2010;95(s2):472 (abstract 1144).

The controversy of hydroxyurea-induced leukemia in polycythemia vera and essential thrombocythemia

T. BARBUI

Hematology and Research Foundation. Ospedali Riuniti. Bergamo (Italy)

The primary objective of this review is to investigate the relationship between hydroxyurea monotherapy and the risk of leukaemia transformation (LT) in the setting of Ph-negative myeloproliferative neoplasms (MPN) excluding primary myelofibrosis.

Acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndrome (MDS) may develop in patients with essential thrombocythemia (ET) and polycythemia vera (PV) who never received cytoreductive drugs. The controversy persists on whether the extension of this risk may be enhanced by the use of hydroxyurea (HU). The issue is of great interest for two main reasons: first, HU has been found to be efficacious in randomized clinical trials and numerous observational studies and presents a good compliance for extended periods of treatment so that current guidelines recommend this drug as first line therapy. Second, in upcoming clinical trials testing the efficacy and safety of new drugs including IFN and JAK2 inhibitors, HU is the standard comparator. It should be emphasized that the interpretation of results concerning LT studies in MPN does not allow to reach valid conclusions since many studies have a limited number of patients and inadequate follow-up period. In addition, the limited number of events prevents a robust analysis and may account for the conflicting results. In two cohorts of ET by French and Italian investigators leukemia evolution in the group of patients who did not receive myelosuppressive therapy was not statistically different from HU treated group in which LT occurred in about 3.5% after a median follow-up period of 98 months. Among 605 patients with ET, Mayo Clinic investigators reported 20 cases (3.3%) of LT after a median follow-up of 84 months. Of note, HU was not associated with increased rate of leukaemia and 4 patients (20%) were previously untreated leading to conclude that LT is a natural sequelae of ET.

In the European collaborative low-dose aspirin (ECLAP) study, five (0.8%) of 664 PV patients treated with phlebotomy with or without interferon have progressed to AML. Similarly, six (0.8%) of 736 patients who were managed with HU alone developed AML.

In a recent case control-study, 162 AML/MDS cases were identified in a large national registry of 11.039 patients with myeloproliferative neoplasm (MPN) and compared with 242 matched MPN con-

trols. Interestingly, 41 (25%) of AML cases were never exposed to cytoreductive therapy and Hydroxyurea therapy even at high doses was not associated with a significant higher risk of AML/MDS than in matched controls. Further support to the low, if any, leukemogenic potential of HU comes from a systematic review of the existing data not only in patients with sickle cell disease but also in subjects with other diseases, including MPN. The conclusion of this review was that current evidence, albeit limited, suggests that hydroxyurea treatment in adults with MPN does not increase the risk for leukaemia. Similar results were obtained in PT1 trial in which the rate of AML in HU arm as compared to Anagrelide (thought to be non leukemogenic) was not different. However, in a long-term analysis of a randomized clinical trial comparing HU to Pipobroman in 292 PV patients (median follow-up 16.3 years), median survival was 20.3 years in HU arm and 15.4% in Pipobroman arm and cumulative incidence of AML/MDS at 10, 15 and 20 years was 6.6%, 16.5% and 24% in the HU and 13%, 34% and 52% in the Pipobroman arm, respectively ($p = 0.004$). In this report, documenting that an high proportion of PV patients exposed for decades to HU may develop leukaemia, it is not clear whether patients did not receive any other drug during this long period of observation. In spite of these uncertainties concerning the leukemogenic role of HU as single drug, there is no controversy that HU sequentially given after 32P and alkylating agents could potentiate the mutagenic potential of these compounds. In conclusion, the bulk of evidence does not support a clear leukemogenic risk of HU and points on the possibility that LT may depend on intrinsic disease biology rather than on the use of HU. Moreover, it is very likely that in the next future the epidemiology of AML/MDS in ET and PV should be reviewed on the light of the new WHO diagnostic criteria that separate initial pictures of PVSG diagnosed ET patients into true ET and primary myelofibrosis. This latter might have a different natural history including hematologic transformation and survival.

Further insights on this topic can be derived from cytogenetic and JAK2 V617F studies in blast cells at the time of transformation into leukemia. Recent investigations report the absence of this mutation in leukemic blasts of previously mutated patients. In

spite of JAK2 V617F disappearance, multiple chromosomal aberrations were still found in some patients implying that clonal cells, negative for JAK2 V617F, may precede the acquisition of JAK2 mutation without inducing an apparent phenotype. The hypothesis

that cytotoxic therapy including interferon and JAK2 inhibitors may impose a selective pressure on these potentially leukemogenic JAK2 V617F negative clonal cells, cannot be excluded and prospective studies in this regard are warranted.

IX LECCIÓN

CONMEMORATIVA

RICARDO CASTILLO

COORDINADORES: P. MARCO. *Alicante*
J. CESAR. *Madrid*

Hemostasis defects and bleeding in chronic liver disease: a paradigm is challenged

P.M. MANNUCCI

Scientific Direction. IRCCS Cà Granda Foundation Maggiore Policlinico Hospital. Milan, Italy

Introduction

Chronic liver diseases are associated with bleeding manifestations (particularly from esophageal varices), that are accompanied by laboratory signs of thrombocytopenia and/or thrombocytopathy, decreased synthesis of most coagulation factors and hyperfibrinolysis. Because of these characteristics chronic liver disease has been identified until recently as a prototype of acquired hemostasis abnormalities, and the causal relationship between abnormal hemostasis tests and bleeding tendency has become a paradigm. I shall attempt to demonstrate how data from the most recent literature challenge this paradigm. This reassessment may have important practical implications for treatment and prophylaxis of bleeding in patients with chronic liver disease.

Primary hemostasis

While thrombocytopenia in chronic liver disease is caused by platelets destruction and/or increased splenic and hepatic sequestration¹, thrombocytopathy is characterized by defective thromboxane A₂ synthesis, storage pool deficiency, abnormalities of platelet glycoprotein Ib and others abnormalities²⁻¹¹. The complex defect stemming from the abnormalities of primary hemostasis has been historically documented by the observation of the prolonged skin bleeding time test, which is a common feature in approximately 40% of patients with chronic liver disease¹². However, the clinical relevance of this finding has not been substantiated. For instance, no association was found between abnormal bleeding time and clinical bleeding¹³. Desmopressin (a vasopressin analogue), when given intravenously or subcutaneously, is able to shorten the prolonged bleeding time in patients with chronic liver disease¹⁴⁻¹⁶, but the significance of this information is obscured by the demonstration that desmopressin is unable to stop bleeding from the upper gastrointestinal tract¹⁷. Another study showed that treatment with desmopressin was unable to control bleeding and reduce transfusion requirements in patients with cirrhosis undergoing surgical hepatectomy¹⁸. These data points to the concept that the defect of primary hemostasis as investigated by the current laboratory methods is not relevant from a clinical standpoint. In addition, a study

investigating platelet adhesion to the subendothelium under flow conditions found that very high plasma levels of von Willebrand factor, which are typical features of patients with cirrhosis, compensate for the defect of platelet number and function in these patients unless they are severely thrombocytopenic¹⁹.

Hence, the common practice of performing the skin bleeding time in patients who undergo liver biopsy or other invasive procedures should be abandoned, and the bleeding risk owing to primary hemostasis defects should be assessed solely on the basis of platelet counts and clinical judgment. Recent guidelines issued by the American Association for the Study of Liver Disease on liver biopsy recommend transfusion when platelets are lower than $50-60 \times 10^9/L$ ²⁰. Treatment with the agonist of the thrombopoietin receptor (eltrombopag), able to increase the platelet number²¹, might be a suitable alternative but requires investigation.

Coagulation

Chronic liver disease is a condition associated with decreased plasma levels of most pro-coagulant factors, except factors VIII and von Willebrand factor, which are high²². Decreased levels of pro-coagulants are, however, accompanied by the concomitant decrease of naturally occurring anti-coagulants²². While in normal conditions the coagulation system is balanced by the two opposing drivers (pro- and anti-coagulant), the significance of the occurrence of the concomitant decrease of both pro- and anti-coagulant factors in chronic liver disease was overlooked for many years. Accordingly, this condition was until recently considered as the epitome of acquired coagulopathies, and the basic tests of coagulation (prothrombin and activated partial thromboplastin times, PT and APTT) have been widely used to assess the risk of bleeding. This attitude is, however, in contrast with the evidence from the literature and clinical practice that the PT, APTT and similar tests are poorly correlated with the occurrence and duration of bleeding after liver biopsy or other potentially invasive procedures²³. Furthermore, traditional coagulation tests are poorly associated with gastrointestinal bleeding, the epitome of hemorrhagic manifestations in chronic liver disease²⁴. In the past, transplantation,

the prototype of major surgery in chronic liver disease, required massive transfusion, which was attributed to the severe abnormalities of coagulation tests observed in patient with chronic liver disease before and during transplantation. However, the need for transfusion declined considerably over time and this was due to improved surgical and anesthesiology procedures, rather than to major changes in medication.

How can the chronic liver disease paradox (i.e., the poor association between these abnormal tests and bleeding) be explained? Perhaps conventional coagulation tests are inadequate to evaluate the balance of coagulation as it occurs *in vivo*, especially in a clinical condition such as chronic liver disease characterized by a concomitant decrease of both pro- and anti-coagulants²³. To truly investigate the interaction between the pro- and anti-coagulants, coagulation tests must be responsive to both players. Unfortunately, conventional coagulation tests are responsive to the pro-, but not to the anti-coagulants²³. This hypothesis was recently tested in order to investigate the balance of coagulation in chronic liver disease by means of a new test that measures the total amount of thrombin (the final enzyme of coagulation) generated from plasma upon activation of coagulation by small amount of tissue factor and phospholipids (or platelets) as triggers. This test, being responsive to the action of both the pro- and anticoagulants, is more suited than other coagulation tests to represent the balance of coagulation²⁵. Using this test evidence was provided that patients with chronic liver disease generate as much thrombin as healthy subjects²⁶, provided platelet numbers are above $60 \times 10^9/L$ ²⁷. This happens notwithstanding the fact that the PT and APTT are prolonged.

The overall conclusion stemming from these observations is that the balance of coagulation in patients with chronic liver disease is normal, provided it is assessed with global tests reflecting the functions of both pro- and anti-coagulants.

There are important practical implications stemming from these conclusions. First, they question the usefulness of conventional coagulation tests to assess the risk of bleeding in patients with chronic liver disease, as well as the common practice of using arbitrary cut-off values for the PT to make decision on whether or not a potentially hemorrhagic procedure can or cannot be safely carried out.

Second, they question the value of treating patients with chronic liver disease with abnormal coagulation tests by means of fresh-frozen plasma or other pro-coagulant agents. While there are no randomized studies with clinical end-points investigating the value of treatment/prophylaxis with fresh-frozen plasma in patients with chronic liver disease, there are studies that investigated the value of treat-

ing patients with chronic liver disease with recombinant activated factor VII (NovoSeven®). In one of these studies 245 patients with chronic liver disease with active upper gastrointestinal bleeding were randomly allocated to treatment with NovoSeven® (100 µg/kg × 8 doses) or placebo²⁸. No significant differences for primary end-points (death, failure to control bleeding and re-bleeding) were observed between the two groups, in spite of the fact that the prolonged PT in patients treated with NovoSeven® were significantly shortened²⁸. A second study, performed in the same setting on patients with more severe chronic liver disease, gave similarly negative results²⁹. Finally, two subsequent randomized studies showed that treatment with NovoSeven® was ineffective in reducing blood transfusion requirements in patients with chronic liver disease undergoing hepatectomy^{30,31}. Results stemming from these clinical trials are not surprising, and can be easily reconciled with the observations of a normal coagulation balance in patients with chronic liver disease.

Fibrinolysis

Although hyper-fibrinolysis has been advocated to occur in patients with cirrhosis, its role as a determinant of bleeding in these patients is debated³². Uncertainty, as for primary hemostasis and coagulation, rests mainly on the lack of appropriate laboratory tests for the global exploration of this antihemostatic system. Most observations are based upon the measurement of the individual components of the system rather than on the overall activity, with consideration of the balance of pro- and anti-fibrinolytic drivers. Chronic liver disease has been associated with low levels of plasminogen, plasmin inhibitor, factor XIII or TAFI, but also with high levels of tPA or PAI-1³³⁻³⁷. These contrasting results contribute to the uncertainty on the clinical value of hyper-fibrinolysis in this setting. Attention has been paid to TAFI³⁸, surmising that the low levels of this principal fibrinolysis inhibitor in chronic liver disease might be an explanation for the hyper-fibrinolytic state often advocated in patients with chronic liver disease. Lisman *et al.*³⁹ tested this hypothesis by measuring the individual components of fibrinolysis as well as the overall plasma fibrinolytic capacity assessed by a global test. TAFI deficiency observed in patients with chronic liver disease did not translate into a heightened plasma fibrinolysis, as shown by the negative results of the global test. They suggested that, as it occurs for coagulation, the balance of fibrinolysis is restored by the concomitant reduction of both pro- and anti-fibrinolytic drivers³⁹. Opposite results and conclusions were indeed reported by Colucci *et al.*⁴⁰. This contro-

versy, probably explained by the different global fibrinolysis assays employed, leaves room for further investigation to clarify the role played by fibrinolysis as a determinant of the bleeding risk in patients with chronic liver disease. However, the measurements of the individual factors of this system (both pro- and anti-fibrinolytic) are unlikely to help. Efforts should be aimed at developing global tests, which should then be evaluated in clinical trials to assess the extent of fibrinolysis derangement and its role in the bleeding risk of patients with chronic liver disease.

To sum up, it is still unknown whether or not a hyper-fibrinolytic state occurs in patients with chronic liver disease and also whether or not this state is responsible to initiate and/or maintain bleeding. All the aforementioned observations translate into a state of uncertainty as to whether or not patients with chronic liver disease should be treated with anti-fibrinolytic drugs when they bleed. Retrospective observations suggest to use these drugs in the treatment of patients with cirrhosis at the time of bleeding⁴¹. However, no evidence from prospective controlled studies has been provided, and their efficacy and safety are still to be defined.

Conclusive remarks

Abnormalities of coagulation in compensated chronic liver disease are more a myth than a reality, because the balance of coagulation is somewhat restored by the concomitant reduction of pro- and anti-coagulants. Furthermore, thrombocytopenia/thrombocytopeny in chronic liver disease are at least in part compensated by increased levels of von Willebrand factor, that make platelets able to adhere and aggregate normally at the site of vascular injury. The concept of patients with chronic liver disease behaving normally with respect to the hemostasis balance is further supported by the evidence that they are at increased risk of thrombosis^{42,43} particularly, but not exclusively in the mesenteric and portal veins⁴⁴⁻⁴⁶, especially if liver disease is associated with inherited or acquired pro- vs. anti-coagulant imbalance^{22,47}. Monocytes from patients with cirrhosis and endotoxaemia express tissue factor that may trigger coagulation⁴⁸, thus increasing the risk of thrombosis.

The PT test, for a long time used as an index of bleeding in chronic liver disease, should be replaced by tests truly representing the balance of coagulation as it occurs *in vivo*. Until then, the risk of bleeding in patients with chronic liver disease should be based on clinical rather than on laboratory criteria.

The long held belief of correcting the abnormal PT test prior to liver biopsy should be reconsid-

ered. Recently, the position paper of the American Association for the Study of Liver Disease²⁰, while recommending platelets transfusion to correct severe thrombocytopenia, warns on the indiscriminate use of plasma, fibrinolysis inhibitors or recombinant factors in view of the side effects due to transfusion of blood products, such as fluid overload, risk of infection and transfusion-related acute lung injury.

In conclusion, there seems to be no causal relationship between the coagulopathy associated with chronic liver disease and bleeding. The bleeding manifestations that frequently occur especially in decompensated chronic liver disease patients are not primarily due to the coagulopathy, but to the hemodynamic alterations subsequent to portal hypertension, endothelial dysfunction (vascular tone), renal failure, recurrent bacterial infections with subsequent development of endogenous circulating heparinoids⁴⁹ and disseminated intravascular coagulation that may trigger the hemorrhagic events. It should be realized that although the balance of coagulation in chronic liver disease is normal, it is not as stable as that observed in healthy subjects. Therefore, the balance can be easily perturbed, especially if one or more of the forementioned underlying clinical conditions do occur. Therapeutic interventions aimed at correcting these underlying conditions are probably more effective in controlling bleeding than correcting the hemostasis abnormalities.

References

1. Gainini EG, Savarino G. Thrombocytopenia in liver disease. *Curr Opin Hematol* 2008; 15: 473-80.
2. Rubin MH, Weston MJ, Langley PG, et al. Platelet function in chronic liver disease: relationship to disease severity. *Dig Dis Sci* 1979; 24: 197-202.
3. Ordinas A, Escolar G, Cirera J, et al. Existence of a platelet-adhesion defect in patients with cirrhosis independent of hematocrit: studies under flow conditions. *Hepatology* 1996; 24: 1137-42.
4. Thomas DP, Ream VJ, Stuart RK. Platelet aggregation in patients with Laennec's cirrhosis of the liver. *N Engl J Med* 1967; 276: 1344-8.
5. Ballard HS, Marcus AJ. Platelet aggregation in portal cirrhosis. *Arch Intern Med* 1976; 136: 316-9.
6. Laffi G, La Villa G, Pinzani M, et al. Altered renal and platelet arachidonic acid metabolism in cirrhosis. *Gastroenterology* 1986; 90: 274-82.
7. Laffi G, Cominelli F, Ruggiero M, et al. Altered platelet function in cirrhosis of the liver: impairment of inositol lipid and arachidonic acid metabolism in response to agonists. *Hepatology* 1988; 8: 1620-6.
8. Laffi G, Daskalopoulos G, Kronborg I, et al. Effects of sulindac and ibuprofen in patients with cirrhosis and ascites. An explanation for the renal-sparing effect of sulindac. *Gastroenterology* 1986; 90: 182-7.
9. Laffi G, Marra F, Failli P, et al. Defective signal transduction in platelets from cirrhotics is associated with increased cyclic nucleotides. *Gastroenterology* 1993; 105: 148-56.

10. Laffi G, Marra F, Gresele P, et al. Evidence for a storage pool defect in platelets from cirrhotic patients with defective aggregation. *Gastroenterology* 1992; 103: 641-6.
11. Ordinas A, Maragall S, Castillo R, et al. A glycoprotein I defect in the platelets of three patients with severe cirrhosis of the liver. *Thromb Res* 1978; 13: 297-302.
12. Violi F, Leo R, Vezza E, et al. Bleeding time in patients with cirrhosis: relation with degree of liver failure and clotting abnormalities. C.A.L.C. Group. Coagulation Abnormalities in Cirrhosis Study Group. *J Hepatol* 1994; 20: 531-6.
13. Boberg KM, Brosstad F, Egeland T, et al. Is a prolonged bleeding time associated with an increased risk of hemorrhage after liver biopsy? *Thromb Haemost* 1999; 81: 378-81.
14. Mannucci PM, Vicente V, Vianello L, et al. Controlled trial of desmopressin in liver cirrhosis and other conditions associated with a prolonged bleeding time. *Blood* 1986; 67: 1148-53.
15. Burroughs AK, Matthews K, Qadiri M, et al. Desmopressin and bleeding time in patients with cirrhosis. *Br Med J* 1985; 291: 1377-81.
16. Cattaneo M, Tenconi PM, Alberca I, et al. Subcutaneous desmopressin (DDAVP) shortens the prolonged bleeding time in patients with liver cirrhosis. *Thromb Haemost* 1990; 64: 358-60.
17. de Franchis R, Arcidiacono PG, Carpinelli L, et al. Randomized controlled trial of desmopressin plus terlipressin vs. terlipressin alone for the treatment of acute variceal hemorrhage in cirrhotic patients: a multicenter, double-blind study. *New Italian Endoscopic Club. Hepatology* 1993; 18: 1102-7.
18. Wong AY, Irwin MG, Hui TW, et al. Desmopressin does not decrease blood loss and transfusion requirements in patients undergoing hepatectomy. *Can J Anaesth* 2003; 50: 14-20.
19. Lisman T, Bongers TN, Adelmeijer J, et al. Elevated levels of von Willebrand Factor in cirrhosis support platelet adhesion despite reduced functional capacity. *Hepatology* 2006; 44: 53-61.
20. Rockey DC, Caldwell SH, Goodman ZD, et al. American Association for the Study of Liver Diseases. Liver biopsy. *Hepatology* 2009; 49: 1017-1044.
21. Newland A. Thrombopoietin receptor agonists in the treatment of thrombocytopenia. *Curr Opin Hematol* 2009; 16: 357-64.
22. Tripodi A, Primignani M, Chantarangkul V, et al. An Imbalance of Pro- vs Anti-Coagulation Factors in Plasma from Patients with Cirrhosis. *Gastroenterology* 2009; 137: 2105-11.
23. Tripodi A, Chantarangkul V, Mannucci PM. Acquired Coagulation Disorders: Revisited Using Global Coagulation/Anticoagulation Testing. *Br J Haematol* 2009; 147: 77-82.
24. Boks AL, Brommer EJ, Schalm SW, van Vliet HH. Hemostasis and fibrinolysis in severe liver failure and their relation to hemorrhage. *Hepatology* 1986; 6: 79-86.
25. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, et al. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003; 33: 4-15.
26. Tripodi A, Salerno F, Chantarangkul V, et al. Evidence of normal thrombin generation in cirrhosis despite abnormal conventional coagulation tests. *Hepatology* 2005; 41: 553-8.
27. Tripodi A, Primignani M, Chantarangkul V, et al. Thrombin generation in patients with cirrhosis: the role of platelets. *Hepatology* 2006; 44: 440-5.
28. Bosch J, Thabut D, Bendtsen F, et al for the European Study Group on rFVIIa in UGI Haemorrhage. Recombinant factor VIIa for upper gastrointestinal bleeding in patients with cirrhosis: a randomized, double-blind trial. *Gastroenterology* 2004; 127: 1123-30.
29. Bosch J, Thabut D, Albillos A, et al for the International Study Group on rFVIIa in UGI Hemorrhage. Recombinant factor VIIa for variceal bleeding in patients with advanced cirrhosis: A randomized, controlled trial. *Hepatology* 2008; 47: 1604-14.
30. Lodge JP, Jonas S, Jones RM, et al for the rFVIIa OLT Study Group. Efficacy and safety of repeated perioperative doses of recombinant factor VIIa in liver transplantation. *Liver Transpl* 2005; 11: 973-9.
31. Planinsic RM, van der Meer J, Testa G, et al. Safety and efficacy of a single bolus administration of recombinant factor VIIa in liver transplantation due to chronic liver disease. *Liver Transpl* 2005; 11: 895-900.
32. Caldwell SH, Hoffman M, Lisman T, et al. Coagulation Disorders and Hemostasis in Liver Disease: Pathophysiology and Critical Assessment of Current Management. *Hepatology* 2006; 44: 1039-46.
33. Booth NA, Anderson JA, Bennett B. Plasminogen activators in alcoholic cirrhosis: demonstration of increased tissue type and urokinase type activator. *J Clin Pathol* 1984; 37: 772-7.
34. Hersch SL, Kunelis T, Francio RB. The pathogenesis of accelerated fibrinolysis in liver cirrhosis: a critical role for tissue plasminogen activator inhibitor. *Blood* 1987; 69:1315-9.
35. Tran-Thang C, Fasel-Felley J, Pralong G, et al. Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors in liver deficiencies caused by chronic alcoholism or infectious hepatitis. *Thromb Haemost* 1989; 62: 651-3.
36. Marongiu F, Mamusa AM, Mameli C, et al. Alpha 2 Antiplasmin and disseminated intravascular coagulation in liver cirrhosis. *Thromb Res* 1985; 37: 287-94.
37. Sinclair TS, Booth NA, Penman SM, et al. Protease inhibitors in liver disease. *Scand J Gastroenterol* 1988; 23: 620-4.
38. Van Thiel DH, George M, Fareed J. Low levels of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) in patients with chronic liver disease. *Thromb Haemost* 2001; 85: 667-70.
39. Lisman T, Leebeek FW, Mosnier LO, et al. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor deficiency in cirrhosis is not associated with increased plasma fibrinolysis. *Gastroenterology* 2001; 121: 131-139.
40. Colucci M, Binetti BM, Branca MG, et al. Deficiency of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor in cirrhosis is associated with increased plasma fibrinolysis. *Hepatology* 2003; 38: 230-237.
41. Gunawan B, Runyon B. The efficacy and safety of L-lysine-epsilon-aminocaproic acid treatment in patients with cirrhosis and hyperfibrinolysis. *Alim Pharm Ther* 2006; 23: 115-20.
42. Northup PG, McMahan MM, Ruhl AP, et al. Coagulopathy does not fully protect hospitalized cirrhosis patients from peripheral venous thromboembolism. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1524-8.
43. Søgaard KK, Horváth-Puhó E, Grønbaek H, et al. Risk of venous thromboembolism in patients with liver disease: a nationwide population-based case-control study. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 96-101.
44. Valla DC. Thrombosis and anticoagulation in liver disease. *Hepatology* 2008; 47: 1384-93.
45. Okuda K, Ohnishi K, Kimura K, et al. Incidence of portal vein thrombosis in liver cirrhosis. An angiographic study in 708 patients. *Gastroenterology* 1985; 89: 279-86.
46. Francoz C, Belghiti J, Vilgrain V, et al. Splanchnic vein thrombosis in candidates for liver transplantation: usefulness of screening and anticoagulation. *Gut* 2005; 54: 691-7.
47. Amitrano L, Brancaccio V, Guardascione MA, et al. Inherited coagulation disorders in cirrhotic patients with portal vein thrombosis. *Hepatology* 2000; 31: 345-8.
48. Saliola M, Lorenzet R, Ferro D, et al. Enhanced expression of monocyte tissue factor in patients with liver cirrhosis. *Gut* 1998; 43: 428-32.
49. Montalto P, Vlachogiannakos J, Cox DJ, Pastacaldi S, Patch D, Burroughs AK. Bacterial infection in cirrhosis impairs coagulation by a heparin effect: a prospective study. *J Hepatol* 2002; 37: 463-70.

XXIII LECCIÓN

CONMEMORATIVA

ANTONIO RAICHS

COORDINADORES: E. FELIU. *Barcelona*
J. GARCÍA LARAÑA. *Madrid*

Clinical and biological heterogeneity of the leukaemic chronic lymphoproliferative disorders

E. MATUTES

Reader and Consultant Haematologist. Haemato-Oncology Unit. Institute of Cancer Research.
Royal Marsden Hospital. London, UK

Introduction

The chronic lymphoproliferative disorders (CLPD) comprise a variety of disease entities derived from the clonal expansion of B and T lymphocytes. They are markedly heterogeneous on their clinical course and pathogenesis. Although they may manifest as leukaemias or lymphomas (nodal based), this distinction is to some extent artificial. The most common form of CLPD involving the blood is chronic lymphocytic leukaemia (CLL), but other diseases, including spill-over of B-cell lymphomas (B-NHL) and T-cell malignancies, may account for up to 30% of the cases presenting with lymphocytosis.

CLL was first recognized by Virchow in 1847, that distinguished lymphocytic from myeloid diseases. It was in the early 1900's that B-cell lymphomas manifesting with leukaemia were described and designated under the broad term of lymphosarcoma. Further, leukaemias that stand now as distinct clinico-pathological entities such as hairy cell leukaemia (HCL) had been recognized albeit under other designations such as leukaemic reticuloendotheliosis as early as 1923 by Ewald although the first descriptive condition is credited to Dr Bertha Bouroncle in 1958. It is therefore apparent that, in early days, clinicians and pathologists had skills which unabled them to recognize with basic tools different forms of chronic lymphoid neoplasms. Advances in the immunobiology in the 1980's and molecular genetics in the 1990's have provided in the modern era a solid basis for the understanding the pathogenesis of the lymphoid neoplasms and allowed us to recognize a variety of disease entities including early subclinical forms such as *in situ* follicular and mantle-cell lymphomas with an uncertain risk to develop frank disease; in turn, all this has offered opportunities to identify targeted approaches for therapy.

This is a brief overview of the disease features on the most common forms of leukaemic CLPD (Table 1) highlighting insights in their pathogenesis and the state of the art and advances in their management.

Chronic lymphocytic leukaemia (CLL)

CLL is by far the most frequent CLPD in Western countries and it is well defined by its clinical manifestations, distinct morphology and immunophenotyp-

Table 1. Primary leukaemic chronic lymphoproliferative disorders*

B-cell derived:

- Chronic lymphocytic leukaemia
- Prolymphocytic leukaemia
- Hairy cell leukaemia
- Hairy cell leukaemia variant

T-cell derived:

- Prolymphocytic leukaemia
- T-cell large granular lymphocytic leukaemia

* A leukaemic phase of B or T cell lymphoma is not included.

ic profile¹. Sensitive immunophenotyping has demonstrated in the general population a subclinical form of CLL, designated monoclonal B cell lymphocytosis (MBL) in c. 7% of individuals. Large scale epidemiological case-control and cohort studies have shown an inherited basis for this disease with up to a 6 fold relative risk to develop CLL in first degree relatives from an affected individual as well as demonstrated the phenomenon of anticipation, a recurrent feature in diseases with a genetic background². The frequency on MBL in the relatives from patients with CLL is 15% reinforcing the relevance of the genetic background in CLL development³. However to date only a genomic wide association study has identified six chromosome loci harbouring susceptibility genes for CLL. Thus, the strongest risk factor to develop CLL is a familial history for this disease.

The course of CLL is very variable, and clinical stages according to Rai and Binet are still considered major prognostic factors for disease outcome. However, it is now possible to "refine" the prognosis by stratifying patients on the basis of cytogenetic abnormalities and the mutational status of the immunoglobulin heavy chain (IgHV) gene. CLL, unlike most B-cell lymphomas, has no recurrent chromosomal abnormalities and instead is characterized by gene deletions, amplifications or mutations which namely involve tumour suppressor genes and those involved in the cell cycle and apoptosis. The most frequent gene abnormalities detected by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) are: del13q14 (*miR15/16*, *ΔDLEU7*), del11q (*ATM* gene), trisomy 12 and del 17p (*TP53*) or *TP53* mutations. These have shown to have a major prognostic impact in both single center and randomized trials^{4,5}. Two seminal

reports in the late 1990's showed a heterogeneity in the pattern of mutations of the *IgHV* genes with a major prognostic impact in survival with unmutated cases having a significant worse prognosis^{6,7}. Other prognostic markers also emerged such as CD38 and ZAP-70 expression on the neoplastic B-cells⁸. Still, uncertainties remain as to whether all markers should be investigated in all the patients in a clinical setting. The most robust regarding prognosis and response to therapy is FISH, and this investigation should be done in patients that are embarking on therapy. It is possible to define more precisely the outcome of CLL patients with advanced disease and who require treatment by compounding the standard clinical and laboratory features with these new markers⁹ (Table 2).

Although it was thought that the cell origin of the CLL could be, according to the somatic *IgHV* mutations, either of pre or post germinal center origin (*naïve* and memory cell respectively), it has become apparent that CLL cells irrespective of the pattern of *IgHV* mutations are antigen experienced. This is supported by microarray gene expression profiling, the skewing of the *IgHV* repertoire and by the identification of subsets with nearly identical (stereotyped) B-cell receptors (BCR) in 30% of the cases¹⁰. The latter implies recognition of similar antigens or epitopes responsible for selecting the leukaemic clone.

Besides the progress in the understanding the pathogenesis of CLL, major advances have been taken place in the treatment of CLL, particularly with the use of fludarabine based regimes (FC or FCM) in combination with Rituximab now considered first line treatments in most of the patients. An exception are patients with *TP53* abnormalities in whom drugs that overcome *TP53* resistance such as Alectuzumab, high dose methyl-prednisolone and lenalidomide should be considered. Further, a variety of new drugs, particularly monoclonal antibodies such as Ofatumumab (humax anti-CD20), bendamustine, flavopiridol, etc. are being incorporated into clinical trials. A controversial issue is the role of or place that has stem-cell transplant (STC) in CLL. There is data indicating that autologous STC may prolong disease free survival but it is not curative. In addition, some studies have suggested a higher incidence of myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia in this cohort of patients. Allogeneic SCT may be curative in some patients but, due to the morbidity and mortality associated to this procedure, it should only be contemplated in young and fit patients with poor prognostic factors such as those with *TP53* abnormalities.

B-cell prolymphocytic leukaemia (B-PLL)

B-PLL was originally described by Galton and cols as a "variant form" of CLL. It is considered as a provisional entity in the 2008 WHO classification. The clinical course is aggressive with resistance to standard CLL therapy and median survivals are around 3 years¹¹. Data is limited on the use of purine analogues in combination with Rituximab or Alectuzumab. The latter has potential as it overcomes *TP53* resistance in CLL, and its activity is mainly seen in blood, bone marrow and spleen. B-PLL has no recurrent chromosomal abnormality but deletions/mutations of the *TP53* gene are very frequent and some cases have rearrangement of the *c-MYC* oncogene with cytogenetic translocations identical to those seen in Burkitt's lymphoma. All these likely underline its refractoriness to treatment. The mutational status of the *IgHV* is heterogeneous with around half of the cases showing somatic hypermutations. Unlike in CLL, neither the mutational status of the *IgHV* nor ZAP-70 expression have a prognostic impact in B-PLL¹². It has been a matter of debate as to whether B-PLL represents a distinct entity different from CLL or CLL with increased prolymphocytes (CLL/PL) and not merely evolution or transformation of CLL. Recent findings by microarray gene profiling strongly suggest that B-PLL is different from CLL. The genetic signature of B-PLL is different from that of CLL. Genes deregulated in this disease include those involved in cell proliferation (i.e., *c-MYC*), apoptosis (i.e., *TP53*) cell metabolism and adhesion molecules¹³.

Hairy cell leukaemia (HCL) and HCL-variant

HCL is a clinico-pathological entity with distinct features. Major advances over the last two decades have been made regarding effective treatments for this dis-

Table 2. Risk groups for overall survival (OS) and progression free survival (PFS) in the UK CLL-4 study*

	PFS (5 years)	OS
High risk (>10% <i>TP53</i> deletion)	0%	9%
Intermediate risk** Either unmutated <i>IgHV</i> or <i>IgHV3-21</i> , del 11q23 or B-2 microglobulin >4 mg/L	12%	53%
Good risk Mutated <i>IgHV</i> and none of the above risk factors	34%	79%

* Osier D et al, *Haematologica* 2010.

** This group can be subdivided in low intermediate (1 factor) and high intermediate (2 or 3 factors).

ease and thus, the scenario on outcome has dramatically changed. A number of reports in the last few years have provided insights in the cell origin where the neoplastic transformation has probably taken place in HCL. The vast majority of cases have somatic mutations of the *IgHV* and only a minority are unmutated but, in the latter situation, a 100% homology to the germ line is exceedingly rare. The most frequent *IgHV* family usage is *VH3-23* but this is not different to what is seen in normal CD5 negative circulating memory marginal B cells¹⁴. Unlike HCL-variant or splenic marginal zone lymphoma (SMZL), hairy cells lack specific *IgHV/IgHD/IgHJ* repertoires or stereotypes. This suggests that transformation occurs in a somatically prediversified (mutated) B-cell that perhaps has not yet been selected by an antigen. Microarray gene profiling has shown that HCL has a distinct signature with up-regulation of cyclin D1, Annexin A1, IL-3 receptor and deregulation of a variety of genes that may explain the distinct pattern of homing of hairy cells. Responses to the two purine analogues 2'-deoxycytosine (DCF) and 2'-chlorodeoxyadenosine (CDA) are experienced by 95% of patients and greater than 85% achieve a complete response (CR). This has been translated with median survivals of greater than 20 years¹⁵. Factors predicting for relapse and outcome are low haemoglobin and platelet counts and achievement of a partial instead CR. Recent data suggest that the rare HCL cases with *IgHV4-34* usage, and/or those that have unmutated *IgVH*, features more commonly seen in HCL-variant, have higher tumour burden and less likely will respond to CDA¹⁶. The use of CDA or DCF combined with Rituximab has a place and should be contemplated in patients with short lived responses to single agent purine analogue, those with multiple relapses and in the minority that do not respond to single purine analogue treatment¹⁷.

HCL-variant is a provisional entity in the WHO classification and it is uncertain its relationship with diffuse red pulp SMZL. This disease resembles HCL in its pathological features but it has distinct morphology, immunophenotype and clinical features and outcome¹⁸. It is characterized by very complex karyotypes and up to a third of the patients have deletions/mutations of the *TP53*. The pattern of somatic mutations of the *IGHV* and family usage is different than in HCL and closer to that seen in SMZL. Up to a third of the cases are unmutated and there is a preferential usage of *VH4-34* particularly in the unmutated cases; unlike SMZL there is no preferential use of the *VH-1* family¹⁴. This and the evidence of stereotypic CDR3 complementary regions may suggest that the target cell for HCL-variant is a memory circulating marginal zone B-cell which has encountered an antigen perhaps independently of the

germinal centre. Median survival in HCL-variant is 9 years *versus* greater than 20 years in HCL and 12 years in SMZL. CDA and DCF have limited efficacy as they yield only transient partial responses. Splenectomy has been considered the best option but data on the use of monoclonal antibodies such as Rituximab, Alemtuzumab or the toxin immun conjugate anti-CD22 combined or not with chemotherapy is scanty.

T-prolymphocytic leukaemia (T-PLL)

This is an aggressive T-cell neoplasm that manifests with widespread disease; a smouldering form has been recognised in a few patients but these patients inevitably progress to the aggressive form. Prognosis is poor with a median survival in the historical series of 7 months. Poor predictors for outcome are age, high lymphocyte count, high *TCL-1* expression and lack of responses to DCF or Alemtuzumab. T-PLL is characterized by recurrent chromosomal abnormalities that involve the rearrangement of the *TCR* chain genes with oncogenes and/or mutations or deletions of tumour suppressor genes. Abnormalities of chromosome 14, often *inv(14)(q11;q32)* or tandem translocations of the chromosomes 14 are seen in up to 80% of the cases. These involve rearrangement of the *TCR-alpha* gene with the *TCL-1* and *TCL1b* oncogenes leading to overexpression of *TCL-1*. Less commonly found are the *t(X;14)(q28;q21)* or the *t(X;7)(q28;q35)* that involve the *MTCP-1* oncogene at Xq28, an homolog to the *TCL-1*. The key role of these two oncogenes in the pathogenesis of T-PLL is substantiated in a transgenic mouse model that develops a T-cell leukaemia with features identical to T-PLL. Other frequent abnormalities are *iso8q* or *t(8;8)* which involve the two arms of chromosome 8 and point mutations of the *ATM* gene at 11q23. The latter is seen not only in the patients with ataxia telangiectasia that are at risk to develop T-PLL but also in sporadic T-PLL cases. The therapeutic options for T-PLL are limited. Alemtuzumab has become the front-line treatment in this disease as responses are experienced in up to 60% previously treated patients and up to 90% therapy *naïve* patients. This has resulted in median survivals of around 16 months in patients who achieve CR. However, ultimately all patients relapse and therefore SCT should be considered in patients who are candidates for this procedure. Recent data comparing a group of T-PLL who had achieved a CR to Alemtuzumab lasting for six months and who had no STC (control group) *versus* another matched group that subsequently had autologous or allogeneic SCT has demonstrated the benefit of SCT. Median survival for the control group was 20 months *versus*

48 months (52 for autologous and 33 for allogeneic) in the SCT arm¹⁹.

T-cell large granular lymphocytic (LGL) leukaemia

This is a disease with an indolent course and derived from the clonal expansion of a cytotoxic T lymphocyte. Main manifestations are cytopenias and autoimmune phenomena. Southern-blot or PCR analysis investigating the configuration of the TCR genes to demonstrate clonality is a key diagnostic investigation to distinguish this disease from reactive polyclonal expansions of LGL. It is becoming evident that the disease results from the persistent expansion of a terminal effector memory cytotoxic lymphocyte triggered by an auto or foreign antigen with a failure to undergo to activated cell death consequent to an impairment in apoptosis. Gene expression profiling has shown that the signature of the leukaemic cells is different from that of normal *naïve* and activated memory T-cells with deregulation of genes involved in apoptosis, immune response and TCR signaling. The putative antigen involved in the disease development is unknown. However, in the rare subset with a CD4+ CD8- phenotype, CMV may be the candidate for triggering the disease in an individual with a genetic predisposition. Up to a third of these patients do not require treatment. The current approach in those patients that need intervention is the use of an immunosuppressive agent such as methotrexate or cyclosporine A with or without prednisolone and growth factors²⁰. Purine analogues, alemtuzumab and experimental drugs such as anti-CD122, anti-CD2 and tipifarnib, a farnesyltransferase inhibitor may be considered in selected patients with the aim of achieving complete and durable remissions.

Conclusions

The CLPD comprise a variety of diseases entities with different pathogenesis and clinical manifestations. Advances over the last decade on immunobiology and molecular genetics have allowed a better characterization of these disorders and provided not only insights into their biology but relevant prognostic information too. This has resulted in the discovery of more effective and tailored treatments for patients suffering from these various conditions with a significant improvement on survival. There is still a long way to go but, hopefully, further studies addressed to discover the genes involved on the initial and subsequent steps in the development of these neoplasms will result in targeted and "curative" treatments.

References

1. Matutes E, Attygalle A, Wotherspoon A, Catovsky D. Diagnostic issues in chronic lymphocytic leukaemia (CLL). Best Practice & Research Clinical Haematology 2010; 23: 3-20.
2. Yullie MR, Matutes E, Marossy A, Hilditch B, Catovsky D, Houlston RS. Familial chronic lymphocytic leukaemia : a Survey and review of published studies. Br.J.Haematol 2000 ; 109 :794-799.
3. Rawstron AC, Yullie MR, Fuller J, Cullen M, Kennedy B, Richards SJ et al. Inherited predisposition to CLL is detectable as subclinical monoclonal B-lymphocyte expansion. Blood 2002 ; 100 :2289-2290.
4. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med 2000 ; 343 : 1910-1916.
5. Catovsky D, Richards S, Matutes E, Oscier D, Dyer MJ, Bezares RF et al; UK National Cancer Research Institute (NCRI) Haematological Oncology Clinical Studies Group; NCRI Chronic Lymphocytic Leukaemia Working Group. Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 Trial): a randomised controlled trial. Lancet 2007; 370:230-9.
6. Damle RN, Wailly T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL et al. Immunoglobulin V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. Blood 1999 ; 94 :1840-1847.
7. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated IgV(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukaemia. Blood 1999 ; 94 :1848-1854.
8. Rassenti LZ, Huyuh L, Toy TL, Chen L, Keating MJ, Gribben JG et al. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. N.Engl J Med 2004 ; 351 :893-895.
9. Oscier D, Wade R, Davies Z, Morilla A, Best G, Richards S et al. Prognostic factors identify 3 risk groups in the LRF CLL 4 trial independent of treatment allocation. Haematologica 2010 (in press).
10. Stamatopoulos K. CLL : promiscuity leads to risks. Blood 2009 ;114 :3508-3509.
11. Dungarwalla M, Matutes E, Dearden CE. Prolymphocytic leukaemia of B and T cell subtype: a state of the art paper. Eur J Haematol. 2008; 80(6):469-76.
12. Del Giudice I, Davis Z, Matutes E, Osuji N, Parry-Jones N, Morilla A et al. IgVH genes mutation and usage, ZAP-70 and CD38 expression provide new insights on B-cell prolymphocytic leukemia (B-PLL). Leukemia 2006; 20:1231-7.
13. Del Giudice I, Osuji N, Dexter T, Brito-Babapulle V, Parry-Jones N, Chiaretti S, Messina M et al. B-cell prolymphocytic leukemia and chronic lymphocytic leukemia have distinctive gene expression signatures. Leukemia. 2009 ; 23(11):2160-7.
14. Hockley SL, Giannouli S, Morilla A, Wotherspoon A, Morgan GJ, Matutes E, et al. Insight into the molecular pathogenesis of hairy cell leukaemia, hairy cell leukaemia variant and splenic marginal zone lymphoma, provided by the analysis of their IGH rearrangements and somatic hypermutation patterns. Br J Haematol. 2009 ; 148 :659-669.
15. Else M, Dearden CE, Matutes E, Garcia-Talavera J, Rohatiner AZ, Johnson SA et al. Long-term follow-up of 233 patients with hairy cell leukaemia, treated initially with pentostatin or cladribine, at a median of 16 years from diagnosis. Br J Haematol. 2009 ; 145(6):733-40.
16. Caligaris-Cappio F. Ig genes and hairy cell leukemia. Blood 2009; 114: 4610-4611.
17. Else M, Osuji N, Forconi F, Dearden C, Del Giudice I, Matutes E, et al. The role of rituximab in combination with pen-

- tostatin or cladribine for the treatment of relapsed/refractory hairy cell leukaemia. *Cancer* 2007; 110(10):2240-2247.
18. Matutes E, Wotherspoon A, Brito-Babapulle V., Catovsky D. The natural history and clinico-pathological features of the variant form of hairy cell leukemia. *Leukemia* 2001; 15:184-186.
 19. Krishnan B, Else M, Tjonnfjord GE, Cazin B, Carney D, Carter J, Ketterer N et al. Stem cell transplantation after alemtuzumab in T-cell prolymphocytic leukaemia results in longer survival than after alemtuzumab alone: a multicentre retrospective study. *Br J Haematol*, 2010; 149: 907-10.
 20. Osuji N, Matutes E, Tjonnfjord G, Grech H, Del Giudice I, Wotherspoon A et al. T-cell large granular lymphocyte leukemia: a report on the treatment of 29 patients and a review of the literature. *Cancer*, 2006; 107:570-574.

SIMPOSIOS

Aproximación de la automatización en hematimetría a la citometría de flujo

COORDINADORES: J. VILLARRUBIA. *Madrid*
T. MOLERO. *Las Palmas de Gran Canaria*

Resumen del simposio

El propósito de este simposio es actualizar los conocimientos en los autoanalizadores hematológicos de las últimas generaciones que utilizan técnicas citofluorométricas para determinar algunos de sus parámetros. Los más ampliamente difundidos son el recuento de reticulocitos y el de los eritroblastos.

Además, actualmente los contadores hematológicos son capaces de discriminar las células sanguíneas mediante técnicas de dispersión de luz (sistema óptico) en uno o más ángulos, incorporando tinciones vitales y/o fluorocromos con hasta tres fluorescencias. Así desde el inicio del presente siglo, algunos equipos pueden detectar y hacer un recuento de forma automatizada o semiautomatizada de las plaquetas con el anticuerpo monoclonal anti-CD61 (Gp IIIa), o de las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias. Posteriormente se ha descrito, también por métodos de fluorescencia, el análisis celular de granulocitos, monocitos y célula madre; la expresión del CD64 en los granulocitos como apoyo al diagnóstico de la sepsis y el Ag HLA-27 en la espondilitis anquilosante. Recientemente, se han introducido técnicas citofluorométricas para realizar el porcentaje de las plaquetas reticuladas; de las células de los fluidos corporales y una aproximación diferencial (líquido cefalorraquídeo, pleural, etc.).

En el último congreso de la ISLH se reunió el Comité Internacional para la Estandarización en Hematología (ICSH) con el propósito de desarrollar un método de referencia para el recuento diferencial de las células sanguíneas, siguiendo tecnología citofluorométrica en citómetros capaces de procesar muestras de sangre con cinco u ocho canales de fluorescencia que reconozcan antígenos de membrana de linfocitos, monocitos, neutrófilos, granulocitos inmaduros, eosinófilos, basófilos, blastos y eritroblastos, así como poblaciones linfocitarias B, T y NK, utilizando distintos paneles de anticuerpos monoclonales que incluyan los expresados por las distintas células mencionadas.

El rastreo de los síndromes linfoproliferativos (SLP) crónicos leucemizados realizado habitualmente en citómetros de flujo convencionales puede también aplicarse a los contadores hematológicos que dispongan de fuentes de luz tipo láser y detectores capaces de medir la dispersión de la luz y la emisión de fluorescencia. Así, se puede realizar un primer paso en el diagnóstico de dichos síndromes observando las propiedades de dispersión de luz celular (FSC/SSC) y el aumento del porcentaje de linfocitos, expresando marcadores B. En los SLP de estirpe T se puede sospechar la presencia de clonalidad por la ausencia o sobreexpresión de algún antígeno T o bien la coexpresión o ausencia de expresión de los CD4/CD8, alteración presente en el 60-70% de los SLP-T. Asimismo, se puede estudiar en los autoanalizadores hematológicos las distintas subpoblaciones de las células NK mediante la expresión de marcadores CD56/CD16.

El estudio de la función plaquetar puede también realizarse por técnicas citofluorométricas y en sangre total, como es la activación y reactivación plaquetar de demostrada utilidad en el estudio de los fenómenos protrombóticos y prohemorrágicos, método que potencia el diagnóstico y pronóstico del estudio clínico de la hemostasia.

Durante el desarrollo del simposio, tendrán la oportunidad de escuchar a expertos en automatización y citometría de flujo, y plantear y solucionar las dudas que surjan al respecto.

UTILIZACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES EN LOS EQUIPOS DE HEMATIMETRÍA CON SISTEMAS ÓPTICO Y DE FLUORESCENCIA

T. MOLERO, A. LEMES, S. DE LA IGLESIA

Servicio de Hematología. Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín. Las Palmas de Gran Canaria

La tecnología aplicada a los autoanalizadores hematológicos de las últimas generaciones se aproxima cada vez más a la de los citómetros de flujo. Aunque se conservan y mejoran las técnicas de impedancia, la dispersión de luz en distintos ángulos (variables según el equipo) en un sistema óptico bidimensional permite evaluar no sólo el tamaño sino también la complejidad/lobularidad de las partículas/células. También la emisión de fluorescencia (láser azul 488 nm) con tinciones vitales o anticuerpos monoclonales (AcMo) se ha ido incorporando progresivamente a los contadores.

Desde que Wallace Coulter en 1954 revolucionó el recuento de las células sanguíneas mediante la impedancia (llamada principio Coulter) hasta nuestros días, no cabe duda de que la tecnología ha progresado vertiginosamente.

El engorroso recuento de los reticulocitos en el microscopio óptico se ha sustituido por una forma totalmente automatizada, incorporando tinciones vitales. Los colorantes utilizados en los diferentes sistemas incluyen la auramina O, el polimetino (Sysmex), el naranja de tiazol (Horiba ABX) y el CD4K 530 (Abbott), así como colorantes no fluorescentes, como la oxacina 750 (Bayer-Technicon) y el tradicional nuevo azul de metileno (Beckman-Coulter, Abbott).

El yoduro de propidio se utiliza para la valoración de la viabilidad celular y el recuento de eritroblastos (Abbott).

Asimismo, el recuento de los eritroblastos en la sangre periférica realizado por tecnologías similares alcanza una excelente correlación con el método manual microscópico de referencia¹. También se están utilizando métodos de dispersión de la luz en los nuevos parámetros de investigación de la serie roja, como la hemoglobina de los reticulocitos (serie ADVIA 120, Sysmex 2100/5000 y Sapphire v3), que ha demostrado utilidad en el diagnóstico diferencial de las anemias ferropénicas, trastorno crónico y talasemias, siendo un método preciso y estable con un buen nivel de concordancia entre la determinación de Ret-He (Sysmex 2100) y CHr (ADVIA 2110)².

Por métodos de fluorescencia se pueden determinar otros parámetros hematimétricos como las plaquetas reticuladas en distintos autoanalizadores (Sysmex XE 2100/5000, Cell-Dyn Sapphire v3), detectándolas en

el mismo canal de los reticulocitos. Para su análisis se ha utilizado naranja de tiazol, auramina O, corifosfomina, polimetina, oxacina y CD4K530. La automatización sustituye a la determinación citofluorométrica con naranja de tiazol y glicoproteína de membrana plaquetar, que es un método que precisa un experto para su análisis y consume tiempo en la preparación, adquisición e interpretación de los resultados. El porcentaje de plaquetas reticuladas en la muestra de la sangre periférica es de indiscutible utilidad en el diagnóstico diferencial de trombocitopenia central o periférica, y posiblemente predictivas, de la recuperación plaquetar después de quimioterapia intensiva o en el trasplante de progenitores hematopoyéticos³.

Los contadores ADVIA 2010 y Sysmex XE-5000 disponen de un modo dedicado al recuento y diferencial de los fluidos corporales, preparado para aumentar la precisión cuando el número de células es muy escaso. Las células con alta fluorescencia (macrófagos, células mesoteliales) se cuentan en el histograma DIFF con discriminador de fluorescencia en 200 canales y se excluyen del recuento de leucocitos. Este canal DIFF enfrenta *side scatter* con intensidad de fluorescencia después de teñir los ácidos nucleicos (ADN/ARN) con tinciones específicas vitales. Se ha demostrado una excelente linealidad, arrastre mínimo y buena correlación al compararlo con el método de referencia (recuento en cámara de Fuchs-Rosenthal)⁴. Comparando con el hemocitómetro, el nuevo equipo de Beckman Coulter DxH 800 muestra una buena correlación ($r^2 = 0,99$) para los hematíes y células nucleadas totales en muestras de fluidos corporales⁵.

Algunos autores han descrito que el recuento de plaquetas por metodología óptica bidimensional es más ajustado que algunos tipos de impedancia, pero es más valiosa la aportación clínica que supone la medición de las plaquetas por métodos inmunológicos incorporando el anticuerpo monoclonal anti-CD61 (gp IIIa) y realizándose de forma automática (Figura 1). Esta determinación aporta una importante herramienta en la decisión transfusional aplicada principalmente a los pacientes sometidos a trasplante de progenitores hematológicos o postquimioterapia⁶. Estas técnicas han sustituido los tediosos e inexactos métodos de recuento manual como los descritos por Fonio o Sutor en el inicio de los siglos XX y XXI, respectivamente⁷.

Aunque el método de referencia en las determinaciones que utilizan AcMo sigue siendo la citometría de flujo⁸, esta técnica automatizada ha demostrado una excelente correlación al compararse con la de referencia incluso a niveles muy bajos de plaquetas^{9,10}. La mencionada tecnología se aplica en los contadores Cell-Dyn 4000 y las distintas versiones del Sapphire.

En el 2000 se validó la determinación automatizada de las poblaciones CD3/CD4 y CD3/CD8 en tubos cerrados con los AcMo incluidos y con el *software* CD3/

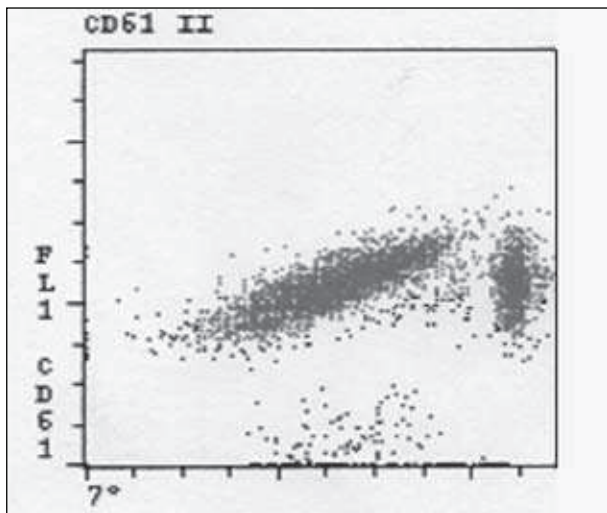


Figura 1. Doble histograma del recuento de plaquetas por el método inmunológico automático en el Cell-Dyn Sapphire. CD61FITC en FL1 frente a dispersión de luz a 7°.

CD4/CD8, mostrando una alta comparabilidad, aceptable precisión, buena linealidad y arrastre indetectable. Se resalta en la publicación que no es necesario el lavado y lisado, evitando también la manipulación y pipeteo del tubo potencialmente contaminado. El tiempo desde el inicio de la adquisición hasta la obtención de los resultados es de 7 minutos¹¹. Los resultados de los linfocitos CD4/CD8 aparecen en el informe en porcentaje y números absolutos, así como un doble histograma en la pantalla de investigación (Figura 2).

Posteriormente, se ampliaron los AcMo utilizados, distinguiéndose otras poblaciones linfocitarias T, B y NK, siguiendo la técnica en tubo abierto descrita en 2005 por nuestro grupo¹². En este trabajo, utilizando los AcMo CD3, CD19, HLA-DR y CD56 enfrentados en dos fluorescencias (FL1/FL2) y aplicando los test estadísticos de Bland-Altman y Passing-Bablock, se demuestra una excelente concordancia con los métodos citofluorométricos de las poblaciones B ($r2 = 0,99$ y $= 1.08x$) y T ($r2 = 0,95$ y $= 1.01x$) (Figuras 3 y 4), aunque menor para las poblaciones T/NK y NK ($r2 = 0,83$ y $0,52$, respectivamente).

Poco después y en un estudio aplicado a muestras de pacientes infantiles y adultos con linfocitosis leve y moderada (recuento absoluto de linfocitos $6-15 \times 10^9/L$) y seleccionadas al azar, se encontró un alto porcentaje de patología B, así como expansiones NK,

linfocitosis reactivas y patología específica de linfocitos colaboradores o supresores. En el grupo de adultos, llama la atención el hallazgo de un 25% de patología B (Figura 5) (confirmándose la clonalidad por citometría de flujo) y expansión NK en un 22% de los casos, mientras que el 14% correspondían a linfocitosis reactivas (Tabla 1). En estos procesos la muestra se prepara de forma manual, la adquisición, lisado y lavado es automática en los Cell-Dyn 4000/Sapphire y el análisis se realizó en el software fcs express v3. En este trabajo se resalta la posibilidad de la realización de un cribado inicial en las linfocitosis, mejorando la eficiencia del laboratorio de rutina y racionalizando el envío de muestras para citometría de flujo¹³.

Otros investigadores han realizado el tipaje linfocitario, siguiendo la metodología automatizada en pacientes afectados de sida, obteniendo también una excelente correlación con el método de referencia en todas las poblaciones estudiadas (CD3, CD4 y CD8)¹⁴.

Una reciente publicación resalta la posibilidad de cuantificar los hematíes maternos y fetales Rh positivos para determinar la hemorragia fetomaterna por métodos inmunocitométricos con el AcMo anti-RhD marcado con FITC en el Cell-Dyn 4000, medido en el canal de los reticulocitos, mostrando una mayor precisión al aumentar el volumen de la muestra (CV < 15% cuando la muestra es de 3 mL, 18,8% para 2 mL y 31,7% para volúmenes inferiores a 1 mL). Este método supera al laborioso e impreciso test de Kleihauer-Betke, y los resultados son comparables a los determinados por citometría de flujo con anti-Rh-D o anti-HbF, de uso generalmente limitado en la rutina del laboratorio¹⁵.

También se han estudiado otras poblaciones sanguíneas con el software CD3/CD4/CD8 como mar-

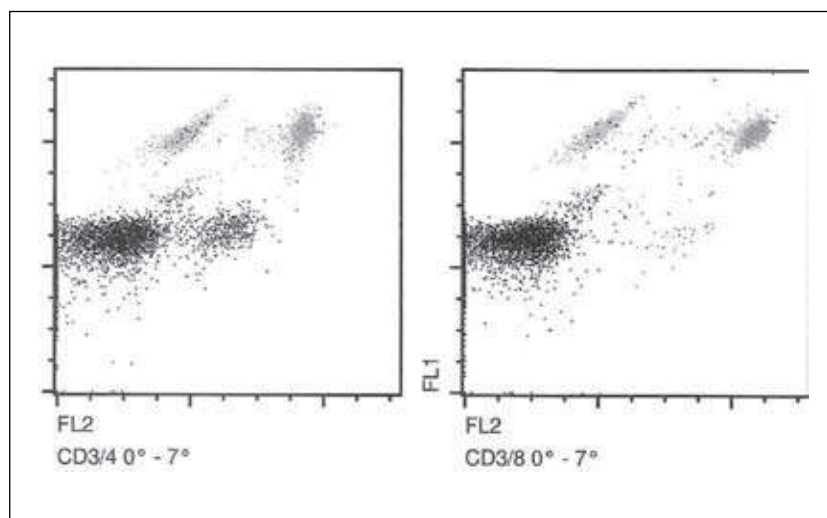


Figura 2. Imagen del doble histograma de fluorescencia CD3/CD4 y CD3/CD8 enfrentando FL1/FL2 en el Cell-Dyn Sapphire. En el histograma de la izquierda, CD4FL1, y en de la derecha, CD8FL1. En ambos CD3FL2.

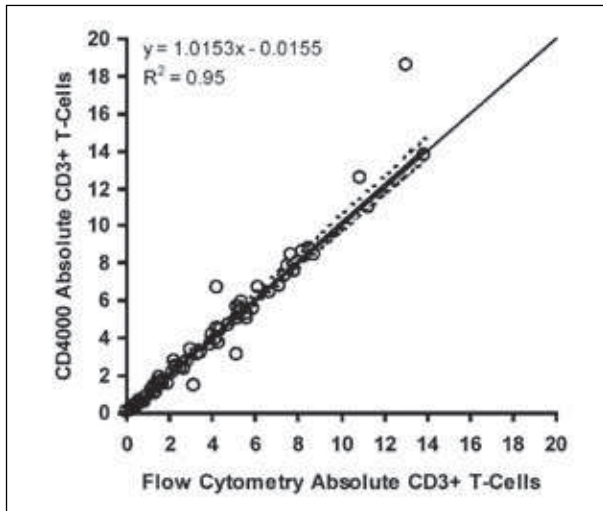


Figura 3. Correlación entre el recuento absoluto de linfocitos T CD3+ por métodos citofluorométricos y Cell-Dyn 4000.

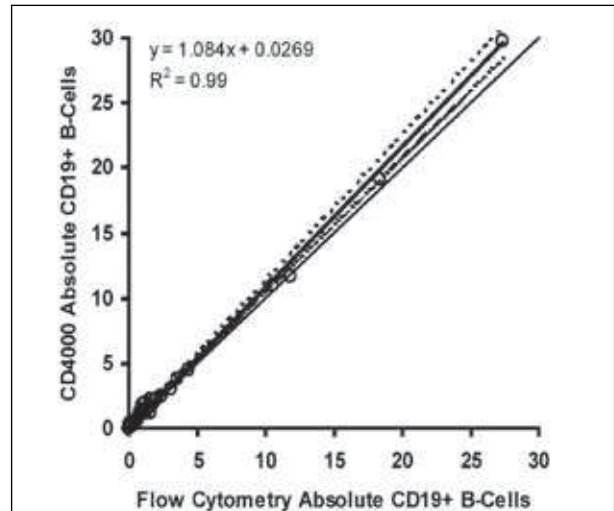


Figura 4. Correlación entre el recuento absoluto de linfocitos B CD19+ por métodos citofluorométricos y Cell-Dyn 4000.

cadres linfoides: CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD22, CD56; mieloides y monocíticas: CD11b, CD13, CD33, CD14, CD64; miscelánea: HLA-DR, CD16 y célula stem: CD45/ CD34. Con el software de plaquetas se analizaron glicoproteínas de membrana CD61(gp IIIa), CD41(gp IIb), CD42b (gp Ib) y marcadores de eritrocitos CD235a (glicoforina). Los autores concluyen afirmando que ambos modos de análisis son claros y eficientes, y aportan una ayuda al diagnóstico de patología linfoide, mieloide o anomalías en plaquetas y hematíes¹⁶.

Otras utilidades de la utilización de Ac Mo en el Sapphire se describen en un artículo donde se determina el Ag HLA-B27 en 96 pacientes para descartar una espondilitis anquilosante. El método citofluorométrico determinó la expresión de HLA-B27 en los linfocitos con el AcMo HLA-B27/FITC IgG2b clona FD705 (One Lambda Inc, Canoga Park, California, USA), y los resultados se compararon con los del Cell-Dyn Sapphire, utilizando una mezcla de HLA-B27/FITC (clona HLA-ABC-m3 IgG2a) y HLA-B7/PE (clona BB7.1 IgG1) (Immunotech, Beckman Coulter Ltd, High Wycombe, UK). Los resultados fueron comparables a los de la citometría de flujo, aportando la del Sapphire tanto sencillez como rapidez y disminuyendo el tiempo de emisión del informe de los resultados¹⁷.

En un artículo recientemente publicado, los autores proponen la aplicación de protocolos para el inmunofenotipado de los linfocitos en el Cell-Dyn Sapphire (siempre que se consiga un volumen de muestra suficiente y un alto porcentaje de células viables) en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con enfermedades neurológicas (infecciones víricas y bacterianas, esclerosis múltiple, neurobo-

rriosis) como alternativa a la citometría de flujo y complemento del análisis microscópico. Podría también utilizarse en la sospecha diagnóstica de infiltrado neuromeningeo en patología neoplásica hematológica como leucemia aguda linfoblástica o linfoma con AcMo específicos dirigidos a linfocitos T o B¹⁸.

Los estudios de expresión del CD64 han aportado una importante información en el diagnóstico de la sepsis, de especial importancia en ancianos y prematuros. Teniendo en cuenta que no está clara la diferenciación entre bandas y PMN en el frotis, siendo dudosa la utilidad de su detección en el recuento microscópico y existiendo una demostrada diferen-

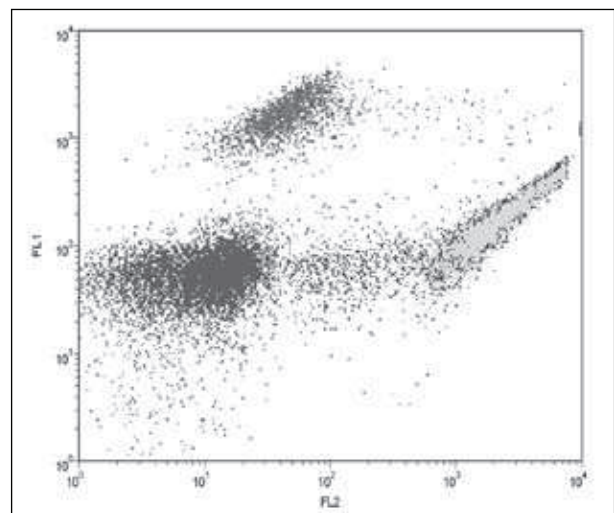


Figura 5. Aumento de la expresión de linfocitos B CD19+ en el Cell-Dyn Sapphire. En FL1, CD3FITC; en FL2, CD19PE+HLA-DRPE.

Tabla 1. Categorización de las linfocitosis en niños y adultos dependiendo de la expresión de las poblaciones linfocitarias B, T o NK y sus distintas subpoblaciones

Categoría	Pacientes < 12 años (n = 35)	Pacientes > 12 años (n = 59)	Comentarios adicionales
Linfocitosis de significado incierto	22 (63%)	7 (12%)	No precisa seguimiento a no ser que presentaran cambios clínicos
Linfocitosis T no reactiva Helper o supresoras	4 (11%)	11 (19%)	La mayoría (11/15) mostraban aumento específico Helper. No precisa seguimiento, a no ser que presentaran cambios clínicos o valorar la morfología en el frotis
Linfocitosis probablemente reactiva	5 (14%)	5 (8%)	No precisa seguimiento, a no ser que presentaran cambios clínicos
Expansión NK transitoria o persistente	3 (9%)	13 (22%)	Las muestras con inmunofenotipo CD3+CD4-CD8- o CD3+CD4+CD8+ se refieren a citometría de flujo. Seguimiento cada 6 meses, para distinguir patología NK transitoria o persistente
Linfocitosis reactiva o expansión NK transitoria o persistente	0 (0%)	8 (14%)	
Posible proliferación B clonal	1 (3%)	15 (25%)	En los niños puede ser una LLA. En adultos se recomienda confirmar clonalidad

cia inter- e intraobservador, se considera que este recuento carece de utilidad. Utilizando este método se han publicado interesantes investigaciones en pacientes sépticos, facilitando la adquisición y el análisis tras la aparición de kits con los AcMo CD64/FITC (dos anticuerpos) + CD163/PE y el programa de análisis que puede estar incorporado^{19,20}.

Otros intentos han ido dirigidos al recuento de células CD45/CD34 en la sangre periférica después de la movilización con factores de crecimiento y en el producto de la aféresis en el seno del trasplante de progenitores hematopoyéticos¹⁶, aunque en nuestra experiencia todavía no se ha alcanzado una buena correlación al compararlo con los métodos citofluorométricos clásicos²¹.

Abbott está actualmente desarrollando un nuevo concepto en citometría de flujo aplicado a los autoanalizadores hematológicos, se trata del barrido por rastreo o *laser rastering* que permitirá el análisis de hasta 300.000 eventos/segundo y que ha demostrado una buena correlación de las poblaciones celulares hematimétricas con el Cell-Dyn Sapphire²².

Es de esperar que las técnicas que utilizan la citometría de flujo en los autoanalizadores continúen en progreso, empleando al menos tres fluorescencias y persiguiendo un despistaje inicial y automatizado de las linfocitosis, así como en otra estirpe celular de distintas patologías hematológicas, y no sólo en la sangre sino también en otros tipos de muestra (medula ósea, fluidos corporales), siendo especialmente útil en los laboratorios de hematología donde el acceso a la citometría de flujo esté limitado.

Bibliografía

- Paterakis G, Kossivas L, Kendall R, Anagnostopoulos N, Stavropoulos-Giokas A, Tassiopoulou A. Comparative evaluation of the erythroblast count generated by three-color fluorescence flow cytometry, the Abbott CELL-DYN 4000 hematology analyzer and microscopy. *Lab Hematol* 1998; 2:64-70.
- Brugnara C, Schiller B, Moran J. Reticulocyte hemoglobin equivalent (Ret He) and assessment of iron-deficient states. *Clin Lab Haematol* 2006; 28 (5): 303-8.
- Chaoui D, Chakroun T, Robert F, Rio B, Belhocine R, Legendre O, et al. Reticulated platelets: a reliable measure to reduce prophylactic platelet transfusions after intensive chemotherapy. *Transfusion* 2005; 45: 766-72.
- De Jonge R, Brouwer R, De Graaf MT, Luitwieler R, Fleming C, De Frankrijker-Merkestijn M, et al. Evaluation of the new body fluid mode on the Sysmex XE-5000 for counting leukocytes and erythrocytes in cerebrospinal fluid and other body fluids. *Clin Chem Lab Med* 2010; 48 (5) [en prensa].
- Barnes PW, Shimer G, Adak D, Hughes J, Eby CS. Performance of Beckman Coulter Unicel® DxHTM 800 cellular analysis system in a tertiary hospital hematology laboratory. *Int Jnl Lab Hem* 2010; 32 (Suppl 1): 72.
- Arroyo JL, García-Marcos MA, López A, Menéndez P, Tabernero MD, Sánchez-Abarca LI, et al. Evaluation of a CD61 MoAb method for enumeration of platelets in thrombocytopenic patients and its impact on the transfusion decision-making process. *Transfusion*. 2001; 41: 1112-216.
- Sutor AH, Grohmann A, Kaufmehl K, Wündisch T. Problems with platelet counting in thrombocytopenia. A rapid manual method to measure low platelet counts. *Semin Thromb Hemost* 2001; 27 (3): 237-43.
- International Council for Standardization in Haematology, Expert Panel on Cytometry and International Society of Haematology Task Force on Platelet Counting. Platelet counting by the RBC/platelet ratio method, a reference method. *Am J Clin Pathol* 2001; 115 (3): 460-4.
- Kunz D, Kunz WS, Scott CS, Gressner AM. Automated CD61 immunoplatelet analysis of thrombocytopenic samples. *Br J Haem* 2001; 112: 584-92.
- Grimaldi E, Del Vecchio L, Scopacasa F, Lom Pardo C, Capone F, Pariante S, et al. Evaluation of the platelet counting by Abbott Cell-Dyn Sapphire haematology analyser compared with flow cytometry. *Int Jnl Lab Hem* 2009; 31: 151-61.
- Marshall P, Hung D, Yuan J, Kim YR. Rapid, automated, closed-tube quantitation of CD4+ and CD8+ T-cell populations on the Cell-Dyn 4000 hematology analyzer. *Lab Hematol* 2000; 6: 137-43.
- Molero T, Roemer B, Del Mar Perera Álvarez M, Lemes A, De La Iglesia Íñigo S, Palacios G, et al. Analysis and enumeration of T cells, B cells and NK cells using the monoclonal antibody fluorescence capability of a routine haematology analyser (Cell-Dyn CD4000). *Clin Lab Haematol* 2005; 27: 224-34.
- Molero T, Lemes A, De la Iglesia S, Scott CS. Monoclonal an-

- tibody fluorescence for routine lymphocyte subpopulation analysis with the Abbott CELL-DYN Sapphire haematology analyser. *Int Jnl Lab Hem* 2007; 29: 446-53.
14. Yamane T, Hagihara K, Nakamae H, Hasegawa T, Hino M. T-lymphocyte subset analysis using the automated hematology analyser CELL-DYN 4000 for patients with hematological disorders. *Leuk Lymphoma* 2006; 47(3): 503-6.
 15. Little BH, Robson R, Roemer B, Scott CS. Immunocytometric quantitation of foeto-maternal haemorrhage with the Abbott Cell-Dyn 4000 haematology analyser. *Clin Lab Haematol* 2005; 27 (1): 21-31.
 16. Johannessen B, Roemer B, Flatmoen L, Just T, Aarsand A, Scott CS. Implementation of monoclonal antibody fluorescence on the Abbott CELL-DYN Sapphire haematology analyser: evaluation of lymphoid, myeloid and platelet markers. *Clin Lab Haematol* 2006; 28: 84-96.
 17. Aarsand AK, Johannessen HB, Scott CS. Evaluation of a method for monoclonal antibody HLA-B27 analysis with the Cell-Dyn Sapphire haematology analyzer. *Int Jnl Lab Hem* 2007; 29 (6): 454-60.
 18. Adam P, Sobek O, Scott CS, Dolezil D, Kasik J, Hjukova L, et al. Immunophenotypic analysis of cerebrospinal fluid cell populations with the Cell-Dyn Sapphire haematology analyzer: method feasibility and preliminary observations. *Int Jnl Lab Hem* 2010; 32: 22-32.
 19. Van der Meer W, Van Dun L, Klein Gunnewiek J, Roemer B, Scott CS. Simultaneous determination of membrane CD64 and HLA-DR expression by blood neutrophils and monocytes using the monoclonal antibody fluorescence capability of a routine haematology analyser. *Journal Immunol Methods* 2006; 311: 207-19.
 20. Cid J, Aguinaco R, Sánchez R, García Pardo G, Llorente A. Neutrophil CD64 expression as marker of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Infection* 2010; 60: 313-9.
 21. Molero T, Lemes A, De la Iglesia S, López J, Rodríguez C, Guerra L, et al. Determinación de progenitores CD34 + comparando dos métodos. Estudio preliminar. *Haematologica* 2008; 93 (ext 2): 103.
 22. Vacca G, Friedman S, Junnarkar M, Yee M, Wu J, Stenerson R, et al. Laser rastering: a new paradigm for automated hematology analysers. *Int Jnl Lab Hem* 2010; 32 (suppl 1): 107.

NUEVO MÉTODO DE REFERENCIA DEL COMITÉ INTERNACIONAL DE ESTANDARIZACIÓN EN HEMATOLOGÍA (ICSH) PARA EL DIFERENCIAL MANUAL LEUCOCITARIO MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO: EVOLUCIÓN Y PUBLICACIÓN

J.M.^a JOU

*Servicio de Hemoterapia y Hemostasia.
Laboratori Core. CDB. Hospital Clínic. Barcelona*

Introducción

El actual método de referencia para el recuento diferencial leucocitario (RDL) manual es el publica-

do por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) en 2007 y aceptado por el ICSH¹. El método recomendado para realizar la evaluación del RDL de los analizadores automáticos consiste en obtener 100 muestras con RDL normal y 100 muestras con RDL con distintas patologías (neutrofilia con y sin bandas, monocitosis, eosinofilia, linfocitosis, con linfocitos reactivos, neutropenias, linfopenias, granulocitos inmaduros, blastos y eritroblastos).

Deben realizarse dos extensiones correctas de cada muestra y teñirse. Dos técnicos expertos en citología deben contar 200 células en el grupo de extensiones asignado. El resultado obtenido en porcentaje de cada técnico debe ser comparado con el otro técnico y, si hubiera discrepancias, un tercer técnico debería contar otras 200 células para deshacer la discrepancia. En la publicación existen tablas de aceptación de discrepancias. Los resultados de las 400 células contadas se transformarán en porcentaje y se desarrollarán comparaciones estadísticas con las obtenidas en los analizadores.

Se aplicarán posteriormente métodos estadísticos para verificar la exactitud de los resultados obtenidos. Estas comparaciones deben crearse con muestras consideradas como normales. Ya que la mayoría de analizadores sólo proporcionan valores de las cinco poblaciones más habituales (neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos), se efectuará un estudio para conocer la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo, verdaderos positivos, falsos negativos y la eficiencia global de las alarmas, tanto numéricas como cualitativas, proporcionadas por los analizadores.

Los que hemos realizado evaluaciones de analizadores sabemos que consume mucho tiempo, habitualmente es subjetivo y muy pesado. Las conclusiones están muchas veces llenas de matices e interpretables.

Antecedentes del uso de anticuerpos monoclonales por citometría de flujo para el RDL de sangre periférica

Uno de los resultados que tradicionalmente supone una baja correlación entre el método manual y los analizadores ha sido el recuento de monocitos². En nuestro laboratorio ya realizamos un estudio en 1994, donde se demostró la mejor correlación entre el método automático y la citometría de flujo³. Posteriormente, otros trabajos⁴ obtuvieron las mismas conclusiones. Otras publicaciones^{5,6} han sido realizadas sobre la utilización de anticuerpos monoclonales para la detección de distintas poblaciones linfocitarias en analizadores hematológicos.

Tabla 1. Poblaciones celulares que deben ser detectadas por el nuevo método de referencia mediante citometría de flujo

Imprescindibles		Otras	
Linfocitos	×	Linfocitos	
Monocitos	×	Células B	×
Neutrófilos	×	Células T	×
Granulocitos inmaduros	×	Células NK	×
Eosinófilos	×	Reactivos	
Basófilos	×	Citotóxicos	
Blastos	×	Plasmáticas	
Eritoblastos	×	Dendríticas	
		CD+16 Monocitos	

En la actualidad, existen analizadores automáticos que pueden procesar marcadores monoclonales (CD61, CD64, CD3, CD4, CD8) sin preparación previa y otros muy recientes que realizan el RDL automatizado a partir de un solo tubo con 10 monoclonales con buenos resultados⁷.

Nuevo método de referencia para el recuento diferencial leucocitario (ICSH)

El ICSH fue fundado en 1964 y durante bastantes años (hasta 1990) fue publicando estándares y métodos de referencia. En colaboración con la ISLH (International Society of Laboratory Hematology) fue refundado en 2007⁸. El ICSH en los dos últimos años ha publicado varios estándares en hematología^{9,12}, que están disponibles *on line* en: www.islh.org/2009/index.php?page=icsh_standards, así como los grupos que trabajan en la actualidad.

Uno de estos grupos, coordinado por Brent Wood, empezó a trabajar en 2007 para desarrollar un método de referencia para el RDL, cuyo objetivo es reemplazar el método morfológico del CLSI H20-A2¹ por un método mediante citometría de flujo que identifica las células de la sangre periférica y que debe cumplir los siguientes requisitos:

1. Método simple: un solo tubo.
2. Detectar todos los tipos de células necesarios por identificación positiva.
3. Buena precisión (CV 5%).
4. Buena sensibilidad (0,1%).
5. Recuentos absolutos y sin lavados.

En la Tabla 1 se pueden ver las poblaciones que deben ser detectadas de manera obligatoria y las opcionales. Se consideró que los citómetros que debían utilizarse eran los disponibles en los laboratorios clínicos. Al principio se inició con los analizadores FACS CANTO I y II; el LSR II (B-D) de 6 y

Tabla 2. Especificación de los paneles probados en los dos laboratorios que han realizado la investigación

	Francia	Suecia	EE UU		
FITC	CD36	Syto16	CD36	CD16 + CD19	Syto 16
PE	CD2 + CDRTH2	CD13 + CD20	CD203c + CD138	CD123	CD34 + CD117
PE-TR	CD19	HLA-DR	CD45	HLA-DR	CD45
PE-Cy5	CD16	CD34+ CD117	CD16+ CD56	CD33 + CD64	CD33 + CD64
PE-Cy7	CD45	CD45	DRAQ5	CD45	CD38

8 colores y el FC500 (B-C) de 5 colores. Los paneles que se probaron fueron los descritos en Francia^{13,14}, Suecia¹⁵ y Estados Unidos (datos no publicados). El resumen se puede ver en la Tabla 2. Todos detectaban las células imprescindibles, pero no así los otros tipos de células Tabla 3.

Se ha realizado un estudio en dos centros: B.L. Wood en Seattle (Estados Unidos) y M. Roussel en Rennes (Francia). Han sido estudiadas 100 muestras, analizadas con las distintas posibilidades de los tres paneles y con dos analizadores distintos en cada laboratorio. Los resultados han sido comparados con el método de referencia, hasta la actualidad, que es el CLSI H2-A2. Los resultados obtenidos, hasta el momento, permiten concluir que:

1. Los tres métodos dan resultados correctos.
2. No hay un claro ganador.
3. Hay poblaciones no muy bien identificadas: los basófilos en el panel de Francia; los granulocitos inmaduros en los tres paneles (dependen del CD16); los eritoblastos con el Syto16 no es óptimo.
4. El panel de Estados Unidos es el más similar en todos los analizadores
5. Usar citómetros con capacidad para 7-10 colores puede separar más poblaciones.

Tabla 3. Poblaciones detectadas por los distintos paneles además de las células imprescindibles

	Francia	Suecia	EE UU
Linfocitos			
Células B	×		×
Células T			
Células NK		×	
Reactivos			×
Citotóxicos	×		×
Plasmáticas		×	×
Dendríticas			×
CD16 + monocitos	×		×

Conclusiones

El nuevo método de referencia para el diferencial leucocitario de sangre periférica será aprobado para ser realizado mediante anticuerpos monoclonales y citometría de flujo. Parece que el panel final estará compuesto por 8 monoclonales y será en un solo tubo.

La publicación del método está previsto que sea entre octubre y noviembre de 2010. El método deberá ser contrastado y aceptado por entre 15 y 20 laboratorios de todo el mundo. En el momento del congreso podremos disponer de más información.

Bibliografía

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference leucocyte (WBC) differential count (Proportional) and evaluation of instrumental methods: H20-A2. Wayne. USA; 2007.
- Harris N, Jou JM, Devoto G, Lotz J, Pappas J, Wranovics D et al. Performance evaluation of the ADVIA 2120 hematology analyzer: an international multicenter clinical trial. *Lab Hematol* 2005; 11: 62-70.
- Vives Corrons JL, Besson I, Villamor N, Aymerich M, Marín JL, Jou JM. Evaluación de la reproducibilidad del recuento automático de monocitos mediante citometría de flujo y anticuerpos monoclonales. *Sangre* 1994; 39: 197-201.
- Arroyo ME, Tabernero MD, García-Marcos MA, Orfao A. Analytic performance of the Pentra 80 automated blood cell analyzer for the evaluation of normal and pathologic WBCs. *Am J Clin Pathol* 2005; 123: 206-14.
- Molero T, Lemes A, De la Iglesia S, Scott CS. Monoclonal antibody fluorescence for routine lymphocyte subpopulation analysis with the Abbott CELL-DYN Sapphire haematology analyser. *Int J Lab Hem* 2007; 29: 446-53.
- Molero T, Roemer B, Perera M, Lemes A, De la Iglesia S, Palacios G, et al. Analysis and enumeration of T cells, B cells and NK cells using the monoclonal antibody fluorescence capability of a routine haematology analyser (Cell-Dyn CD4000). *Clin Lab Haem* 2005; 27: 224-34.
- Beunis MH, Van de Geijn GJ, Van Rees V, Bom N, Pegels JG, Njo TL. Flow cytometric leucocyte differentiation: Hematoflow. *Int J Lab Hem* 2010; 32 (suppl 1): 97.
- Machin S, Jou JM, Briggs C, Davis B, McFadden S. The reformed International Council for Standardization in Hematology (ICSH). *Int J Lab Hem* 2008; 30: 89-90.
- Briggs C, Carter C, Lee SH, Sandhaus L, Simon-López R, Vives Corrons JL. ICSH guideline for worldwide point-of-care testing in haematology with special reference to the complete blood count. *Int J Lab Hem* 2008; 30: 105-16.
- Lee SH, Erber WN, Porwit A, Tomonaga M, Peterson LC. ICSH guidelines for the standardization of bone marrow specimens and reports. *Int J Lab Hem* 2010; 30: 349-64.
- Davis BH, Jungerius B. International Council for Standardization in Haematology. Technical report 1-2009: new reference material for haemoglobinocyanide for use in standardization of blood haemoglobin measurements. *Int J Lab Hem* 2010; 32: 139-41.
- Jou JM, Briggs C, LaSalle B, Lee SH, McFadden S, Lewis SM. ICSH new reference method for Erythrocyte Sedimentation Rate. *Int J Lab Hem* (in press).
- Faucher JL, Lacronique-Gazaille C, Fribet E, Trimoreau F, Donnard M, Bordessoule D et al. "6 Markers/5 Colors" Extended white blood cell differential by flow cytometry. *Cytometry* 2007; 71a: 934-44.
- Roussel M, Benard C, Ly-Sunnaran B, Fest T. Refining the white blood cell differential: The first flow cytometry routine application. *Cytometry Part A* (in press).
- Björnsson S, Wahlström S, Norström E, Bernevi I, O'Neill U, Johansson E, et al. Total nucleated cell differential for blood and bone marrow using a single tube in a five-color flow cytometer. *Cytometry*; 2008; 74B: 91-103.

APLICACIÓN DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO AL ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS Y FUNCIÓN DE LA PLAQUETA

J.E. O'CONNOR

Laboratorio de Citómica. Unidad Mixta de Investigación CIPF-UVEG. Centro de Investigación Príncipe Felipe. Universidad de Valencia

Las alteraciones en la función plaquetaria están asociadas a disfunciones tromboembólicas o hemorrágicas. Por esta razón, los estudios de activación y reactividad plaquetaria son relevantes en el conocimiento de la fisiopatología de la hemostasia y en sus estrategias terapéuticas¹.

La funcionalidad plaquetaria puede ser evaluada por diferentes metodologías que detectan alteraciones morfológicas, bioquímicas y de la composición de la membrana, asociadas a la activación celular. Entre los métodos clásicos de análisis de la función plaquetaria se cuentan los que detectan la agregación plaquetaria o la liberación de moléculas plaquetarias. Sin embargo, el análisis de las propiedades funcionales de las plaquetas *ex vivo*, utilizando las técnicas convencionales, refleja el comportamiento de la población total de plaquetas en la muestra en estudio. Sin embargo, diferentes poblaciones en la muestra pueden contribuir de forma diferente al resultado global y no es posible discriminarlas².

La citometría de flujo proporciona un análisis multiparamétrico y sensible de células o partículas individuales² y se ha convertido, por ello, en una técnica extremadamente útil en el estudio de las plaquetas y su funcionalismo^{3,4}. De hecho, el análisis de las características fenotípicas y funcionales de las plaquetas por citometría de flujo se considera un área de investigación de gran interés y con innumerables aplicaciones clínicas. Por ello, el estado actual del conocimiento básico y clínico de la hemostasia, su regulación y su patología recomienda incluir el análisis de la función plaquetaria en el estudio de los fenómenos prohemorrágicos y protrombóticos. A este fin contribuyen dos aspectos complementarios: por una parte, el desarrollo actual de la citometría de flujo la convierte en la tecnología de elección para el análisis multiparamétrico y

sensibles de partículas biológicas de tamaño cercano al umbral de detección²; y, por otra parte, la disponibilidad de técnicas citométricas en sangre entera, basadas en la identificación fenotípica de las poblaciones de interés, potencia extraordinariamente el valor diagnóstico y pronóstico de la citometría de flujo en el estudio clínico de la hemostasia⁵⁻⁹.

Las principales ventajas del estudio de la funcionalidad plaquetaria mediante citometría de flujo en sangre entera se pueden resumir como: a) permite estudiar la función plaquetaria en condiciones cuasifisiológicas; b) la manipulación mínima previene la activación artefactual de plaquetas; c) evita la pérdida potencial de subpoblaciones plaquetarias; d) requiere de muy pequeños volúmenes de muestra, y e) permite el análisis simultáneo de plaquetas y otras células sanguíneas³.

Hasta muy recientemente, y aún es así en ciertos contextos clínicos, el análisis citométrico de plaquetas más habitual es el de los anticuerpos antiplaquetarios, que permite la detección de autoanticuerpos y aloanticuerpos, el inmunofenotipo de HPA-1a y la detección de anticuerpos maternos y fetales anti-HPA-1a, el análisis de inmunoglobulinas asociadas a plaquetas en trombocitopenias y en aloinmunización, así como establecer el *cross-match* de plaquetas. Sin embargo, la función plaquetaria se puede analizar ampliamente en sangre entera por citometría de flujo y las principales aplicaciones clínicas se dan en los siguientes campos, que serán comentados en la ponencia: a) análisis de la reactividad plaquetaria *in vitro*, b) detección y cuantificación de plaquetas activadas circulantes, c) estudio de las interacciones plaqueta-plaqueta, d) estudio de las interacciones entre plaquetas y leucocitos, e) detección y cuantificación de micropartículas plaquetarias procoagulantes, f) diagnóstico y seguimiento de alteraciones congénitas o adquiridas en la función o el número de plaquetas, g) estudio de la maduración normal y patológica de las plaquetas y h) monitorización del tratamiento antiagregante.

Los principales parámetros plaquetarios susceptibles de ser analizados por citometría de flujo se pueden agrupar en tres grandes áreas:

a) Parámetros morfológicos: Durante la activación de la plaqueta, la reorganización del citoesqueleto induce el paso de una forma discoide a esferoide, la emisión de pseudópodos y la desgranulación. En ciertas condiciones, la plaqueta activada libera al medio micropartículas. Estos cambios morfológicos están asociados a cambios de las señales de dispersión frontal y lateral de luz, que pueden cuantificarse de forma sensible y cinética, en tiempo real^{2,3}.

b) Parámetros inmunofenotípicos: Los anticuerpos conjugados con fluorocromos permiten la detección y cuantificación de numerosos antígenos plaquetarios con alta especificidad y sensibilidad. El inmunofenotipo de plaquetas con marcadores específicos de glico-

proteínas constitutivas de membrana permite distinguir las plaquetas del ruido de fondo y determinar la unión de plaquetas activadas a otras células de la sangre, así como caracterizar anomalías congénitas en la expresión de glicoproteínas de la membrana, como el síndrome de Bernard Soulier o la trombostenia de Glanzmann. Por otra parte, algunos antígenos se expresan *de novo* en la superficie o cambian su conformación tras la activación^{7,8}.

c) Parámetros de activación: Durante la activación de la plaqueta ocurren diversas alteraciones a nivel de los lípidos y de las proteínas de la membrana, que pueden ser detectadas con anticuerpos monoclonales o con moléculas fluorescentes de unión específica a estructuras de la membrana plaquetaria. Los cambios incluyen: a) alteraciones cuantitativas de glicoproteínas componentes de la membrana, b) alteraciones conformacionales de receptores y sus ligandos, c) exposición de componentes de la membrana de gránulos plaquetarios, d) unión a la membrana de las plaquetas de proteínas solubles liberadas durante la secreción y e) expresión de actividad procoagulante y formación de micropartículas³.

Por otra parte, la activación plaquetaria se acompaña de una secuencia de fenómenos bioquímicos intracelulares, tales como fosforilación y desfosforilación de proteínas específicas, flujo de iones de calcio a través de la membrana plasmática y liberación desde los depósitos intracelulares⁵⁻⁹, formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, variaciones en el estado de polimerización de proteínas estructurales y cambios en el potencial de membrana plasmática y mitocondrial, que pueden ser cuantificados o seguidos de forma cinética en tiempo real, usando sustratos fluorogénicos específicos del proceso bioquímico de interés.

En la presente ponencia se comentarán de forma resumida las bases técnicas del análisis fenotípico y funcional por citometría de flujo de plaquetas en muestras de sangre entera y sus principales aplicaciones diagnósticas y terapéuticas.

Bibliografía

1. Monteiro MC, O'Connor JE, Martínez M. La citometría de flujo en el análisis de las plaquetas (I). Aspectos estructurales y funcionales de las plaquetas. *Rev Diag Biol* 2001; 50: 111-36.
2. O'Connor JE, Callaghan R, Escudero M, Herrera G, Martínez A, Monteiro MC, et al. The relevance of flow cytometry for biochemical analysis. *IUBMB Life* 2001; 51: 231-9.
3. Monteiro MC, O'Connor JE, Martínez M. La citometría de flujo en el análisis de las plaquetas (II). Aplicaciones en el análisis funcional. *Rev Diag Biol* 2001; 51: 87-99.
4. The European Working Group on Clinical Cell Analysis "European Working Group on Clinical Cell Analysis: Consensus protocol for the flow cytometric characterization of platelet function". *Thrombosis & Hemostasis* 1998; 79: 885-96.

5. Monteiro MC, Sansonetty F, Gonçalves MJ, O'Connor JE. A flow cytometric kinetic assay of platelet activation in whole blood using Fluo-3 and CD41. *Cytometry* 1999; 35: 302-10.
6. Monteiro MC, Sansonetty F, Gonçalves MJ, O'Connor JE. Flow cytometric analysis of calcium mobilization in whole blood platelets. *Current Protocols in Cytometry* 2003; 9.20.1-9.20.7.
7. Monteiro MC, Gonçalves MJ, Sansonetty F, Martínez M, O'Connor JE. Aplicación de la citometría de flujo funcional a la monitorización del tratamiento antiplaquetario: Movilización de Ca²⁺ y expresión de P-selectina en sujetos tratados con ticlopidina. *Rev Diag Biol* 2003; 52: 23-31.
8. García-Martínez C, Labiós M, Hermenegildo C, Tarín JJ, O'Connor JE, Cano A. The effect of hormone replacement therapy on Ca²⁺ mobilization and P-selectin (CD62P) expression in platelets examined under flow cytometry. *Blood Coag Fibrin* 2004; 15: 1-8.
9. Martínez M, Gómez Biedma S, Ruiz-Aja S, Vivó M, O'Connor JE. Utility of flow cytometry to assess the interaction between erythrocytes and platelets: Morphological alterations and changes in cytosolic free calcium and in platelet activation induced by arachidonic acid in erythrocytes. *Rev Diag Biol* 2007; 56: 138-142.

RASTREO DIAGNÓSTICO DE HEMOPATÍAS CLONALES Y SU INCORPORACIÓN A LOS CONTADORES HEMATOLÓGICOS

J. ALMEIDA¹, S. BARRENA¹, E. ARROYO¹, M.^aL. SÁNCHEZ¹, J. FLORES¹, W. NIETO¹, E. SOBRAL DA COSTA², S. QUIJANO¹, A. LÓPEZ¹, C. PEDREIRA³, C. FERNÁNDEZ¹, P. BÁRCENA¹, M. LIMA⁴, M.^aC. GARCÍA-MACIAS⁵, A. ÓRFÃO¹

¹ Servicio General de Citometría. Departamento de Medicina y Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC-CSIC/USAL). Universidad de Salamanca.

² Instituto de Pediatría e Puericultura Martagão Gesteira y Departamento de Clínica Médica. URFS/Federal University of Rio de Janeiro. Rio de Janeiro (Brazil).

³ School of Medicine and COPPE-PEE. Engineering Graduate Program. Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ). Rio de Janeiro (Brazil). ⁴ Laboratório de Citometria. Serviço de Hematologia Clínica. Centro Hospitalar do Porto. Hospital Geral de Santo António. Porto (Portugal). ⁵ Departamento de Anatomía Patológica. Hospital Universitario de Salamanca

des secundarios y otros tejidos. En las últimas décadas se han introducido nuevas herramientas de apoyo al diagnóstico hematológico de las que han resultado especialmente útiles en una primera fase, 1) los recuentos celulares automatizados en contadores hematológicos⁵⁻⁷ y, en una segunda etapa, 2) la caracterización fenotípica, citogenética y molecular de las células neoplásicas^{4,8}. En este sentido, el recuento automatizado de las cifras periféricas de distintas poblaciones celulares (p.ej., hematíes, plaquetas, leucocitos y sus subpoblaciones mayoritarias de linfocitos, granulocitos neutrófilos y monocitos, entre otros subtipos de células nucleadas) y diversos parámetros relacionados con las mismas (p.ej., concentración de hemoglobina), han aportado una herramienta clave de rastreo diagnóstico de anomalías cuantitativas y cualitativas de las poblaciones mayoritarias de células de SP asociadas a hemopatías clonales; con ello se ha ampliado enormemente la capacidad de despistaje de hemopatías clonales, al facilitarse la realización de cientos de hemogramas en un corto periodo de tiempo y un coste relativamente limitado⁹⁻¹⁰. En paralelo, a partir de finales de los años 80, la información fenotípica y genética se ha ido incorporando progresivamente y de forma masiva a la práctica diagnóstica diaria a través de las nuevas clasificaciones de consenso, de uso extendido en el diagnóstico y clasificación de las hemopatías malignas^{4,11}. Esto ha conducido a que en la clasificación actual de las hemopatías malignas de la Organización Mundial de Salud⁴, la definición de la gran mayoría de las distintas entidades incluidas dentro de cada subgrupo de hemopatías clonales tenga en cuenta simultáneamente criterios citomorfológicos, histopatológicos, inmunofenotípicos y genético-moleculares, junto con el comportamiento clínico y biológico de la enfermedad.

Inicialmente, la incorporación de estas nuevas herramientas diagnósticas al laboratorio de hematología se ha realizado con el objetivo principal de contribuir a mejorar la clasificación de las hemopatías, una vez se ha confirmado la presencia de tumor con los métodos microscópicos convencionales¹². No obstante, los avances técnicos alcanzados, junto al empleo sistemático de estas nuevas herramientas en la rutina diagnóstica, han propiciado que su aplicación se haya extendido desde una posición de herramienta diagnóstica de segunda línea (dirigida a confirmar la sospecha diagnóstica fundamentada en la observación citológica e histológica), al rastreo diagnóstico inicial y la monitorización del tratamiento de un número creciente de hemopatías malignas¹³⁻¹⁶. En el caso de las técnicas inmunofenotípicas, esta evolución ha sido especialmente notable en los últimos años y, en especial, a partir del momento en el que se han empezado a utilizar en la rutina marcales simultáneos con tres o más anticuerpos analizados mediante citometría de flujo. Con ellos, se ha podido demostrar que las técnicas inmunofenotípicas propor-

Introducción

Clásicamente, ante la sospecha de la posible existencia de un proceso leucémico y/o linfomatoso¹⁻⁴, el rastreo diagnóstico y la caracterización de hemopatías malignas se ha fundamentado de forma casi exclusiva en los estudios citomorfológicos e histopatológicos de sangre periférica (SP), médula ósea (MO), órganos linfoides

cionan un recuento fiable, altamente específico, sensible y reproducible de las distintas subpoblaciones celulares presentes en una muestra biológica, siempre que esta última esté constituida por suspensiones unicelulares¹⁴. Además, estas técnicas complementan y detallan con precisión, la información proporcionada por los contadores hematológicos ante diferentes alarmas, permitiendo incluso la distinción, dentro de un compartimiento celular concreto, entre células neoplásicas y su contrapartida normal, cuando ambas coexisten en una muestra¹⁷⁻¹⁹. En este campo, el éxito de los análisis multiparamétricos por citometría de flujo ha sido particularmente evidente en el rastreo diagnóstico de los síndromes linfoproliferativos crónicos (SLPC), ya sea en muestras SP, MO⁸ y tejido linfoide (Barrena *et al.*, enviado para publicación) o en diferentes líquidos corporales, como el líquido cefalorraquídeo (LCR)²⁰. Asimismo, a través de la citometría multiparamétrica se obtiene información de incalculable valor en otras neoplasias hematológicas linfoides y mieloides, incluidas las leucemias agudas linfoblásticas (LLA) y mieloblásticas (LMA)^{15,21-23}, la hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN)²⁴ y más recientemente también, los síndromes mielodisplásicos (SMD)²⁵ y algunos subtipos concretos de enfermedades mieloproliferativas como las mastocitosis sistémicas (MS)²⁶⁻²⁹. A continuación, revisaremos la utilidad de los estudios inmunofenotípicos en el diagnóstico de las hemopatías clonales, centrándonos de forma preferente nuestro interés en aquellas aplicaciones que pudieran incorporarse fácilmente a los contadores hematológicos, como el diagnóstico de clonalidad en SLPC.

Rastreo de clonalidad B en el diagnóstico de síndromes linfoproliferativos crónicos

Desde hace tiempo, la citometría de flujo se ha convertido en uno de los métodos más empleados para la caracterización diagnóstica de los SLPC-B^{8,30}. Aunque en la actualidad conocemos que la citometría de flujo permite distinguir entre células B normales y neoplásicas, de acuerdo con la presencia en estas últimas de características fenotípicas aberrantes, en un principio las técnicas inmunofenotípicas sólo se aplicaban al estudio de los SLPC-B, cuando el diagnóstico de la hemopatía ya se había establecido con un elevado grado de certeza, sobre la base de criterios morfológicos y/o histopatológicos^{4,12}.

Las expansiones de linfocitos B maduros se detectan habitualmente en SP, MO y/o órganos linfoides secundarios, siendo menos frecuente la infiltración de otros tejidos como el sistema nervioso central, la piel y las mucosas, entre otros⁴. Uno de los principales objetivos del estudio fenotípico de estas expansiones de linfocitos de aspecto maduro, consiste en establecer o descartar, su naturaleza clonal. Clásicamente, las técnicas de

fenotipado por citometría de flujo han demostrado ser de gran utilidad en el rastreo diagnóstico de clonalidad B^{31,32}. Así, durante muchos años, el diagnóstico inmunofenotípico de clonalidad B se ha fundamentado de forma casi exclusiva en la existencia de un exceso de células B que expresan de forma exclusiva en su membrana y/o citoplasma inmunoglobulinas (Ig) k+ o Ig-lambda+^{33,34} (Figura 1). No obstante, los avances recientes en el conocimiento de las diferencias fenotípicas existentes entre células B normales y neoplásicas, junto con la disponibilidad de un número creciente de fluorocromos y de equipos capaces de medir simultáneamente > 2 fluorescencias diferentes han modificado las estrategias empleadas para la identificación de clonalidad B, convirtiendo el fenotipado por citometría de flujo en la técnica de elección para su rastreo diagnóstico^{8,16,35,36}.

Entre otros avances, éstos incluyen la posibilidad de llevar a cabo un análisis rápido, simple y relativamente barato de muestras con sospecha diagnóstica de infiltración por SLPC-B que permita la identificación de la línea celular y estadio madurativo de la población de linfocitos expandida, empleando marcajes múltiples en tres (p. ej., CD3, CD4, CD8, CD56 y CD19) o cuatro fluorescencias (p. ej., CD3, CD4, CD8, CD56, CD19, sIgK y sIglambda), en una sola medición⁸ (Figura 1). Su ampliación a ocho fluorescencias (p. ej., CD3, CD4, CD8, CD5, CD38, CD56, CD19, CD20, CD45, TCRγδ, sIgK y sIglambda) permite además la identificación de subpoblaciones celulares y fenotipos aberrantes adicionales, asociados a los SLPC-B más frecuentes³⁷. En su conjunto, este tipo de aproximaciones metodológicas proporcionan una sensibilidad y especificidad > 95% cuando se comparan con los procedimientos convencionales, pudiendo además alcanzar a obtener los resultados en un corto espacio de tiempo⁸. Cuando se sospecha la presencia de células B clonales en la muestra, la identificación de la existencia de fenotipos aberrantes –presentes en la práctica totalidad de los SLPC-B³⁵– constituye un signo inequívoco de clonalidad B, no requiriéndose habitualmente en esta situación de confirmación molecular. Además, la inclusión en el proceso de rastreo diagnóstico de clonalidad B, de marcadores dirigidos a identificar las aberraciones fenotípicas más frecuentes en los SLPC-B más habituales permite alcanzar una gran sensibilidad que se sitúa en niveles de 10⁻⁴-10⁻⁵ en la rutina diagnóstica^{35,38}. Ante estas características, el uso de los análisis multiparamétricos por citometría de flujo se extiende hoy día también al diagnóstico de enfermedad mínima tanto en el contexto de una evaluación del grado de infiltración tumoral de un tejido y del grado de extensión de un tumor al diagnóstico (p. ej., infiltración de LCR en linfomas no-hodgkinianos B agresivos o con sospecha de infiltración leptomeníngea)²⁰, como a la hora de monitorizar los efectos del tratamiento en situaciones donde la sensibilidad de las técnicas convencionales resulta insuficiente^{35,38-39}.

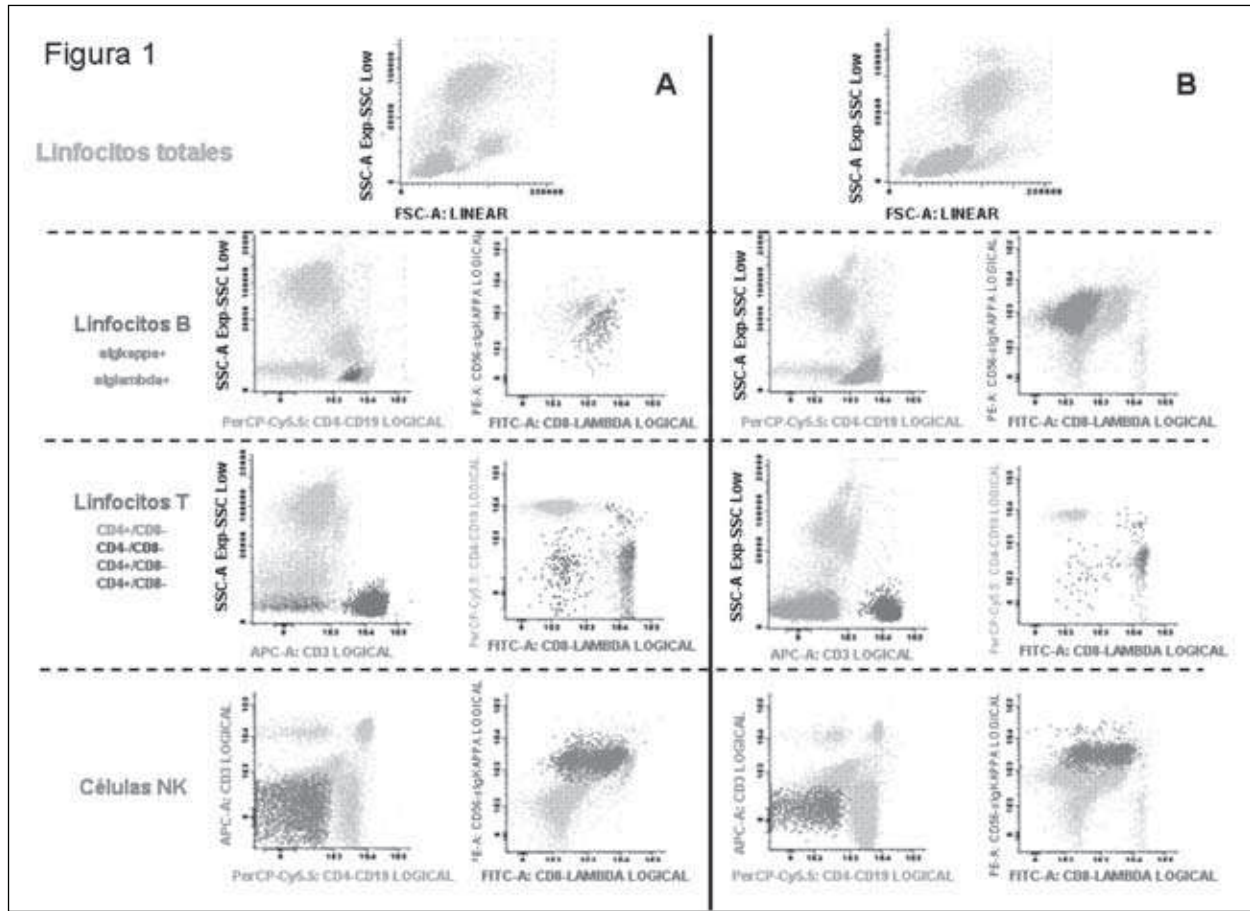


Figura 1. Identificación de las principales poblaciones linfocitarias de sangre periférica en una muestra representativa de un donante adulto sano (panel A) y de un paciente con leucemia linfática crónica (panel B), identificándose las distintas subpoblaciones linfocitarias según un código de colores definido en la figura.

En los SLPC-B, el rastreo inmunofenotípico por citometría de flujo suele proporcionar también información adicional, útil para la caracterización diagnóstica de las células B clonales. Son ejemplos claros de ello: a) la observación de células B de elevado tamaño y complejidad interna en los linfomas de células grandes y la tricoleucemia, b) la expresión débil de CD20 y sIg asociada a leucemia linfática crónica (LLC) B, c) la ausencia/disminución acentuada de expresión de CD19 en células de pequeño tamaño en el linfoma folicular y d) la expresión elevada de CD38 en el linfoma de Burkitt y en el mieloma múltiple (donde se asocia además a expresión débil de CD45, negatividad para CD19 y expresión de CD56 en una proporción significativa de casos)^{35,40,41}. Ello se debe a que los SLPC-B más habituales, muestran características fenotípicas únicas, que los distinguen de los demás subtipos diagnósticos de la enfermedad que hacen que el inmunofenotipo constituya en la actualidad, junto con las características clínicas, morfológicas, histopatológicas y genéticas/moleculares, un pilar básico en la caracterización diagnóstica de los SLPC-B⁴.

En paralelo, la demostración de la elevada frecuencia con la que las células B neoplásicas presentan fe-

notipos aberrantes ha abierto también la posibilidad de emplear este tipo de análisis para la evaluación de infiltración tisular en los SLPC-B, al diagnóstico y/o tras el tratamiento, proporcionando información de gran utilidad clínica sobre el grado de extensión de la enfermedad y la persistencia de enfermedad mínima residual, respectivamente. En relación con este último aspecto, aunque el número de estudios realizados hasta la fecha es relativamente reducido y se limita prácticamente a la LLC-B, la tricoleucemia y el linfoma de células del manto^{35,42,43}, hoy se reconoce que el inmunofenotipado por citometría de flujo constituye una técnica de elevada sensibilidad ($<10^{-4}$ - 10^{-5}) y especificidad para el diagnóstico de enfermedad mínima residual en SLPC-B, siendo el impacto clínico de sus resultados elevado en la LLC-B³⁸. Merece destacar el hecho de que con relativa frecuencia –debido a la elevada sensibilidad de la citometría de flujo– se detecta la presencia de dos o más clones diferentes (no relacionados) de células B en un mismo paciente, siendo su frecuencia de hasta un 5% de todos los SLPC-B leucemizados⁴⁴. La verdadera repercusión clínica de estos hallazgos está aún por dilucidar.

Rastreo de clonalidad T en el diagnóstico de SLPC

Durante décadas hemos carecido de marcadores clonotípicos similares a las cadenas ligeras de las Ig de las células B para la demostración de la naturaleza clonal de las células T. Por ello, inicialmente la sospecha inmunofenotípica de clonalidad T se ha fundamentado en la observación de un desequilibrio entre distintas subpoblaciones de células T y la presencia de fenotipos T poco habituales o aberrantes^{19,45}. Así, desde hace tiempo, entre otros criterios empleados en el diagnóstico inmunofenotípico de sospecha de clonalidad T y la identificación de células T neoplásicas en SLPC-T, se incluyen: 1) la ausencia o pérdida de expresión de una o más moléculas pan-T (p. ej., CD7 en células de Sezary); 2) la sobreexpresión de un antígeno asociado a células T; 3) los asincronismos madurativos (perfil fenotípico de coexpresión de dos o más marcadores, ausente en linfocitos T normales, como la expresión asincrónica de CD3 y TCR en la superficie celular, y 4) la coexpresión de CD4 y CD8 y la ausencia de expresión de ambos marcadores en una proporción importante de linfocitos T. Estos criterios, aunque útiles en la rutina, no son completamente eficaces, ya que sólo están presentes en cerca del 60-70% de los SLPC-T⁴⁶⁻⁴⁹. Ante esta situación, tradicionalmente se ha empleado la identificación de reordenamientos clonales de los genes que codifican para las diferentes cadenas del TCR mediante técnicas moleculares (p. ej., Southern blot), como el método de referencia para el diagnóstico de clonalidad T⁵⁰.

Tal como ocurre con los linfocitos T maduros normales, las células neoplásicas de los SLPC-T expresan en su mayoría las cadenas alfa (α) y beta (β) o gama (γ) y delta (δ) del TCR (TCR $\alpha\beta$ y TCR $\gamma\delta$, respectivamente). En la actualidad, existen dos aproximaciones metodológicas distintas para la caracterización del repertorio de estas cadenas del TCR centradas en técnicas de biología molecular y citometría de flujo, respectivamente⁵¹⁻⁵⁴.

En el caso de las técnicas inmunofenotípicas, hoy disponemos de una amplia batería de anticuerpos específicos dirigidos frente a gran parte de las distintas familias de las cadenas del TCR, especialmente de la cadena β . Estudios recientes demuestran que la caracterización del repertorio T mediante citometría de flujo permite confirmar o excluir clonalidad T, de acuerdo con la demostración de la existencia de una expansión preferencial de una familia de regiones variables de las cadenas α y/o β y γ y/o δ del TCR⁵¹⁻⁵⁴. Esta aproximación resulta especialmente útil en aquellos casos en los que carecemos de aberraciones fenotípicas evidentes y/o cuando no están disponibles de forma inmediata los resultados de las técnicas moleculares. No obstante, merece destacar que la interpretación de los resultados de los estudios del repertorio T en sujetos con

sospecha de SLPC-T exige un conocimiento detallado del repertorio T normal⁵⁵. En este sentido, la selección del grupo control es clave, ya que hoy se conoce que dicho repertorio depende de una gran variedad de factores, entre los que se incluyen el origen étnico, la edad, el tejido objeto de estudio y la subpoblación T en cuestión (p. ej., linfocitos T CD4+ vs. CD8+)⁵⁶⁻⁵⁷. Asimismo, se reconoce que en sujetos sanos pueden encontrarse expansiones de una o más familias, especialmente entre los linfocitos T efectores de individuos de edad avanzada⁵⁸⁻⁶¹, o en sujetos que padecen algunas enfermedades de naturaleza infecciosa, tumoral o autoinmune en las que pueden observarse expansiones oligoclonales de células T⁶²⁻⁶⁵. En estos casos, las expansiones no suelen superar el 40% de las células T CD4+ y/o CD8+ de SP. Aún con estas precauciones, el análisis del repertorio de familias TCR en pacientes con sospecha de infiltración por SLPC-T, resulta de gran utilidad en el rastreo diagnóstico de clonalidad T, sobre todo cuando se combina con la identificación de fenotipos aberrantes para una mejor delimitación de la población tumoral y se observa por ejemplo, uso restringido de una familia de la cadena β del TCR en más de 60% de las células T⁵³.

Rastreo de clonalidad NK en el diagnóstico de SLPC

A diferencia de lo que ocurre en pacientes que presentan expansiones de linfocitos T o B maduros, en los sujetos que muestran aumento de células NK la demostración de clonalidad sigue resultando difícil, si exceptuamos una pequeña proporción de pacientes en los que se detectan alteraciones citogenéticas y se demuestra la integración clonal de secuencias genómicas de origen vírico, y las mujeres en las que se comprueba la existencia de un patrón clonal de inactivación del cromosoma X sobre células NK previamente purificadas⁶⁶⁻⁶⁸.

Desde el punto de vista fenotípico, datos preliminares sugieren que el patrón de expresión de receptores KIR (en especial de CD158a y CD158b) podrían ser marcadores útiles para la detección de clonalidad NK⁶⁹⁻⁷³. Sin embargo, ya en estos estudios preliminares se reconoce su limitada sensibilidad y especificidad, en especial cuando la población clonal de células NK esta presente sobre un fondo de células NK policlonales residuales.

Rastreo diagnóstico de clonalidad linfoide en los contadores hematológicos

En los últimos 15 años, los contadores hematológicos han sufrido importantes cambios en cuanto a sus com-

Tabla 1. Utilidad de las técnicas de fluorescencia e inmunofenotipado por citometría de flujo de aplicación en los contadores hematológicos automatizados

Tipo de análisis	Técnica	AcMo	Aplicación
Cuantificación del contenido de ADN	Tinción de las células muertas con yoduro de propidio diluido (colorante cromogénico que se une al ADN)	-	Viabilidad celular
Identificación y recuento de reticulocitos	Marcaje de células con naranja de tiazol (colorante cromogénico que se une al ARN y ADN)	-	Recuento de reticulocitos
Expresión de CD64 en granulocitos neutrófilos	Inmunofluorescencia directa con anticuerpos monoclonales (AcMo) conjugados con fluorocromos	CD64 CD45	Diagnóstico de infección/sepsis
Identificación y recuento de plaquetas	Inmunofluorescencia directa con anticuerpos monoclonales (AcMo) conjugados con fluorocromos y cuantificación del tamaño plaquetar por FSC/SSC	CD61 CD41	Diagnóstico de trombopenias
Identificación y recuento de poblaciones linfocitarias	Inmunofluorescencia directa con AcMo conjugados con fluorocromos	CD3 CD4 CD8	Recuento en número absoluto y relativo de las principales poblaciones T linfocitarias en pacientes VIH+

AcMo: anticuerpo monoclonal; FSC: dispersión frontal de luz (forward light scatter); SSC: dispersión lateral de luz (sideward light scatter); VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

ponentes, proporcionando nuevas posibilidades analíticas. Entre otras modificaciones, algunos contadores han incorporado fuentes de luz tipo láser y detectores capaces de medir tanto la luz dispersada del láser al incidir sobre cada célula analizada, como múltiples emisiones fluorescentes; con ello, los contadores hematológicos se han acercado en sus capacidades analíticas a un verdadero citómetro de flujo^{40,74-76}. El traslado de algunas aplicaciones incipientes de la citometría de flujo a los primeros modelos de contadores hematológicos que incorporaron un láser como fuente de luz ha supuesto todo un éxito^{10,40,77,78}. Un claro ejemplo de ello lo constituye el análisis de reticulocitos empleando fluorocromos específicos de ácidos nucleicos, una determinación en la que los contadores hematológicos han desplazado completamente a los citómetros de flujo en la práctica diaria⁷⁹⁻⁸⁰ (Tabla 1). Siguiendo esta estrategia, algunos fabricantes incorporaron a finales de los noventa hasta tres detectores de fluorescencia⁷⁶ en algunos modelos de contadores hematológicos, abriendo la puerta a la utilización de los contadores hematológicos en la evaluación de marcajes fenotípicos simples o múltiples, en paralelo con la viabilidad celular de la muestra.

La primera de estas nuevas aplicaciones de inmunofenotipado se centró en el empleo de anticuerpos anti-CD61 para un recuento más preciso del número de plaquetas, especialmente en muestras de SP de pacientes con trombopenia, como una estrategia más precisa a la hora de establecer una indicación de requerimientos transfusionales^{81,82} (Tabla 1). Casi en paralelo, se evaluó también la posibilidad de emplear los contadores hematológicos para el recuento del número absoluto de linfocitos T CD4+ y CD8+, dirigiendo fundamentalmente a la monitorización de poblaciones linfocitarias en pacientes con infección por el

virus de la inmunodeficiencia humana (VIH+)^{83,84} (Tabla 1). Pese a la demostración de la posible utilidad de esta estrategia en ambos campos, el éxito de la misma, valorado en términos de difusión y uso, no ha sido tan amplio y extendido como cabría suponer en un principio. A este éxito parcial han contribuido, muy probablemente, diversos factores de los que merece destacar por su posible relevancia: a) la amplia difusión alcanzada por los citómetros de flujo en los centros hospitalarios de nuestro entorno, b) el flujo de muestras para estudios fenotípicos, preestablecido en cada laboratorio, c) la ausencia de una ventaja clara sobre las determinaciones realizadas en los citómetros de flujo y d) el coste asociado a cada determinación. Más recientemente, algunos contadores han incorporado además la evaluación de la intensidad de expresión de CD64 como parámetro informativo ante un posible diagnóstico de sepsis y su monitorización⁸⁵ (Tabla 1).

En este momento, la pregunta clave se centra en conocer si los contadores ampliarán su utilidad y capacidades al rastreo diagnóstico de clonalidad en hemopatías malignas y, de forma especial, al rastreo diagnóstico de clonalidad linfoide B, T y NK. En este sentido, cabe señalar que la disponibilidad de tres detectores de fluorescencia en algunos contadores hematológicos permitiría al menos un rastreo rápido y eficiente de las poblaciones linfoides expandidas y/o alteradas en adultos con linfocitosis absolutas superiores a $3,5-5 \times 10^3$ células/ μL ⁸. No obstante, en este contexto cabe resaltar que, debido a las limitaciones técnicas actuales (y pese a los esfuerzos realizados en las últimas décadas por la incorporación a la rutina diagnóstica de muestras de MO u otros tejidos), parece lógico que, al menos por el momento, el rastreo diagnóstico de clonalidad en los contadores hematológicos deba centrarse de forma casi exclusiva en el estudio de muestras de SP.

A la hora de ampliar la aplicación de los estudios inmunofenotípicos a los contadores hematológicos, más allá del diagnóstico de clonalidad B, T y NK en SLPC, resulta especialmente atractivo un estudio preliminar que sugiere la posibilidad de realizar un rastreo diagnóstico de las alteraciones genéticas más frecuentes en leucemias agudas. Para ello, los autores han evaluado la posibilidad de detectar en un contador hematológico, proteínas de fusión derivadas de translocaciones cromosómicas (p. ej., de reordenamientos de los genes BCR/ABL), empleando microesferas recubiertas de anticuerpos específicos de dichas proteínas y un revelado fluorescente^{86,87}. Asimismo, la introducción de nuevas tecnologías que permitan el análisis simultáneo de cientos de miles de células por segundo, en las nuevas generaciones de contadores hematológicos⁸⁸, abre también la posibilidad de emplear este tipo de instrumentos analíticos en la monitorización de enfermedad mínima residual (EMR) en muestras de SP, siempre que esto sea posible con un número limitado de marcadores, adaptado al número de detectores de fluorescencia disponibles (p. ej., marcaje de tres fluorescencias para monitorizar EMR en pacientes con LLC-B, si su número no se amplía de forma paralela).

Bibliografía

- Li CY, Yam LT. Cytochemistry and immunochemistry in hematologic diagnoses. *Hematol Oncol Clin North Am* 1994; 8 (4): 665-81.
- Dunphy CH. Applications of flow cytometry and immunohistochemistry to diagnostic hematopathology. *Arch Pathol Lab Med* 2004; 128 (9): 1004-22.
- Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994; 84 (5): 1361-92.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (4th ed). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2008.
- Tatsumi J, Tatsumi Y, Tatsumi N. Counting and differential of bone marrow cells by an electronic method. *Am J Clin Pathol* 1986; 86 (1): 50-4.
- D'Onofrio G, Kim YR, Schulze S, Lorentz T, Dorner K, Gossens W, et al. Evaluation of the Abbott Cell Dyn 4000 automated fluorescent reticulocyte measurements: comparison with manual, FACSscan and Sysmex R1000 methods. *Clin Lab Haematol* 1997; 19 (4): 253-60.
- Mori Y, Mizukami T, Hamaguchi Y, Tsuruda K, Yamada Y, Kamihira S. Automation of bone marrow aspirate examination using the XE-2100 automated hematology analyzer. *Cytometry B Clin Cytom* 2004; 58 (1): 25-31.
- Costa ES, Arroyo ME, Pedreira CE, García-Marcos MA, Tabernero MD, Almeida J, et al. A new automated flow cytometry data analysis approach for the diagnostic screening of neoplastic B-cell disorders in peripheral blood samples with absolute lymphocytosis. *Leukemia* 2006; 20 (7): 1221-30.
- Trabuio E, Valverde S, Antico F, Manoni F, Gessoni G. Performance of automated platelet quantification using different analysers in comparison with an immunological reference method in thrombocytopenic patients. *Blood Transfus* 2009; 7 (1): 43-8.
- Kickler TS. Clinical analyzers. *Advances in automated cell counting*. *Anal Chem* 1999; 71 (12): 363R-5R.
- Meusers P, Brittinger G. [REAL classification of non-Hodgkin lymphoma from the clinico-oncologic viewpoint]. *Praxis (Bern 1994)* 1998; 87 (23): 793-800.
- Little JV, Foucar K, Horvath A, Crago S. Flow cytometric analysis of lymphoma and lymphoma-like disorders. *Semin Diagn Pathol* 1989; 6 (1): 37-54.
- Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood* 2008; 111 (8): 3941-67.
- Orfao A, Schmitz G, Brando B, Ruiz-Arguelles A, Basso G, Braylan R, et al. Clinically useful information provided by the flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies: current status and future directions. *Clin Chem* 1999; 45 (10): 1708-17.
- Basso G, Buldini B, De Zen L, Orfao A. New methodologic approaches for immunophenotyping acute leukemias. *Haematologica* 2001; 86 (7): 675-92.
- Davis BH, Holden JT, Bene MC, Borowitz MJ, Braylan RC, Cornfield D, et al. 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the flow cytometric immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia: medical indications. *Cytometry B Clin Cytom* 2007; 72 (Suppl 1): S5-13.
- D'Ostilio A, Ginaldi L, Marini L, Di Gennaro A, De Martinis M, Quaglino D. Clinical uses of flow cytometry in hematological oncology. *Recenti Prog Med* 1997; 88 (4): 157-65.
- Kaleem Z. Flow cytometric analysis of lymphomas: current status and usefulness. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130 (12): 1850-8.
- Cady FM, Morice WG. Flow cytometric assessment of T-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Clin Lab Med* 2007; 27 (3): 513-32.
- Quijano S, López A, Manuel Sancho J, Panizo C, Deben G, Castilla C, et al. Identification of leptomeningeal disease in aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma: improved sensitivity of flow cytometry. *J Clin Oncol* 2009; 27 (9): 1462-9.
- Orfao A, Ciudad J, López-Berges MC, López A, Vidriales B, Caballero MD, et al. Acute lymphoblastic leukemia (ALL): detection of minimal residual disease (MRD) at flow cytometry. *Leuk Lymphoma* 1994; 13 (Suppl 1): 87-90.
- Bene MC, Bernier M, Castoldi G, Faure GC, Knapp W, Ludwig WD, et al. Impact of immunophenotyping on management of acute leukemias. *Haematologica* 1999; 84 (11): 1024-34.
- Ortuno Giner FJ, Orfao A. Applicability of flow cytometry in the diagnosis and immunophenotyping follow-up of acute leukemias. *Med Clin (Barc)* 2002; 118 (11): 423-36.
- Hernández-Campo PM, Almeida J, Acevedo MJ, Sánchez ML, Alberca I, Vidriales B, et al. Detailed immunophenotypic characterization of different major and minor subsets of peripheral blood cells in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Transfusion* 2008; 48 (7): 1403-14.
- Van de Loosdrecht AA, Alhan C, Bene MC, Della Porta MG, Drager AM, Feuillard J, et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from the first European LeukemiaNet working conference on flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2009; 94 (8): 1124-34.
- Orfao A, Escribano L, Villarrubia J, Velasco JL, Cervero C, Ciudad J, et al. Flow cytometric analysis of mast cells from normal and pathological human bone marrow samples: identification and enumeration. *Am J Pathol* 1996; 149 (5): 1493-9.
- Escribano L, Orfao A, Villarrubia J, Díaz-Agustín B, Cervero C, Ríos A, et al. Immunophenotypic characterization of human bone marrow mast cells. A flow cytometric study of normal and pathological bone marrow samples. *Anal Cell Pathol* 1998; 16 (3): 151-9.

28. Escribano L, Díaz-Agustín B, López A, Núñez López R, García-Montero A, Almeida J, et al. Immunophenotypic analysis of mast cells in mastocytosis: When and how to do it. Proposals of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA). *Cytometry B Clin Cytom* 2004; 58 (1): 1-8.
29. Escribano L, García Montero AC, Núñez R, Orfao A. Flow cytometric analysis of normal and neoplastic mast cells: role in diagnosis and follow-up of mast cell disease. *Immunol Allergy Clin North Am* 2006; 26 (3): 535-47.
30. Braylan RC. Impact of flow cytometry on the diagnosis and characterization of lymphomas, chronic lymphoproliferative disorders and plasma cell neoplasias. *Cytometry A* 2004; 58 (1): 57-61.
31. Bellido M, Rubiol E, Ubeda J, Estivill C, López O, Manteiga R, et al. Rapid and simple immunophenotypic characterization of lymphocytes using a new test. *Haematologica* 1998; 83 (8): 681-5.
32. Alexander HD, Markey GM, Morris TC. Diagnostic value of clonality of surface immunoglobulin light and heavy chains in malignant lymphoproliferative disorders. *Am J Hematol* 1994; 46 (3): 256.
33. Demurtas A, Accinelli G, Pacchioni D, Godio L, Novero D, Busolati G, et al. Utility of flow cytometry immunophenotyping in fine-needle aspirate cytologic diagnosis of non-hodgkin lymphoma: a series of 252 cases and review of the literature. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2010; 18: 311-22.
34. Perea G, Altes A, Bellido M, Aventin A, Bordes R, Ayats R, et al. Clinical utility of bone marrow flow cytometry in B-cell non-Hodgkin lymphomas (B-NHL). *Histopathology* 2004; 45 (3): 268-74.
35. Sánchez ML, Almeida J, Vidriales B, López-Berges MC, García-Marcos MA, Moro MJ, et al. Incidence of phenotypic aberrations in a series of 467 patients with B chronic lymphoproliferative disorders: basis for the design of specific four-color stainings to be used for minimal residual disease investigation. *Leukemia* 2002; 16 (8): 1460-9.
36. Matutes E. Immunophenotype of the chronic lymphoproliferative disorders. *Haematologica* 1998; 83: 193-8.
37. S. Böttcher AR, J. Flores, P. Lucio, R. de Tute, A. Mendonça, Q. Lecrevisse, T. Kalina, M. Kneba, J.J.M. van Dongen, A. Orfao. On behalf of the EuroFlow Consortium. Improved differential diagnosis between WHO-defined mature B-cell malignancies using integrated 8-color flow cytometry and novel software for multivariate analysis of immunophenotypic data. *Haematologica* 2009; 94 (suppl. 2) 273 abs. 0670.
38. Montillo M, Schinkoethe T, Elter T. Eradication of minimal residual disease with alemtuzumab in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) patients: the need for a standard method of detection and the potential impact of bone marrow clearance on disease outcome. *Cancer Invest* 2005; 23 (6): 488-96.
39. Vuillier F, Claisse JF, Vandenvelde C, Travade P, Magnac C, Chevret S, et al. Evaluation of residual disease in B-cell chronic lymphocytic leukemia patients in clinical and bone-marrow remission using CD5-CD19 markers and PCR study of gene rearrangements. *Leuk Lymphoma* 1992; 7 (3): 195-204.
40. Quijano S, López A, Rasillo A, Barrena S, Luz Sánchez M, Flores J, et al. Association between the proliferative rate of neoplastic B cells, their maturation stage, and underlying cytogenetic abnormalities in B-cell chronic lymphoproliferative disorders: analysis of a series of 432 patients. *Blood* 2008; 111 (10): 5130-41.
41. Orfao A, Almeida AJ, Sánchez ML, San Miguel JF. Chronic lymphocytic leukemia: molecular genetics, Biology Diagnosis and management. The Human Press. New Jersey: M.G. Faguet; 2004. p. 173-190.
42. Sausville JE, Salloum RG, Sorbara L, Kingma DW, Raffeld M, Kreitman RJ, et al. Minimal residual disease detection in hairy cell leukemia. Comparison of flow cytometric immunophenotyping with clonal analysis using consensus primer polymerase chain reaction for the heavy chain gene. *Am J Clin Pathol* 2003; 119 (2): 213-7.
43. Böttcher S, Ritgen M, Buske S, Gesk S, Klapper W, Hoster E, et al. Minimal residual disease detection in mantle cell lymphoma: methods and significance of four-color flow cytometry compared to consensus IGH-polymerase chain reaction at initial staging and for follow-up examinations. *Haematologica* 2008; 93 (4): 551-9.
44. Sánchez ML, Almeida J, González D, González M, García-Marcos MA, Balanzategui A, et al. Incidence and clinicobiologic characteristics of leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders with more than one B-cell clone. *Blood* 2003; 102 (8): 2994-3002.
45. Ortonne N, Buyukbabani N, Delfau-Larue MH, Bagot M, Wechsler J. Value of the CD8-CD3 ratio for the diagnosis of mycosis fungoides. *Mod Pathol* 2003; 16 (9): 857-62.
46. Matutes E, Catovsky D. Classification of mature T-cell leukemias. *Leukemia* 2003; 17 (8): 1682-3; author reply 3.
47. Matutes E. Chronic T-cell lymphoproliferative disorders. *Rev Clin Exp Hematol* 2002; 6 (4): 401-20; discussion 49-50.
48. Lima M, Almeida J, dos Anjos Teixeira M, Queiros ML, Santos AH, Fonseca S, et al. Utility of flow cytometry immunophenotyping and DNA ploidy studies for diagnosis and characterization of blood involvement in CD4+ Sezary's syndrome. *Haematologica* 2003; 88 (8): 874-87.
49. Jamal S, Picker LJ, Aquino DB, McKenna RW, Dawson DB, Kroft SH. Immunophenotypic analysis of peripheral T-cell neoplasms. A multiparameter flow cytometric approach. *Am J Clin Pathol* 2001; 116 (4): 512-26.
50. Rockman SP. Determination of clonality in patients who present with diagnostic dilemmas: a laboratory experience and review of the literature. *Leukemia* 1997; 11 (6): 852-62.
51. Hu H, Queiro MR, Tilanus MG, de Weger RA, Schuurman HJ. Expression of T-cell receptor alpha and beta variable genes in normal and malignant human T cells. *Br J Haematol*. 1993 May; 84 (1): 39-48.
52. Langerak AW, Van Den Beemd R, Wolvers-Tettero IL, Boor PP, Van Lochem EG, Hooijkaas H, et al. Molecular and flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire for clonality assessment in mature TCRalpha-beta T-cell proliferations. *Blood* 2001; 98 (1): 165-73.
53. Lima M, Almeida J, Santos AH, Dos Anjos Teixeira M, Alguero MC, Queiros ML, et al. Immunophenotypic analysis of the TCR-Vbeta repertoire in 98 persistent expansions of CD3(+)/TCR-alpha-beta(+) large granular lymphocytes: utility in assessing clonality and insights into the pathogenesis of the disease. *Am J Pathol* 2001; 159 (5): 1861-8.
54. Sandberg Y, Almeida J, González M, Lima M, Barcena P, Szczepanski T, et al. TCRgamma-delta+ large granular lymphocyte leukemias reflect the spectrum of normal antigen-selected TCRgamma-delta+ T-cells. *Leukemia* 2006; 20 (3): 505-13.
55. Van den Beemd R, Boor PP, Van Lochem EG, Hop WC, Langerak AW, Wolvers-Tettero IL, et al. Flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire in healthy controls. *Cytometry* 2000; 40 (4): 336-45.
56. Geursen A, Skinner MA, Townsend LA, Perko LK, Farmiloe SJ, Peake JS, et al. Population study of T cell receptor V beta gene usage in peripheral blood lymphocytes: differences in ethnic groups. *Clin Exp Immunol* 1993; 94 (1): 201-7.
57. McLean-Tooke A, Barge D, Spickett GP, Gennery AR. T cell receptor Vbeta repertoire of T lymphocytes and T regulatory cells by flow cytometric analysis in healthy children. *Clin Exp Immunol* 2008; 151 (1): 190-8.
58. Vallejo AN. Age-dependent alterations of the T cell repertoire and functional diversity of T cells of the aged. *Immunol Res* 2006; 36 (1-3): 221-8.

59. Posnett DN, Sinha R, Kabak S, Russo C. Clonal populations of T cells in normal elderly humans: the T cell equivalent to "benign monoclonal gammopathy". *J Exp Med* 1994; 179 (2): 609-18.
60. Kovaiou RD, Weiskirchner I, Keller M, Pfister G, Cioca DP, Grubeck-Loebenstien B. Age-related differences in phenotype and function of CD4+ T cells are due to a phenotypic shift from naive to memory effector CD4+ T cells. *Int Immunol* 2005; 17 (10): 1359-66.
61. Khan N, Shariff N, Cobbold M, Bruton R, Ainsworth JA, Sinclair AJ, et al. Cytomegalovirus seropositivity drives the CD8 T cell repertoire toward greater clonality in healthy elderly individuals. *J Immunol* 2002; 169 (4): 1984-92.
62. Shimomura T, Fujimura K, Takafuta T, Fujii T, Katsutani S, Noda M, et al. Oligoclonal accumulation of T cells in peripheral blood from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 1996; 95 (4): 732-7.
63. Direskeleni H, Eksioğlu-Demiralp E, Kibaroglu A, Yavuz S, Ergun T, Akoglu T. Oligoclonal T cell expansions in patients with Behcet's disease. *Clin Exp Immunol* 1999; 117 (1): 166-70.
64. Okajima M, Wada T, Nishida M, Yokoyama T, Nakayama Y, Hashida Y, et al. Analysis of T cell receptor Vbeta diversity in peripheral CD4 and CD8 T lymphocytes in patients with autoimmune thyroid diseases. *Clin Exp Immunol* 2009; 155 (2): 166-72.
65. Bristeau-Leprince A, Mateo V, Lim A, Magerus-Chatinet A, Solary E, Fischer A, et al. Human TCR alpha/beta+ CD4-CD8- double-negative T cells in patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome express restricted Vbeta TCR diversity and are clonally related to CD8+ T cells. *J Immunol* 2008; 181 (1): 440-8.
66. Lima M, Almeida J, Montero AG, Teixeira Mdos A, Queiros ML, Santos AH, et al. Clinicobiological, immunophenotypic, and molecular characteristics of monoclonal CD56-/dim chronic natural killer cell large granular lymphocytosis. *Am J Pathol* 2004; 165 (4): 1117-27.
67. Boudewijns M, Van Dongen JJ, Langerak AW. The human androgen receptor X-chromosome inactivation assay for clonality diagnostics of natural killer cell proliferations. *J Mol Diagn* 2007; 9 (3): 337-44.
68. Kim HS, Kim KH, Chang MH, Ji SH, Lim do H, Kim K, et al. Whole blood Epstein-Barr virus DNA load as a diagnostic and prognostic surrogate: extranodal natural killer/T-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2009; 50 (5): 757-63.
69. Zambello R, Falco M, Della Chiesa M, Trentin L, Carollo D, Castriconi R, et al. Expression and function of KIR and natural cytotoxicity receptors in NK-type lymphoproliferative diseases of granular lymphocytes. *Blood* 2003; 102 (5): 1797-805.
70. Gattazzo C, Miorin M, Scquizzato E, Teramo A, Cabrelle A, Balsamo M, et al. Lack of expression of inhibitory KIR3DL1 receptor in patients with NK-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Haematologica* [en prensa: DOI 103324/Haematol.2010.0233].
71. Yonescu R, Hristov AC, Ahmad A, Overby A, Thomas GH, Griffin CA. Cytogenetic characterization of natural killer cell leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2008; 183 (2): 125-30.
72. Fischer L, Hummel M, Burmeister T, Schwartz S, Thiel E. Skewed expression of natural-killer (NK)-associated antigens on lymphoproliferations of large granular lymphocytes (LGL). *Hematol Oncol* 2006; 24 (2): 78-85.
73. Epling-Burnette PK, Painter JS, Chaurasia P, Bai F, Wei S, Djeu JY, et al. Dysregulated NK receptor expression in patients with lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Blood* 2004; 103 (9): 3431-9.
74. Izzo P, Spagnuolo A, Manicone A. Assessment of erythrocyte deformability with the laser-assisted optical rotational cell analyzer (LORCA). *Boll Soc Ital Biol Sper* 1999; 75 (1-2): 9-15.
75. Hardeman MR, Dobbe JG, Ince C. The Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer (LORCA) as red blood cell aggregometer. *Clin Hemorheol Microcirc* 2001; 25 (1): 1-11.
76. Grimaldi E, Scopacasa F. Evaluation of the Abbott CELL-DYN 4000 hematology analyzer. *Am J Clin Pathol* 2000; 113 (4): 497-505.
77. Briggs C. Quality counts: new parameters in blood cell counting. *Int J Lab Hematol* 2009; 31 (3): 277-97.
78. Buttarello M, Bulian P, Farina G, Temporin V, Toffolo L, Trabucio E, et al. Flow cytometric reticulocyte counting. Parallel evaluation of five fully automated analyzers: an NCCLS-ICSH approach. *Am J Clin Pathol* 2001; 115 (1): 100-11.
79. Hirose A, Yamane T, Shibata H, Kamitani T, Hino M. Automated analyzer evaluation of reticulocytes in bone marrow and peripheral blood of hematologic disorders. *Acta Haematol* 2005; 114 (3): 141-5.
80. Van Hove L, Goossens W, Van Duppen V, Verwilghen RL. Reticulocyte count using thiazole orange. A flow cytometry method. *Clin Lab Haematol* 1990; 12 (3): 287-99.
81. Arroyo JL, García-Marcos MA, López A, Menéndez P, Tabernero MD, Sánchez-Abarca LI, et al. Evaluation of a CD61 MoAb method for enumeration of platelets in thrombocytopenic patients and its impact on the transfusion decision-making process. *Transfusion* 2001; 41 (10): 1212-6.
82. Grimaldi E, Del Vecchio L, Scopacasa F, Lo Pardo C, Capone F, Pariante S, et al. Evaluation of the platelet counting by Abbott CELL-DYN SAPPHERE haematology analyser compared with flow cytometry. *Int J Lab Hematol* 2009; 31 (2): 151-60.
83. Gale HB, Henry K. Measuring percent lymphocytes by flow cytometry to calculate absolute lymphocyte subset counts for HIV+ specimens. *Cytometry* 1992; 13 (2): 175-81.
84. Hagihara K, Yamane T, Aoyama Y, Nakamae H, Hino M. Evaluation of an automated hematology analyzer (CELL-DYN 4000) for counting CD4+ T helper cells at low concentrations. *Ann Clin Lab Sci* 2005; 35 (1): 31-6.
85. Davis BH, Bigelow NC. Comparison of neutrophil CD64 expression, manual myeloid immaturity counts, and automated hematology analyzer flags as indicators of infection or sepsis. *Lab Hematol* 2005; 11 (2): 137-47.
86. Weerkamp F, Dekking E, Ng YY, Van der Velden VH, Wai H, Bottcher S, et al. Flow cytometric immunobead assay for the detection of BCR-ABL fusion proteins in leukemia patients. *Leukemia* 2009; 23 (6): 1106-17.
87. Gina Zini PP, Stefano Valentini, Antonella Di Mario, Giuseppe d'Onofrio. Possibility of detection of BCR-ABL fusion protein by using a routine blood hematology analyzer. *International Journal of Laboratory Hematology* 2010; 32 (Suppl 1): 139.
88. Vacca G. P, Abbott Hematology. Progress update on laser rastering in Hematology. XXIII International Symposium on Technological Innovations in Laboratory Hematology 10-12 May 2010.

Plaquetas y endotelio

COORDINADORES: J. VALLÉS. *Valencia*
G. ESCOLAR. *Barcelona*

Resumen del simposio

Las plaquetas representan un papel determinante en la formación del tapón hemostático, cuya finalidad es detener la hemorragia tras la rotura de un vaso. El contacto de las plaquetas con la superficie del vaso dañado o la interacción de agonistas fisiológicos con sus receptores específicos inician una compleja serie de transmisión de señales y mecanismos bioquímicos que tienen como consecuencia final la coordinación de las distintas respuestas funcionales de la célula. Alteraciones congénitas o adquiridas de la función plaquetaria pueden conducir a distintos grados de diátesis hemorrágica.

Las plaquetas también son responsables de la formación del trombo oclusivo en pacientes con enfermedad aterotrombótica, como son el infarto de miocardio agudo, enfermedad isquémica cerebral y enfermedad periférica arterial. Por este motivo, se ha impulsado en los últimos años un gran desarrollo de nuevos fármacos antiplaquetarios, principalmente en el entorno del tratamiento de la cardiopatía coronaria. Sin embargo, pese a que los fármacos en uso muestran un beneficio clínico, el riesgo de recurrencia sigue siendo elevado.

Un tema de debate actual es si los fármacos antiplaquetarios administrados para tratamiento y prevención secundaria de accidentes isquémicos alcanzan una inhibición óptima y permanente sobre las plaquetas en todos los pacientes o si, por el contrario, existe una respuesta individual que, de ser conocida, ayudaría a reducir el riesgo de aparición de nuevos accidentes vasculares.

Una patología de gran interés clínico donde las plaquetas se ven involucradas, no por anomalías en la función, sino por una disminución en su número, es la púrpura trombocitopénica inmune (PTI). En los últimos años, el conocimiento de nuevos mecanismos responsables de la PTI han conducido a nuevas estrategias terapéuticas que suponen un avance en el tratamiento de esta patología.

A lo largo de este simposio vamos a tratar de abordar algunos aspectos actuales sobre estos temas.

En primer lugar, el Dr. A.K. Rao, de la Universidad de Temple, Filadelfia, revisará las alteraciones congénitas plaquetarias, centrándose en las anomalías genéticas de los mecanismos de señalización intraplaquetarias. El conocimiento de estas anomalías de señalización ayudará al diagnóstico de estos pacientes, que normalmente se engloban en un grupo heterogéneo, caracterizado por una disminución de la agregación y secreción de gránulos tras la activación de sus plaquetas. También comentará los estudios recientes sobre los defectos de función plaquetaria asociados a mutaciones del gen RUNX1 (CFABA2 o AML1), que regulan la expresión de proteínas importantes en las plaquetas y la fosforilación de las mismas.

A continuación, el Dr. M. Ruano, del Hospital Universitario La Fe de Valencia, centrará su charla en una puesta al día de los nuevos tratamientos antiplaquetarios, aportando una visión crítica de dos nuevos inhibidores del receptor P2Y₁₂, que en breve se comercializarán en nuestro país (prasugrel y ticagrelor), subrayando las dos vertientes de estos tratamientos: por una parte, la disminución de accidentes vasculares, pero también el incremento de riesgo de sangrado que les acompaña, con las consecuencias clínicas adversas que de ello se deriva.

En la tercera intervención, la Dra. M.T. Santos, del Centro de Investigación del Hospital Universitario La Fe de Valencia, comentará cuál es el momento actual de la monitorización del tratamiento antiplaquetario con aspirina o clopidogrel, tema que está creando mucha inquietud por su posible implicación clínica y también social, a causa del gran número de pacientes que reciben estos fármacos antiplaquetarios. En esta presentación aportará información sobre los métodos más utilizados para valorar la respuesta de las plaquetas a estos fármacos, su relación con la clínica y los posibles mecanismos implicados en el menor efecto de la terapéutica en algunos pacientes.

Por último, este simposio cuenta con la participación del Dr. R. Stasi, del Hospital St. George's, en Londres, que efectuará una revisión sobre los avances terapéuticos en el tratamiento de la púrpura trombocitopénica inmune (PTI). Tras una visión global razonada de la administración de los agentes trombotopoyéticos en la PTI, centrará su charla en las características y modos de acción de los factores trombotopoyéticos de segunda generación como romiplastín y eltrombopag. También revisará las ventajas y potenciales riesgos del uso de estos agentes.

INHERITED ABNORMALITIES IN PLATELETS SIGNALING MECHANISMS. INSIGHTS INTO PLATELET PHYSIOLOGY

A.K. RAO, G. JALAGADUGULA, G. MAO, K. ANEJA, G. KAUR

Sol Sherry Thrombosis Research Center and Department of Medicine. Temple University School of Medicine. Philadelphia, USA

Platelet function in hemostasis

This review will focus on the disorders related to abnormalities in platelet signaling mechanisms. Following injury to the blood vessel, platelets adhere to exposed subendothelium by a process (adhesion), which involves among other events the interaction of a plasma protein, von Willebrand factor (vWF), and a specific glycoprotein complex on the platelet surface, glycoprotein Ib-IX-V (GPIb-IX) (Figure 1). This interaction is particularly important for platelet adhesion under conditions of high shear stress. Adhesion is followed by recruitment of additional platelets which form clumps, a process called aggregation (cohesion). This involves binding of fibrinogen to specific platelet surface receptors –a complex comprised of glycoproteins IIb-IIIa (GPIIb-IIIa, integrin α IIb β 3). GPIIb-IIIa is platelet-specific and has the ability to bind vWF as well. While resting platelets do not bind fibrinogen, platelet activation induces a conformational change in the GPIIb-IIIa complex which leads to fibrinogen binding. Activated platelets release contents of their granules (secretion) including ADP and serotonin from the dense granules, which causes the recruitment of additional platelets. In addition, platelets play a major role in coagulation mechanisms; several key enzymatic reactions occur on the platelet membrane lipoprotein surface. During platelet activation the negatively charged phospholipids, especially phosphatidylserine, become exposed on the platelet surface, an essential step for accelerating specific coagulation reactions by platelet procoagulant activity.

A number of physiological agonists interact with specific receptors on the platelet surface to induce responses, including a change in platelet shape from discoid to spherical (shape change), aggregation, secretion, and thromboxane A₂ (TxA₂) production. Binding of agonists to platelet receptors initiates the production or release of several intracellular messenger molecules, including products of hydrolysis of phosphoinositide (PI) by phospholipase C (diacylglycerol, DAG; and inositol 1,4,5-triphosphate, InsP₃), TxA₂ and cyclic nucleotides (cAMP) (Figure 1). These

induce or modulate the various platelet responses of Ca²⁺ mobilization, protein phosphorylation, aggregation, secretion, and thromboxane production. The interaction between the platelet surface receptors and the key intracellular enzymes (e.g. phospholipases A₂ and C, adenylyl cyclase) is mediated by a group of proteins which bind and are modulated by GTP (G-proteins). Platelet activation results in a rise in cytoplasmic ionized calcium concentration; InsP₃ functions as a messenger to mobilize Ca²⁺ from intracellular stores. Diacylglycerol activates protein kinase C (PKC) and this results in the phosphorylation several proteins. PKC activation is considered to play a major role in platelet secretion and in the activation of GPIIb-IIIa. Numerous other mechanisms, such as activation of tyrosine kinases and phosphatases, are also triggered by platelet activation. Either inherited or acquired defects in the above platelet mechanisms may lead to impaired platelet role in hemostasis.

Inherited disorders of platelet function: an overview

Disorders of platelet function are characterized by highly variable mucocutaneous bleeding manifestations and excessive haemorrhage following surgical procedures or trauma. Table 1 provides a classification of inherited disorders associated with impaired platelet function, based on the platelet function or responses that are abnormal (Figure 1). Of note, not all of them are due to a defect in the platelets *per se*. Some, such as the von Willebrand disease, vWD and afibrinogenemia, result from deficiencies of plasma proteins essential for normal platelet function. Moreover, in many patients with inherited abnormalities in platelet aggregation responses, the underlying molecular mechanisms remain unknown. In patients with defects in platelet-vessel wall interactions (adhesion disorders), adhesion of platelets to subendothelium is abnormal. The two disorders in this group are von Willebrand disease (vWD), due to a deficiency or abnormality in plasma vWF, and the Bernard-Soulier syndrome (BSS), in which platelets are deficient in GPIb (and GPV and GPIX); in both disorders, platelet-vWF interaction is compromised. Binding of fibrinogen to the GPIIb-IIIa complex is a prerequisite for platelet aggregation. Disorders characterized by abnormal platelet-platelet interactions (aggregation disorders) arise because of a severe deficiency of plasma fibrinogen (congenital afibrinogenemia) or because of a quantitative or qualitative abnormality of the platelet membrane GPIIb-IIIa complex which binds fibrinogen (Glanzmann thrombasthenia). Patients with defects in platelet secretion and signal transduction

Table 1. Inherited disorders of platelet function

1. Defects in platelet-vessel wall interaction (disorders of adhesion)
a. von Willebrand disease (deficiency or defect in plasma vWF)
b. Bernard-Soulier syndrome (deficiency or defect in GPIb)
2. Defects in platelet-platelet interaction (disorders of aggregation)
a. Congenital Afibrinogenemia (deficiency of plasma fibrinogen)
b. Glanzmann's thrombasthenia (deficiency or defect in GPIIb-IIIa)
3. Disorders of platelet secretion and abnormalities of granules
i. Storage pool deficiency (δ , α , $\alpha\delta$)'
ii. Quebec platelet disorder
4. Disorders of platelet secretion and signal transduction
i. Defects in platelet-agonist interaction (receptor defects) (ADP, thromboxane A_2 , collagen, epinephrine)
ii. Defects in G-proteins ($G_{\alpha q}$, $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i}$ abnormalities)
iii. Defects in phosphatidylinositol metabolism and protein phosphorylation Phospholipase C- $\beta 2$ deficiency PKC- θ deficiency
v. Abnormalities in arachidonic acid pathways and thromboxane A_2 synthesis · Phospholipase A_2 deficiency · Cyclooxygenase deficiency · Thromboxane synthase deficiency
5. Disorders of platelet coagulant-protein interaction (Scott Syndrome)
6. Defects related to cytoskeletal/structural proteins Wiskott-Aldrich syndrome protein $\beta 1$ tubulin
7. Abnormalities of transcription factors leading to functional defects <i>RUNX1</i> (Familial platelet dysfunction with predisposition to acute myelogenous leukemia) <i>GATA-1</i> <i>FLI1</i> (Paris-Trousseau/Jacobsen syndrome)

Defects in GTP-binding proteins

GTP-binding proteins are a heterotrimeric class of proteins (consisting of α , β and γ subunits) that link surface receptors and intracellular enzymes. Abnormalities involving $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha i 1}$ and $G_{\alpha s}$ subclass proteins have been described in human platelets.

$G_{\alpha q}$ deficiency

$G_{\alpha q}$ plays a major role in mediating platelet responses to activation. We have described a patient with $G_{\alpha q}$ deficiency in association with a mild bleeding disorder, abnormal platelet aggregation and secretion in response to a number of agonists, and diminished GTPase activity (a reflection of G_{α} -subunit dysfunction) in response to platelet activation². The binding of ^{35}S -GT γ S to a preparation of the patient's platelet membranes was diminished, and this was associated with a selective de-

crease in platelet membrane $G_{\alpha q}$, with normal levels of $G_{\alpha i 2}$, $G_{\alpha i 3}$ and $G_{\alpha z}$. The downstream events from $G_{\alpha q}$, including Ca^{2+} mobilization, release of arachidonic acid from phospholipids upon platelet activation, and activation of $\alpha IIb\beta 3$ receptors were impaired. The $G_{\alpha q}$ coding sequence in this patient was normal, but $G_{\alpha q}$ mRNA levels were decreased in platelets, suggesting a potential defect in transcriptional regulation of the gene. This abnormality appeared to be selective for platelets since the patient's neutrophils had normal $G_{\alpha q}$ protein and normal function³.

$G_{\alpha i 1}$ deficiency

Platelet $G_{\alpha i 1}$ deficiency has been reported in association with a bleeding disorder and abnormalities in $\alpha IIb\beta 3$ activation, platelet aggregation, and dense granule secretion upon activation⁴. The patient's platelets did not demonstrate inhibition of forskolin-stimulated cAMP levels on exposure to ADP, thrombin, or epinephrine. In contrast, $G_{\alpha q}$ -mediated Ca^{2+} mobilization and pleckstrin phosphorylation were normal in response to ADP, thrombin, or collagen. Platelet $G_{\alpha i 1}$ protein was decreased by 75%, whereas $G_{\alpha i 2}$, $G_{\alpha i 3}$, $G_{\alpha z}$ and $G_{\alpha q}$ were normal.

$G_{\alpha s}$ hyperfunction and genetic variation in extra large $G_{\alpha s}$

$G_{\alpha s}$ activation increases platelet cAMP levels and inhibits platelet aggregation and secretion. Two unrelated families have been described with inducible hyperactivity of $G_{\alpha s}$ ⁵. These patients had a bleeding diathesis, prolonged bleeding times, variable mental retardation, and mild skeletal malformations. Platelet aggregation responses to physiologic agonists were normal, but the platelets showed increased sensitivity to inhibition by agents (PGE1, PGI2) that elevate cAMP levels. The platelet $G_{\alpha s}$ protein level was increased in these patients. Platelet $G_{\alpha s}$ deficiency has also been described in a patient with pseudohypoparathyroidism Ib (PHPIb) in association with disturbed imprinting and altered methylation in the *GNAS1* gene cluster.

PLC- $\beta 2$ deficiency and defects in phospholipase C activation, calcium mobilization, and protein phosphorylation

Several investigators have described patients with relatively mild bleeding diatheses and impaired platelet aggregation and dense granule secretion, despite normal granule stores and the ability to synthesize TXA₂¹. An early event upon stimulating several platelet G-protein coupled receptors is activation of PLC-

$\beta 2$ leading to formation of the intracellular mediators IP3 and diacylglycerol; the former is responsible for Ca^{2+} mobilization and the latter for PKC-induced protein phosphorylation. Defects in one or more of these responses have been documented in several patients. For example, in one study of 8 patients with abnormal platelet aggregation and secretion in response to several different receptor-mediated agonists, Ca^{2+} mobilization and/or pleckstrin phosphorylation was abnormal in seven patients, suggesting that the impaired secretion and aggregation resulted from upstream abnormalities in early signaling events⁶. In fact, specific defects at the level of PLC- $\beta 2$ ^{7,8}, $G\alpha q$ ², and PKC- θ ⁹ were identified in these eight patients.

In two related patients we have described platelet PLC- $\beta 2$ deficiency; platelet aggregation and secretion were impaired in association with impaired IP3 and diacylglycerol formation, calcium mobilization, and pleckstrin phosphorylation following activation with ADP, collagen, PAF, or thrombin, indicating a defect in PLC activation⁸. Human platelets contain at least seven PLC isozymes and a selective decrease was observed in only the PLC- $\beta 2$ isozyme⁷. The decreased platelet PLC- $\beta 2$ protein levels were associated with a normal gene coding sequence but with diminished PLC- $\beta 2$ mRNA levels in platelets, but not neutrophils, suggesting a haematopoietic lineage-specific defect in PLC- $\beta 2$ gene regulation¹⁰. Additional studies in this patient documented a 13-bp deletion in the 5' promoter region of PLC- $\beta 2$ gene providing evidence for defective transcriptional regulation; this region has a binding site for the transcription factor NF- κB ¹⁰. These studies support the importance of PLC- $\beta 2$ in hemostasis.

Defects in protein phosphorylation: PKC- θ deficiency

PKC isozymes, a family of serine and threonine specific protein kinases, phosphorylate a wide array of proteins involved in signal transduction. PKC enzymes regulate several aspects of platelet function, including activation of $\alpha IIb\beta 3$ receptors, platelet aggregation and secretion, and platelet production. Deficiency of a human platelet PKC isozyme (PKC θ) has been described in a patient with lifelong mucocutaneous bleeding manifestations, mild thrombocytopenia, and markedly abnormal platelet aggregation (including primary wave) and dense granule secretion in response to multiple agonists^{9,11}. Agonist-induced phosphorylation of pleckstrin and myosin light chain were diminished in the patient's platelets. This subject had a heterozygous mutation in a transcription factor RUNX1 (also called core-binding factor A₂, CBFA2), which has been linked to a familial platelet function defect, thrombocytopenia, and predisposition to acute leukemia^{9,11}

(see below). Expression profiling of platelets from this patient revealed down regulation of several genes, including myosin light chain (*MYL9*) and 12-lipoxygenase (*ALOX12*)¹², indicating that these genes may be transcriptional targets of *RUNX1*.

Defects in arachidonic acid metabolism and thromboxane production

A major platelet response to activation is liberation of arachidonic acid from phospholipids and its subsequent oxygenation to thromboxane A₂. Patients have been described with impaired thromboxane synthesis due to congenital deficiencies of cyclooxygenase, thromboxane synthase and phospholipase A₂^{1,13}.

Transcription factor mutations and associated platelet dysfunction

Transcription factors regulate the expression of proteins in platelets and megakaryocytes, and play an important role in megakaryopoiesis and platelet production. Several studies, including ours, have demonstrated impaired platelet function in patients with mutations in specific transcription factors. In general, these patients have an associated congenital thrombocytopenia.

Transcription factor RUNX1 and familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia

An association between inherited platelet abnormalities and a predisposition to acute myeloid leukemia has been reported in several different families in which the thrombocytopenia and abnormal platelet aggregation responses antedated the leukemia and were linked to inherited mutations in the gene *RUNX1* (*AML1*, *CBFA2*)^{9,14,15}. The platelet defect and the predisposition to leukemia with *RUNX1* mutations is inherited as an autosomal dominant trait and individuals generally have mild thrombocytopenia and a bleeding disorder. Most *RUNX1* mutations have affected the conserved Runt domain. Some of these patients have had associated alpha or dense granule SPD. We have described a patient⁹ with a splice site mutation in *RUNX1* leading to a frameshift with premature termination in the Runt domain; this patient was found to have abnormal $\alpha IIb\beta 3$ activation, decreased platelet myosin light chain and pleckstrin phosphorylation, and a selective decrease in platelet protein kinase C- θ (PKC- θ). This patient also had diminished platelet PF4, albumin and IgG, suggesting an α granule abnormality, but had normal levels of the α granule proteins fibrin-

ogen and β -thromboglobulin⁹. Expression (transcript) profiling of platelets from this patient revealed down-regulation of several genes, including *MYL9* (myosin light chain), *ALOX12* (12-lipoxygenase), and *PF4* (platelet factor 4)¹², suggesting that these genes may be regulated by *RUNX1*. Studies from our group show that *ALOX12*¹⁶, *PKC- θ* ¹⁷, *MYL9*¹⁸ and *PF4*¹⁹ are, indeed, direct transcriptional targets of *RUNX1*. Impaired regulation by *RUNX1* of these and other genes leads to the alterations in platelet function and number. We propose also that the downregulation of *MYL9* contributes in a major way to the thrombocytopenia and the platelet dysfunction. Patients with *RUNX1* haplo-deficiency have been shown to have impaired megakaryopoiesis¹⁴ and decreased platelet thrombopoietin receptors (Mpl)²⁰.

GATA-1 mutations and platelet dysfunction

GATA-1 is a major transcription factor regulator of both megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *GATA-1* mutations have been associated with an X-linked syndrome consisting of dyserythropoiesis, anemia, thrombocytopenia, and large platelets; selectively impaired responses to collagen and ristocetin related to abnormalities in GPIIb β ; diminished levels of platelet G α S protein and mRNA; and a form of gray platelet syndrome (R216N).

FLI-1 mutations and dimorphic dysmorphic platelets with giant α -granules and thrombocytopenia (Paris-Trousseau/Jacobsen syndrome)

The Paris-Trousseau syndrome, a variant of Jacobsen's syndrome, is a rare autosomal dominant disorder characterized by mental retardation, congenital thrombocytopenia, giant α granules in a subpopulation of circulating platelets and bone marrow dysmegakaryopoiesis in association with deletion of the distal part of either the maternally or paternally derived chromosome 11 (11q23.3-24). Among the genes deleted is the transcription factor *FLI1*, which plays an important role in megakaryocyte development.

Conclusions

In the last two decades there has been a tremendous increase in our understanding of the mechanisms that operate in platelets. Mouse knockout models have been documented showing the role of numerous proteins that regulate platelet function. Corresponding human defects have not been described for the vast majority, although it is likely that they exist for many.

More important, the mechanisms leading to the platelet dysfunction are completely unknown in the vast majority of patients encountered in clinical practice with a bleeding disorder and impaired aggregation and secretion; such patients are not rare. A concerted effort is needed to delineate the molecular basis in these patients.

Acknowledgement

This work was supported by grant RO1HL85422, T32HL007777.

References

1. Rao AK. Hereditary disorders of platelet secretion and signal transduction. In: Colman RW, Marder VJ, Clowes AW, George JN, Goldhaber SZ, eds. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 961-74.
2. Gabbeta J, Yang X, Kowalska MA, Sun L, Dhanasekaran N, Rao AK. Platelet signal transduction defect with Galpha subunit dysfunction and diminished Galphaq in a patient with abnormal platelet responses. Proc Natl Acad Sci USA. 1997; 94: 8750-5.
3. Gabbeta J, Vaidyula VR, Dhanasekaran DN, Rao AK. Human platelet G α q deficiency is associated with decreased G α q gene expression in platelets but not neutrophils. Thromb Haemost 2002; 87: 129-33.
4. Patel YM, Patel K, Rahman S, Smith MP, Spooner G, Sumathipala R, et al. Evidence for a role for Galphai1 in mediating weak agonist-induced platelet aggregation in human platelets: reduced Galphai1 expression and defective Gi signaling in the platelets of a patient with a chronic bleeding disorder. Blood 2003; 101: 4828-35.
5. Freson K, Hoylaerts MF, Jaeken J, Eyssen M, Arnout J, Vermynen J, et al. Genetic variation of the extra-large stimulatory G protein alpha-subunit leads to Gs hyperfunction in platelets and is a risk factor for bleeding. Thromb Haemost 2001; 86: 733-8.
6. Yang X, Sun L, Gabbeta J, Rao AK. Platelet activation with combination of ionophore A23187 and a direct protein kinase C activator induces normal secretion in patients with impaired receptor mediated secretion and abnormal signal transduction. Thromb Res 1997; 88: 317-28.
7. Lee SB, Rao AK, Lee K-H, Yang X, Bae YS, Rhee SG. Decreased expression of phospholipase C- β 2 isozyme in human platelets with impaired function. Blood 1996; 88: 1684-91.
8. Yang X, Sun L, Ghosh S, Rao AK. Human platelet signaling defect characterized by impaired production of 1,4,5 inositoltrisphosphate and phosphatic acid, and diminished pleckstrin phosphorylation. Evidence for defective phospholipase C activation. Blood 1996; 88: 1676-83.
9. Sun L, Mao G, Rao AK. Association of CBFA2 mutation with decreased platelet PKC- θ and impaired receptor-mediated activation of GPIIb-IIIa and pleckstrin phosphorylation: proteins regulated by CBFA2 play a role in GPIIb-IIIa activation. Blood 2004; 103: 948-54.
10. Mao G, Kunapuli SP, Rao AK. Regulation of platelet PLC- β 2 expression by NF- κ B: Studies in human platelet PLC- β 2 deficiency. Blood 2006; 210a.
11. Gabbeta J, Yang X, Sun L, McLane MA, Niewiarowski S, Rao AK. Abnormal inside-out signal transduction-dependent ac-

- tivation of glycoprotein IIb-IIIa in a patient with impaired pleckstrin phosphorylation. *Blood* 1996; 87: 1368-76.
12. Sun L, Gorospe JR, Hoffman EP, Rao AK. Decreased platelet expression of myosin regulatory light chain polypeptide (MYL9) and other genes with platelet dysfunction and CBFA2/RUNX1 mutation: insights from platelet expression profiling. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 146-54.
 13. Adler DH, Cogan JD, Phillips JA, Schnetz-Boutaud N, Milne GL, Iverson T, et al. Inherited human cPLA(2alpha) deficiency is associated with impaired eicosanoid biosynthesis, small intestinal ulceration, and platelet dysfunction. *J Clin Invest* 2008.
 14. Song WJ, Sullivan MG, Legare RD, Hutchings S, Tan X, Kufirin D, et al. Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet* 1999; 23: 166-75.
 15. Michaud J, Wu F, Osato M, Cottles GM, Yanagida M, Asou N, et al. In vitro analyses of known and novel RUNX1/AML1 mutations in dominant familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia: implications for mechanisms of pathogenesis. *Blood* 2002; 99: 1364-72.
 16. Kaur G, Jalagadugula G, Mao G, Rao AK. RUNX1/core binding factor A2 regulates platelet 12-Lipoxygenase gene (ALOX12): studies in human RUNX1 haplodeficiency. *Blood* 2010; 115: 3128-35.
 17. Jalagadugula GS, Kaur G, Mao G, Dhanasekaran DN, Rao AK. Platelet/megakaryocyte PKC-θ is a transcriptional target of RUNX1/CBFA2: studies in human RUNX1 haplodeficiency. *Blood* 2008; 112: 649.
 18. Jalagadugula GS, Kaur G, Mao G, Dhanasekaran DN, Rao AK. RUNX1/CBFA2 regulates myosin light chain9 (MYL9) in megakaryocytic cells: decreased MYL9 expression in human RUNX1 haplodeficiency. *Blood* 2008; 112: 645.
 19. Aneja K, Jalagadugula G, Mao G, Rao AK. Mechanism of platelet factor (PF4) deficiency with RUNX1 mutations: RUNX1 is a transcriptional regulator of PF4. *Blood* 2009; 114: 98-9.
 20. Heller PG, Glembotsky AC, Gandhi MJ, Cummings CL, Pirolo CJ, Marta RF, Kombliht LI, Drachman JG, Molinas FC. Low Mpl receptor expression in a pedigree with familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia and a novel AML1 mutation. *Blood* 2005; 105: 4664-70.

NUEVOS FÁRMACOS ANTIPLAQUETARIOS

M.I. RUANO MARCO

Servicio de Medicina Intensiva.

Hopital Universitario La Fe. Valencia

Introducción

La relación entre plaquetas y aterotrombosis, establecida de antiguo, ha ido creciendo en interés y trascendencia terapéutica conforme se ha ido estableciendo un más estrecho vínculo entre trombosis-activación plaquetar y diversas situaciones clínicas, particularmente el síndrome coronario agudo (SCA). El papel del trombo como responsable de la inmensa mayoría de los infartos de miocardio (IM) no se estableció hasta 1980 y no es hasta 1986 cuando también otras manifestaciones de SCA, como la angina inestable, se vincularon

con evidencia de activación plaquetar. La aspirina, primero, y luego el clopidogrel demostraron su eficacia en estos procesos. Pese a dicha eficacia, la hipercoagulabilidad propia de los procesos coronarios agudos, la variabilidad individual en la respuesta a los antiagregantes disponibles y el mayor riesgo trombótico impuesto por el intervencionismo endocoronario han estimulado el desarrollo de fármacos más eficaces que soslayan las limitaciones de los actualmente disponibles (Figura 1).

Las plaquetas desempeñan un papel central en estas situaciones. En respuesta a la ruptura espontánea (placa activa) o inducida yatrogénicamente en las intervenciones coronarias percutáneas (ICP), se exponen a la sangre el tejido conectivo, proteínas de la matriz subendotelial y el material de la placa aterosclerosa. Las plaquetas se adhieren al colágeno y al factor Von Willebrand del subendotelio vía los receptores glicoproteínas VI, Ia/IIa y Ib, IX. En respuesta a la adhesión, se producen mediadores locales como el tromboxano y ADP, que ponen en marcha mecanismos que acaban induciendo la expresión en la superficie plaquetar de la glicoproteína IIb/IIIa que, al unirse a fibrina y trombina, dan lugar a la agregación y formación del trombo.

Los intentos de modulación terapéutica de esta cascada de reacciones comienzan con la introducción del empleo de aspirina en los SCA. Aunque introducida en terapéutica a finales del siglo XIX, su acción antitrombótica se pone de manifiesto de manera casual. En 1983 un estudio de la Veterans Administration de Estados Unidos demuestra la capacidad de la aspirina para reducir la aparición de IM en pacientes ingresados por angina inestable¹. Le siguió la ticlopidina, fármaco antiinflamatorio introducido en los años 70, que puso de manifiesto su capacidad de inhibir irreversiblemente la función plaquetar. Los efectos secundarios frecuentes (neutropenia) limitaron el uso de ticlopidina, fundamentalmente, a pacientes con contraindicación a la aspirina. Al mismo grupo de fármacos (tienopiridinas) pertenece el clopidogrel, dotado de mucho mejor perfil de seguridad y que, con la aspirina, configuran el presente de la antiagregación plaquetar, dejando a un lado los inhibidores de la glicoproteína IIb/IIIa (IGP IIb/IIIa).

No obstante, la evidencia del beneficio clínico de estos fármacos, la plena eficacia, está lejos de conseguirse y las complicaciones tromboembólicas, pese a su empleo, siguen teniendo lugar. La amplia variabilidad interindividual en la repuesta a aspirina y clopidogrel ha sido puesta de manifiesto en numerosos estudios y, lo que es más importante, la repuesta insuficiente en la agregación plaquetar se asocia con un incremento de acontecimientos clínicos adversos². La función plaquetar, cuya extraordinaria complejidad incrementada por sus relaciones con otras células y sistemas apenas hemos comenzado a entrever, dificulta el diseño de fármacos que controlen eficazmente su actividad. La importancia de estos hechos se pone de manifiesto si considera-

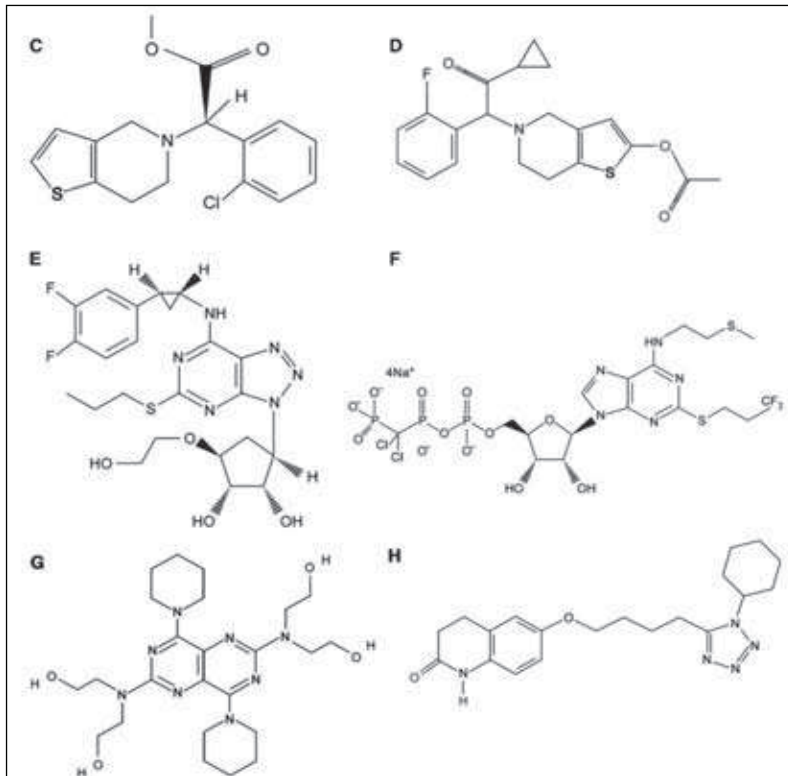


Figura 1. Estructura química de los fármacos descritos en el texto. C: clopidogrel; D: prasugrel; E: ticagrelor; F: cangrelor; G: dipyridamol; H: cilostazol. Modificado de T.A. Meadows. *Circ Res* 2007; 100: 1261.

mos que el número de pacientes que reciben aspirina en Estados Unidos (sólo en cardioprotección) alcanza los 26 millones de ciudadanos y que la resistencia a la aspirina se sitúa entre un 10 y un 30%. Los esfuerzos por desarrollar nuevos fármacos antiplaquetarios están pues, plenamente justificados. En breve, se comercializarán en nuestro país dos nuevos inhibidores del receptor P2Y₁₂, prasugrel y ticagrelor, a los que dedicaremos la mayor parte de las páginas que siguen.

Prasugrel

Las tienopiridinas preexistentes son profármacos que necesitan una biotransformación para convertirse en el fármaco activo. El 85% del clopidogrel es desactivado por esterasas, reduciendo así su biodisponibilidad.

El prasugrel, por el contrario, sufre una rápida transformación en dos pasos: el primero, hidrólisis por esterasas, y el segundo, por múltiples isotipos del sistema del citocromo P450, que da lugar al metabolito activo. En ambos fármacos, los metabolitos activos se unen a los residuos cisteína del receptor P2Y₁₂, inhibiendo su interacción con el ADP. La unión es irreversible y su efecto se prolonga durante toda la vida de la plaqueta.

Como consecuencia del diferente mecanismo de transformación, el prasugrel produce mayores concen-

traciones del metabolito activo y da lugar a una mayor inhibición de la agregación, con comienzo de acción más rápido. Su acción comienza a los 15 minutos, alcanzando el máximo efecto a los 60 minutos, mientras que el clopidogrel necesita 4-6 horas para ello. La mayor potencia antiagregante implica, por otra parte que se reduzca la proporción de pacientes con respuesta inadecuada³.

El primer gran ensayo clínico con prasugrel fue el JUMBO-TIMI 26, un estudio en fase 2 en el que se comparó el clopidogrel con 3 dosis de prasugrel⁴. El objetivo primario (hemorragias) mostró tendencia a ser superior con el prasugrel que con clopidogrel (1,7-1,2% n.s.). Las hemorragias mayores se dieron en similar proporción (0,5-0,8%). Aunque el ensayo no estaba diseñado para valorar la eficacia, el prasugrel produjo menor incidencia de efectos adversos cardiacos e isquemia recurrente, así como de trombosis del *stent* o necesidad de revascularización urgente (0,5-0,8%, $p = 0,54$).

El gran ensayo de eficacia del prasugrel es el TRITON-TIMI 38⁵. Se trata de un estudio en fase 3 llevado a cabo sobre 13.068 pacientes con SCA en los que se tenía intención de practicar intervencionismo coronario y que fueron aleatorizados a clopidogrel o prasugrel administrado durante hasta 15 meses. El objetivo primario (muerte, IM o ictus) aconteció en el 12,1% de los pacientes tratados con clopidogrel y en el 9,9% ($p < 0,001$) de los que lo fueron con prasugrel (Figura 2). Los eventos trombóticos también fueron reducidos significativamente. Las hemorragias mayores se dieron en el 2,4% del grupo prasugrel y en el 1,8 de los tratados con clopidogrel (riesgo 1,32, IC 1,03-1,68, $p < 0,03$). También fue superior la proporción de hemorragias que implicaban amenaza vital (1,4-0,9%; $p = 0,01$) y las que fueron finalmente fatales (0,4-0,1%; $p = 0,002$). La mortalidad global no se vio modificada.

Dado el opuesto sentido de los efectos de prasugrel (reducción de riesgo trombótico y aumento del hemorrágico), se ha llevado a cabo un análisis *post hoc* para identificar los subgrupos de pacientes en los que no existe beneficio clínico neto. Según los datos de tales análisis, los pacientes con antecedentes de ictus o accidente isquémico transitorio se perjudicaban claramente con el empleo de prasugrel y los pacientes mayores de 75 años o de menos de 60 kg de peso no obtenían beneficio alguno (Figura 3). El análisis de beneficio clínico neto muestra que, aunque el riesgo de sangrado

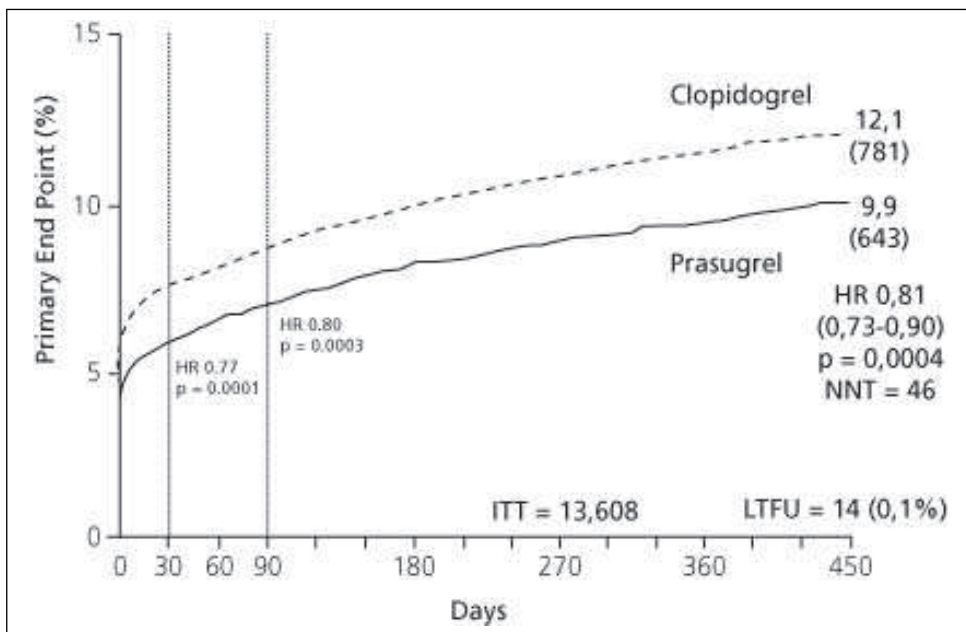


Figura 2. Estudio TRITON-TIMI-38. Curvas de Kaplan-Meier para el objetivo primario (muerte cardiovascular, o IM o ictus no fatales)⁵.

es significativo, no neutraliza completamente la mayor eficacia antitrombótica.

El beneficio del prasugrel se mantiene tanto si se usan IGP IIb/IIIa como si no. El riesgo hemorrágico no aumenta por el empleo concomitante de los IGP IIb/IIIa⁶.

El grupo tratado con prasugrel presentó asimismo un mayor número de casos de cáncer de colon (13 vs. 4 o 0,2 vs. 0,1%, p = 0,03). A la vista de estos datos, la FDA solicitó al laboratorio responsable del producto llevar a cabo estudios *in vitro* en líneas celulares tumorales, e *in vivo* en ratones, que no evidenciaron ninguna relación entre el crecimiento celular y el prasugrel. Aunque la relación parece poco probable, la FDA ha pedido la recogida de datos al respecto en un gran ensayo en curso.

Los contrapuestos efectos descritos y la repercusión económica de la interpretación que se haga de estos resultados han dado lugar a un

sinfín de comentarios. La opinión de la institución NICE del Reino Unido es que el prasugrel está sólo indicado en: 1) ICP inmediata para el tratamiento del IM con elevación del ST, 2) trombo-sis del *stent* acontecida bajo tratamiento con clopidogrel y 3) en pacientes diabéticos. En estos pacientes, NICE considera que el uso de prasugrel es coste-efectivo. NICE alberga dudas sobre la idoneidad de administrarlo a todos los pacientes con SCA, porque en el ensayo

TIMI 38 la administración de clopidogrel se hizo antes del intervencionismo sólo en el 25% de los casos. Aunque en el prasugrel sucedió otro tanto, la trascendencia terapéutica es, en este caso, de menor entidad, dada su más rápida metabolización.

Los pacientes diabéticos en el estudio TIMI-38 mostraron una reducción de efectos adversos cardiovasculares más importante, sin aumento de hemorragias respecto a los pacientes tratados con clopidogrel.

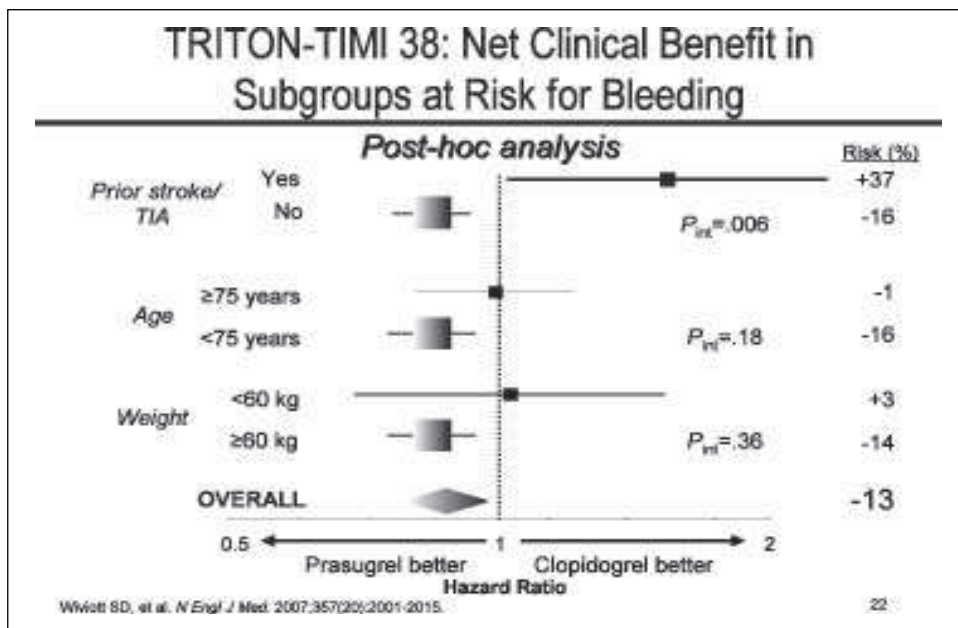


Figura 3. Subgrupos con influencia en riesgo hemorrágico en el estudio TRITON-TIMI-38⁵.

En el estudio OPTIMUS-3, se comparó el efecto antiagregante de la dosis de carga de 60 mg de prasugrel con la de 600 mg de clopidogrel en pacientes diabéticos. La función plaquetar se valoró con el VerifyNow, la agregometría por transmisión de luz y por VASP. La inhibición de la función plaquetar fue superior con prasugrel⁷.

La agencia europea del medicamento ha aceptado como indicación los SCA (con o sin elevación del ST) sometidos a ICP primaria o aplazada. No recomienda el uso en pacientes ≥ 75 años y, si se da, hacerlo a dosis de 5 mg (mitad de la normal).

Cangrelor

Es un inhibidor P2Y₁₂ que, administrado por vía intravenosa, comienza su acción en segundos y posee un potente efecto capaz de alcanzar prácticamente un 100% de inhibición plaquetar. Se metaboliza en el plasma sin intervención hepática o renal y tiene una vida media de apenas minutos, con desaparición de la acción inhibitoria plaquetar en 60 minutos.

A pesar de estos prometedores antecedentes, el ensayo en fase 3 Champion-Platform fue interrumpido al considerar en un análisis intermedio (cuando se disponía ya de datos de más de cinco mil pacientes) que no se pondría de manifiesto, de continuarlo, un beneficio sustancial⁸. La misma suerte, y por la misma razón, corrió el estudio Champion-PCI, que estudiaba pacientes con SCA de alto riesgo⁹. El riesgo hemorrágico era superior con cangrelor usando los criterios de Acute Catheterization and Urgent Intervention Triage Strategy, pero no cuando se usaba la escala TIMI. Los autores concluyen que no existe superioridad de cangrelor respecto a clopidogrel administrado con carga de 600 mg y 30 minutos antes de la ICP y que podría incrementar el riesgo hemorrágico.

Ticagrelor

El ticagrelor es un antagonista no tienopiridínico del receptor P2Y₁₂, más estable y que presenta mayor afinidad por él. A diferencia de las tienopiridinas, su molécula, análoga al ADP, actúa directamente sobre el receptor sin necesitar biotransformación, aunque su metabolito es equipotente

en cuanto a inhibición plaquetar. Otra diferencia trascendente es la reversibilidad de la unión al receptor del ADP. Como consecuencia de estas propiedades, se ha mostrado como un inhibidor más potente, rápido y con menor variabilidad interindividual que clopidogrel. En estudios en fase 2, el riesgo hemorrágico de dosis de 90 a 180 mg/12 h era el mismo que el de la dosis diaria de 75 mg de clopidogrel.

Su eficacia clínica ha sido valorada en el estudio PLATO, realizado sobre más de dieciocho mil pacientes con SCA con o sin elevación del ST¹⁰.

El objetivo principal (muerte, infarto o ictus) tuvo lugar a los 12 meses (Figura 4) en el 9,8% de los casos del grupo ticagrelor frente al 11,7% en el clopidogrel (riesgo 0,84, $p < 0,001$). También fue favorable su empleo en cuanto a riesgo de muerte cardiovascular (4,0-5,1%) y muerte por cualquier causa (4,5-5,9%). El beneficio está presente, tanto si existe intención de practicar ICP como si no.

Las hemorragias mayores acontecieron con similar proporción (11,6-11,2%, $p = 0,43$) pero las hemorragias no relacionadas con la cirugía coronaria fueron más frecuentes con ticagrelor (4,5-3,8%, $p = 0,03$) incluyendo más hemorragias cerebrales mortales y menos muertes por hemorragias de otros tipos (Figura 5). El estudio PLATO confirmó dos efectos secundarios puestos de manifiesto en los ensayos en fase 2, la producción de disnea y la de episodios de pausas ventriculares. La disnea se detectó en el 13,8% de los pacientes tratados con ticagrelor y en el 7,8% de los que recibieron clopidogrel. La mayoría de los episodios de disnea duraron menos de una semana, pero indujeron la interrupción del fármaco en el 0,9% de los pacientes. La monitorización ECG

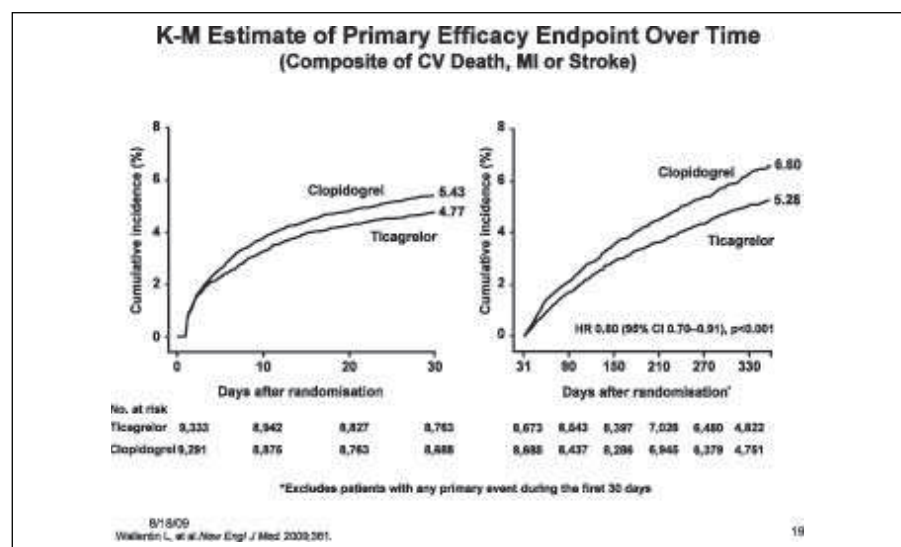


Figura 4. Curvas de Kaplan-Meier en el estudio PLATO para el objetivo primario (muerte cardiovascular, infarto de miocardio o ictus)¹⁰.

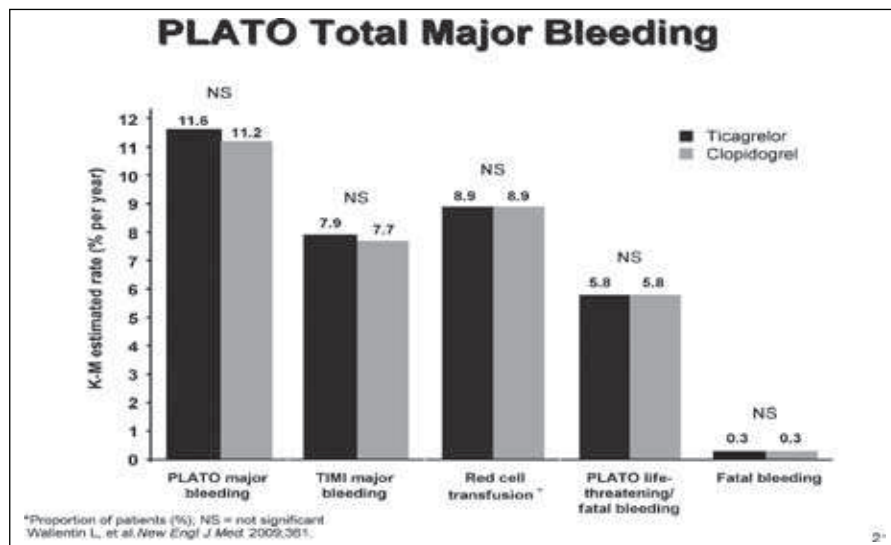


Figura 5. Riesgo hemorrágico comparativo de ticagrelor y clopidogrel en estudio PLATO¹⁰.

puso de manifiesto más episodios de pausa ventricular durante la primera semana, pero casi siempre fueron asintomáticos, sin diferencias en la frecuencia de síncope ni en la de uso de marcapasos. Ambos efectos secundarios se han puesto en relación con la inducción de alteraciones en la recaptación de adenosina por los eritrocitos.

El beneficio se mantenía tanto si la dosis de carga de clopidogrel era de 300 mg como de si era de 600 mg, la que más se emplea actualmente. La reversibilidad de la unión con el receptor del ADP hace que la acción antiagregante revierta antes, lo que confiere ventaja a ticagrelor en los casos que han de ser sometidos a cirugía coronaria.

Elinogrel

El elinogrel o PRT060128 es un inhibidor directo y reversible del receptor del ADP que se suministra por vía i.v. Ha sido estudiado en un estudio piloto en fase II (ERASE-MI) en pacientes con IM sometido a ICP primaria¹¹. El grupo control recibe clopidogrel en dos bolos de 600 y 300 mg separados 4 horas. Sólo se incluyeron 70 pacientes porque el estudio se interrumpió por razones administrativas. El escaso número de pacientes no permite apuntar ninguna conclusión. El estudio INNOVATE-PCI está aún en marcha, aunque ya no recluta pacientes.

Cilostazol

El cilostazol es un inhibidor reversible de la fosfodiesterasa III que aumenta los niveles intraplaquetares de AMPc. Por el mismo mecanismo produce una vasodilatación arterial. Se ha probado también su capacidad

para reducir la hiperplasia de la íntima y el crecimiento del músculo liso vascular. Todas estas acciones representan un valioso potencial frente a los problemas que inducen las endoprótesis vasculares. Se ha comprobado su capacidad para reducir reestenosis post-stent en enfermos con lesiones largas o diabetes¹². Un reciente estudio sobre 1.212 casos de SCA aleatorizados a tratamiento con aspirina, clopidogrel y cilostazol o a sólo los dos primeros fármacos, durante 6 meses, puso de manifiesto su eficacia, mostrando

una reducción en el objetivo primario (muerte cardiovascular, IM e ictus) del 15,1 al 10,3%, ($p = 0,011$). El cilostazol no se tradujo en aumento de hemorragias, pero sí dio lugar a cefalea y palpitaciones¹³.

Inhibidores del receptor de la trombina

La trombina es un potente agonista plaquetar a través de los receptores activados por proteasas (PAR). En el ser humano hay cuatro subtipos de PAR que se distribuyen por diversos tejidos. La trombina actúa además sobre la glicoproteína Ib/IX/V, aunque su contribución a la activación plaquetar no está totalmente aclarada. La trombina activa las plaquetas a través del PAR-1 y PAR-4. Su estímulo es de diez a cien veces más potente en el receptor PAR-1 que en el PAR-4. El PAR-1 es un receptor de gran afinidad que se activa a extraordinariamente bajas concentraciones de trombina, mientras el PAR-4 es de baja afinidad y actúa a elevadas concentraciones de trombina⁹. El receptor PAR-1 está también presente en las células endoteliales vasculares, músculo liso, monocitos y macrófagos, y puede activarse también por otras serin-proteasas, como plasmina, proteína C activada y los factores de coagulación VIIa, Xa. Los PAR intervienen en la contractilidad, proliferación, inflamación y procesos de reparación de la pared vascular. La activación del receptor PAR-1 estimula además la acción procoagulante de la plaqueta, dando lugar a la generación de trombina.

Los fármacos actualmente en uso (inhibidores del TXA₂ y del receptor P2Y₁₂) presentan significativas limitaciones clínicas, persistiendo complicaciones trombóticas y, sobre todo, aumentando las hemorrágicas con su asociación o aumento de dosis. La activación

del P2Y₁₂ representa además un papel importante en el inicio de la coagulación, modulando la generación de trombina. Al contrario que las vías de activación plaquetar mediadas por TXA₂ y receptor del ADP, que intervienen tanto en la formación del trombo hemostático como del patológico, la mediada por el PAR-1 contribuye a la trombosis patológica, pero puede no ser necesaria para la hemostasia (formación de la monocapa inicial de plaquetas)¹⁴.

SCH 530348

Este fármaco es un competidor no péptido del receptor PAR-1 con gran afinidad por él. Estudios preclínicos muestran su capacidad para inhibir la activación plaquetar inducida por trombina y por el TRAP, sin afectar parámetros de coagulación. Tiene una semivida terminal de 165-311 horas y, tras su supresión, se tardan 4 semanas en restablecer la función plaquetar al 50%.

En un estudio en fase 2 (TRA-PCI), 1.030 pacientes programados para ICP con probable implantación de *stent* fueron aleatorizados en proporción 3:1 a recibir SCH 530348 (10, 20 o 40 mg) o placebo. Todos recibieron clopidogrel (carga de 300 o 600 mg y mantenimiento de 75 mg) y un anticoagulante (heparina o bivalirudina). Los 573 pacientes a los que finalmente se practicó ICP recibieron dosis de mantenimiento de 0,5, 1 o 2,5 mg, o placebo. No se observó incremento de sangrado en relación con el aumento de dosis del SCH 530348 y se apuntó además una tendencia a la reducción de mortalidad, efectos cardiovasculares adversos e isquemia recurrente a 60 días¹⁵. La seguridad y buena tolerancia de este fármaco ha sido confirmado en un segundo estudio en fase 2.

El SCH 530348 parecería pues capaz de prevenir los fenómenos isquémicos relacionados con la generación de trombina, evitando su unión a las plaquetas sin limitar su acción generadora de fibrina a partir del fibrinógeno ni la agregación plaquetar del trombo hemostático. Tal potencial justifica que se lleven a cabo ensayos en fase 3 con este fármaco que puedan demostrar su eficacia clínica. Se hallan en curso dos estudios que investigarán el papel de este fármaco en el SCA (TRA-CER) y en prevención secundaria en pacientes con IM, ictus o enfermedad vascular periférica previas (TRA-2P-TIMI-50).

E-5555

Es un potente inhibidor del receptor PAR-1, activo por vía oral, que ha demostrado inhibición plaquetar sin aumento de riesgo hemorrágico en estudios preclínicos. La agregación plaquetar inducida por TRAP se

vio casi totalmente inhibida a cualquier dosis, sin elevar los tiempos de hemorragia. El E-5555 ha puesto de manifiesto en conejos un interesante efecto, como es la inhibición del espasmo vascular vinculado a hemorragias cerebrales. La seguridad y tolerancia del fármaco, así como sus efectos sobre la inflamación endovascular y los efectos adversos cardiovasculares, están siendo objeto de investigación en pacientes con cardiopatía coronaria y SCASEST en sendos estudios en fase 2 (Lancelot-1 y 2)¹⁴.

Bibliografía

- Lewis HD Jr, Davis JW, Archibald DG, Steinke WE, Smitherman TC, Doherty JE 3rd, et al. Protective effects of aspirin against acute myocardial infarction and death in men with unstable angina. Results of A Veterans Administration Cooperative study. *N Engl J Med* 1983; 309: 396-403.
- Vallés J, Santos MT, Fuset MP, Moscardó A, Ruano M, Breña S, et al. Partial inhibition of platelet TXA₂ synthesis by aspirin and/or TXA₂-independent platelet reactivity is associated with myonecrosis in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2007; 99: 19-25.
- Angiolillo DJ, Bhatt DL, Gurbel PA, Jennings LK. Advances in antiplatelet therapy: agents in clinical development. *Am J Cardiol* 2009; 103 [suppl]: 40A-51A.
- Wiviott SD, Antman EM, Winters KJ, Weerakkody G, Murphy SA, Behounek BD, et al. Randomized comparison of prasugrel (CS-747, LY640315), a novel thienopyridine P2Y₁₂ antagonist, with clopidogrel in percutaneous coronary intervention: results of the Joint Utilization of Medications to Block Platelets Optimally (JUMBO)-TIMI 26 trial. *Circulation* 2005; 111: 3366-73.
- Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, Montalescot G, Ruzyllo W, et al. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2007; 357: 2001-15.
- O'Donoghue M, Antman EM, Braunwald E, Murphy SA, Steg PG, Finkelstein AJ, et al. The efficacy and safety of prasugrel with and without a glycoprotein IIb/IIIa inhibitor in patients with acute coronary syndromes undergoing percutaneous intervention: a TRITON-TIMI 38 (Trial to Assess Improvement in Therapeutic Outcomes by Optimizing Platelet Inhibition With Prasugrel-Thrombolysis In Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54: 678-85.
- Wiviott SD, Braunwald E, Angiolillo DJ, et al. Greater clinical benefit of more intensive oral antiplatelet therapy with prasugrel in patients with diabetes mellitus in the trial to assess improvement in therapeutic outcomes by optimizing platelet inhibition with prasugrel/Thrombolysis in Myocardial Infarction 38. *Circulation* 2008; 118: 1626-36.
- Harrington RA, Stone GW, McNulty S, White HD, Lincoff AM, Gibson CM, et al. Platelet inhibition with cangrelor in patients undergoing PCI. *N Engl J Med* 2009; 361: 2318-29.
- Bhatt DL, Lincoff AM, Gibson CM, Stone GW, McNulty S, Montalescot G, et al. Intravenous platelet blockade with cangrelor during PCI. *N Engl J Med* 2009; 361: 2330-41.
- Wallentin L, Becker RC, Budaj A, Cannon C, Emanuelson H, Held C, et al; PLATO investigators. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2009; 361: 1045-57.
- Berger JS, Roe MT, Gibson CM, Kilaru R, Green CL, Melton L, et al. Safety and feasibility of adjunctive antiplatelet therapy with intravenous elinogrel, a direct-acting and reversible P2Y₁₂ ADP-receptor antagonist, before primary percuta-

neous intervention in patients with ST-elevation myocardial infarction: the Early Rapid ReversAl of platelet thromboSis with intravenous Elinogrel before PCI to optimize reperfusion in acute Myocardial Infarction (ERASE MI) pilot trial. *Am Heart J* 2009; 158: 998-1004.

12. Lee SW, Park SW, Kim YH, Yun Sc, Park DW, Lee CW, et al. Drug-eluting stenting followed by cilostazol treatment reduces late restenosis in patients with diabetes mellitus the DECLARED DIABETES Trial (A Randomized Comparison of Triple Antiplatelet Therapy with Dual Antiplatelet Therapy After Drug-Eluting Stent Implantation in Diabetic Patients). *J Am Coll Cardiol* 2008; 51: 1181-7.
13. Han Y, Li Y, Wang S, Ping Q, Wang Z, Wang D, et al. Cilostazol in addition to aspirin and clopidogrel improves long-term outcomes after percutaneous coronary intervention in patients with acute coronary syndromes: a randomized, controlled study. *Am Heart J* 2009; 157: 733-9.
14. Angiolillo DJ, Capodanno D, Goto S. Platelet thrombin receptor antagonism and atherothrombosis. *Eur Heart J* 2010; 31: 17-28.
15. Becker RC, Moliterno DJ, Jennings LK, et al. Safety and tolerability of SCH 530348 in patients undergoing non-urgent percutaneous coronary intervention: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase II study. *Lancet* 2009; 373: 919-28.

AVANCES EN LA MONITORIZACIÓN DEL TRATAMIENTO ANTIPLAQUETARIO

M.T. SANTOS, A. MOSCARDÓ, B. CORTINA, I. MADRID, J. VALLÉS

Centro de Investigación.

Hospital Universitario La Fe. Valencia

Las plaquetas desempeñan un papel importante en la trombosis, como se evidencia en el beneficio clínico del tratamiento antiplaquetario en pacientes de alto riesgo, previniendo en torno al 25% la incidencia de recurrencia en el conjunto de los pacientes con patología vascular¹.

Aunque la aterotrombosis es un fenómeno complejo en el que intervienen el endotelio, factores de la coagulación, alteraciones hemoreológicas, etc., no cabe duda de que una reactividad plaquetaria elevada es un importante determinante en la aparición de eventos, por lo que una adecuada inhibición de la función de las plaquetas está en la primera línea del tratamiento.

También sería deseable que los fármacos produjesen un efecto óptimo y uniforme de inhibición de la función plaquetaria en todos los pacientes. No obstante, como revisaremos a continuación, existe una variabilidad individual en el efecto antiplaquetario de los fármacos más utilizados: la aspirina y el clopidogrel con potenciales implicaciones clínicas.

Variabilidad del efecto antiplaquetario

En 1993 Helgason *et al.*² describieron el efecto inhibitorio insuficiente de la aspirina sobre las plaquetas en algunos de sus pacientes con ictus y acuñaron el término “resistencia a aspirina”, un término actualmente controvertido. Pero fue la aparición del trabajo de Gum y Topol en 2003 el que realmente puso en la palestra el tema de que algunos pacientes individuales pudiesen no estar obteniendo el beneficio adecuado del tratamiento. Su artículo tuvo gran repercusión en medios de comunicación social, como el *New York Times*. Posteriormente, se comprobó que la variabilidad individual de la respuesta no era exclusiva de la aspirina, sino que ésta es frecuente en el caso del clopidogrel, igualmente con preocupación por parte de médicos y pacientes. Por citar el caso más reciente, los nuevos hallazgos sobre la variabilidad genética en los polimorfismos del citocromo P450, que limitan la biodisponibilidad del metabolito activo del clopidogrel⁴ fue noticia en el *Wall Street Journal* el pasado 22 de marzo de 2010 por su indudable repercusión, no sólo científica, sino también económica y social. Desde un punto de vista científico, la necesidad de aclarar los mecanismos que influyen en la variabilidad individual de los fármacos antiplaquetarios ha resultado en un crecimiento exponencial de las revisiones y artículos sobre el tema. En estos años se ha reducido el uso del término “resistencia” por otras denominaciones más acordes con la realidad del fenómeno, como “pacientes con inhibición adecuada/no adecuada” con “reactividad elevada en el tratamiento”, “elevada actividad residual” o “variabilidad de respuesta al tratamiento”. No obstante, independientemente de la semántica, existe actualmente una creciente evidencia experimental acerca de que no todos los pacientes alcanzan la misma inhibición funcional por el tratamiento antiplaquetario, cuando éste se monitoriza en el laboratorio por distintos test de función plaquetaria, a los que nos referiremos más adelante. Por otra parte, los estudios actuales apoyan la idea de que los grupos de pacientes con una menor inhibición plaquetaria por el tratamiento presentan un mayor riesgo de eventos, a lo que también nos referiremos después de modo más específico. El fenómeno de resistencia a fármacos antiplaquetarios, aunque con algunos avances, sigue manteniendo sus incógnitas y su activa controversia entre los defensores de su potencial importancia y los activos detractores. Existen incertidumbres sobre el cómo valorar de modo individualizado si un paciente concreto está sujeto o no a un mayor riesgo trombótico por un menor efecto del fármaco, si se obtendría un beneficio clínico mayor por el ajuste del tratamiento de acuerdo con las determinaciones de laboratorio o qué técnica/s utilizar para este fin.

La complejidad de las respuestas a los interrogantes planteados anteriormente está indefectiblemente asociada a la propia complejidad de reactividad plaquetaria, que brevemente repasamos a continuación, y al hecho de que las técnicas disponibles actualmente tratan de monitorizar uno u otro aspecto de la respuesta plaquetaria, no conociéndose aún cuál de ellas se asocia más al riesgo clínico.

Aspectos generales de la reactividad plaquetaria

La interacción de los agonistas fisiológicos con sus receptores específicos o el contacto de las plaquetas con la superficie trombogénica del vaso dañado inicia una compleja secuencia bioquímica de transmisión de señales intracelulares que, actuando como interruptores bioquímicos, diversifican y coordinan las distintas respuestas funcionales de la célula⁵. Las plaquetas se adhieren al endotelio dañado o entran en contacto con sus estímulos fisiológicos en la fase fluida, iniciando la señalización específica correspondiente y activándose⁶. La activación induce la liberación de numerosas sustancias de sus gránulos alfa (citocinas, quimiocinas, factores de coagulación, proteasas, etc.) y de sus gránulos densos (ADP, ATP, serotonina), así como de productos metabólicos originados por la activación plaquetaria, como la síntesis de tromboxano A₂ (TXA₂), o el óxido nítrico (NO). A su vez, los productos liberados durante la activación plaquetaria interaccionan con el endotelio, los leucocitos, eritrocitos y plaquetas circulantes, lo que condiciona el reclutamiento plaquetario y crecimiento del trombo⁷. También los productos liberados por las plaquetas activadas inducen modificaciones en el endotelio y las células inflamatorias, condicionando la progresión de la aterosclerosis y la inflamación^{8,9}. La unión plaqueta-plaqueta mediante puentes de fibrinógeno entre moléculas del receptor integrina αIIbβ3 (GP-IIb/IIIa) en conformación activa por la estimulación plaquetaria (agregación) es esencial en la formación del tapón hemostático y del trombo oclusivo. Este trombo se consolida por la formación de mallas de fibrina inducida por la generación de trombina. Las plaquetas también contribuyen a acelerar y potenciar la generación de trombina y la retracción del coágulo¹⁰.

Teniendo en cuenta la complicada maquinaria bioquímica de las plaquetas, aquí únicamente esbozada, no es de extrañar que, después de tantos años de estudio intensivo de las mismas, aún tengamos numerosas zonas de sombra y que no se haya conseguido todavía un tratamiento antiplaquetario totalmente efectivo en la prevención secundaria de los procesos cardiovasculares. A destacar además en el escenario de este artículo que la aspirina y el clopidogrel actúan reduciendo únicamente dos vías metabólicas y de amplifi-

cación en las plaquetas (TXA₂, ADP), por lo que la búsqueda de nuevas dianas farmacológicas es intensa.

Tratamiento antiplaquetario con aspirina y/o clopidogrel

Aspirina

El efecto más específico de la aspirina es su capacidad para acetilar la serina en la posición 529 de la ciclooxigenasa 1 (COX-1), lo que bloquea su actividad irreversiblemente, impidiendo la síntesis de TXA₂, una sustancia vasoconstrictora y proagregante. La síntesis de TXA₂ amplifica la respuesta de las plaquetas que lo producen¹¹ y contribuye al reclutamiento de otras plaquetas circulantes^{7,12}. No obstante, una proporción (7-10%) de las plaquetas se renueva diariamente, proporción que puede ser incluso superior en pacientes con enfermedad vascular, aspecto que hay que tener en cuenta en el contexto de la terapéutica antiplaquetaria.

Además de su efecto sobre la síntesis de TXA₂, la aspirina puede contribuir a su efecto beneficioso mediante otros mecanismos no asociados a la COX-1 como sus efectos, reduciendo la progresión de la aterosclerosis^{10,13} o modulando la interacción de las plaquetas con otras células sanguíneas: eritrocitos¹⁴⁻¹⁶ y leucocitos¹⁷⁻¹⁹. En nuestra opinión, las interacciones celulares son un determinante del efecto variable de la aspirina¹⁶.

Un tema esencial de la fisiología es que la aspirina no bloquea todos los aspectos de la función plaquetaria, sino sólo aquellos sensibles al fármaco, principalmente los mediados por síntesis de TXA₂. Por ejemplo, la agregación con altas concentraciones de colágeno o trombina, son poco inhibidas por aspirina y pueden considerarse como COX-1-independientes⁵.

La existencia de pacientes con una inhibición menor de la esperada de la función plaquetaria evaluada con distintos test de función plaquetaria está actualmente confirmada en numerosos artículos y ampliamente revisada²⁰⁻²². No obstante, la proporción de pacientes tratados con aspirina con mal control en la función plaquetaria es variable entre los distintos estudios (4-45%), probablemente por los distintos test funcionales utilizados.

Si el fenómeno existe, ¿qué implicaciones clínicas tiene? Los datos disponibles sugieren que los pacientes con inhibición insuficiente de la función por aspirina en tratamiento crónico tienen una peor evolución clínica o, en el caso de pacientes con síndrome coronario agudo, aumento de daño miocárdico²³⁻²⁶. Existen también ya algunos metaanálisis que asocian función plaquetaria elevada, principalmente monitorizando la misma con agregometría óptica y PFA-100 con un mayor riesgo de eventos²⁷⁻³⁰.

Los mecanismos propuestos como potenciales mediadores clínicos, celulares y genéticos de la variabilidad del efecto de la aspirina se muestran en la Tabla 1²⁰.

Inhibidores del receptor P2Y12

La inhibición del efecto agonista del ADP es el mecanismo de acción de fármacos ampliamente utilizados clínicamente en la actualidad, como las tienopiridinas (ticlopidina, clopidogrel) y de otros inhibidores más recientes como el prasugrel, cangrelor y ticagrelor³¹.

El ADP actúa sobre los receptores P2Y12 y P2Y1 expresados en las plaquetas, y la respuesta funcional completa depende de la activación de ambos receptores. El receptor P2Y12 está acoplado a la proteína señalizadora Gi, que al activarse, produce la inhibición de la adenil-ciclase y, por tanto, reduce la concentración de AMP cíclico (AMPc), lo que favorece la agregabilidad a ADP y la estabilización de los agregados plaquetarios. El bloqueo de P2Y12 por los fármacos impide además la activación de proteínas cinasas dependientes de AMPc, como la PKA que fosforila a VASP, proceso que se ha empleado para determinar la eficacia del bloqueo de P2Y12 en el laboratorio utilizando citometría de flujo³². Por su parte, el receptor P2Y1 está

acoplado a la proteína Gq que señala activando la fosfolipasa C β , que inicia el metabolismo del fosfatidil-inositol y el aumento de calcio en el citosol, lo que a su vez disminuye la concentración de AMP cíclico.

El clopidogrel es un profármaco que necesita una transformación por las isoenzimas del citocromo P450 del hígado para obtener el metabolito activo (SR 26334) con efecto antiplaquetario^{33,34}. También el prasugrel es un profármaco que necesita metabolismo hepático, aunque posee una mejor farmacocinética. En cambio, el cangrelor y el ticagrelor son antagonistas directos y reversibles del receptor del ADP y no necesitan metabolismo hepático³¹. El metabolito activo del clopidogrel se une irreversiblemente a P2Y12 mediante la formación de puentes disulfuro entre el grupo tiol del metabolito activo y dos residuos cisteína extracelulares (Cys 17 y Cys 270) del receptor³⁵, y su efecto sobre la función se mantiene durante el tiempo que la plaqueta esté en circulación. En este caso, como en el de la aspirina, hay que tener en cuenta el recambio plaquetario diario, normalizándose la función a los 5-7 días de interrumpir el tratamiento. En cambio, el cangrelor (intravenoso) y el ticagrelor (oral) se unen a P2Y12 de forma reversible, recuperándose la función horas después de interrumpir el tratamiento³¹.

Teniendo en cuenta que el P2Y12 no es el único receptor para el ADP en las plaquetas, no es de extra-

Tabla 1. Posibles condicionantes de la variabilidad a los fármacos antiplaquetarios

	Aspirina*	Clopidogrel**
Factores clínicos y farmacocinéticos	<ul style="list-style-type: none"> - No prescripción - No seguir el tratamiento - Diabetes - Síndrome coronario agudo - Baja absorción - Interacciones con fármacos (antiinflamatorios no esteroideos) 	<ul style="list-style-type: none"> - No prescripción - No seguir el tratamiento - Diabetes - Síndrome coronario agudo - Edad - Elevado índice de masa corporal - Fallo renal - Dosis insuficiente - Baja absorción - Bajo metabolismo - Interacciones farmacológicas (Ca²⁺ antagonistas, inhibidores bomba de protones)
Factores celulares	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibición insuficiente de COX-1 - Elevado <i>turnover</i> plaquetario - Sobreexpresión de la COX-2 - Activación plaquetaria inducida por eritrocitos - Incremento de catecolaminas - Generación de 8-iso-PGF₂ 	<ul style="list-style-type: none"> - Elevado <i>turnover</i> plaquetario - Aumento de la exposición a ADP - Elevación de las vías de activación: <ul style="list-style-type: none"> P2Y12 P2Y1 P2Y-independientes
Factores genéticos	Polimorfismos de: <ul style="list-style-type: none"> COX-1 Receptor GP-IIb/IIIa Receptor de FwW Receptor P2Y1 	Polimorfismos de: <ul style="list-style-type: none"> Isoenzimas de CYP450 Receptor GP1a Receptor P2Y12 Receptor GP-IIb/IIIa

* Wang TH, et al. *Eu Heart J* 2006; 27: 647-54.

** Geisler T, Gawaz. *Haemostasiologic* 2009; 29: 360-7.

ñar que el tratamiento estándar con clopidogrel resulte en una inhibición parcial (<50%) de la agregación plaquetaria inducida por ADP (5-20 μ M). No obstante, la inhibición del receptor P2Y12 inestabiliza el agregado plaquetario, induciendo, en algunos sujetos y dependiendo de la concentración de ADP empleada, la reversibilidad de la agregación. La respuesta subóptima a clopidogrel en los pacientes es variable entre distintos estudios, usando técnicas diferentes (4-30%).

La variabilidad de respuesta al clopidogrel sobre la agregación plaquetaria en los pacientes está ampliamente demostrada^{22,36}. También existen datos que asocian una elevación de la función plaquetaria monitorizada por agregometría óptica, fosforilación de VASP y VerifyNow P2Y12 assay con una peor evolución clínica, sobre todo en los pacientes sometidos a la implantación de un *stent* coronario, que es donde más se ha estudiado^{22,34,37}. Los factores que actualmente se cree que influyen en la variabilidad del clopidogrel se muestran en la Tabla 1³⁸. Entre estos factores, la baja disponibilidad del metabolito activo es probablemente relevante. Un condicionante importante es su metabolismo por el citocromo P450, que podría reducirse por medicaciones concomitantes metabolizadas por el citocromo y por la presencia de polimorfismos del mismo. Recientemente, distintos estudios han asociado la presencia del polimorfismo CYP2C19 a una alteración de los niveles metabólicos del metabolito activo del clopidogrel, por lo que se ha sugerido la conveniencia de una evaluación rutinaria de variantes genéticas en pacientes tratados con clopidogrel⁴. El hecho de que un aumento de dosis de clopidogrel reduzca la proporción de pacientes con mal control³⁹, también apoya diferencias de metabolismo del fármaco. La seguridad y eficacia del aumento de dosis de mantenimiento de clopidogrel en pacientes poco respondedores al clopidogrel usando Verify P2Y12 es el objetivo del estudio GRAVITAS en 2.700 pacientes, aún en curso⁴⁰. Por otra parte, los nuevos fármacos, como el prasugrel y el ticagrelor, que inhiben más y más uniformemente la función de las plaquetas^{41,42}, también presentan un mayor beneficio clínico respecto a la isquemia^{43,44}, a expensas de un mayor riesgo hemorrágico en algún tipo de pacientes.

Técnicas de laboratorio para monitorizar el efecto de fármacos antiplaquetarios

Como se ha comentado, las plaquetas son células complejas que responden al estímulo con distintas respuestas funcionales en las que participan diferentes secuencias señalizadoras. No existe un parámetro analítico que englobe, de forma general, todas las funciones de las plaquetas. Éste es un problema esencial en el avance en la monitorización del efecto funcional de los fár-

macos antiplaquetarios en el laboratorio y, como cabría esperar, la variabilidad en la respuesta a la aspirina y/o clopidogrel es distinta cuando se utiliza uno u otro procedimiento de laboratorio, ya que la dependencia del TXA₂ (inhibido por aspirina) o del ADP en lo que al receptor P2Y12 se refiere (diana del clopidogrel) no es la misma en las distintas respuestas funcionales de las plaquetas, por lo que, como se ha indicado, la proporción de pacientes con mal control es variable en los distintos estudios, diferencias también atribuibles a los distintos tipos de pacientes.

En cambio, como veremos, sí es posible conocer desde un punto de vista bioquímico el nivel de efecto del fármaco sobre su diana farmacológica específica. En el caso de la aspirina, ésta es la inhibición de la COX-1 y subsiguiente síntesis de TXA₂, afectando a las respuestas funcionales TXA₂ o COX-1-dependientes, pero no aquellas COX-1-independientes o insensibles a aspirina. En el caso del clopidogrel, y teniendo en cuenta la existencia en la plaqueta del receptor P2Y1 además del P2Y12, se toma la fosforilación de la proteína de señalización VASP como efecto farmacológico específico, utilizando unas condiciones experimentales en las que se trata de minimizar el efecto funcional de P2Y1, que comentamos más adelante.

Las técnicas de función actualmente disponibles para monitorizar efecto de antiplaquetarios miden: agregometría, adhesión-agregación, activación, reclutamiento y tromboelastografía modificada.

Agregometría

Entre las respuestas funcionales de las plaquetas, no cabe duda de que la agregación o unión de plaquetas entre sí para formar un trombo es una etapa esencial en la trombogénesis, y su reducción por los fármacos antiplaquetarios es muy probablemente un componente esencial del beneficio clínico. Por eso, entre las técnicas de monitorización del efecto de los fármacos antiplaquetarios, el estudio de la agregación plaquetaria por agregometría óptica con distintos inductores es la prueba más utilizada, como lo ha sido a lo largo de los últimos 50 años en la comprensión de la fisiopatología plaquetaria, por eso se le considera el estándar de oro.

Agregometría óptica en plasma rico en plaquetas

Fundamento: Mide el incremento del paso de luz que se produce a través de una suspensión de plaquetas en plasma (PRP) por la agregación de las mismas en respuesta a un agonista. El plasma pobre en plaquetas autólogo sirve de control. Requiere para su correcta realización personal cualificado y una buena estandarización de las fases analíticas y preanalíticas del ensa-

yo, obteniéndose entonces unos coeficientes de variación técnicos muy aceptables 4-7%.

No es una técnica que pueda emplearse de forma rutinaria o como *point of care* (POC) en un número elevado de pacientes, debido al tiempo necesario para su realización, aunque es muy empleada en los estudios de investigación sobre el efecto de los fármacos antiplaquetarios y es el test de referencia para otras técnicas. La agregación inducida por ácido araquidónico (AA) es muy informativa sobre el efecto de la aspirina en las plaquetas, ya que ésta se produce principalmente por el TXA₂ formado a partir del ácido graso exógeno. No obstante, hay que tener en cuenta que en la respuesta agregatoria final al ácido araquidónico también puede contribuir el ADP liberado de los gránulos si la cantidad de TXA₂ formado induce secreción, por lo que su especificidad para monitorizar el efecto de aspirina es menor que la cuantificación directa de la síntesis de TXA₂, a la que nos referiremos más adelante. Asimismo, la agregación en PRP inducida por ADP monitoriza el efecto de los antagonistas de P2Y12, como las tienopiridinas. La agregación con el mimético de trombina (TRAP o iso-TRAP) se utiliza a veces de control, ya que a alta concentración la agregabilidad de las plaquetas es prácticamente independiente de aspirina o clopidogrel.

Agregometría de impedancia

El agregómetro de impedancia diseñado en 1980⁴⁵ y todavía comercializado por Chrono-Log (Chronolog Corporation, Estados Unidos) fue el primero en dar respuesta a la inquietud de que el medio fisiológico de las plaquetas es la sangre total y no el PRP. Su principio más que óptico es eléctrico. El equipo mide cambios en la resistencia al paso de corriente cuando las plaquetas se depositan sobre un electrodo. Uno de los equipos Chrono-Log mide simultáneamente la reacción de liberación (lumiagregómetro). Este sistema de agregación se ha facilitado actualmente con un nuevo equipo multicanal y computarizado, el Multiplate (Dinabyte GmbH, Alemania) que, utilizando los distintos agonistas plaquetarios, permite la monitorización del efecto de los tres antiplaquetarios utilizados en la clínica: aspirina, clopidogrel y GPIIb/IIIa. Muestra una aceptable asociación con la gregometría óptica y coeficientes de variabilidad razonables⁴⁶.

VerifyNow® (Accumetrics Inc., Estados Unidos)

Antes llamado Ultegra Platelet Function Analyzer. *Fundamento:* la técnica mide los cambios de transmisión de luz originados por la aglutinación de bolitas recubiertas de fibrinógeno en sangre total al unirse a ellas las plaquetas activadas, un proceso dependiente de la glicoproteína GPIIb/IIIa. En la actualidad, el

equipo dispone de cartuchos específicos para monitorizar el efecto de aspirina, de los bloqueantes del receptor P2Y12 y de los antagonistas del receptor GPIIb/IIIa. Es un método de agregometría muy facilitado (POC) que no requiere pipeteo de la muestra, ya que el análisis se realiza directamente en el tubo de extracción de sangre. En todos los casos el fabricante da los puntos de corte de buen y mal control de los test utilizados para controlar los fármacos en unidades arbitrarias. Por su simplicidad, está siendo utilizado en estudios clínicos amplios sobre el efecto del clopidogrel⁴⁰.

Plateletworks (Helena Laboratories, Estados Unidos)

El método consiste en la detección cuantitativa de agregados plaquetarios en sangre total. Para ello se realiza un doble recuento de plaquetas en sangre total en un tubo anticoagulado con EDTA (para evitar la agregación) y en otro tubo de citrato, en presencia de un agonista plaquetario. La diferencia en el número de plaquetas aisladas entre los dos tubos daría el porcentaje de agregación. Requiere para este contaje un contador de células basado en el principio de impedancia. Es una facilitación del método de Wu y Hoak⁴⁷, ya que los tubos de extracción ya contienen los reactivos necesarios. La principal limitación es que se recomienda una rápida lectura (<10 min), lo que lo limita en el uso rutinario en pacientes³⁷.

Sistema de activación-reclutamiento

Consiste en un sistema dual de células: el sistema generador y el sistema de ensayo. En el sistema generador se estimula PRP o sangre total con colágeno fibrilar (10 seg) y rápidamente se centrifuga (13.000 xg, 1 min) para obtener un liberado celular. En este liberado se cuantifican diversos parámetros de activación plaquetaria: liberación de gránulos densos (14C-5HT) y de gránulos α (β-tromboglobulina) y síntesis de TXA₂. Adicionalmente, una alícuota del liberado se utiliza como inductor de la agregación de otras plaquetas autólogas (sistema de ensayo) y la respuesta agregatoria (reclutamiento) se detecta por agregometría óptica^{7,48} o citometría de flujo¹². Es interesante destacar que el estudio del reclutamiento consiste realmente en una agregometría óptica, en la que se usa como inductor de la agregación, en vez de productos de laboratorio (ADP, TRAP, etc.), el agonista fisiológico que es el liberado celular de activación del propio paciente a examen, por lo que cabría esperar una mayor aproximación a la fisiología de la reactividad plaquetaria. No existe todavía una forma facilitada de este procedimiento y requiere personal muy cualificado de laboratorio para su realización.

Sistemas de adhesión-agregación

Tiempo de sangría

Es la única técnica de función plaquetaria *in vivo*. Es el tiempo que tarda en detenerse la hemorragia después de una pequeña incisión estandarizada en la cara anterior del brazo, manteniendo una presión de 40 mmHg. Este test da una idea global de la función plaquetaria en la hemostasia primaria, modificada por otras células sanguíneas y el endotelio. Ha sido ampliamente utilizada como prueba de función plaquetaria preoperatoria hasta los años noventa. En la actualidad, no es muy utilizado por su difícil estandarización y carácter invasivo. El tratamiento con aspirina alarga el tiempo de sangría, por lo que se ha utilizado también para explorar la variabilidad individual de la respuesta farmacológica⁴⁹.

Impact Cone and Plate Analyser (CPA, DiaMed, Suiza)

Mide adhesión y agregación de las plaquetas sobre una superficie de poliestireno cuando la sangre interacciona a un flujo equivalente al arterial (1.800/seg) durante 2 min. La adhesión y agregación se cuantifican mediante un analizador de imagen después de lavado y teñido de la muestra. La adhesión se expresa como porcentaje de la superficie plástica cubierta por plaquetas y la agregación como la medida del volumen de células adheridas. Se ha utilizado para monitorizar el efecto de antagonistas de GP-IIb/IIIa⁵⁰ y el efecto protrombótico de los eritrocitos⁵¹.

Platelet Function Analyzer (PFA-100®), Dade-Behring, Alemania)

Es un sistema que imita *in vitro* el tiempo de sangría. El sistema hace pasar sangre citratada a través de un capilar con alta velocidad de cizallamiento hacia una pequeña apertura en una membrana recubierta de colágeno + epinefrina (CEPI) o colágeno + ADP (CADP). La función plaquetaria se monitoriza como el tiempo que tardan la sangre en ocluir la apertura en la membrana. Este sistema proporciona una evaluación global de la función plaquetaria que depende de procesos de adhesión-agregación y también del número de plaquetas, hematocrito, FVW, activación de GP-IIb/IIIa, etc.⁵². Este sistema es también un *point of care* de fácil utilización. El cartucho CEPI se ha utilizado ampliamente para monitorizar el efecto de aspirina^{50,53}. Por el contrario, el sistema PFA-100 con los cartuchos anteriores no puede monitorizar el efecto de las tienopiridinas³⁷. Recientemente, se ha hecho disponible un nuevo cartucho, Innovance PFA P2Y12, para monitorizar tienopiridinas⁵⁴.

Activación plaquetaria

Citometría de flujo

El uso de la citometría de flujo permite medir, entre otros parámetros, la expresión en la membrana de la plaqueta de P-selectina (CD62) o el cambio conformacional del receptor GP-IIb/IIIa con el anticuerpo PAC-1⁵⁵ y su modificación por los fármacos antiplaquetarios⁵⁶. El uso de la citometría de flujo para el estudio de la activación plaquetaria representa un avance por la pequeña cantidad de muestra que se requiere, aunque necesita de un equipo caro y de personal entrenado. Para el estudio del efecto del clopidogrel por citometría de flujo se usa el ADP como agonista en presencia de PGE1 y se monitoriza la fosforilación de la proteína intracelular VASP³². En estas condiciones, la fosforilación de VASP (que se identifica con un anticuerpo monoclonal para la forma fosforilada) en plaquetas permeabilizadas es directamente proporcional al grado de inhibición del receptor P2Y₁₂.

Monitorización de la liberación de gránulos densos

Puede realizarse mediante marcaje isotópico de las plaquetas con ¹⁴C-5HT para monitorizar la secreción de serotonina⁷. La serotonina puede también cuantificarse por ELISA en liberados de activación plaquetaria. El ADP y ATP liberado por plaquetas activadas puede cuantificarse mediante cromatografía líquida de alta presión⁴⁸ o por la reacción clásica del ATP con la luciferín-luciferinasa mediante métodos bioquímicos o usando el lumiagregómetro (Chronolog Corp, Estados Unidos), que mide simultáneamente la agregación plaquetaria y la liberación de ATP.

Monitorización de la síntesis de TXA₂

La determinación del TXB₂, el metabolito estable del TXA₂ en las plaquetas, es, en nuestra opinión, la medida más específica para controlar el efecto farmacológico de la aspirina. Puede realizarse en suero (en condiciones específicas de incubación inmediatamente después de su extracción a 37 °C)⁵⁷, lo que dificulta su uso práctico en pacientes que no acudan al laboratorio para la extracción de sangre, o en sangre total citratada estimulada con ácido araquidónico o colágeno. También se han determinado los metabolitos del TXA₂ en la orina. No obstante, en la orina, la presencia de metabolitos del TXA₂ puede tener su origen no sólo en las plaquetas, sino también en otras células (riñón, leucocitos, etc.)⁵⁸. En nuestra opinión, la determinación del TXA₂ en sangre citratada estimulada con ácido araquidónico o colágeno es la más adecuada para determinar el efecto de la aspirina fuera de un laboratorio puramente experimental, sobre todo con colágeno, ya que

el ácido araquidónico podría ser utilizado por otras células capaces de metabolizar este compuesto, dando resultados muy orientativos pero menos específicos del TXB₂ de origen plaquetario.

Participación de las plaquetas en la generación de trombina

Existen en la actualidad varias técnicas para medir el papel de las plaquetas en la generación de trombina, incluyendo la técnica original de Henker *et al.*⁵⁹ y el sistema facilitado de la misma como el sistema CAT (Calibrated Automated Thrombography)⁶⁰. Con este enfoque se han descrito modificaciones por el efecto de los fármacos antiplaquetarios en la generación de trombina^{61,62}.

La tromboelastografía, una técnica conocida desde hace más de 50 años, podría tener también utilidad en la monitorización del efecto de fármacos antiplaquetarios sobre la generación de trombina³⁷. La tromboelastografía proporciona información sobre la formación del coágulo (tiempo de latencia, velocidad, intensidad máxima) y la lisis del mismo. Además de los clásicos tromboelastógrafos (ROTEG, ROTEM) existen en la actualidad distintos equipos basados en tromboelastografía, más orientados a monitorizar el papel de las plaquetas y el efecto de fármacos antiplaquetarios en la formación del coágulo, como el HemoStatus Test (Medtronics blood Management) y el Platelet Mapping System (Haemoscope Corporation, Estados Unidos).

Conclusiones y perspectivas de futuro

El riesgo de recurrencia de enfermedades vasculares continúa siendo elevado, a pesar de la terapéutica antiplaquetaria. La respuesta funcional elevada en algunos paciente tratados podría ser un factor que contribuya a la recurrencia, como se ha comprobado en los estudios anteriormente mencionados. Pero los datos disponibles son todavía insuficientes para poder determinar con fiabilidad el impacto en la evolución clínica y, por tanto, actualmente no se recomienda la monitorización rutinaria de los fármacos antiplaquetarios en los pacientes. No obstante, es importante fomentar la investigación clínica y experimental en este ámbito por su carácter traslacional y potencial impacto en el tratamiento.

El caso de la variabilidad de respuesta al clopidogrel está ampliamente admitido y las razones biológicas que lo sustentan, referidas anteriormente, están más claras y son biológicamente plausibles. En cambio, la resistencia a la aspirina sigue siendo un tema de abierta controversia, a pesar de que los datos disponibles aumentan y apoyan la existencia del fenómeno y su implicación clínica^{27-30,53}.

Estos estudios están siendo controvertidos por la creencia de algunos líderes de opinión^{63,64} de que la resistencia a aspirina es una entidad inexistente o muy infrecuente, ya que la aspirina siempre produce una inhibición adecuada de la síntesis de TXA₂ y, en los pacientes en los que no ocurre, es atribuible principalmente a la falta de seguimiento en el tratamiento. Por otra parte, los efectos antitrombóticos de la aspirina no asociados al metabolismo del ácido araquidónico son, en su opinión, de menor entidad y están mal caracterizados, a pesar de existir una larga lista de ellos^{10,13}, incluyendo los datos de nuestro laboratorio en relación con la disminución del efecto antiplaquetario de la aspirina por la interacción eritrocito-plaqueta^{7,12,14-16,48}.

Respecto a la síntesis de TXA₂, los estudios farmacológicos del doctor Patrono y colaboradores, se han realizado en sujetos normales⁶⁵. No obstante, parece plausible que pueda existir alguna diferencia entre sujetos normales y pacientes con enfermedad vascular⁶⁶. En los últimos años, diversos grupos han demostrado una inhibición insuficiente del TXA₂ en pacientes en tratamiento crónico con aspirina⁶⁷⁻⁷⁰, antes de la intervención coronaria percutánea⁵⁶, en la cirugía de *bypass*⁷¹ y en el síndrome coronario agudo^{26,72}. Aunque todavía no conocemos las bases biológicas de la inhibición insuficiente del TXA₂ por aspirina en los pacientes, no cabe duda científica de que es un fenómeno que se produce, lo que lleva asociado un incremento de todos los aspectos de función plaquetaria COX-1-dependientes y, por tanto, siendo un fenómeno subyacente en los resultados de la monitorización de la función plaquetaria estudiada con otros test menos específicos⁷⁰. Recientemente, en un estudio en 700 pacientes, se ha asociado la inhibición insuficiente del TXA₂ a un aumento de eventos vasculares adversos⁵⁶.

En el tema de resistencia a fármacos antiplaquetarios debe considerarse con prudencia, ya que son necesarios más estudios para establecer, entre otras cosas, qué aspectos de la función plaquetaria y qué técnicas se asocian más a la recurrencia; conocer si el ajuste de dosis/pautas en pacientes poco respondedores aumenta el beneficio clínico del tratamiento; si la doble resistencia a aspirina y clopidogrel incrementa el riesgo y si esto puede paliarse en pacientes en situación de alto riesgo asociando un tercer fármaco antiplaquetario. Por eso, como se ha comentado, no existe actualmente un acuerdo internacional para la monitorización rutinaria del efecto de los fármacos antiplaquetarios. Finalmente, se están realizando estudios de investigación básica para detectar nuevas dianas farmacológicas y nuevos fármacos antiplaquetarios más eficientes y/o complementarios a los ya disponibles⁷³, así como nuevos métodos de laboratorio.

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.

Bibliografía

1. Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *Br Med J* 2002; 324: 71-86.
2. Helgason CM, Tortorice KL, Winkler SR, Penney DW, Schuller JJ, McClelland TJ, et al. Aspirin response and failure in cerebral infarction. *Stroke* 1993; 24: 345-50.
3. Gum PA, Kottke-Marchant K, Welsh PA, White J, Topol EJ. A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 961-5.
4. Damani SB. The case for routine genotyping in dual-antiplatelet therapy. *J Am Coll Cardiol* 2010 [En prensa].
5. Santos MT, Moscardó A, Vallés J, Martínez M, Pinon M, Aznar J, et al. Participation of tyrosine phosphorylation in cytoskeletal reorganization, α IIb β 3 integrin receptor activation, and aspirin-insensitive mechanisms of thrombin-stimulated human platelets. *Circulation* 2000; 102: 1924-30.
6. Jackson SP. The growing complexity of platelet aggregation. *Blood* 2007; 109 (12): 5087-95.
7. Santos MT, Vallés J, Marcus AJ, Safier LB, Broekman MJ, Islam N, et al. Enhancement of platelet reactivity and modulation of eicosanoid production by intact erythrocytes. *J Clin Invest* 1991; 87: 571-80.
8. May AE, Seizer P, Gawaz M. Platelets: inflammatory firebugs of vascular walls. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: s5-10.
9. Santos MT, Vallés J, Moscardó A. Más allá de la hemostasia: papel de las plaquetas en procesos tromboinflamatorios. *Haematologica (Ed Esp)* 2009; 94 (Extra 1): 155-61.
10. Undas A, Brummel-Ziedins KE, Mann KG. Antithrombotic properties of aspirin and resistance to aspirin: beyond strictly antiplatelet actions. *Blood* 2007; 109 (6): 2285-92.
11. FitzGerald GA. Mechanisms of platelet activation: thromboxane A2 as an amplifying signal for other agonists. *Am J Cardiol* 1991; 68: 11B-5B.
12. Vallés J, Santos MT, Aznar J, Martínez M, Moscardó A, Pinon M, et al. Platelet-erythrocyte interactions enhance α IIb β 3 integrin receptor activation and P-selectin expression during platelet recruitment: down-regulation by aspirin ex vivo. *Blood* 2002; 99: 3978-84.
13. Awtry EH, Loscalzo J. Aspirin. *Circulation* 2000; 101: 1206-18.
14. Santos MT, Vallés J, Aznar J, Marcus AJ, Broekman MJ, Safier LB, et al. Prothrombotic effects of erythrocytes on platelet reactivity: reduction by aspirin. *Circulation* 1997; 95: 63-8.
15. Vallés J, Santos MT, Aznar J, Osa A, Lago A, Cosin J, et al. Erythrocyte promotion of platelet reactivity decreases the effectiveness of aspirin as an antithrombotic therapeutic modality: the effect of low-dose aspirin is less than optimal in patients with vascular disease due to prothrombotic effects of erythrocytes on platelet reactivity. *Circulation* 1998; 97: 350-5.
16. Santos MT, Vallés J, Lago A, Tembl J, Sánchez E, Moscardó A, et al. Residual platelet thromboxane A2 and prothrombotic effects of erythrocytes are important determinants of aspirin resistance in patients with vascular disease. *Thromb Haemost* 2008; 6: 615-21.
17. 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.
18. López-Farre A, Caramelo C, Esteban A, Alberola ML, Millas I, Monton M, et al. Effects of aspirin on platelet-neutrophil interactions: Role of nitric oxide and endothelin-1. *Circulation* 1995; 91: 2080-8.
19. De la Cruz JP, Blanco E, Sánchez de la Cuesta F. Effect of dipyridamole and aspirin on the platelet-neutrophil interaction via the nitric oxide pathway. *Eur J Pharmacol* 2000; 397: 35-41.
20. Wang TH, Bhatt DL, Topol EJ. Aspirin and clopidogrel resistance: an emerging clinical entity. *Eur Heart J* 2006; 27: 647-54.
21. Maree AO, Fitzgerald DJ. Variable platelet response to aspirin and clopidogrel in atherothrombotic disease. *Circulation* 2007; 115: 2196-207.
22. Gurbel PA, Mahla E, Antonino MJ, Tantry US. Response variability and the role of platelet function testing. *J Invasive Cardiol* 2009; 21: 172-8.
23. Eikelboom JW, Hankey GJ, Thom J, Bhatt DL, Steg PG, Montalescot G, et al. Incomplete inhibition of thromboxane biosynthesis by acetylsalicylic acid: determinants and effect on cardiovascular risk. *Circulation* 2008; 118: 1705-12.
24. Marcucci R, Paniccia R, Antonucci E, Poli S, Gori AM, Valente S, et al. Residual platelet reactivity is an independent predictor of myocardial injury in acute myocardial infarction patients on antiaggregant therapy. *Thromb Haemost* 2007; 98: 844-51.
25. Cheng X, Chen W-H, Simon DI. Aspirin resistance or variable response or both? *Am J Cardiol* 2006; 98 (10 Suppl 1): S11-7.
26. Vallés J, Santos MT, Fuset MP, Moscardó A, Ruano M, Pérez F, et al. Partial inhibition of platelet thromboxane A2 synthesis by aspirin is associated with myonecrosis in patients with ST-Segment elevation myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2007; 99: 19-25.
27. Krasopoulos G, Brister SJ, Beattie WS, Buchanan MR. Aspirin "resistance" and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis. *Br Med J* 2008; 336 (7637): 195-8.
28. Snoep JD, Hovens MMC, Eikenboom JCJ, Van der Bom JG, Huisman MV. Association of laboratory-defined aspirin resistance with a higher risk of recurrent cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med* 2007; 167: 1593-9.
29. Reny J-L, De Moerloose P, Dauzat M, Fontana P. Use of the PFA-100 closure time to predict cardiovascular events in aspirin-treated cardiovascular patients: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost* 2008; 6 (3): 444-50.
30. Crescente M, Di Castelnuovo A, Iacoviello L, de Gaetano G, Cerletti C. PFA-100 closure time to predict cardiovascular events in aspirin-treated cardiovascular patients: A meta-analysis of 19 studies comprising 3,003 patients. *Thromb Haemost* 2008; 99: 1129-31.
31. Cattaneo M. New P2Y(12) inhibitors. *Circulation* 2010; 121: 171-9.
32. Schwarz UR, Geiger J, Walter U, Eigenthaler M. Flow cytometry analysis of intracellular VASP phosphorylation for the assessment of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets -Definition and detection of ticlopidine/clopidogrel effects. *Thromb Haemost* 1999; 82: 1145-52.
33. Price MJ. New antiplatelet therapies in development. *Am J Health Syst Pharm* 2008; 65 (13 Suppl 5): S11-5; quiz S16-8.
34. Ferreiro JL, Angiolillo DJ. Clopidogrel response variability: current status and future directions. *Thromb Haemost* 2009; 102: 7-14.

35. Ding Z, Kim S, Dorsam RT, Jin J, Kunapuli SP. Inactivation of the human P2Y₁₂ receptor by thiol reagents requires interaction with both extracellular cysteine residues, Cys17 and Cys270. *Blood* 2003; 101 (10): 3908-14.
36. Angiolillo DJ, Bhatt DL, Gurbel PA, Jennings LK. Advances in antiplatelet therapy: agents in clinical development. *Am J Cardiol* 2009; 103 (3 Suppl): 40A-51A.
37. Price MJ. Bedside evaluation of thienopyridine antiplatelet therapy. *Circulation* 2009; 119: 2625-32.
38. Geisler T, Gawaz M. Individualized antiplatelet therapy: what can a clinical score contribute? *Hamostaseologie* 2009; 29: 360-7.
39. Angiolillo DJ, Shoemaker SB, Desai B, Yuan H, Charlton RK, Bernardo E, et al. Randomized comparison of a high clopidogrel maintenance dose in patients with diabetes mellitus and coronary artery disease: results of the Optimizing Antiplatelet Therapy in Diabetes Mellitus (OPTIMUS) study. *Circulation* 2007; 115 (6): 708-16.
40. Price MJ, Berger PB, Angiolillo DJ, Teirstein PS, Tanguay J-F, Kandzari DE, et al. Evaluation of individualized clopidogrel therapy after drug-eluting stent implantation in patients with high residual platelet reactivity: design and rationale of the GRAVITAS trial. *Am Heart J* 2009; 157: 818-24.
41. Brandt JT, Payne CD, Wiviott SD, Weerakkody G, Farid NA, Small DS, et al. A comparison of prasugrel and clopidogrel loading doses on platelet function: magnitude of platelet inhibition is related to active metabolite formation. *Am Heart J* 2007; 153 (1): 66.e9-16.
42. Gurbel PA, Bliden KP, Butler K, Antonino MJ, Wei C, Teng R, et al. Response to ticagrelor in clopidogrel nonresponders and responders and effect of switching therapies: the RESPOND study. *Circulation* 2010; 121 (10): 1188-99.
43. Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, Montalescot G, Ruzyllo W, Gottlieb S, et al. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2007; 357 (20): 2001-15.
44. Cannon CP, Harrington RA, James S, Ardissino D, Becker RC, Emanuelsson H, et al. Comparison of ticagrelor with clopidogrel in patients with a planned invasive strategy for acute coronary syndromes (PLATO): a randomised double-blind study. *Lancet* 2010; 375 (9711): 283-93.
45. Cardinal DC, Flower JR. The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood. *J Pharmacol Methods* 1980; 3: 135.
46. Panizza R, Antonucci E, Maggini N, Romano E, Gori AM, Marcucci R, et al. Assessment of platelet function on whole blood by multiple electrode aggregometry in high-risk patients with coronary artery disease receiving antiplatelet therapy. *Am J Clin Pathol* 2009; 131: 834-42.
47. Wu KK, Hoak JC. A method for the quantitative detection of platelet aggregates in patients with arterial insufficiency. *Lancet* 1974; 2: 924.
48. 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.
49. Buchanan MR, Brister SJ. Individual variation in the effects of ASA on platelet function: implications for the use of ASA clinically. *Can J Cardiol* 1995; 11: 221-7.
50. Varon D, Lashevski I, Brenner B, Beyar R, Lanir N, Tamarin I, et al. Cone and plate(let) analyzer: monitoring glycoprotein IIb/IIIa antagonists and von willebrand disease replacement therapy by testing platelet deposition under flow conditions. *Am Heart J* 1998; 135 (5 Suppl Part 2): S187-93.
51. Peerschke EIB, Silver RT, Weksler B, Grigg SE, Savion N, Varon D. Ex vivo evaluation of erythrocytosis-enhanced platelet thrombus formation using the cone and plate(let) analyzer: effect of platelet antagonists. *Br J Haematol* 2004; 127: 195-203.
52. Jilma B, Fuchs I. Detecting aspirin resistance with the platelet function analyzer (PFA-100). *Am J Cardiol* 2001; 88: 1348-9.
53. Crescente M, Di Castelnuovo A, Iacoviello L, Vermynen J, Cerletti C, De Gaetano G. Response variability to aspirin as assessed by the platelet function analyzer (PFA)-100. A systematic review. *Thromb Haemost* 2008; 99: 14-26.
54. Linnemann B, Schwonberg J, Rechner AR, Mani H, Lindhoff-Last E. Assessment of clopidogrel non-response by the PFA-100 system using the new test cartridge INNOVANCE PFA P2Y. *Ann Hematol* 2010; 89 (6): 597-605.
55. Gurbel PA, Becker RC, Mann KG, Steinhubl SR, Michelson AD. Platelet function monitoring in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50 (19): 1822-34.
56. Frelinger AL 3rd, Li YouF, Linden MD, Barnard MR, Fox ML, Christie DJ, et al. Association of cyclooxygenase-1-dependent and -independent platelet function assays with adverse clinical outcomes in aspirin-treated patients presenting for cardiac catheterization. *Circulation* 2009; 120 (25): 2586-96.
57. Patrono C, Ciabattini G, Pinca E, Pugliese F, Castrucci G, De Salvo A, et al. Low dose aspirin and inhibition of thromboxane B₂ production in healthy subjects. *Tromb Res* 1980; 17: 317-27.
58. Eikelboom JW, Hirsh J, Weitz JI, Johnston M, Yi Q, Yusuf S. Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. *Circulation* 2002; 105: 1650-5.
59. Kessels H, Beguin S, Andree H, Hemker HC. Measurement of thrombin generation in whole blood--the effect of heparin and aspirin. *Thromb Haemost* 1994; 72: 78-83.
60. Hemker HC, Giesen P, AlDieri R, Regnault V, De Smed E, Wagenvoort R, et al. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002; 32: 249-53.
61. Butenas S, Cawthern KM, Van't Veer C, DiLorenzo ME, Lock JB, Mann KG. Antiplatelet agents in tissue factor-induced blood coagulation. *Blood* 2001; 97: 2314-22.
62. Wegert W, Graff J, Kaiser D, Breddin HK, Klinkhardt U, Harder S. Effects of antiplatelet agents on platelet-induced thrombin generation. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2002; 40: 135-41.
63. Patrono C, Rocca B. Aspirin: promise and resistance in the new millennium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28 (3): s25-32.
64. Patrono C, Rocca B. Aspirin, 110 years later. *J Thromb Haemost* 2009; 7 (Suppl 1): 258-61.
65. Patrignani P, Filabozzi P, Patrono C. Selective cumulative inhibition of platelet thromboxane production by low-dose aspirin in healthy subjects. *J Clin Invest* 1982; 69: 1366-72.
66. Sciuilli MG, Renda G, Capone ML, Tacconelli S, Ricciotti E, Manarini S, et al. Heterogeneity in the suppression of platelet cyclooxygenase-1 activity by aspirin in coronary heart disease. *Clin Pharmacol Ther* 2006; 80 (2): 115-25.
67. Pulcinelli FM, Riondino S, Celestini A, Pignatelli P, Trifiro E, Di Renzo L, et al. Persistent production of platelet thromboxane A₂ in patients chronically treated with aspirin. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 2784-9.
68. Maree AO, Curtin RJ, Dooley M, Conroy RM, Crean P, Cox D, et al. Platelet response to low-dose enteric-coated aspirin in patients with stable cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46: 1258-63.
69. Frelinger AL 3rd, Furman MI, Linden MD, Li Y, Fox ML, Barnard MR, et al. Residual arachidonic acid-induced platelet activation via an adenosine diphosphate-dependent but cyclooxygenase-1- and cyclooxygenase-2-independent pathway: a 700-patient study of aspirin resistance. *Circulation* 2006; 113 (25): 2888-96.
70. Santos MT, Vallés J, Lago A, Tembl J, Sánchez E, Moscardó A, et al. Residual platelet thromboxane A₂ and prothrombo-

tic effects of erythrocytes are important determinants of aspirin resistance in patients with vascular disease. *J Thromb Haemost* 2008; 6 (4): 615-21.

71. Zimmermann N, Wenk A, Kim U, Kienzle P, Weber A-A, Gams E, et al. Functional and biochemical evaluation of platelet aspirin resistance after coronary artery bypass surgery. *Circulation* 2003; 108 (5): 542-7.
72. Santos MT, Fuset MP, Ruano M, Moscardó A, Vallés J. Effect of atorvastatin on platelet thromboxane A(2) synthesis in aspirin-treated patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2009; 104: 1618-23.
73. Barrett NE, Holbrook L, Jones S, Kaiser WJ, Moraes LA, Rana R, et al. Future innovations in anti-platelet therapies. *Br J Pharmacol* 2008; 154 (5): 918-39.

SYNTHETIC THROMBOPOIETIN RECEPTOR AGONISTS IN PRIMARY IMMUNE THROMBOPENIA

R. STASI¹, A. NEWLAND²

¹ Department of Haematology, St. George's Hospital, London (United Kingdom). ² Department of Haematology, Royal London Hospital, London (United Kingdom)

Introduction

The acronym ITP stands for primary immune thrombocytopenia (ITP), previously referred to as idiopathic thrombocytopenic purpura. ITP is an acquired autoimmune disorder defined by isolated thrombocytopenia and the exclusion of other causes of thrombocytopenia¹. The clinical manifestations of ITP are highly variable and range from the completely asymptomatic patient to frank haemorrhage from any site, the most serious of which is intracranial². Several issues regarding the optimal treatment of adult patients with chronic ITP remain unresolved. There is very limited evidence based on randomized trials to guide management decisions, and for some patients the morbidity from side effects of therapy may exceed any problems caused by the ITP^{2,3}. At the present time, treatment is considered appropriate for symptomatic patients and for those at significant risk of bleeding^{1,4,7}. Splenectomy is historically the second-line treatment in adults with ITP in whom achieving a safe platelet count with initial prednisone therapy has failed. For those who are refractory or relapse after splenectomy, there is a long list of available approaches⁸. With the possible exception of rituximab⁹, all have modest response rates, and in the case of immunosuppressive agents, an increased risk of infection. Evolving concepts about the mechanisms of the thrombocytopenia in ITP have led to the investigation of thrombopoietic growth factors for the treatment of patients with this disease, and data from clinical trials actually support a role for growth factors

stimulating platelet production in the treatment of this disorder.

Rationale for the use of thrombopoietic agents in ITP

Current treatments for ITP aim at suppressing the production of platelet autoantibodies and/or inhibiting macrophage-mediated destruction of opsonized platelets. However, in several patients the main mechanism of thrombocytopenia may be an impaired platelet production rather than an increased platelet destruction⁸. Studies using indium-111 (111In)-labeled autologous platelets showed considerable heterogeneity in platelet turnover in chronic ITP. Although the platelet lifespan is often markedly decreased, in some patients the lifespan is only mildly reduced; furthermore, platelet turnover (a measure of platelet production) is frequently subnormal. Overall, approximately 40% of patients with ITP had a reduced platelet turnover. In keeping with this finding, autoantibodies against platelet glycoproteins have been shown to interfere with the maturation of megakaryocytes, resulting in reduced platelet production. Furthermore, most ITP megakaryocytes show ultrastructural features of apoptosis or para-apoptosis, and these morphologic changes could be induced in cultured megakaryocytes with ITP plasma. In vitro studies have also shown that antibodies that target the GpIb-IX-V complex may induce thrombocytopenia both by inhibiting megakaryopoiesis, and by inhibiting proplatelet formation. Accordingly, growth factor stimulation of megakaryopoiesis might be expected to increase the platelet count in patients with ITP.

Thrombopoietin receptor agonists

First-generation molecules

Two recombinant thrombopoietins have been used in clinical trials. Recombinant human thrombopoietin (rhTPO), which has a circulatory half-life of 20 to 40 hours, is a glycosylated molecule produced in Chinese hamster ovary (CHO) cells consisting of the full-length, native human amino acid sequence. A number of clinical trials were carried out with a nonglycosylated, truncated form of TPO produced in *Escherichia coli* composed of the first 163 amino acids of the native molecule and chemically coupled to polyethylene glycol (PEG). The recombinant protein, called "megakaryocyte growth and differentiation factor" (MGDF), had important differences compared to native TPO that probably explain its immunogenic potential. When administered subcutaneously to platelet donors, some of the donors

produced antibodies against MGDF that cross-reacted with endogenous TPO, thereby causing severe thrombocytopenia¹⁰. This adverse event led to the discontinuation of clinical research with both MGDF and the full-length form of thrombopoietin. Nevertheless, early reports of the use of pegylated recombinant human MGDF suggested that megacaryocyte stimulation may actually be effective in ameliorating the thrombocytopenia associated with ITP¹¹, which further lent support to the use of second-generation thrombopoietic agents in this disorder.

Second-generation molecules

The theoretical advantage of the second generation thrombopoietic agents is that they bear no structural similarity with native TPO, and should not trigger auto-immune anti-TPO antibodies like PEG-MDGF. These compounds, also referred to as TPO receptor agonists or TPO mimetics, bind and activate the TPO receptor. The molecules for which phase III clinical trials in patients with ITP have been completed are romiplostim, a TPO peptide mimetic, and eltrombopag, a TPO non-peptide receptor agonist (Table 1). Several other second-generation thrombopoietic growth factors are in early stages of development, but the discussion here will focus on the two main agents.

Romiplostim

Romiplostim (formerly AMG 531) is a recombinant protein known as a "peptibody". It is made of 2 disulphide-bonded immunoglobulin IgG1 heavy-chain and kappa light-chain constant regions (Fc fragments) each of which is covalently bound at residue 228 of the heavy chain with 2 identical peptide sequences linked via polyglycine. The carrier Fc component of the molecule binds to the FcRn salvage receptor and undergoes endothelial recirculation, resulting in a substantially longer half-life than the peptide alone. The peptide component binds to the extracellular domains of the human TPO receptor (TPO-R) resulting in its activation.

The efficacy of romiplostim in the treatment of ITP was demonstrated in large multinational placebo-controlled phase III trial conducted over a 24-week period in splenectomized and nonsplenectomized patients. Patients were randomized (2:1) to receive romiplostim or placebo once weekly by subcutaneous (SC) injection over the study period¹². The initial romiplostim dose was 1 µg/kg and subsequent doses were adjusted based on platelet response to achieve target counts of 50×10^9 to $200 \times 10^9/l$. The maximum permitted dose was 15 µg/kg. A total of 125 patients were enrolled in the studies. These patients had severe and

refractory ITP, with baseline platelet counts ranging from 2 to 31 (median 16) $\times 10^9/l$. Almost two-thirds had received at least three previous ITP treatments and almost one-third were receiving concomitant ITP therapy. The median duration of ITP was approximately 8 years in splenectomized and approximately 2 years in nonsplenectomized patients. Romiplostim achieved a durable platelet response in 16 of 42 (38%) splenectomized and 25 of 41 (61%) nonsplenectomized patients. Corresponding figures for the placebo group were 0 of 21 (0%) and 1 of 21 (5%), respectively. Overall, durable or transient (≥ 4 weeks with counts $\geq 50 \times 10^9/l$ without use of rescue medication in the previous 8 weeks) platelet responses were achieved in 88% (36/41) of nonsplenectomized and 79% (33/42) of splenectomized patients treated with romiplostim, compared with only 14% (three of 21) of nonsplenectomized and 0% (0) splenectomized placebo recipients ($p < 0.0001$). Romiplostim treated patients were able to maintain a platelet count of $50 \times 10^9/l$ or more for a mean of 15.2 weeks (nonsplenectomized patients) or 12.3 weeks (splenectomized patients), compared with only 1.3 or 0.2 weeks for placebo recipients. The majority of the romiplostim-treated patients (87%) were able to discontinue concomitant treatments or substantially reduce dosage (by $> 25\%$) compared with only 38% of placebo recipients. Moreover, fewer romiplostim-treated patients required rescue medications compared with placebo recipients (26.2 versus 57.1% of splenectomized and 17.1 versus 61.9% of nonsplenectomized patients). Although adverse events were reported in most patients treated with romiplostim or placebo, most events were mild to moderate and appeared to be related to the underlying disease. Among those treated with romiplostim, there were few serious treatment-related adverse events (increased bone marrow reticulins and arterial embolism were each observed in 1 case) or discontinuations because of adverse events (3 cases). Bleeding events of at least grade 3 severity were more common with placebo than with romiplostim (12 versus 7%). There was no evidence of an increased risk of thromboembolic events during romiplostim treatment: such events were equally uncommon in patients receiving romiplostim or placebo (2.5%). No antibodies against romiplostim or TPO were detected.

Patients on any of the previous romiplostim phase 1 to phase 3 studies have been enrolled in an open-label study of long-term administration of the drug. Data from 142 patients treated for periods of up to 3 years have been reported¹³. Altogether, 87% of patients ($n = 124$) achieved a platelet response ($> 50 \times 10^9/l$ and double the baseline value in the absence of rescue medication in the previous 8 weeks) and, on an average, this response occurred for 67% of the weeks on study in patients who responded. Long-term romiplostim

Table 1. Pharmacological characteristics of AMG 531 and eltrombopag. From Stasi et al.¹¹

	ROMIPLOSTIM*	ELTROMBOPAG**
Chemical structure	Peptibody	Hydrazone organic compound
Molecular weight	29,542 Da	564.6 Da
Mechanism of binding to TPO-R	Similar to endogenous TPO	Different from endogenous TPO
Formulation	Vials for Injection	Capsules
Route of administration	Subcutaneous [†]	Oral
Frequency of administration	Once weekly	Once daily
C ₀ (pg/mL)	2,810 ± 1,170 at 0.3 µg/kg IV 12,900 ± 1,800 at 1.0 µg/kg IV 21,1000 ± 32,000 at 10 µg/kg IV	-
AUC	964 ± 1,310 pg · h/mL at 0.3 µg/kg IV 26,700 ± 19,100 pg · h/mL at 1.0 µg/kg IV 153,0000 ± 260,000 pg · h/mL at 10 µg/kg IV	79.0 µg · hour/mL at 75 mg/day
CL (mL · kg ⁻¹ · h ⁻¹)	754 ± 435 at 0.3 µg/kg IV 63.0 ± 55.7 at 1.0 µg/kg IV 6.69 ± 1.03 at 10 µg/kg IV	NR
V _c (mL/kg)	122 ± 51 at 0.3 µg/kg IV 78.8 ± 10.7 at 1.0 µg/kg IV 48.2 ± 7.4 at 10 µg/kg IV	NR
t _{1/2} (h)	1.50 ± 2.83 at 0.3 µg/kg IV 2.41 ± 1.56 at 1.0 µg/kg IV 13.8 ± 3.9 at 10 µg/kg IV	>12
t _{max} (median)	13 days at 0.3 µg/kg IV 12 days at 1.0 µg/kg IV 15 days at 10 µg/kg IV	15 days at 75 mg/day

* In the phase I study, eligible subjects were randomized in a ratio of 2:1 to receive a single injection of AMG 531 at escalating doses or placebo.

** In the phase I study, subjects received eltrombopag or placebo as oral capsules once daily for 10 days at doses of 5, 10, 20, 30, 50, or 75 mg.

TPO-R = thrombopoietin receptor; TPO = thrombopoietin; IV = intravenous; C₀ = maximum serum concentration at time 0 after IV bolus administration; C_{max} = maximum plasma concentration; AUC = area under serum concentration-time curve; CL = systemic clearance; V_c = central volume of distribution; t_{1/2} = half-life; t_{max} = time when peak platelet count was observed; NR = not reported.

[†] Romiplostim was given intravenously to normal volunteers.

treatment was generally well tolerated and treatment-related serious events occurred in 13 patients (9%). Thromboembolic events occurred in seven (5%) patients, six of whom had pre-existing risk factors such as cardiovascular disease and/or a history of thrombosis. Bone marrow samples were taken from 16 patients: eight patients were found to have presence of increased bone marrow reticulin. Reticulin deposition is often present in the bone marrow of healthy individuals and patients with ITP, and increased reticulin has been observed in patients treated with various TPO mimetics¹². The clinical significance of these findings is unknown, but close monitoring has shown no evidence of progression to collagen fibrosis or clonal myeloproliferative disorder after romiplostim treatment. One patient transiently developed neutralizing antibodies to romiplostim (absent on retesting > 4 months after discontinuation of treatment), but these did not cross-react with endogenous TPO or affect the platelet response.

Eltrombopag

Eltrombopag olamine (formerly SB497115) is a small, orally available, hydrazone organic compound developed by GlaxoSmithKline. In preclinical studies eltrombopag has been shown to stimulate human megakaryocyte differentiation and proliferation in a dose dependent manner and to activate the TPO receptor in human and chimpanzees platelets, but is not active on the rat, mouse, ferret, or cynomolgus monkey TPO receptor. Its activity is therefore species-specific. In vitro experiments suggest that eltrombopag interacts with TPO-R at a distance from the binding site for endogenous TPO and appears to initiate signal transduction by a mechanism different from TPO.

The results of a 6-month, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III study of eltrombopag (RAISE [RAnimized placebocontrolled ITP Study with Eltrombopag]) have been presented at the 2008 Annual Meeting of the American Society of He-

matology (ASH)¹⁴ and a full publication is in progress. RAISE included adult patients with chronic ITP who had platelet counts of $< 30 \times 10^9/l$ and who had been previously treated for ITP. A total of 197 patients were randomized to individualized treatment with eltrombopag (n = 135; initial dosage 50 mg/day, then adjusted according to individual response) or placebo (n = 62). The primary endpoint for RAISE was the odds of responding (i.e., achieving a platelet count of $50\text{-}400 \times 10^9/l$) during the treatment period. Patients who received eltrombopag were 8 times more likely to achieve platelet counts $50 \times 10^9/l$ to $400 \times 10^9/l$ during the 6-month treatment period compared with patients on placebo (OR [95% CI] = 8.2 [4.32, 15.38]; $p < 0.001$). Baseline median platelet counts were $16 \times 10^9/l$ in both groups and never exceeded $30 \times 10^9/l$ in the placebo group. Patients responded to eltrombopag regardless of splenectomy status, use of baseline ITP medications, or baseline platelet counts. Significantly fewer patients treated with eltrombopag had any bleeding (WHO Grades 1-4; $p < 0.001$) or clinically significant bleeding (WHO Grades 2-4; $p < 0.001$) throughout the trial compared with patients treated with placebo. More patients in the eltrombopag group (59%) stopped or dose-reduced their concomitant ITP medications than in the placebo group (32%; $p = 0.016$). Patients in the eltrombopag group (19%) required less rescue therapy compared with the placebo group (40%; $p = 0.001$) during the treatment phase of the study. Eltrombopag also had a positive impact on QOL. Quality of life was evaluated using the following instruments: SF-36v2, a 6-item subset of FACT-thrombocytopenia (FACT-Th), and the fatigue subscale of FACIT-Fatigue. After 6 months, patients receiving eltrombopag had significantly greater improvements from baseline than placebo in physical and emotional role, vitality and overall mental health. Furthermore, eltrombopag recipients had greater improvements from baseline in FACT-Th scores than placebo, indicating statistically and clinically significant benefits in concerns for bleeding and bruising symptoms and physical and social activities. Overall, patients treated with eltrombopag perceived an improved ability to participate in activities of daily living and a reduction in fatigue symptoms.

Eltrombopag was generally well tolerated. The frequency of grade 3-4 adverse events during treatment (eltrombopag, two [3%]; placebo, one [3%]) and adverse events leading to study discontinuation (eltrombopag, three [4%]; placebo, two [5%]), were similar in both groups. Other adverse events that were reported with eltrombopag, but not with placebo, were nausea (8%) and vomiting (5%).

The interim results of an ongoing long-term study (EXTEND [Eltrombopag eXTENDED Dosing]) are available in abstract form¹⁵. EXTEND enrolled patients

with chronic ITP who had previously completed an eltrombopag trial. Patients received individualized dosages (initial dosage 50 mg/day, adjusted to 25-75 mg/day depending on platelet count). A total of 207 patients had valuable data available; median duration of therapy was 91.5 days. In EXTEND, platelet counts of $> 50 \times 10^9/l$ were seen in 79% of eltrombopag patients at least once during the study, and similar results were observed among patients regardless of whether they received concomitant ITP medication at baseline or whether they had undergone a splenectomy.

Potential risks of thrombopoietic agents

Rebound thrombocytopenia, i.e., thrombocytopenia below a patient's baseline level, has been observed in 10% of patients recruited for the trials with romiplostim and eltrombopag when thrombopoietic agents were stopped. This phenomenon is thought to be due to the higher platelet counts during treatment that may have absorbed and thereby suppressed plasma levels of endogenous TPO. Thrombosis may be a potential risk, but clinical trials have not yet observed a difference in either arterial or venous thrombotic events between treatment and placebo groups. Reversible increase of bone marrow reticulin has been observed in a few patients in the clinical trials with romiplostim¹⁶. This also requires patient monitoring and a prospective bone marrow study in a larger number of patients to provide a clearer view of the frequency, reversibility, and clinical consequences of bone marrow changes associated with these new agents in ITP patients. Because TPO promotes the viability of haematopoietic progenitor cells of all lineages and TPO receptors are present in haematologic malignancies, there is the potential risk that thrombopoietic agents may accelerate growth of malignant cells.

Conclusion

The new synthetic thrombopoietin receptor agonists, romiplostim and eltrombopag appear to be a major breakthrough in the management of ITP, as treatment in this condition traditionally has aimed at decreasing platelet destruction. The definitive results of phase III clinical trials investigating romiplostim and eltrombopag unequivocally demonstrate the efficacy of these agents in elevating the platelet count and reducing bleeding events of patients with chronic ITP. Apart from their efficacy both prior to and after splenectomy, these new drugs are appealing for a number of reasons, including the fact that they are not blood products, thereby avoiding the potential risk of infectious diseases, and that unlike most of

the current conventional therapies they are not immunosuppressive. Ongoing maintenance studies will address the long-term efficacy and safety issues and will help define where these agents fits within the current treatment landscape.

References

- George JN, Woolf SH, Raskob GE, Wasser JS, Aledort LM, Ballem PJ, et al. Idiopathic thrombocytopenic purpura: a practice guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology. *Blood* 1996; 88 (1): 3-40.
- Cohen YC, Djulbegovic B, Shama-Lubovitz O, Mozes B. The bleeding risk and natural history of idiopathic thrombocytopenic purpura in patients with persistent low platelet counts. *Arch Intern Med* 2000; 160 (11): 1630-8.
- Portielje JE, Westendorp RG, Kluin-Nelemans HC, Brand A. Morbidity and mortality in adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2001; 97 (9): 2549-54.
- Stasi R, Provan D. Management of immune thrombocytopenic purpura in adults. *Mayo Clin Proc* 2004; 79 (4): 504-22.
- Cines DB, Bussel JB. How I treat idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). *Blood* 2005; 106 (7): 2244-51.
- George JN. Management of patients with refractory immune thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 2006; 4 (8): 1664-72.
- Bussel J. Treatment of immune thrombocytopenic purpura in adults. *Semin Hematol* 2006; 43 (3 Suppl 5): S3-10; discussion S8-9.
- Stasi R, Evangelista ML, Stipa E, Buccisano F, Venditti A, Amadori S. Idiopathic thrombocytopenic purpura: current concepts in pathophysiology and management. *Thromb Haemost* 2008; 99 (1): 4-13.
- Arnold DM, Dentali F, Crowther MA, Meyer RM, Cook RJ, Sigouin C, et al. Systematic review: efficacy and safety of rituximab for adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Ann Intern Med* 2007; 146 (1): 25-33.
- Li J, Yang C, Xia Y, Bertino A, Glaspy J, Roberts M, et al. Thrombocytopenia caused by the development of antibodies to thrombopoietin. *Blood* 2001; 98 (12): 3241-8.
- Stasi R, Evangelista ML, Amadori S. Novel thrombopoietic agents: a review of their use in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Drugs* 2008; 68 (7): 901-12.
- Kuter DJ, Bussel JB, Lyons RM, Pullarkat V, Gernsheimer TB, Senecal FM, et al. Efficacy of romiplostim in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura: a double-blind randomised controlled trial. *Lancet* 2008; 371 (9610): 395-403.
- Bussel JB, Kuter DJ, Pullarkat V, Lyons RM, Guo M, Nichol JL. Safety and efficacy of long-term treatment with romiplostim in thrombocytopenic patients with chronic ITP. *Blood* 2009; 113 (10): 2161-71.
- Bussel JB, Provan D, Shamsi T, Cheng G, Psaila B, Kovaleva L, et al. Effect of eltrombopag on platelet counts and bleeding during treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2009; 373 (9664): 641-8.
- Bussel JB, Cheng G, Saleh MN, Meddeb B, Bailey C, Stone NL, et al. Safety and efficacy of long-term treatment with oral eltrombopag for chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2008 November 16, 2008; 112 (11): 3432.
- Kuter DJ, Mufti GJ, Bain BJ, Hasserjian RP, Davis W, Rutstein M. Evaluation of bone marrow reticulin formation in chronic immune thrombocytopenia (ITP) patients treated with romiplostim. *Blood* 2009 Aug 11.

Avances en leucemia aguda mieloblástica

COORDINADORES: E. ANGUITA. *Madrid*
R. MARTÍNEZ. *Madrid*

Resumen del simposio

En la actualidad, estamos viviendo un momento apasionante de la hematología, ya que por primera vez existe una aplicabilidad en la práctica clínica de los conocimientos científicos básicos en oncohematología. Esto es así en el ámbito del diagnóstico, pronóstico y seguimiento de los pacientes; de hecho, esta revolución comenzó hace ya algunos años en este campo. No obstante, el gran cambio se ha producido en el área terapéutica, en la cual se puede alcanzar una transformación radical en el futuro del tratamiento de los pacientes con leucemia. En el pasado reciente, los tratamientos tenían una base empírica, una gran inespecificidad y, por tanto, una eficacia limitada unida a una toxicidad elevada. El tratamiento de la leucemia aguda mieloblástica (LAM) fue el pionero en el inicio de la ruta hacia una terapéutica específica con el uso del ATRA en la leucemia aguda promielocítica. No obstante, la ciencia continuaba por detrás de la clínica, explicando el efecto del tratamiento más que generándolo. La era que se abre ante nosotros, en la que se empieza a poder realizar un tratamiento basado en los datos biológicos de la enfermedad, requiere un conocimiento de las bases científicas de la patología por el clínico y de la realidad práctica de la clínica por el científico biomédico. La presente sesión trata de dar unas pinceladas que ayuden a iniciar esta conversación conceptual. En primer lugar, se trata del origen de la leucemia, el modelo mejor conocido para entender la aparición de la leucemia aguda es el de las leucemias linfoblásticas infantiles con reordenamiento TEL-AML1. Este modelo permite exportar conocimiento a otras neoplasias y, particularmente, la LAM. A continuación, se introduce la importancia de los factores de transcripción como actores esenciales, junto a los micro-ARN, en la diferenciación normal de las células de la médula ósea y, junto a los oncogenes y antioncogenes, en la aparición de la leucemia. Se introducen, además, los métodos disponibles en el momento actual para modelar estas enfermedades en el laboratorio. Finalmente, se esbozan los tratamientos que están apareciendo en la actualidad, como reflejo de estos conocimientos científicos.

CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKAEMIA. A PARADIGM FOR UNDERSTANDING CARCINOGENESIS

C. LUTZ, T. ENVER

MRC Molecular Haematology Unit.
Weatherall Institute of Molecular Medicine.
John Radcliffe Hospital. Oxford (UK)

Leukaemia represents one of the most common cancers in children with a cumulative risk of 1:2.000 before the age of 15 years. About 85% of all childhood acute leukaemia cases are lymphoblastic. Childhood acute lymphoblastic leukaemias (ALL) are diverse with different phenotypes and underlying mutations⁽¹⁾. While in the 1960s ALLs had a bad prognosis changes in treatment have resulted in current overall survival rates of about 80% in recent years^(2,3). Despite the good response rate the relapse rate remains in the order of 20%. The overall survival also doesn't take into account the toxic side effects, complications and duration of multi-agent therapy (2-3 years) which makes better treatment options a necessity. In recent years childhood ALL has been heavily researched and much has been understood about the underlying molecular mechanisms and cell biology. The results of these studies have implications for disease monitoring and treatment and may provide a paradigm for the understanding of cancer in general.

Frequent mutations of transcription factors in childhood ALL

Childhood acute lymphoblastic leukaemia is a heterogeneous disease consisting of B and T lineage leukaemias. Chromosomal changes are frequently

detected and often involve transcription factors. Table 1 gives an overview of disease distribution and fusion genes involved. The prognosis of these leukaemia subsets varies considerably. Fusion genes containing the MLL gene are frequent in infant leukaemias and are associated with poor prognosis. In contrast childhood leukaemias with hyperdiploid karyotype or harbouring the TEL-AML1 fusion protein are associated with good prognosis and long overall survival. Two characteristics have fuelled research into TEL-AML1 associated ALL. First, TEL-AML1 constitutes the most common genetic abnormality in childhood cancer and second TEL-AML1 is known to be a first hit mutation⁽⁴⁾. Research into TEL-AML1+ ALLs has involved both the analysis of patient material and experimental modelling.

TEL-AML1 pre-leukaemia arises in primitive cells and is hierarchically organized

The fusion event involving TEL and AML1 has been shown to arise *in utero*⁽⁴⁾. Twins sharing the same placenta developed leukaemia from the same leukaemic clone, suggesting that this clone was transmitted *in utero* between the two foetuses⁽⁴⁾. This finding was confirmed by back-tracking the TEL-AML1 translocation in some ALL patients. DNA screening of blood spots on Guthrie cards that were taken postnatally for screening of metabolic diseases showed a positive TEL-AML1 fusion gene in patients that developed leukaemia up to 14 years later. The detection of TEL-AML1 in peripheral CD19+ cells suggests the persistence of a pre-leukaemic clone for more than a decade⁽⁵⁾.

Studies of cord blood from healthy newborns showed the occurrence of the TEL-AML1 translocation in approximately 1% of all children investigated, which equates to 100 times the incidence of TEL-AML1 positive leukaemia⁽⁶⁾. These obser-

Table 1. Main subtypes and chromosome changes in childhood acute lymphoblastic leukaemia

Disease	Frequency %	Chromosome abnormality	Molecular product
T-cell precursor ALL	~15%		
B-cell precursor ALL	~85%		
B-cell subtypes:			
- Hyperdiploid karyotype	~35% of B-cell ALL	Hyperdiploidy	Not known
- TEL-AML1	~25% of B-cell ALL	t(12;21)(p13;q22)	Fused transcription factor
- BCR-ABL	~5% of B-cell ALL	t(9;22)(q34;q11)	Activated kinase
- E2A-PBX1	~5% of B-cell ALL	t(1;19)(q23;p13)	Fused transcription factor
- MLL fusion genes	~5% of B-cell ALL	11q23 translocations	Modified transcription factor
- Other	~25% of B-cell ALL	-	-

vations led to the hypothesis that TEL-AML1 functions as a first mutation.

Insights into the early functions of TEL-AML1 and the cells in which it acts have been provided through analysis of monozygotic twins of which only one child had TEL-AML1+ leukaemia. This child had a B-cell precursor ALL including an abnormal cell compartment with a stem/B phenotype (CD34+, CD38^{-low}, CD19+) which has been described for TEL-AML1+ and BCR-ABL+ leukaemias (Figure 1A)⁽⁷⁾. The healthy twin was haematological normal but had an expanded TEL-AML1+ pre-leukaemic clone in the bone marrow (CD34+, CD38^{-low}, CD19+, CD10-)⁽⁸⁾.

Despite being enlarged this pre-leukaemic clone was very rare at a frequency of 0.002% of total mononuclear cells in the peripheral blood. In order to study these cells in more detail a human disease model was designed making use of lentiviral gene transfer and the NOD/SCID mouse xenotransplantation model. The behaviour of B-cells in this model mirrored the B-cell behaviour of a TEL-AML1 mouse model showing a differentiation block with a relative increase in the proportion of pro-B cells⁽⁹⁾. The expression of TEL-

AML1 in cord blood resulted in a pre-leukaemic clone corresponding to the pre-leukaemic clone (CD34+, CD38^{-low}, CD19+) identified in the non-leukaemic twin⁽⁶⁾. The transduction of a mixture of early B cell and myeloid progenitors (CD34+, CD38+) and pro-B cells (CD34+, CD38+, CD19+) failed in contrast to haematopoietic stem cells (HSCs) to produce the pre-leukaemic clone. This showed a clear cell context dependence of TEL-AML1 function. These pre-leukaemic cells were serially transplantable and therefore termed pre-leukaemic stem cells. An elegant mouse model that studied the pre-leukaemic effects of an inducible TEL-AML1 fusion protein under the control of the endogenous TEL promoter reached similar conclusions. Schindler et al showed that TEL-AML1 is permissive for normal embryonic development and postnatal B-cell maturation. This study also showed a cell context dependent effect of TEL-AML1. Expression of TEL-AML1 in B cell progenitors had no effect on the B-cell development. This was in sharp contrast to the effects on HSCs which induced a complete B-cell developmental block before the common lymphoid progenitor (CLP) level and resulted

in an enlarged HSC compartment. This enlarged HSC compartment can be interpreted as a pre-leukaemic clone that can progress to leukaemia if additional mutations are acquired. More mature cell compartments expressing TEL-AML1 showed no difference in function or size. Another key finding of this study showed that TEL-AML1 expressing fetal liver cells had an increased replating ability which is in line with experimental data from other studies and strengthens the hypothesis of a first hit occurrence in utero^(10,11).

The properties of the modelled pre-leukaemic cell together with clinical evidence for a long-lived pre-leukaemic clone shows its stem

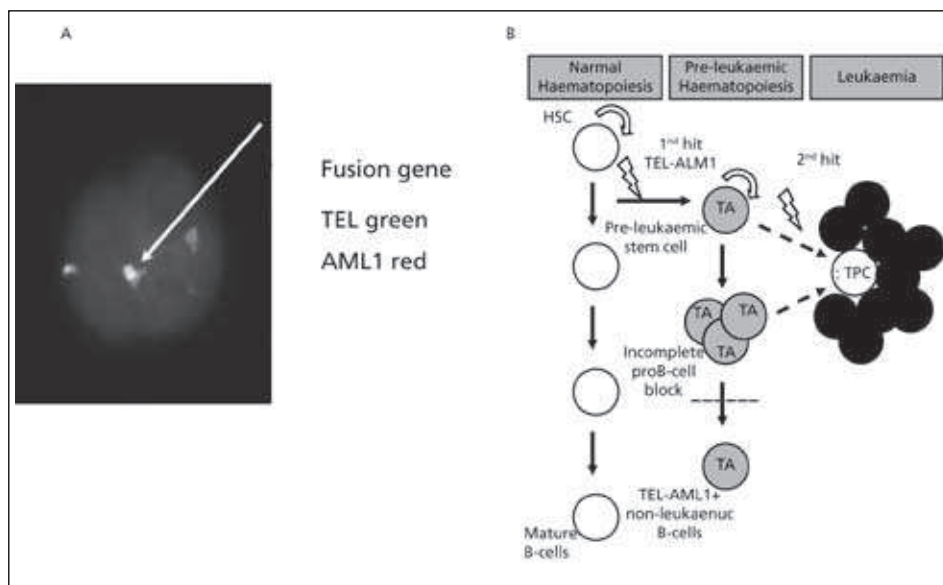


Figure 1. Leukaemia cell and cell hierarchies in t(12;21) associated pre-B ALL. (A) Example of an interphase FISH showing TEL-AML1 expression in a human CD34+, CD38^{-/low}, CD19+ stem/B cell from a patient with TEL-AML1+ ALL. TEL signal, green; AML1, red; TEL-AML1 fusion (green-red) indicated by arrowhead. (B) The cell in which the TEL-AML1 fusion arises as an initiating mutation remains uncertain but probably occurs in a cell which has already undergone DJ rearrangement (Hong et al., 2008). The cell in which the fusion first has biological impact possesses a primitive stem/B phenotype (34+38^{-/low}19+) which is unique to pre-B ALL and not seen in unaffected children (Castor et al. 2005, Hong et al. 2008). This cell has self-renewal capacity and is capable of generating a larger population of more mature cells which are incompletely blocked in further differentiation at the pro-B stage; based on these functional properties it has been termed a pre-leukaemic stem cell or 'pre-LSC' (Hong et al., 2008). These TEL-AML1+ pre-LSC and pro-B-like progeny form a pre-leukaemic pool in which additive mutations may arise to generate leukaemia. Stem/B cells (34+38^{-/low}19+) are thought to be rich in tumour propagating cell (TPC) activity and able to generate and maintain the bulk of the B-precursor leukaemia. The structure of the leukaemic clone is currently an area of debate with some studies pointing towards a hierarchical arranged clone driven by CSC/TPC and others favouring all cells in a clone to have tumour propagating ability.

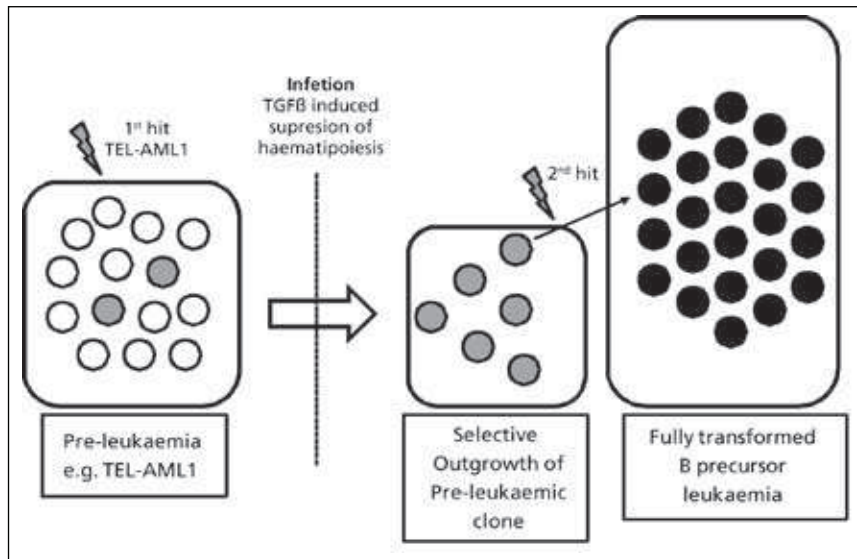


Figure 2. Model of infection induced pre-leukaemia outgrowth. In the event of infection and cytokine induced haematopoietic suppression followed by a regenerative wave of expansion TEL-AML1 induced survival advantages lead to an outgrowth of a pre-leukaemic clone. This enlarged pre-leukaemic clone can then evolve to frank leukaemia by acquiring additional mutations. These 2nd hits (like deletions of the residual TEL allele) are believed to occur either by chance or through the genotoxic influence of an inflammatory milieu of oxidative stress⁽¹²⁾.

cell properties of self-renewal and differentiation. Together these data suggest that leukaemia in the case of TEL-AML1 arises from a hierarchical organized pre-leukaemia with pre-leukaemic stem cells at the top of the hierarchy (Figure 1B). The ability to model the pre-leukaemic phase allows one to explore events that: i) may provide selective advantage for the pre-leukaemic clone and ii) result in its transformation to the frank leukaemic state.

Epidemiological evidence suggests that the pre-leukaemic clone may be promoted by an abnormal response to cytokines produced as a result of infection⁽¹²⁾. It has been shown in a TEL-AML1 over expressing cell line that TEL-AML1 confers resistance to the anti-proliferative effects of TGF β resulting in a competitive growth advantage of an enlarged TEL-AML1 expressing cell population. These observations suggest a mechanism for the immune evasion and evolution of the TEL-AML1+ pre-leukaemic clone⁽¹³⁾ (Figure 2).

Modelling leukaemia as a multi hit process

Modelling leukaemia helps to deepen the understanding of the underlying molecular mechanisms and cell biology of human diseases. Leukaemias have successfully been modelled by using mutations where introduction of a single hit has led to the ultimate transformation^(14,15). MLL fusion genes have been shown to

be particularly potent in generating leukaemia. This may reflect the dysregulation of many regulatory processes within the cell or the imposition of genome instability that leads to the rapid acquisition of additional collaborating mutations^(16,17). In contrast in mutations like TEL-AML1 and AML1-ETO, the experimental introduction of additional hits is required in order to induce leukaemia⁽¹⁸⁻²⁰⁾. Candidate 2nd hits have been identified through the spectrum of mutations in human ALL⁽²¹⁾. These have been used in attempts to model the transition from pre-leukaemia to leukaemia in a step-wise process.

In a mouse model in which TEL-AML1 transduced BM cells lacking the overlapping p16^{INK4a}p19^{ARF} genes were transplanted into wild type

syngeneic mice most animals developed acute leukaemia⁽¹⁸⁾. Interestingly one case was a T-ALL, one case an AML and 4 cases could not be identified due to technical problems. In a knock-in model where TEL-AML1 was expressed under the control of the endogenous TEL-promoter additional N-ethyl-N-nitrosurea (ENU) treatment resulted in T-ALL but not B-precursor ALL as is the case in human TEL-AML1+ ALL⁽¹¹⁾. Attempts to model leukaemia from AML1-ETO+ pre-leukaemia were more successful with additional ENU treatment or the introduction of Flt-3-length mutations resulting in mouse AML resembling many features of the human disease^(19,20).

Given the difficulties associated with experimental generation of leukaemia in human cells, most studies of human leukaemia have been undertaken through transplantation of primary human acute leukaemia samples into immuno-incompetent mice.

Models of leukaemia propagation

In xenotransplantation models, performed mainly using AML samples, it has been shown that only a small leukaemic stem cell population can replenish the pool of leukaemic cells^(22,23). This observation, that cells within a leukaemia are different in terms of their phenotype and function lead to the hypothesis of cancer/leukaemia stem cells. This theory states that tumours are hierarchically organized like the tissues

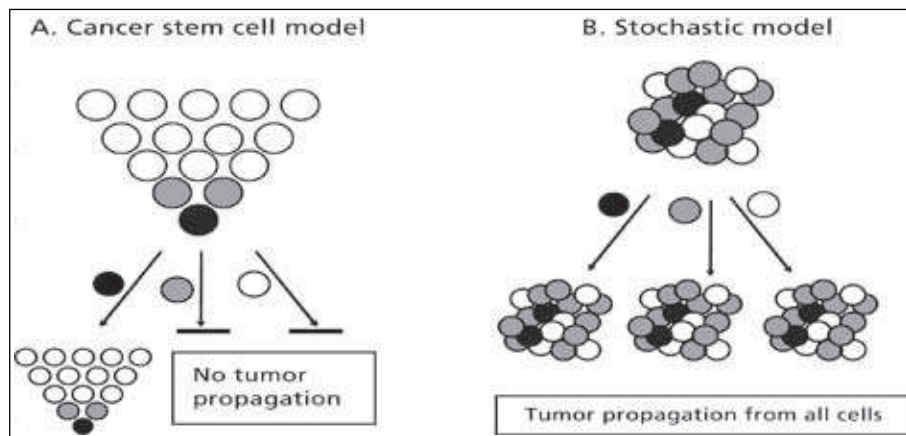


Figure 3. Models of tumour propagation. (A) Tumour cells are phenotypically and functionally heterogeneous but only a subset of these cells can self-renew and propagate tumour growth by the production of more mature progeny. Functionally distinct cancer stem cells can be identified and enriched based on phenotype. (B) The stochastic model suggests that all tumour cells are biologically equivalent. Each cell has a low but equal probability of driving tumour growth that cannot be predicted. Because of that tumour initiating cells can't be enriched by phenotype and cancer therapies need to aim at the bulk of leukaemia⁽²⁴⁾.

from which they derive with a rare and primitive cancer stem cell (CSC) sitting at the hierarchical top of the cellular hierarchy. These CSC are able to replenish the pool of more mature cancer cells as well as undergoing self-renewal and thus these cells are uniquely able to sustain the cancer/leukaemia⁽²⁴⁾ (Figure 3A). An alternative explanation for why not all cancer cells can propagate the tumour is provided by the stochastic model (Figure 3B). There is an ongoing debate about the validity of the CSC paradigm with conflicting data from a newly developed, more immuno-incompetent mouse model for xenotransplantation⁽²⁵⁾. Cancer stem cells of melanoma tumours represent 1 in 837,000 cells when assessed using the classical NOD/SCID xenograft transplantation model, whereas this was reduced to 1 in 4 when the NSG mouse model which additionally lacks NK-cells was used⁽²⁶⁾. In addition the NOD/SCID model is problematic in assessing the leukaemia initiating potential of cells expressing CD38. In the case of AML it is a long standing hypothesis that the leukaemia initiating cells are rare cancer stem cells that reside in the CD34+/CD38-compartment⁽²³⁾. This observation was challenged by the discovery that flow pre-selected CD38+ cells are cleared by the residual immune system of NOD/SCID mice. The use of more immunodeficient mouse strains, an intra-bone route of injection and the administration of intravenous IgG markedly reduced this effect and resulted in leukaemia propagating potential of CD34+/CD38+ cells⁽²⁷⁾. Finally leukaemia initiating potential and serial transplantability have been shown for all leukaemic sub compartments analyzed in cases of NPM+ AML⁽²⁸⁾. At the very least these data suggest that tumour propagating

cells may be less rare than has been thought previously.

Changing hierarchies in leukaemia propagation in childhood ALL

In recent years many groups have reported the identification of leukaemia propagating cells in childhood acute lymphoblastic leukaemia. Most studies reached different conclusions in terms of the identity of these cells. Two studies reported these cells to be 34+, 38^{-low}, 19+ whereas others reported these cells to be more primitive residing within the 34+, 19-compartment^(7,3,29). One study even suggested that leukaemia propagating cells could be detected in all populations investigated⁽³⁰⁾. The observation that pre-leukaemia is organized hierarchically doesn't necessarily imply that this organization needs to be maintained in the fully transformed state. The acquisition of additional mutations during leukemogenesis may alter or eradicate the initial hierarchical structure of the pre-leukaemic clone. High risk ALLs like MLL fusion gene and BCR-ABL positive paediatric pre-B leukaemias were shown to follow a flat organization structure and harbour leukaemia initiating potential in all compartments analyzed⁽³⁰⁻³²⁾. In some studies it has also been shown that even standard risk ALLs display a flat organization with cells from all compartments being able to transplant human leukaemia in a xenotransplantation model⁽³⁰⁾ (Figure 4).

Leukaemia, a dynamic and heterogeneous process

An explanation for the different experimental results obtained from human pre-leukaemia and leukaemia studies could be that the leukaemic state is dynamic. All ALL cases consist of a phenotypically heterogeneous set of leukaemia cells. Whereas the existence of distinct LSCs is still subject of debate it is widely accepted that ALLs are genetically diverse. It has been shown for many B-cell malignancies including CLL and ALL that these diseases consist of genetically heterogeneous subclones^(33,34). The coexistence of several leukaemia subclones has also been shown for AMLs. A

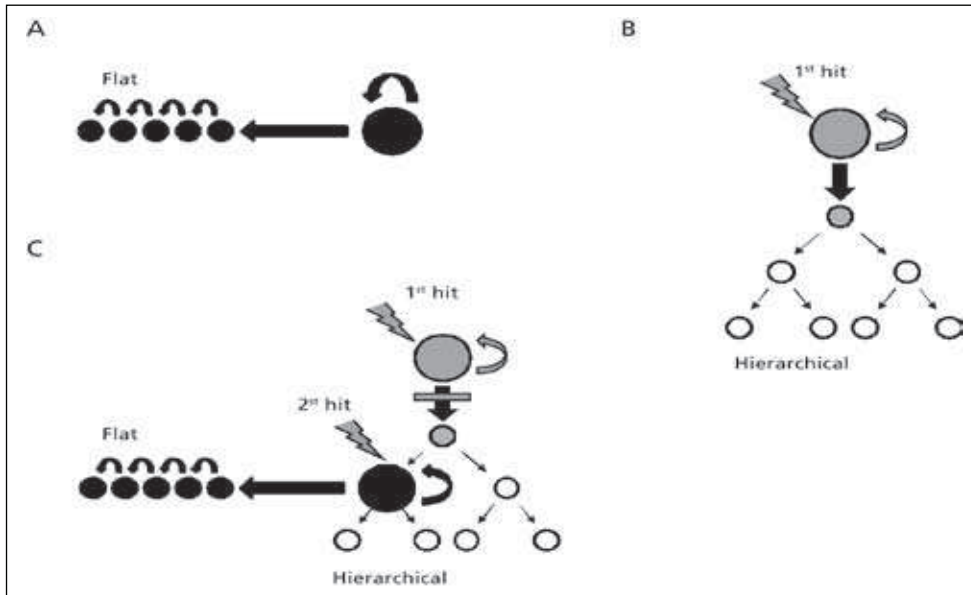


Figure 4. Variation in leukaemia hierarchies. (A) Human acute leukaemias involving MLL fusion genes and other aggressive leukaemias have been shown to follow a flat hierarchy with all cell compartments within the leukaemia being able to propagate tumour growth. (B) For TEL-AML1 induced preleukaemia it has been shown that these are organized hierarchically with only the preleukaemic stem cell being able to self-renew and differentiate. (C) Acquisition of 2nd or multiple hits may corrupt this hierarchy resulting in a flat organization. These 2nd hits can occur at different stages of the established hierarchy imposing self-renewal properties upon different target cells. The extent to which any particular case is hierarchically organized may depend on the nature of the precise underlying mutations and on the cells in which they occurred. This situation is likely to be dynamic as leukaemic clones evolve during the course of disease or in response to therapy.

study by Dick and colleagues showed that several leukaemia stem cell clones exist and are able to drive leukaemia in quaternary serial transplantation⁽²²⁾. A study comparing the copy number variations of matched diagnostic and relapsed ALL samples showed a clear relation of diagnostic and relapse clones. In most cases the relapse driving clone was either a descendant or a descendant of an ancestor of the initial leukaemic clone. Interestingly the relapse driving clone was already present at diagnosis in most cases analyzed⁽³⁴⁾. These data illustrate that leukaemias consist of heterogeneous cell compartments and develop in a dynamic fashion with constantly evolving subclones (Figure 4C).

Different models for different leukaemias

In summary the data reviewed above show that there are significant differences between different leukaemias regarding the nature of mutations and the context in which they occur or function. Taken together these factors would determine the nature of cell hierarchies observed in any given individual. It is therefore problematic to draw general conclusions about ALL without taking the underlying genetics into account. It can be concluded from the available data that ALLs are heterogeneous as a disease group but also

that each ALL contains diverse cell populations. These are phenotypically, genetically and possibly functionally heterogeneous.

Although to date most of these questions have been assessed in experimental models, such as xenotransplantation experiments little is known about ALL behaviour in patients during the course of therapy. Despite big advances in childhood ALL therapy relapse still occurs in about 20% of cases implying that leukaemic cells remain after therapy. This may either represent a therapy resistant and distinct cell compartment or

it could be a mixture of different leukaemic cell types that show no differential chemotherapy response resembling the initial leukaemia (Figure 5). Therefore longitudinal studies that analyze bone marrow samples of patients undergoing treatment are very important for the identification of cell compartments harbouring residual leukaemia cells. Understanding the mechanisms of therapy escape will ultimately help to understand where relapse arises from in ALL but also serve as a model to understand cancer relapse in general.

Acknowledgements

This work was supported by specialist programme grants from the Leukaemia & Lymphoma Research Fund (TE) and a Deutsche Forschungsgemeinschaft fellowship (to CL).

References

1. Kersey JH. Fifty years of studies of the biology and therapy of childhood leukemia. *Blood* 1997; 90: 4243-51.
2. Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2006; 354: 166-78.
3. Silverman LB, Gelber RD, Dalton VK, Asselin BL, Barr RD, Clavell LA, et al. Improved outcome for children with acute

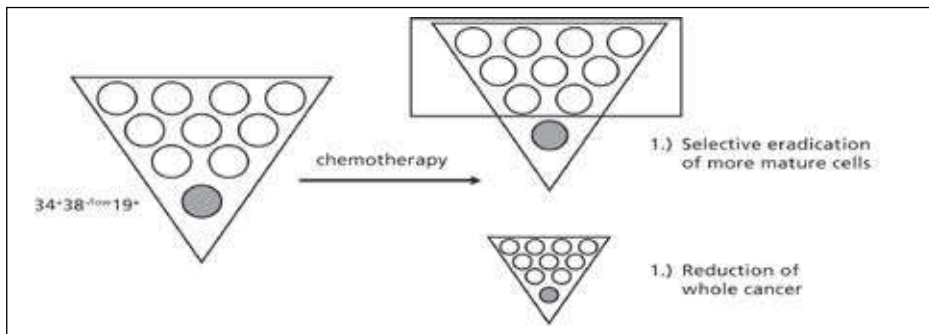


Figure 5. Correlation of cellular hierarchies with disease behaviour. Observations of cell heterogeneity in ALLs were almost exclusively made on diagnostic samples. The analysis of cell compartments during the course of chemotherapy will be helpful in dissecting the functional heterogeneity of childhood ALLs. There could be a 38-/low selective chemotherapy induced kill that leaves out the primitive 34+19+ cell compartment. But it is also possible that there is no preferential kill of cells and the tumour is shrinking proportionally in all compartments. This analysis will not only show functional heterogeneity of different cell compartments but also help identifying where leukaemic relapse is coming from with further implications on therapy.

- lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. *Blood* 2001; 97: 1211-8.
4. Greaves MF, Wiemels J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 639-49.
 5. Gale KB, Ford AM, Repp R, Borkhardt A, Keller C, Eden OB, et al. Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 13950-4.
 6. Mori H, Colman SM, Xiao Z, Ford AM, Healy LE, Donaldson C, et al. Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 8242-7.
 7. Castor A, Nilsson L, Astrand-Grundstrom I, Buitenhuis M, Ramirez C, Anderson K, et al. Distinct patterns of hematopoietic stem cell involvement in acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* 2005; 11: 630-7.
 8. Hong D, Gupta R, Ancliff P, Atzberger A, Brown J, Sonaji S, et al. Initiating and cancer-propagating cells in TEL-AML1-associated childhood leukaemia. *Science* 2008; 319: 336-9.
 9. Tsuzuki S, Seto M, Greaves M, Enver T. Modeling first-hit functions of the t(12;21) TEL-AML1 translocation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 10: 8443-8.
 10. Morrow M, Horton S, Kiousis D, Brady HJ, Williams O. TEL-AML1 promotes development of specific hematopoietic lineages consistent with preleukemic activity. *Blood* 2004; 103: 3890-6.
 11. Schindler JW, Van Buren D, Foudi A, Krejci O, Qin J, Orkin SH, et al. TEL-AML1 corrupts hematopoietic stem cells to persist in the bone marrow and initiate leukaemia. *Cell Stem Cell* 2009; 5: 43-53.
 12. Greaves M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2006; 3: 193-203.
 13. Ford AM, Palmi C, Bueno C, Hong D, Cardus P, Knight D, et al. The TEL-AML1 leukemia fusion gene dysregulates the TGF-beta pathway in early B lineage progenitor cells. *J Clin Invest* 2009; 119: 826-36.
 14. Barabé F, Kennedy JA, Hope KJ, Dick JE. Modeling the initiation and progression of human acute leukemia in mice. *Science* 2007; 316: 600-4.
 15. Krivtsov AV, Twomey D, Feng Z, Stubbs MC, Wang Y, Faber J, et al. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature* 2006; 442: 818-22.
 16. Guenther MG, Lawton LN, Rozovskaia T, Frampton GM, Levine SS, Volkert TL, et al. Aberrant chromatin at genes encoding stem cell regulators in human mixed-lineage leukaemia. *Genes Dev* 2008; 22: 3403-8.
 17. Krivtsov AV, Feng Z, Lemieux ME, Faber J, Vempati S, Sinha AU, et al. H3K79 methylation profiles define murine and human MLL-AF4 leukaemias. *Cancer Cell* 2008; 14: 355-68.
 18. Bernardin F, Yang Y, Cleaves R, Zahurak M, Cheng L, Civin CI et al. TEL-AML1, expressed from t(12;21) in human acute lymphocytic leukemia, induces acute leukemia in mice. *Cancer Res* 2002; 62: 3904-8.
 19. Higuchi M, O'Brien D, Kumaravelu P, Lenny N, Yeoh EJ, Downing JR. Expression of a conditional AML1-ETO oncogene bypasses embryonic lethality and establishes a murine model of human t(8;21) acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2002; 1: 63-74.
 20. Schessl C, Rawat VP, Cusan M, Deshpande A, Kohl TM, Rosten PM, et al. The AML1-ETO fusion gene and the FLT3 length mutation collaborate in inducing acute leukemia in mice. *J Clin Invest* 2005; 115: 2159-68.
 21. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, Dalton JD, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2007; 446: 758-64.
 22. Hope KJ, Jin L, Dick JE. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat Immunol* 2004; 5: 738-43.
 23. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3: 730-7.
 24. Wang JC, Dick JE. Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends Cell Biol* 2005; 15: 494-501.
 25. Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, Gott B, Chen X, Chaleff S, et al. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol* 2005; 174: 6477-89.
 26. Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Johnson TM, Morrison SJ. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* 2008; 456: 593-8.
 27. Taussig DC, Miraki-Moud F, Anjos-Afonso F, Pearce DJ, Allen K, Ridler C, et al. Anti-CD38 antibody-mediated clearance of human repopulating cells masks the heterogeneity of leukemia-initiating cells. *Blood* 2008; 112: 568-75.
 28. Taussig DC, Vargaftig J, Miraki-Moud F, Griessinger E, Sharrock K, Luke T, et al. Leukemia-initiating cells from some acute myeloid leukemia patients with mutated nucleophosmin reside in the CD34(-) fraction. *Blood* 2010; 115: 1976-84.
 29. Cox CV, Evely RS, Oakhill A, Pamphilon DH, Goulden NJ, Blair A. Characterization of acute lymphoblastic leukemia progenitor cells. *Blood* 2008; 104: 2919-25.
 30. Le Viseur C, Hotfilder M, Bomken S, Wilson K, Röttgers S, Schrauder A, et al. In childhood acute lymphoblastic leukaemia

- mia, blasts at different stages of immunophenotypic maturation have stem cell properties. *Cancer Cell* 2008; 14: 47-58.
31. Kong Y, Yoshida S, Saito Y, Doi T, Nagatoshi Y, Fukata M, et al. CD34+CD38+CD19+ as well as CD34+CD38-CD19+ cells are leukemia-initiating cells with self-renewal capacity in human B-precursor ALL. *Leukemia* 2008; 6: 1207-13.
 32. Rehe K, Wilson K, McNeill H, Schrappe M, Irving J, Vormoor J. Disease propagating blasts in standard and high risk acute lymphoblastic leukemia are frequent and of diverse immunophenotype. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2009; 114: 1421.
 33. Campbell PJ, Pleasance ED, Stephens PJ, Dicks E, Rance R, Goodhead I, et al. Subclonal phylogenetic structures in cancer revealed by ultra-deep sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 13081-6.
 34. Mullighan CG, Phillips LA, Su X, Ma J, Miller CB, Shurtleff SA, et al. Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science* 2008; 322: 1377-80.

ALTERACIONES DE LA TRANSCRIPCIÓN

E. ANGUIA MANDLY

Hospital Clínico San Carlos.

Universidad Complutense de Madrid. Weatherall

Institute of Molecular Medicine. Oxford (Reino Unido)

Introducción

El tejido hematopoyético renueva de forma continua las células de la sangre a través del mantenimiento de una población celular pluripotente y de la diferenciación de células progenitoras y precursoras de potencialidad gradualmente más restringida. Este proceso depende en gran medida de los factores de transcripción. La alteración en la expresión de un factor de transcripción por traslocación, mutación, modificaciones del código epigenético, inserción viral, etc., puede bloquear la maduración celular de manera directa o a través de otros factores de transcripción¹. Sin embargo, estas anomalías son, en general, insuficientes para producir leucemia aguda mieloblástica (LAM). Otras alteraciones como las mutaciones de Ras, P53 y c-KIT o la duplicación de FLT3 (FLT3-ITD), otorgan una ventaja proliferativa o de supervivencia a las células hematopoyéticas; son las denominadas mutaciones de clase I, frente a las anteriores, conocidas como de clase II. Datos experimentales, obtenidos en ratones transgénicos, y datos clínicos, procedentes del estudio de muestras de pacientes con LAM, muestran que, de hecho, se requiere la presencia conjunta de ambos tipos de mutaciones para generar una LAM. Estas evidencias han llevado a enunciar un modelo de doble evento para la leucemogénesis. No obstante, algunas alteraciones de los factores de transcripción parecen ser

suficientes para causar LAM, posiblemente por que pueden funcionar como mutaciones de clase I y II simultáneamente. Éste sería el caso de las mutaciones bialélicas de C/EBP α o de AML1-ETO9, como se verá más adelante². Por tanto, los factores de transcripción guían el proceso normal de la hematopoyesis y también condicionan la contrapartida maligna de la misma, por lo que su estudio es determinante para la clasificación, pronóstico y, potencialmente, el tratamiento de la LAM, además de para la comprensión del proceso que da lugar a la leucemia.

Los factores de transcripción en la mielopoyesis normal

En el momento actual está emergiendo una nueva visión de la regulación de la transcripción, según la cual factores de transcripción específicos para un linaje celular activan programas genéticos y, al mismo tiempo, ejercen un efecto inhibitorio sobre otros programas alternativos. Las células madre multipotentes, aquellas que pueden dar lugar a diversas líneas celulares de un tejido, tendrían preactivados distintos programas transcripcionales correspondientes a las líneas celulares a que pueden dar lugar³. Estos programas sufrirían fluctuaciones hasta que uno dominase. Esto se logra gracias al antagonismo cruzado entre factores de transcripción clave, que a su vez son capaces de autorregularse⁴. En el caso del sistema mieloide, el predominio de uno de los factores en conflicto, PU.1 o GATA-1, en el progenitor mieloide común (CMP) daría lugar a la bifurcación en progenitores bipotentes granulocítico/macrofágicos (GMP) y megacariocítico/eritroides (MEP). A su vez, el resultado del antagonismo entre GFI1 y Nab2/ERG en los progenitores granulocítico/macrofágicos y de Fli1 respecto a EKLF en los progenitores megacariocítico/eritroides produciría la aparición de granulocitos, macrófagos, eritrocitos y megacariocitos, respectivamente. Otros pares antagónicos afectan a otras alternativas de diferenciación, como C/EBP β y FOG1 en los precursores megacariocítico/eritroides respecto a los eosinófilos⁵. Estudios recientes han hecho que se replantee esta jerarquía; según éstos, el antagonismo PU.1:GATA-1 se produciría en el precursor multipotente y determinaría la aparición de un progenitor linfoide/mieloide o megacariocítico/eritroide⁶. AF9 (MLLT3) es una proteína reguladora de los cambios iniciales que determinan la diferenciación eritroide y megacariocítica⁷. Un proceso similar determina la jerarquía linfoide, en cuyos progenitores iniciales el desequilibrio entre EBF respecto a PU.1 y C/EBP α puede inclinar la balanza hacia la línea linfoide o hacia el progenitor mieloide común. A su vez, distintos niveles de PU.1 y C/EBP α pueden llevar a la formación de macrófagos o de neutrófilos. También el orden en

que se expresan los factores de transcripción tiene un papel en el resultado del proceso; así, la expresión de C/EBP α seguida de GATA-2 en precursores linfoides comunes origina la aparición de eosinófilos; en cambio, la inversión del orden da lugar a basófilos⁵. Otros factores que conviene citar por su importancia clínica son los determinantes de la aparición de la célula madre hematopoyética fetal, SCL y Runx1 (AML1).

Estos fenómenos son importantes para el hematólogo por dos razones. Por una parte, una aplicación clínica de inmenso futuro de esta red de factores de transcripción es la generación de células madre pluripotentes (aquellas capaces de generar todos los tipos celulares, excepto los del tejido extraembrionario) inducidas (iPS), mediante la transferencia a células diferenciadas adultas de los factores que gobiernan las células madre (Oct4-Nanog-Sox2). Más adelante se podría llegar a reprogramar cualquier tipo celular en otro con fines de terapia regenerativa. Por otro lado, se han descrito anomalías en prácticamente todos los factores de transcripción necesarios para las alternativas de diferenciación de la hematopoyesis. Los más importantes en el ámbito de la LAM se resumen a continuación.

Core Binding Factor (AML1 y CBF β) en el corazón de la patogénesis de la LAM

Los genes que codifican las dos subunidades de CBF (*core binding factor*) son los más frecuentemente afectados por alteraciones cromosómicas en LAM. Están afectados hasta en un 20% de los casos de LAM, que se han denominado "leucemias CBF", las cuales comparten ciertas características clínicas, incluyendo un pronóstico generalmente favorable.

AML1 (RUNX1 o CBF α) es, por sí mismo, el gen más frecuentemente afectado por translocaciones en pacientes con LAM. Es de sobra conocido que la t(8;21)(q22;q22), que aparece en el 30-40% de las LAM-M2, produce la fusión AML1-ETO. Esta proteína quimérica produce un efecto "dominante negativo" sobre AML1 al disminuir la accesibilidad de la cromatina de sus genes diana, disminuyendo la acetilación de las histonas. Además, AML1 se encuentra alterado en pacientes con LAM o con síndrome mielodisplásico (SMD) por diversas translocaciones poco frecuentes, como la t(3;21)(q26;q22), que da lugar al híbrido RUNX1-EVI1; la t(16;21)(q24;q22) que produce el reordenamiento AML1-MTG16; la t(12;21)(q12;q22), AML1-copine VIII; la t(19;21)(q13;q22), AML1-AMP19; t(X;21)(p22.32;q22.1), AML1-FOG2 y t(7;21)(p22;q22), AML1-USP42.

AML1 se ve indirectamente afectado por la inversión del cromosoma 16 inv(16)(q13;q22) y la t(16;16)(q13;q22). Estas alteraciones producen la unión

de MYH11 con la proteína con la que AML1 forma heterodímeros, CBF β , y están presentes hasta en un 12% de las LAM, particularmente LAM-M4Eo.

Aunque los reordenamientos AML1-ETO y CBF β -MYH11 parecen importantes en el desarrollo de la LAM, la persistencia de AML1-ETO en individuos con LAM en remisión y los estudios en ratón sugieren que no son suficientes para causar leucemia sin la presencia de otras mutaciones adicionales. No obstante, se ha demostrado que una forma truncada de AML1-ETO (AML1-ETO9a) es suficiente para producir LAM en ratones y se han encontrado formas similares en células leucémicas humanas⁸.

Además de los reordenamientos con otras proteínas, se han hallado mutaciones puntuales de AML1, especialmente en pacientes con LAM-M0 y SMD/LAM (LAM secundaria a SMD, LAM con displasia multilineal o SMD con exceso de blastos), alcanzando el 10-20% de los casos clasificados como SMD/LAM⁹. En más de la mitad de los casos de LAM-0 en los que aparecen mutaciones de AML1, éstas están presentes en los dos alelos. La mayoría de estas mutaciones producen una pérdida de función de AML1.

Alteraciones de C/EBP α y LAM humana

Como se ha mencionado, las mutaciones de C/EBP α (CCAAT/enhancer binding protein- α) pueden ser determinantes para la aparición de LAM, debido a que, a la importancia que tiene C/EBP α para la diferenciación de la línea mieloide, se suma su papel en la regulación del ciclo celular. Diversos experimentos en ratón apoyan esta afirmación. C/EBP α codifica una proteína de 42 kDa, junto con una forma menor, de 30 kDa, que actúa inhibiendo la isoforma mayor. La eliminación en ratón de la proteína de 42 kDa, preservando la de 30 kDa determina la aparición de LAM. En pacientes con LAM se han detectado mutaciones de C/EBP α entre un 5 y un 14% de los casos, fundamentalmente en M1 y M2 (14 y 14% de las mismas), y con menor frecuencia, en M4 y M5 (3 y 1% de estas LAM). Las mutaciones de C/EBP α se pueden dividir en dos tipos fundamentales. Unas mutaciones producen una terminación prematura de la proteína de 42 kDa, pero no afectan a la de 30 kDa que actúa inhibiendo la proteína completa restante. Un segundo tipo de mutaciones afectan a la unión de C/EBP α al ADN y a su homo- y heterodimerización con otros miembros de la familia C/EBP. En la mayoría de los pacientes con LAM en los que se han encontrado mutaciones de C/EBP α , se ha detectado más de una (72% de los casos). En más del 90% de los casos con más de una mutación, se ha determinado la existencia de una mutación de cada uno de los tipos mencionados, habitualmente cada una en un alelo. Ambas mutaciones, además, se han encontrado en

el momento del diagnóstico y no en recaídas, indicando que son fenómenos relacionados con la patogénesis de la enfermedad y no con su progresión.

Respecto a las características de la LAM asociada a mutaciones de C/EBP α , además de la asociación con los citados tipos de la clasificación FAB, se ha descrito un inmunofenotipo típico (HLA-DR+, CD13+, CD15+, CD33+, CD34+, con el marcador T aberrante CD7+). Además, se han relacionado con un buen pronóstico. Un hecho particularmente interesante, aunque muy infrecuente, es la presencia de mutaciones hereditarias de C/EBP α asociadas a LAM.

Además, se ha encontrado una reducción de la expresión de C/EBP α en ARN en pacientes portadores de la proteína híbrida AML1/ETO y, en algunos casos, de LAM en que se ha constatado la metilación de su promotor. También se han descrito un descenso del nivel de proteína de C/EBP α en los pacientes con LAM portadores de las proteínas híbridas AML1-MDS1-EVI1 y CBF β -MYH11. Por el contrario, la t(14;19)(q32;q13) afecta C/EBP α produciendo un incremento de su expresión que se traduce en leucemia aguda linfoblástica B¹⁰.

PU.1 y LAM

Como cabría esperar por su importancia en la diferenciación de la línea mielóide, la alteración de PU.1 puede conducir a una LAM. Esto se ha demostrado mediante diversos experimentos en animales; en particular, destaca la aparición de LAM en los ratones, en los que se elimina el elemento regulador que se encuentra 5' de PU.1 y que causa una disminución del nivel de expresión de este gen.

En el ser humano se han detectado mutaciones de PU.1 en un 7% de los pacientes con LAM. Estas mutaciones disminuyen la interacción de PU.1 con otras proteínas, como AML1 y c-JUN. Además, la expresión de PU.1 está disminuida en los pacientes portadores de las proteínas híbridas FLT3-ITD y PML-RAR α y AML1-ETO bloquea la actividad de PU.1¹¹.

GFI1, un recién llegado al mundo de la LAM

GFI1 (*growth factor independence 1*) es un factor de transcripción represor. Está claramente establecido que su ausencia en ratón, al igual que mutaciones congénitas humanas, causan neutropenia severa. Sin embargo, no ha sido hasta este mismo año cuando se ha descubierto que una variante de este gen producida por un polimorfismo de una única base del ADN (SNP) se asocia a LAM. Aunque esta variante congénita se encuentra también en individuos normales, es más frecuente entre los pacientes con LAM. Aunque ambas se unen a

AML1-ETO, la forma habitual disminuye su capacidad de represión en presencia de esta proteína híbrida, pero la de la variante asociada a LAM permanece inalterada. Se ha observado que los pacientes en los que se asocian la variante de GFI1 y la t(8;21) tienen peor evolución que el resto de los casos con t(8;21)¹².

EVI1

EVI1 (*ecotropic viral integration 1*) está afectado en los casos de LAM con anomalías de 3q26 (aproximadamente un 1% de las LAM). Además, la expresión de EVI1 está incrementada en un 5-10% de las LAM sin alteraciones de 3q26. En ambos casos, la alteración de la expresión de EVI1 se asocia a un pronóstico muy desfavorable.

AF9, “la pareja más mielóide de MLL”

Los reordenamientos del gen MLL ocurren tan sólo en aproximadamente el 3% de las LAM, si bien su importancia radica en el mal pronóstico al que se asocian. Estos reordenamientos ocurren fundamentalmente en los subtipos de la clasificación FAB M4, M5a y M5b, en los que aparecen en el 5, 33 y 16% de los casos, respectivamente. El gen con el que se reordena MLL con mayor frecuencia en la LAM (35%) es AF9, también conocido como MLLT3. AF9 forma una proteína quimérica con MLL como consecuencia de la traslocación t(9;21)(p22;q23)¹³. La proteína quimérica resultante retiene los dominios de unión al ADN (AT-hooks) y metiltransferasa de MLL. Este último realiza la metilación de la histona H3 en la lisina 4. Esta marca de la cromatina se correlaciona con la activación de la transcripción. MLL-AF9 contiene, además, el dominio transactivador de AF9. El papel de este reordenamiento en oncohematología ha sido demostrado en ratón, ya que la expresión MLL-AF9 en células madre hematopoyéticas o progenitores granulomonocíticos murinos genera un síndrome mieloproliferativo.

La leucemia megacarioblástica del síndrome de Down y GATA-1

La incidencia de leucemia megacarioblástica en el seno del síndrome de Down es 500 veces superior a la de la población general. Además, entre el 4 y el 10% de los bebés con Down presentan la enfermedad mieloproliferativa transitoria (TMD), un síndrome preleucémico autolimitado que se ve abocado a leucemia megacarioblástica en el 20% de los casos en el lapso de 4 años. La característica molecular común a ambos procesos es la presencia de mutaciones del factor de

transcripción GATA-1, ya sean deleciones, inserciones o mutaciones puntuales, en el exón 2. Estas mutaciones impiden la expresión de la proteína completa, dando lugar, en cambio, a una isoforma acortada de ésta, conocida como GATA-1s. No obstante, se han descrito mutaciones similares en ausencia de trisomía 21, que no determinan la aparición de leucemia. Por tanto, ambos eventos, trisomía 21 y mutación de GATA-1, parecen ser necesarios para la aparición de estas enfermedades. Unos cuantos genes son potentes candidatos para ser responsables del papel de la trisomía 21, principalmente los factores de transcripción ERG, ETS2, GABPA y AML1. Obviamente, su intervención no tiene por qué considerarse excluyente. También algunos genes que codifican micro-ARN podrían intervenir en el efecto que causa el cromosoma 21 extra. Por otra parte, se han descrito diversas mutaciones de clase I en estos pacientes, en genes como Jak3, Jak2, FLT3 y TP53¹⁴.

ERG, un oncogén megacariocítico

ERG (*Ets-related gene*) está reordenado en los casos de leucemia megacarioblástica con t(16;21), formando el gen híbrido TLS-ERG. Además, existe un subgrupo de leucemias con cariotipo complejo en las que la expresión de ERG está incrementada y los casos con citogenética normal en los que ERG está aumentado se han relacionado con un mal pronóstico. Recientemente, se ha demostrado que ERG se comporta como un oncogén en el ratón y que colabora con GATA-1s en inmortalizar progenitores megacariocíticos, por lo que la copia adicional de ERG debida a la trisomía 21 es probable que represente un papel en la génesis de la leucemia megacarioblástica del síndrome de Down¹⁵.

Modelos de enfermedad

Hemos resumido los datos más interesantes que se conocen hasta el momento sobre el papel de los factores de transcripción en LAM. Como se ha indicado, una posible causa, difícilmente detectable, que puede alterar la expresión o función de un factor de transcripción es la presencia de mutaciones puntuales. Nosotros hemos utilizado con éxito dHPLC (Wave, Transgenomic) para

la búsqueda de mutaciones puntuales. Este método tiene la ventaja de permitir detectar anomalías presentes en un clon minoritario de la enfermedad o hallarlas en los casos en que junto a las células patológicas exista un porcentaje elevado de células normales¹⁶.

Tras encontrar anomalías en las muestras de pacientes con leucemia, un problema al que nos enfrentamos es el establecimiento de una relación causal entre la alteración molecular y la patología a la que se asocia. El estudio de múltiples casos sanos y enfermos ayuda a fortalecer la asociación, pero no la establece, ni permite conocer el proceso por el que la alteración causaría la enfermedad. Los modelos animales, especialmente murinos, son de ayuda para este fin; no obstante, los procesos fisiológicos y patológicos entre humano y ratón son tan diversos que a menudo los resultados son insuficientes o confusos. En la actualidad se están desarrollando técnicas de transfección mediante lentivirus de secuencias de ADN a células madre de cordón umbilical humano¹⁷. Este sistema se ha utilizado con éxito para transfectar genes reordenados humanos relacionados con leucemia aguda. Nosotros hemos empleado lentivirus para transfectar genes mutados o en su forma "silvestre" a células procedentes de unidades de aféresis movilizadas con G-CSF. Las células se seleccionaron con un anticuerpo anti-CD34, se expandieron *in vitro* y se infectaron con los virus correspondientes que expresan la proteína verde fluorescente (GFP), lo cual permite la posterior selección de las células portadoras del transgén mediante *cell sorting*. A continuación, se puede estudiar el efecto causado en la capacidad de diferenciación de estas células en distintos momentos. Para ello, hemos realizado cultivos a largo plazo (*long-term culture-initiating cells*, LTC-IC) que

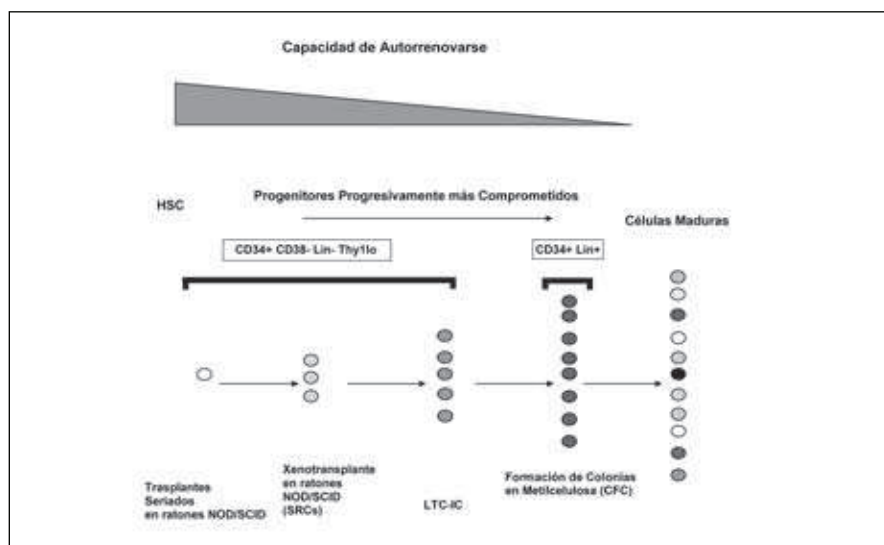


Figura 1. Estudios en células madre y progenitores hematopoyéticos. HSC: célula madre hematopoyética.

permiten conocer la capacidad diferenciadora de los progenitores hematopoyéticos más inmaduros, ensayos de colonias en medio semisólido, para estudiar progenitores más maduros, o estudios de diferenciación específica hacia las líneas eritroide o granulocítica. Dichas células pueden ser también trasplantadas en ratones con inmunodeficiencia severa combinada/diabéticos no obesos (NOD/SCID) y estudiadas después (Figura 1). Esta tecnología puede ayudar a solventar el problema señalado, al permitir estudio *in vivo* con identidad de especie.

Bibliografía

- Cantor AB, Orkin SH. Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene* 2002; 21: 3368-76.
- Komeno Y, Kitaura J, Kitamura T. Molecular basis of myelodysplastic syndromes: lessons from animal models. *J Cell Physiol* 2009; 219: 529-34.
- Anguita E, Hughes J, Heyworth C, Blobel GA, Wood WG, Higgs DR. Globin gene activation during hemopoiesis is driven by protein complexes nucleated by GATA-1 and GATA-2. *EMBO J* 2004; 23: 2841-52.
- Anguita E, Villegas A, Iborra F, Hernández A. Gfi1b controls its own expression binding to multiple sites. *Haematologica* 2010; 95: 36-46.
- Enver T, Graf T. Forcing cells to change lineages. *Nature* 2009; 462: 587-93.
- Laslo P, Pongubala JMR, Lancki DW, Singh H. Gene regulatory networks directing myeloid and lymphoid cell fates within the immune system. *Sem Immunol* 2008; 20: 228-35.
- Pina C, May G, Soneji S, Hong D, Enver T. MLLT3 regulates early human erythroid and megakaryocytic cell fate. *Cell Stem Cell* 2008; 2: 264-73.
- Müller AMS, Duque J, Shizuru JA, Lübbert M. Complementing mutations in core binding factor leukemias: from mouse models to clinical applications. *Oncogene* 2008; 27: 5759-73.
- Harada Y, Harada H. Molecular pathways mediating MDS/AML with focus on AML/RUNX1 point mutations. *J Cell Physiol* 2009; 220: 16-20.
- Pabst T, Mueller BU. Complexity of C/EBPA dysregulation in human acute myeloid leukemia. *Clin Can Res* 2009; 15: 5303-7.
- Kastner P, Chan S. PU.1: A crucial and versatile player in hematopoiesis and leukemia. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 22-7.
- Khandanpour C, Thiede C, Valk PJ, Sharif-Askari E, et al. A variant allele of Growth Factor Independence 1 (GFI1) is associated with acute myeloid leukemia. *Blood* 2010; 115: 2462-72.
- Schoch C, Schnittger S, Klaus M, Kern W, Hiddemann W, Haferlach T. AML with 11q23/MLL abnormalities as defined by the WHO classification: incidence, partner chromosomes, FAB subtype, age distribution, and prognostic impact in an unselected series of 1897 cytogenetically analyzed AML cases. *Blood* 2003; 102: 2395-402.
- Malinge S, Izraeli S, Crispino JD. Insights into the manifestations, outcomes, and mechanisms of leukemigenesis in Down Syndrome. *Blood* 2009; 113: 2619-28.
- Salek-Ardakani S, Smooha G, De Boer J, et al. ERG is a megakaryocytic oncogene. *Cancer Res* 2009; 69: 4665-73.
- Hernández A, Villegas A, Anguita E. Human promoter mutations unveil Oct-1 and GATA-1 opposite action on Gfi1b regulation. *Ann Hematol* 2010; 89: 759-65.
- Gupta R, Hong D, Iborra F, Sarno S, Enver T. NOV (CCN3) functions as a regulator of human hematopoietic stem or progenitor cells. *Science* 2007; 316 (5824): 590-3.

DE LA BIOLOGÍA AL TRATAMIENTO DE LA LEUCEMIA AGUDA MIELOBLÁSTICA

J. SERRANO, J. SERRANO-LÓPEZ, J. SÁNCHEZ, A. TORRES

Servicio de Hematología.

Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba

Introducción

La leucemia aguda mieloblástica (LAM) es una enfermedad clonal y muy heterogénea, cuyo manejo está cambiando, a tenor de los importantes avances acaecidos en las tres últimas décadas en la caracterización genética y molecular de la enfermedad. Hasta el momento, se han descrito más de 200 alteraciones genéticas subyacentes, con reconocida implicación en la patogénesis y relevancia pronóstica muchas de ellas. Esto ha llevado a la OMS en la clasificación 2008 de neoplasias mieloides, al reconocimiento de entidades clínico-biológicas independientes con marcadores genético-moleculares específicos¹.

El modelo de leucemogénesis vigente en la actualidad considera a la LAM una enfermedad multifactorial y secuencial. Deben concurrir alteraciones genéticas/mutaciones en al menos dos genes, las cuales cooperarían entre sí, dando lugar al fenotipo maligno. Las traslocaciones cromosómicas que implican a genes que codifican factores de transcripción (Core Binding Factor, RAR α , MLL), así como las mutaciones que ocurren en reguladores de los complejos de transcripción (mutaciones CEBPA, RUNX1, NPM1), actúan como complejos represores negativos, produciendo un silencio transcripcional de los genes implicados en la diferenciación y maduración de células hematopoyéticas (mutaciones/oncogenes clase II). Sin embargo, dichos oncogenes, por sí mismos, no son suficientes para producir LAM en experimentos en ratones, sino que requieren la cooperación de los llamados oncogenes clase I implicados en la regulación del ciclo celular, proliferación e inhibición de la apoptosis, por estimulación de receptores tirosininasas como FLT3, RAS o c-Kit².

La caracterización molecular no sólo permite una clasificación más detallada y redefinición del pronós-

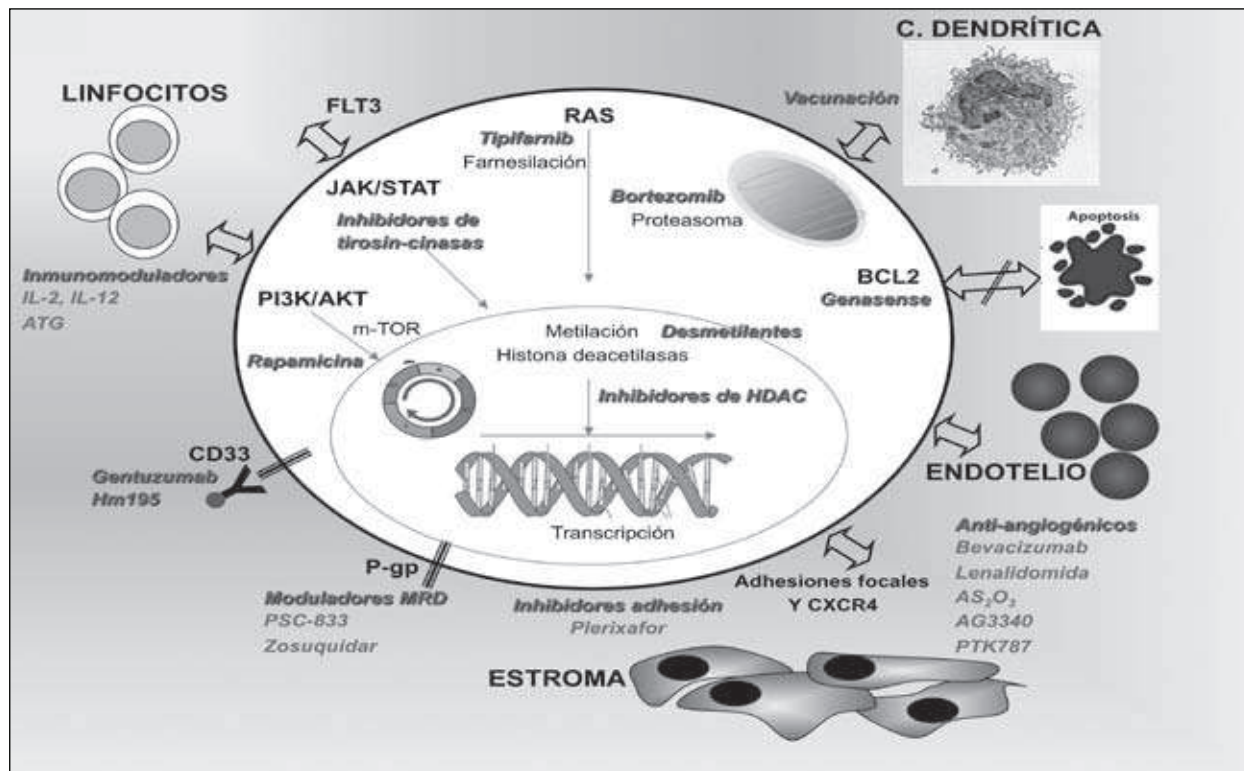


Figura 1.

tico en un mayor número de pacientes, sino que facilita la optimización de los tratamientos disponibles y su uso de forma más individualizada³, proporcionando además las bases para el desarrollo de nuevas terapias dirigidas contra las dianas moleculares que participan en la leucemogénesis⁴ (Figura 1).

Junto a las alteraciones genéticas, recientemente se ha puesto de manifiesto la importancia de los mecanismos epigenéticos en la LAM, como la hipermetilación de regiones promotoras de genes, deacetilación de histonas y regulación de micro-ARN en la expresión de genes y traducción a proteínas. Estos hallazgos han justificado al empleo de tratamiento hipometilante, sólo o asociado a inhibidores de histonas deacetilasas (HDAC). Asimismo, la evidencia del papel de la neovascularización en la proliferación celular de la LAM sienta las bases del uso de fármacos antiangiogénicos en su tratamiento, al igual que los inhibidores de la adhesión al estroma, de la ruta m-TOR y del proteosoma, implicados en la supervivencia celular y apoptosis de las células de la LAM⁵.

Por otra parte, el desarrollo de nuevos fármacos citotóxicos, como la clofarabina, elacitarabina, amonafide o partenolide, constituyen también estrategias válidas⁶, así como el empleo de anticuerpos monoclonales como anti-CD33 (gentuzumab ozogamicina, GO) y de moduladores de la resistencia multidrogas (Tabla 1).

Inhibidores proliferación: Inh. Señales de transmisión

Inhibidores de las proteín-cinasas

Son fundamentalmente inhibidores tirosín-cinasas o serín-treonín-cinasas. FLT3 pertenece a la familia de receptores tirosín-cinasa clase III y desempeña un papel importante en la proliferación y diferenciación hematopoyética, expresándose tanto en progenitores hematopoyéticos normales como en los blastos de LAM. La inhibición de FLT3 es de particular interés, ya que múltiples estudios han demostrado que las mutaciones que se traducen en la duplicación interna en tándem (DIT-FLT3) del receptor se asocian a mal pronóstico, en pacientes con cariotipo normal⁷. Debido al impacto negativo de dichas mutaciones, se han ensayado o están en curso ensayos clínicos con inhibidores del gen FLT3^{2,5-6}: PKC-412 (midostaurín), CEP-701 (lestaurtinib), MLN-518 (tandutinib), SU11248 (sunitinib), AC220 (Ambit) y Bay 43-9006 (sorafenib), los cuales inactivan también otras tirosín-cinasas (c-Kit, VEGF, PDGFR, ABL, etc.), produciendo un bloqueo en la proliferación e induciendo apoptosis. Los ensayos en fase I-II con estos fármacos, administrados vía oral, proporcionan sólo respuestas transitorias con disminución de blastos en médula ósea y/o sangre periférica^{8,9}, lo que ha llevado a ensayos en combinación con quimio-

Tabla 1. Nuevas terapias en leucemia aguda

<i>Mecanismo</i>	<i>Agente</i>	<i>Diana</i>
A) Inhibidores proliferación: Inhibidores señales transmisión:		
- Inhibidores farnesil-transferasa	Tipifarnib	RAS
- Inhibidores tirosín-cinasas	Midostaurín/lestaurinib tandutinib, sunitinib, AC220, sorafenib inhibidores aurora-cinasa	FLT3 C-KIT, ABL, JAK-2 Aurora-A, B, C
- Inhibidores M-TOR	Rapamicina, everolimus tensirolimus	m-TOR
B) Promotores diferenciación:		
- DNA hipometilantes	5-azacitidina/decitabin	Metiltransferasas de ADN
- Inhibidores histona-deacetilasa	Fenilbutirato Ácido valproico Vorinostat Panobinostat	HDAC
- Inhibidores proteosomas	Bortezomib Partenolide	NF-kB
- Agentes diferenciadores	ATRA	Receptor ATRA
C) Inductores apoptosis		
	Genasense Bortezomib Plerixafor	BCL-2 NF-kB CXCR4
D) Agentes antiangiogénesis		
	Bevacizumab Lenalidomida	VEGF
E) Moduladores resistencia-drogas		
	PSC-833 Zosuquidar	MRD (P-gp)
F) Citotóxicos:		
- Alquilantes - Inhibidores topoisomerasa - Análogos nucleósidos	Cloretazida Amonafide Clofarabina, Sapacitabina Elacitarabina	
G) Inmunoterapia:		
- Antígenos conocidos: - anti-CD33 - anti-receptor GM-CSF - Antígenos desconocidos: - Estimulación sistema inmune - Vacunación células dendríticas - Vacunación peptídica - Transferencia linfocitos T	Gentuzumab	CD33

rapia. Destaca un estudio multicéntrico internacional (RATIFY) en el que participan, entre otros, CALGB y los grupos españoles PETHEMA y CETLAM, que

compara quimioterapia intensiva con/sin PKC-412. Sin embargo, ni la asociación de quimioterapia intensiva con midostaurín en pacientes < 60 años con LAM

en primera línea¹⁰, ni con lestaurtinib en un estudio aleatorizado¹¹, en pacientes con mutaciones FLT3 en LAM en primera recaída, han mostrado diferencias ni en tasa de RC ni de SG.

También se comunicaron en la reunión ASH 2009 resultados preliminares con otros inhibidores de cinasas, aún en fase temprana de investigación, como sora-fenib⁵, el cual muestra actividad en ensayos en pacientes con LAM DTI-FLT3 rec/ref, tanto en monoterapia como en combinación con quimioterapia, y el estudio de escalada de dosis de AC220 de Cortes *et al.*¹², el cual muestra mayor actividad en pacientes con DTI-FLT3. También los inhibidores JAK2, MEK-cinasa, aurora-cinasas y cinasas dependientes de ciclinas (CDK) se muestran como fármacos seguros y en fases de desarrollo clínico.

Inhibidores de farnesil-transferasa

Las mutaciones de los genes RAS, que se ha demostrado que representan un papel importante en la leucemogénesis, están presentes en un 10-15% de pacientes con LAM y, a pesar de no tener impacto pronóstico, pueden constituir una potencial diana terapéutica. Tipifarnib es uno de los fármacos de este grupo, el cual actúa inhibiendo la farnesilación de la proteína RAS y perturbando su ruta de señalización intracelular. Los resultados obtenidos en estudios fase I-II, tanto en ancianos como en enfermedad avanzada, sentaron las bases para la puesta en marcha de estudios aleatorizados. Recientemente, se han comunicado los resultados de un estudio comparativo de tipifarnib frente al mejor tratamiento de soporte en pacientes > 70 años con LAM *de novo*, con tasa de RC del 8%, sin diferencias en SG en los dos grupos del estudio¹³. La asociación con bortezomib y en otro estudio con etopósido oral en pacientes mayores y frágiles se ha mostrado segura y puede ser una opción terapéutica⁵.

Inhibidores de mTOR

La ruta de señalización intracelular PI3K/AKT es crucial en la regulación de algunos procesos celulares, como metabolismo, proliferación y apoptosis celular. Su activación constitutiva se ha implicado en la patogénesis de varias neoplasias incluida la LAM. Nuestro grupo ha demostrado en una serie de 82 pacientes con LAM, así como en líneas celulares, que la activación de la vía PI3K/AKT conduce a una localización citoplásmica de la survivina (proteína de la familia de inhibidores de apoptosis, IAPs) en su forma *wild-type* predominantemente. Todo ello provoca un estado proliferativo aumentado con disminución de la fracción celular quiescente y, por tanto, supone un factor pronós-

tico favorable en los pacientes tratados ($p = 0,002$)¹⁴. La diana de la rapamicina en mamíferos (mTOR) es una serín-treonín-cinasa localizada por debajo de PI3K/AKT, cuya actividad se inhibe específicamente por la rapamicina, incluyendo células *stem* leucémicas. Así, en un estudio piloto de 23 pacientes, la rapamicina indujo respuestas clínicas en cuatro de nueve pacientes con LAM¹⁵. Existen análogos de la rapamicina actualmente en investigación con propiedades farmacológicas más favorables, como tensirolimus o everolimus, con eficacia en LAM solos o en combinación¹⁶.

Promotores de diferenciación celular

ADN hipometilantes

La metilación del ADN y otros eventos epigenéticos son de gran importancia en las neoplasias hematológicas. Por ello resulta de gran importancia disponer de agentes hipometilantes del ADN.

La decitabina es un análogo de las pirimidinas que, una vez incorporado al ADN, inhibe de manera irreversible las metiltransferasas del ADN, lo cual conduce a la hipometilación de los promotores de los genes supresores de tumores, a la activación de estos genes supresores y a la diferenciación celular o apoptosis. Varios estudios concluyen que la decitabina puede inducir respuestas en dosis bajas en pacientes con LAM refractaria. La asociación de decitabina con inhibidores de HDAC, como ácido valproico, ha tenido unos resultados discordantes en pacientes de edad avanzada y leucemia de alto riesgo⁶. Por su parte, la combinación con GO ha mostrado resultados similares a los obtenidos por éste como agente único.

La 5-azacitidina es otro agente desmetilante de estructura similar a la decitabina, administrado vía subcutánea o intravenosa a dosis de 75 mg/m²/día, 7 días. Un estudio fundamental, recientemente publicado, el ensayo internacional en fase III AZA-001, donde se incluyeron 358 pacientes con mielodisplasia de alto riesgo, entre los cuales 113 (32%) con LAM según los nuevos criterios de la OMS (20-30%). Un total de 179 pacientes se asignaron a azacitidina y otros 179 a tratamiento convencional, que incluyó medidas de soporte sólo, citarabina a dosis bajas o quimioterapia intensiva según decisión del investigador. El análisis se efectuó por intención de tratamiento. Después de una mediana de seguimiento de 21 meses, la probabilidad de SG a los 2 años fue del 50,8% en el grupo de Aza vs. 26,2% en el convencional ($p < 0,0001$). De los 106 pacientes con LAM evaluables, con una mediana de edad de 70 años, 53 recibieron una mediana de 8 ciclos de Aza y 53 tratamiento convencional; la mediana de supervivencia en el primer grupo fue de 24,4 meses y del segundo de 15,9 meses ($p = 0,005$)¹⁷. Sin embargo, la

actividad y los resultados son inferiores en pacientes con enfermedad recaída/refractaria.

Por otra parte, el grupo de MD Anderson ha ensayado una formulación oral de 5-azacitidina, cuya biodisponibilidad osciló entre el 5 y el 35%. De una serie de 45 pacientes con SMD, LAM o LMMC, se comunicaron recientemente los resultados de 14 de ellos que recibieron al menos 6 ciclos de 5-Aza oral. En este grupo la tasa de RC fue del 29% y 43% tuvieron enfermedad estable¹⁸.

Inhibidores de histonas deacetilasas

La deacetilación aberrante de las histonas tiene un papel en la leucemogénesis al bloquear la transcripción y la diferenciación celular. Los inhibidores de HDAC pretenden restaurar la acetilación normal. Se han investigado en estudios fase I-II, una gran variedad de inhibidores tales como el ácido valproico, vorinostat y panobinostat. Este último agente tiene además efecto sinérgico *in vitro* con la doxorubicina. Por su parte, vorinostat ha mostrado sinergia en ensayos tipo I-II con idarubicina y ara-C, así como con hipometilantes con tasas de respuestas muy esperanzadoras, en torno al 80%⁵.

Inhibición del NFκB

Las células de LAM más inmaduras (células *stem* leucémicas) presentan una activación constitutiva de NFκB. Por ello su inhibición, que produciría apoptosis, puede ser una buena estrategia para eliminar dichas células leucémicas. Los principales agentes estudiados para inhibir NFκB son bortezomib y partenolide.

Diversos estudios han mostrado actividad antileucémica del bortezomib, así como un efecto sinérgico *in vitro* con inhibidores de HDAC. Un estudio en fase II promovido en España ha combinado FLAG-Ida con bortezomib en pacientes con LAM rec/ref. Otro ensayo ha asociado bortezomib con azacitidina con un 21% de respuestas en LAM rec/ref¹⁹.

El partenolide, una sesquiterpenolactona derivada de plantas es un potente inhibidor de NFκB con actividad antitumoral. Actualmente, se hallan en curso estudios en fase I-II en la LMA.

Agentes diferenciadores

El ácido *all-trans*retinoico (ATRA) revolucionó el tratamiento de la LAP por su efecto sobre la diana molecular PML/RAR-alfa al actuar induciendo diferenciación celular. Posteriormente, se han realizado ensayos para valorar este efecto en otras LAM con resultados

disparos, aunque se ha sugerido que los pacientes con NMP1 mutada, en ausencia de DIT-FLT3, también se benefician del ATRA.

Inductores apoptosis

Oligonucleótido anti-Bcl-2

Se ha demostrado que la sobreexpresión de Bcl-2 en LAM conlleva un mal pronóstico y una resistencia a la apoptosis. El oligonucleótido antisentido Bcl-2, Genasense, ha mostrado *in vitro* sensibilización de líneas celulares de LAM a la quimioterapia. Así, estudios fase I mostraron tasas de RC del 45% en ancianos asociado a quimioterapia y, como rescate, 8 de los 20 pacientes tratados respondieron, lo cual ha llevado a la puesta en marcha de diversos estudios fase III^{2,6}.

Inhibidores de la adhesión al estroma

Las células de LAM a través de la adhesión al estroma originan señales de supervivencia celular e inhibición de apoptosis. Por ello, la inhibición de esta adhesión facilitaría la muerte celular. El receptor CXCR4 está directamente implicado en el anclaje de las células hematopoyéticas al estroma medular. Plerixafor es un Ac-anti-CXCR4 empleado en la movilización de progenitores hematopoyéticos a sangre periférica en pacientes que fracasaron con otras pautas. Ha demostrado también su efecto sobre la supervivencia celular por inhibición de la adhesión al estroma, lo cual ha justificado su empleo con la intención de sensibilizar las células LAM al efecto de la quimioterapia. En este sentido, los grupos PETHEMA y CETLAM han promovido un protocolo de rescate con FLA-Ida primado con plerixafor.

Agentes antiangiogénicos

La angiogénesis representa un papel crucial en el crecimiento y la diseminación tumoral. Los pacientes con LAM muestran un aumento de la microvascularización en biopsias óseas comparado con biopsias normales; además, las células LAM expresan factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el cual estimula el crecimiento y la proliferación leucémica, y su sobreexpresión empeora el pronóstico. Así, recientemente se ha demostrado en líneas celulares de LAM y en muestras de pacientes, que la adición de un inhibidor del receptor VEGF a idarubicina es más eficaz que la quimioterapia sola²⁰. En estudios fase II en LAM recidiva/refractaria se ha empleado el Ac-anti-VEGF (bevacizumab) asociado a quimioterapia con 33% de RC.

La lenalidomida es un antiangiogénico muy eficaz en pacientes con mieloma y con síndrome 5q-, habiéndose investigado también en SMD de alto riesgo y LAM con 5q-. Más recientemente, se ha utilizado también en LAM con cariotipo distinto a 5q-. Los resultados iniciales, tanto con dosis de 10 mg/día como de 50 mg/día, fueron desalentadores, mejorando la tasa de respuestas tras combinación con ara-C y daunorubicina²¹. Se han observado también remisiones completas citogenéticas en pacientes LAM con trisomía 13 aislada²². Recientemente, lenalidomida se ha utilizado para tratar leucemias agudas en recidiva tras trasplante alogénico. En un estudio fase I, se emplearon dosis que oscilaron desde 25 a 75 mg/día. La dosis finalmente recomendada fue de 50 mg/día. Se obtuvo RC en 5 de 31 pacientes tratados (16%). Sobre la base de estos datos que demuestran su aplicabilidad posttrasplante, en la actualidad se promueve el empleo de lenalidomida en este contexto como mantenimiento.

Moduladores resistencia multidrogas

La glicoproteína P (P-gp) es una proteína de expulsión celular de fármacos codificada por el gen de resistencia múltiple a drogas (MRD-1). Este gen es selectivo para antraciclinas y epidofilotoxinas. La ciclosporina y sus derivados inhiben parcialmente la acción de la P-gp, por lo que se han empleado junto a quimioterapia con objeto de aumentar la citotoxicidad y aumentar la tasa de RC. Los resultados no han sido en general favorables, y por ello se investiga un nuevo compuesto, el zosuquidar, el cual no requiere reducir la dosis durante la quimioterapia⁶.

Citotóxicos

Agentes alquilantes

La cloretazina (laromustina) es un nuevo alquilante activo en LAM. En ensayos fase III en pacientes con LAM en primera recaída, la tasa de RC fue más alta en el grupo de tratamiento combinado cloretazina más citarabina frente a citarabina-placebo, aunque con mayor toxicidad²³, por lo que se investigan dosis inferiores. Recientemente, la cloretazina se ha utilizado como monoterapia en primera línea en pacientes de alto riesgo y mayores 60 años²⁴, con tasas de respuesta del 32%.

Inhibidores topoisomerasa II

El amonafide es un agente intercalante del ADN que, a diferencia de los inhibidores clásicos de topoisome-

rasa II, es ATP-independiente y no es un sustrato para P-gp. Un ensayo en fase II confirmó su actividad en LAM secundarias con tasa de RC del 42%, asociado a ara-C²⁵. Estos resultados fundamentan el ensayo fase III en curso, que compara amonafide y ara-C vs. daunorubicina y ara-C en pacientes con LAM secundarias (estudio ACCEDE).

Análogos de nucleósidos

La clofarabina es un nuevo análogo de las purinas capaz de inhibir la síntesis de ADN y que actúa como inhibidor tanto de ribonucleótido-reductasa como de ADN-polimerasa, con actividad también sobre la *stem* leucémica. Es activo en pacientes con LAM en primera recaída/refractaria. En ASH 2009, se comunicaron resultados de ensayos fases I y II en pacientes de edad avanzada en primera línea, con tasas de RC > 30%. También se han realizado estudios fase II de clofarabina en combinación con otros agentes, incluyendo tanto ara-C como GO⁵, con una tasa de respuestas globales del 60% tras tratamiento de inducción en pacientes mayores con clofarabina 20 mg/m² i.v. × 5 días asociado a citarabina. Datos similares presenta el estudio comparativo de clofarabina sola y asociada a citarabina a dosis bajas en pacientes mayores en primera línea con diferencias significativas a favor del tratamiento combinado (63 vs. 31%)²⁶. Además, un ensayo en monoterapia también en pacientes > 60 años y factores pronósticos desfavorables²⁷ muestra una tasa de respuestas globales del 46%. Por su parte, en nuestro país, PETHEMA y CETLAM promueven un ensayo fase II en primera línea en pacientes mayores no candidatos a quimioterapia intensiva.

Recientemente, se han publicado también resultados con la formulación oral de clofarabina en SMD alto riesgo²⁸.

Otros análogos de los nucleósidos en fase de investigación son la sapacitabina y elacitarabina, con datos actualmente en ancianos con enfermedad refractaria o en recaída⁵.

Inmunoterapia

Anticuerpos monoclonales: Ac-anti-CD33

El 90% de las células de LAM, así como los precursores hematopoyéticos normales expresan el antígeno CD33. Gentuzumab ozogamicina es un anticuerpo monoclonal humanizado anti-CD33, unido a un potente citotóxico, la caliqueamicina. Los estudios en pacientes mayores en recaída mostraron una tasa aceptable de respuestas. Dichos hallazgos han llevado a diversos grupos cooperativos a poner en marcha en-

sayos fase III para analizar el impacto de GO junto a quimioterapia intensiva, tanto en inducción como en consolidación. El grupo MRC (AML 15) ha mostrado un impacto positivo del GO²⁹, no en las tasas de RC, sino en la SG y SLE a los 3 años (51 vs. 40%, $p = 0,008$), aunque solamente en pacientes de riesgo intermedio. Sin embargo, hasta el momento el estudio SWOG SO106, (que aleatoriza GO en tratamiento de inducción y en mantenimiento) no ha mostrado beneficio, y siguen en marcha ensayos de PETHEMA, EORTC, HOVON y ECOG, entre otros grupos.

Estimulación del sistema inmune: vacunación peptídica o vacunación con células dendríticas

En los últimos años, los esfuerzos en la línea de inmunoterapia en LAM se basan en la identificación de péptidos específicos leucémicos (PRAME, PR3; survivina, WT-1), capaces de ser reconocidos por linfocitos T tras la inyección subcutánea en forma de vacunas peptídicas. Alternativamente, el uso de células dendríticas con objeto de conseguir una óptima presentación antigénica de dichos antígenos leucémicos constituye otra opción terapéutica potencialmente más efectiva. En este sentido, nuestro grupo ha demostrado que los productos de aféresis obtenidos de pacientes con LAM en remisión completa contienen, además de progenitores hematopoyéticos para autotrasplante, un número suficiente de precursores mieloides de células dendríticas de origen no leucémico que pueden ser empleados para optimizar una estrategia de vacunación postrasplante⁵⁰.

Conclusiones

Los avances en el conocimiento de la biología de la LAM ponen de manifiesto la heterogeneidad y complejidad de la misma. La integración de los hallazgos moleculares contribuye no sólo a una mejor caracterización de la enfermedad y a su categorización pronóstica, sino que ha permitido identificar dianas terapéuticas específicas. El desarrollo de nuevos fármacos dirigidos a modificar y corregir la fisiopatología celular, los cuales están actualmente en desarrollo clínico, su combinación con agentes clásicos y la individualización del tratamiento parece conducir a una mejora en los resultados a medio plazo en la LAM. Ofrecen además la posibilidad de tratamiento a pacientes mayores, de riesgo desfavorable o con comorbilidades, considerados hasta el momento no candidatos a tratamiento intensivo y se empiezan a cuestionar conceptos tan arraigados, como la necesidad de alcanzar remisión completa para mejorar la supervivencia.

Bibliografía

- Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009; 114 (5): 937-51.
- Lowenberg B. Acute myeloid leukemia: the challenge of capturing disease variety. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2008: 1-11.
- Döhner H, Estey EH, Amadori S, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European Leukemia Net. *Blood* 2010; 115: 453-74.
- Torres A, García-Castellanos JM, Serrano J, et al. Leucemias agudas. *Medicine* 10ª serie. Elsevier. p. 1390-401.
- Zhu X, Ma Y, Liu D. Novel agents and regimens for acute myeloid leukemia: 2009 ASH annual meeting highlights. *J Hematol Oncol* 2010; 3: 17.
- 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: 33-8.
- Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2008; 358: 1909-18.
- DeAngelo DJ, Stone RM, Heaney ML, Nimer SD, Paquette RL, Klisovic RB, et al. Phase 1 clinical results with tandutinib (MLN518), a novel FLT3 antagonist, in patients with acute myelogenous leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome: safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Blood* 2006; 108 (12): 3674-81.
- Stone RM, DeAngelo DJ, Klimek V, Galinsky I, Estey E, Nimer SD, et al. Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. *Blood* 2005; 105 (1): 54-60.
- Stone RM, Fischer T, Paquette R, Schiller G, Schiffer CA, Ehninger G, et al. A phase 1b study of midostaurin (PKC412) in combination with daunorubicin and cytarabine induction and high-dose cytarabine consolidation in patients under age 61 with newly diagnosed de novo acute myeloid leukemia: overall survival of patients whose blasts have FLT3 mutations is similar to those with wild-type FLT3. *Blood* 2009. Abstract 634.
- Levis M, Ravandi F, Wang ES, Baer MR, Perl A, Coutre S, et al. Results from a randomized trial of salvage chemotherapy followed by lestaurtinib for FLT3 mutant AML patients in first relapse. *Blood* 2009; 114 Abstract 788.
- Cortes J, Foran J, Ghirdaladze D, DeVetten M, Zodelava M, Holman P, et al. AC220, a potent, selective, second generation FLT3 receptor tyrosine kinase (RTK) inhibitor, in a first-in-human (FIH) phase 1 AML study. *Blood* 2009; 114 Abstract 636.
- Karp JE, Flatten K, Feldman EJ, Greer JM, Loegering DA, Ricklis RM, et al. 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 (20): 4841-52.
- Serrano J, Serrano-López J, Sánchez-García J, Herrera C, Torres A. Analysis of the PI3K/AKT/Survivin pathway in acute myeloid leukemia. *Blood* 2009, 114: Abstract No 2645.
- Recher C, Beyne-Rauzy O, Demur C, Chicanne G, Dos Santos C, et al. Antileukemic activity of rapamycin in acute myeloid leukemia. *Blood* 2005; 105: 2527-34.
- Perl AE, Kasner MT, Tsai DE, Vogl DT, Loren AW, Schuster SJ, et al. A phase I study of the mammalian target of rapamycin inhibitor sirolimus and MEC chemotherapy in relapsed and refractory acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res* 2009; 15 (21): 6732-9.

17. Fenaux P, Mufti GJ, Hellström-Lindberg E, Santini V, Gattermann N, Germing U, et al. Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2010; 28 (4): 562-9.
18. García-Manero G, Gore SD, Skikne B, Cogle CR, Ning Y, MacBeth KJ, et al. A phase 1, open-label, dose-escalation study to evaluate the safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of oral azacitidine in patients with myelodysplastic syndromes (MDS) or acute myelogenous leukemia (AML). *Blood* 2009; 114, Abstract 117.
19. Blum W, Klisovic RB, Walker A, Garzon R, Liu S, Schaaf LJ, et al. Epigenetic targeting via transcriptional inhibition of DNA methyltransferase: a phase I study of bortezomib in combination with 5-azacytidine in adults with relapsed or refractory AML. *Blood* 2009; 114: abstract No.2065.
20. Barbarroja N, Torres LA, Luque MJ, Carretero RM, Valverde-Estapa A, López-Sánchez LM, et al. 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 (6): 679-91.
21. Ades L, Stamatoullas A, Raffoux E, Prebet T, Lenain P, Guieze R, et al. Lenalidomide (LEN) combined to intensive chemotherapy (IC) in AML and higher risk MDS with del 5q. Interim results of a phase I/II Study. *Blood* 2009; 114: abstract No.1049.
22. Fehniger TA, Byrd JC, Marcucci G, Abboud CN, Kefauver C, Payton JE, Vij R, Blum W. Single-agent lenalidomide induces complete remission of AML in patients with isolated trisomy 13. *Blood* 2009; 113 (5): 1002-5.
23. Giles F, Vey N, DeAngelo D, Seiter K, Stock W, Stuart R, et al. Phase 3 randomized, placebo-controlled, double-blind study of high-dose continuous infusion cytarabine alone or with laromustine (VNP40101M) in patients with acute myeloid leukemia in first relapse. *Blood* 2009; 114 (19): 4027-33.
24. Schiller GJ, O'Brien SM, Pigneux A, Deangelo DJ, Vey N, Kell J, et al. Single-agent laromustine, a novel alkylating agent, has significant activity in older patients with previously untreated poor-risk acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2010; 28 (5): 815-21.
25. Erba HP, O'Donnell M, Allen SL, Baer MR, Powell BL, Stone RM, et al. Amonafide L-malate (AS1413) in combination with cytarabine is equally effective in older and younger patients with secondary AML; final data from a Phase II study. *Blood* 2009, 114: abstract No.1047.
26. Burnett AK, Russell NH, Kell J, Dennis M, Milligan D, Paolini S, et al. European development of clofarabine as treatment for older patients with acute myeloid leukemia considered unsuitable for intensive chemotherapy. *J Clin Oncol* 2010 Apr 12. [Epub ahead of print].
27. Kantarjian HM, Erba HP, Claxton D, Arellano M, Lyons RM, Kovascovics T, et al. Phase II study of clofarabine monotherapy in previously untreated older adults with acute myeloid leukemia and unfavorable prognostic factors. *J Clin Oncol* 2010; 28 (4): 549-55.
28. Faderl S, García-Manero G, Estrov Z, Ravandi F, Borthakur G, Cortes JE, et al. Oral clofarabine in the treatment of patients with higher-risk myelodysplastic syndrome. *J Clin Oncol* 2010. [Epub ahead of print].
29. Burnett AK, Hills RK, Milligan D, Hunte AE, et al. Attempts to optimize induction and consolidation chemotherapy in patients with acute myeloid leukaemia: results of the MRC AML15 Trial. *Blood* 2009, 114: abstract No.1049.
30. Sánchez J, Herrera C, Torres A, Román-Gómez J, Álvarez MA. Chemotherapy plus G-CSF mobilized peripheral blood stem cells harvests from acute myeloblastic leukemia patients contain large amounts of polyclonal myeloid linneg cd11cpos dendritic precursors cells. *Br J Haematol* 2004; 124: 636-44.

Coagulopatías congénitas

COORDINADORES: F.J. BATLLE. *A Coruña*
J.F. LUCÍA. *Zaragoza*

Resumen del simposio

Este simposio pretende resaltar el importante valor de la cooperación nacional e internacional en coagulopatías congénitas, siendo indispensable que se expongan los últimos datos más relevantes de los diferentes grupos de trabajo.

En una primera intervención, el Prof. Augusto B. Federici, del Centro Angelo Bianchi Bonomi Hemophilia Thrombosis Center de Milán, presenta algunos de los datos más relevantes obtenidos por el European Group on von Willebrand disease (VWD), tanto a través del proyecto “Molecular and clinical markers in the diagnosis and treatment of type 1 VWD (MCMDM-1VWD)” ya finalizado, así como también el proyecto actualmente en desarrollo denominado “Molecular and clinical markers in the diagnosis of type 3 VWD”. Los resultados del primero han supuesto un cambio importante en la concepción de el tipo 1 de EVW. Así, hasta ahora era considerado como el más frecuente, aunque probablemente no lo sea por cuanto que en él se han venido incluyendo numerosos pacientes con alteraciones moleculares más propias de otros tipos de EVW. El segundo proyecto tiene un especial interés por la escasa frecuencia del tipo 3 de EVW, así como por la gravedad y trascendencia clínica del mismo. Pretende incluir el mayor número posible de pacientes de Europa y compararlos con los estudiados en Irán, país en el que existe una elevada prevalencia de este tipo de EVW, consecuencia de la existencia de frecuente consanguinidad. En él se realizará un extenso estudio molecular y se investigarán las bases moleculares del desarrollo de aloanticuerpos en algunos de estos pacientes.

La segunda presentación aborda el proyecto español del estudio epidemiológico y registro de la EVW en nuestro país, cuya particularidad consiste en la inclusión de pacientes a los que, además del estudio local realizado en cada centro, se les realizará un estudio centralizado con el objeto de homogeneizar mejor el diagnóstico de los mismos. Este aspecto es clave si se tiene en cuenta la complejidad del diagnóstico de la EVW y de parte de la metodología que se emplea a tal fin. Este proyecto se acaba de iniciar en octubre de 2010 y pretende generar una plataforma de pacientes armónicamente diagnosticados a los que además se les ofrezca la posibilidad de participar en estudios internacionales, como el del tipo 3 de EVW propuesto por el Dr. Federici.

En una tercera intervención, titulada “Avances en la profilaxis de la hemofilia en España”, el Dr. José Félix Lucía, del Servicio de Hematología del Hospital Miguel Servet de Zaragoza, señala los resultados más relevantes y recientes obtenidos en el seno del proyecto de trabajo SETH “Profilaxis en hemofilia”. Entre otros aspectos, resalta la necesidad de analizar las causas por las que no se alcanza en nuestro país un porcentaje de profilaxis primaria más elevado en niños o de secundaria en adultos.

La última ponencia, “Actualización de la profilaxis primaria en hemofilia e inhibidores”, expuesta por Carmen Altisent, de la Unitat d’Hemofilia del Hospital Vall d’Hebrón de Barcelona, y M.^a Fernanda López Fernández, del CHU A Coruña, resume los datos más relevantes obtenidos en el proyecto de trabajo SETH dedicado a este problema. En ella destacan el aspecto francamente novedoso y todavía no bien explicado del valor de la profilaxis empleando el factor VIIa recombinante en pacientes con hemofilia e inhibidor.

Aun cuando el desarrollo de estos grupos/proyectos de trabajo se inició no hace muchos años, sin duda algunos de los resultados que se exponen en este simposio demuestran el gran interés de los mismos y de todos sus participantes, haciendo posible una mayor y mejor investigación de las coagulopatías congénitas en España, de la que los pacientes son los primeros en beneficiarse, además de lograr un mayor reconocimiento internacional.

NEW INSIGHTS INTO INHERITED VON WILLEBRAND DISEASE

A.B. FEDERICI

*Division of Hematology and Transfusion Medicine.
L. Sacco University Hospital. Department of Internal
Medicine. University of Milan. Italy*

Introduction

Von Willebrand disease (VWD) is the most common inherited bleeding disorder and is due to quantitative or qualitative defects of von Willebrand factor (VWF). VWD is inherited by autosomal dominant or recessive patterns, but women with mild forms are more symptomatic¹. In population-based studies, the prevalence of VWD is very high (0.81%)¹, but the clinical relevance of many of these cases is uncertain. Considering patients referred for clinical manifestations of bleeding, the actual prevalence is 66-100 cases per million of the general population^{1,2}. The most updated classification of VWD has proposed six different types: VWD1, VWD3, VWD2A, VWD2B, VWD2M, VWD2N¹. Correct classification of different types by clinical and laboratory parameters is important for management of patients with VWD^{1,2}.

Clinical and laboratory diagnosis

Three main criteria are required for correct diagnoses of VWD: a) positive bleeding history since childhood; b) reduced VWF activity in plasma; c) history of bleeding in the family with autosomal dominant or recessive inheritance. The clinical and laboratory versus molecular markers useful for VWD diagnosis and classification are listed in Table 1: the dynamic use of these markers is shown in a flow-chart (Figure 1). The diagnosis of mild VWD forms, particularly VWD1, may require several laboratory tests to be repeated in different occasions. Evidence-based diagnosis of VWD1 has been recently proposed according to these three criteria as published³.

• *Clinical markers:* clinical manifestations are excessive mucocutaneous bleeding and pro-

longed oozing after surgical procedures. In women menorrhagia may be the only clinical manifestation. Soft tissue and joint bleeding are rare, except in patients with VWD3, characterized by severe deficiencies of VWF and FVIII. The clinical expression of the disease is usually mild in most patients with VWD1 and VWD2N, whereas severity increases in VWD2M, VWD2B, VWD2A and particularly in VWD3. Generally, the severity of bleeding correlates with the degree of reduction of VWF:RCo and FVIII. Several attempts have been recently made to evaluate sensitivity and specificity of bleeding symptoms, especially in the mild cases with VWD1 characterized by VWF:RCo levels >20U/dL. A bleeding severity score (BSS) has been analyzed in affected and non-affected members of 154 families enrolled prospectively in a large European study on VWD1⁴. Despite the fact that this BSS was investigated prospectively in VWD1, this approach can be useful in all VWD, as recently reported in another prospective study⁵.

• *Laboratory markers:* differently from hemophilia A that requires for diagnosis only two parameters, namely the prolonged partial thromboplastin time (PTT) with low levels of FVIII, several laboratory tests should be performed to diagnose VWD types (Table 1). Among these tests to be performed sequentially as first and second levels (Figure 1), the ristocetin cofactor activity (VWF:RCo) explores the interaction of VWF with the platelet GPIIb/IIIa and is still the standard method for measuring VWF activity. VWF:RCo is based on the property of the antibiotic ristocetin to agglutinate

Tabla 1. Clinical and laboratory versus molecular markers used for VWD diagnosis

<p>I. Clinical markers for VWD</p> <ul style="list-style-type: none"> - Clinical history: lifelong mucocutaneous and postoperative bleeding, to be collected with appropriate questionnaires to calculate the Bleeding Severity Score (BSS) - Family history positive for bleeding and/or other affected VWD
<p>II. Laboratory markers for correct diagnosis of VWD types</p> <ul style="list-style-type: none"> - First level: <ul style="list-style-type: none"> VWF: ristocetin cofactor activity [a] VWF antigen [b] Factor VIII [c] Ristocetin Induced Platelet Agglutination (RIPA) [d] VWF:RCo/Ag [e] and FVIII/VWF:Ag [f] - Second level: <ul style="list-style-type: none"> VWF multimeric structure on low and high resolution gels [g] VWF pro-peptide [h] measured as ratio with VWF antigen (VWFpp/VWF:Ag) Infusion test [i] with desmopressin (DDAVP) Factor VIII binding assay [l]
<p>III. Molecular markers for diagnosis confirmation of VWD</p> <ul style="list-style-type: none"> - Search for large deletion in VWD3 - Search for mutations clustered within specific VWF domains: <ul style="list-style-type: none"> D2-D3-C2-A2-CK (VWD2A); D3 (VWD1/2M Vicenza) D'-D3 (VWD2N) A1 (VWD2B and VWD2M)

For the use of these tests see the diagnostic flow-chart reported in Figure 1.

formalin-fixed normal platelets in the presence of VWF. This method is specific for VWF abnormalities but it is not very sensitive (values < 6 U/dL not reliable) and not always reproducible (CV inter- and intra assay 8-15%). Among several other methods developed more recently, the novel ELISA VWF:RCo assays using recombinant or plasma-derived GPIb offers increased (as low as < 1 U/dL) sensitivity and lower (5-8%) CV⁶. VWF antigen (VWF:Ag) is a very sensitive assay when it is measured by ELISA test: VWF:Ag is undetectable in VWD3, is reduced in VWD1 and can be normal in most VWD2A, VWD2B, VWD2M, VWD2N. In the past VWD1 was reported to be the most frequent form of VWD, accounting for approximately 70% of cases. A reappraisal of VWD diagnoses after 10 years (1998-2008) in 1,234 Italian patients showed only 671/1234 (55%) patients with VWD1, because many cases previously diagnosed as VWD1 were re-diagnosed VWD2A or VWD2M due to discrepant VWF:RCo/Ag ratio². The presence of qualitative defects of VWF in previously diagnosed VWD1 has been also reported in 154 families evaluated prospectively by the European Study⁷: in this European cohort of patients the VWF:RCo/Ag ratio < 0.6 was predictive of structural abnormalities and of mutations within specific regions of VWF gene: therefore we have introduced the cut-off level of 0.6 for the VWF:RCo/Ag ratio in this updated flow-chart (Figure 1). The pro-coagulant activity of factor VIII (FVIII) is usually very low (<10 U/dL) in patients with VWD3 who are characterized by undetectable levels of VWF:Ag. In patients with VWD2A, VWD2B, VWD2M, FVIII is normal in most cases. VWF is the carrier of FVIII and therefore in normal individuals both proteins can be found in equal amounts in circulation as FVIII/VWF complex

with a ratio equal to 1. The FVIII/VWF:Ag ratio can also be a useful laboratory marker, because such a ratio is >1 in VWD1 and <1 in VWD2N². Ristocetin-induced platelet agglutination (RIPA) is measured by mixing in the aggregometer different concentrations of ristocetin and patient platelet rich-plasma (PRP). Results are expressed as the concentrations of ristocetin (mg/ml) able to induce 30% agglutination. Most VWD types show a low response to ristocetin (>1.2 mg/ml of ristocetin concentration), but an important exception is VWD2B, in which there is hyper-responsiveness to ristocetin (<0.8 mg/ml), due to a higher than normal affinity of VWF for platelet GPIb⁵. Normal VWF is composed of a complex series of multimers with molecular weight ranging from 800 to 20,000 kiloDaltons (kDa), which can be analyzed by agarose gel electrophoresis. Low-resolution agarose gels distinguish VWF multimers, which are conventionally indicated as high, intermediate and low molecular weight. In VWD1, VWD2M and VWD2N all multimers are present, whereas in

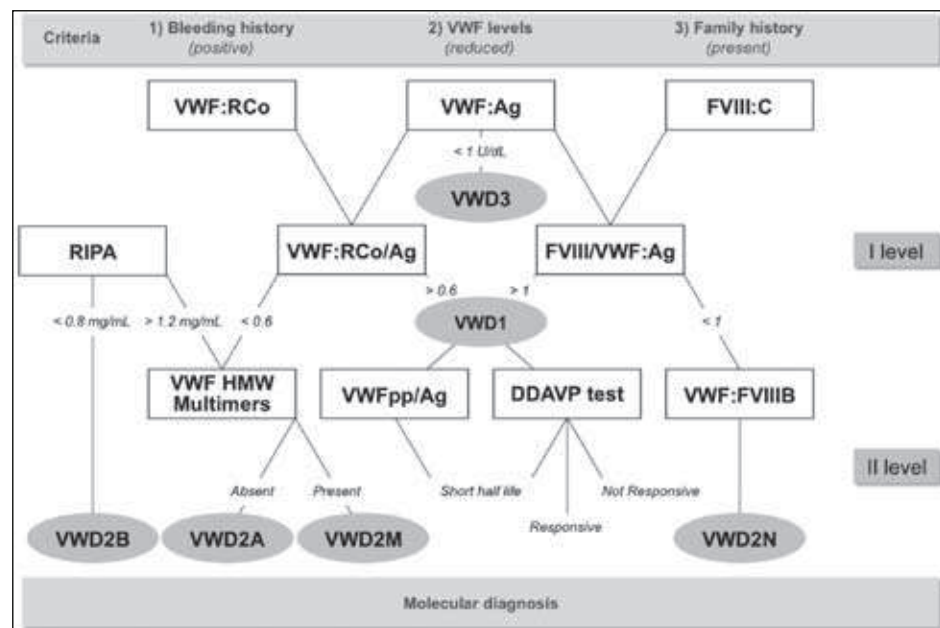


Figure 1. Flow chart proposed for the correct diagnosis and classification of different VWD types. Once bleeding history of the suspected patients with VWD is collected and family history of bleeding investigated (Table 1), a reduced level of VWF should be measured by using VWF:RCo (a). First level of diagnosis: VWD3 can be diagnosed in case of undetectable VWF:Ag (b). FVIII (c) is always reduced in VWD3 and in VWD2N: it can be reduced or normal in all the other VWD types. VWD2B can be identified (d) in case heightened RIPA (<0.8 mg/ml) whereas VWD1, VWD2A and VWD2M cause low RIPA (>1.2 mg/ml). A proportionate reduction of both VWF:Ag and VWF:RCo with a VWF:RCo/Ag ratio > 0.6 suggests VWD1 (e). If the VWF:RCo/Ag ratio is < 0.6, VWD2A, VWD2B, VWD2M, VWD2N should be suspected. VWD2N can be suspected in case of FVIII/VWF ratio (f) < 1 while a FVIII/VWF ratio is > 1 is usually associated with VWD1. Second level of diagnosis: Multimeric analysis in plasma (g) is necessary to distinguish between VWD2A (lack of the largest and intermediate multimers) and VWD2M (all the multimers present). VWFpp/VWF:Ag (h) is increased in VWD1 with short half-life of VWF. DDAVP infusion test (i) can identify patients with no biological response, short biological response or response to this drug. VWF:FVIII:B (j) should be performed to confirm VWD2N. This figure is modified and updated from that reported previously³. Once phenotypic diagnosis is performed, mutations should be searched for (molecular diagnosis) to confirm VWF defects within the family of VWD patients (Figure 2).

VWD2A the high and intermediate multimers are missing. Most VWD2B show the loss of high multimers even though there are patients with relatively normal multimers^{2,5}. The VWF propeptide (VWFpp) and VWF proteins remain noncovalently associated and stored in alpha-granules in megakaryocytes/platelets or Weibel-Palade bodies in endothelial cells for regulated release. In plasma, VWFpp and mature multimers dissociate and circulate independently. VWFpp circulates in plasma as a homodimer with a half-life of 2-3 hours, while mature VWF circulates with a half-life of 8-12 hours⁸. For these reasons, the ratio between VWFpp and VWF:Ag has been recently proposed to identify VWD1 patients with reduced VWF survival².

Desmopressin (1-deamino-8-D-arginine vasopressin, DDAVP) is a synthetic analogue of vasopressin that it is relatively inexpensive and carries no risk of transmitting blood-borne infectious agents. Such a DDAVP infusion trial should be considered an important tool for VWD diagnosis, because VWD patients can be divided according to their biological response in three different groups: short half-life, responsive, not responsive⁸⁻¹⁰. Note that an increased ratio of VWFpp/VWF:Ag usually correlates with short half-life of VWF activities after DDAVP¹⁰. The knowledge of biological response at the time of diagnosis is really important because VWD patients can be immediately identified as unresponsive or short-life responsive to DDAVP and should be shifted immediately to the use of plasma-derived VWF/FVIII concentrates².

The VWF binding assay to FVIII (VWF:FVIII) measures the affinity of VWF for FVIII. In this assay, anti-VWF antibody is coated on wells of a micro titer plate and test plasma is added to the wells. The FVIII/VWF complex from the plasma is bound by the antibody after which FVIII is removed from the complex by a high ionic strength buffer. Excess recombinant FVIII (rFVIII) is then added and, after removal of unbound rFVIII, the VWF and the bound rFVIII are assayed². This assay allows

VWD2N to be distinguished from mild to moderate hemophilia A.

The role of molecular diagnosis

• *Molecular markers:* molecular and prenatal diagnoses of VWD have been introduced since early 1990s. Originally, the first mutations were found within exon 28 of VWF gene that is responsible for domains A1, A2, A3. Most VWD2A cases are due to missense mutations in the A1 domain, with R1597W or Q or Y and S1506L accounting for about 60% of them. The majority of VWD2B cases are due to missense mutations in the A1 domain, about 90% being caused by R1306W, R1308C, V1316M and R1341Q^{1,2}. A few heterogeneous mutations, also located within the A1 domain, underlies VWD2M. A recurrent mutation in VWD1/2M Vicenza has been identified in families from Europe (R1205H), another mutation (M740I) is seen exclusively in families from the Vicenza area in the North East of Italy^{1,2}. Missense mutations in the FVIII-binding domain at the amino-terminal portion of VWF are responsible for VWD2N^{1,2}. The molecular defects responsible for VWD2A, VWD2B, VWD2M and VWD2N are located in specific VWF domains (Figure 2): on the other hand, mutations respon-

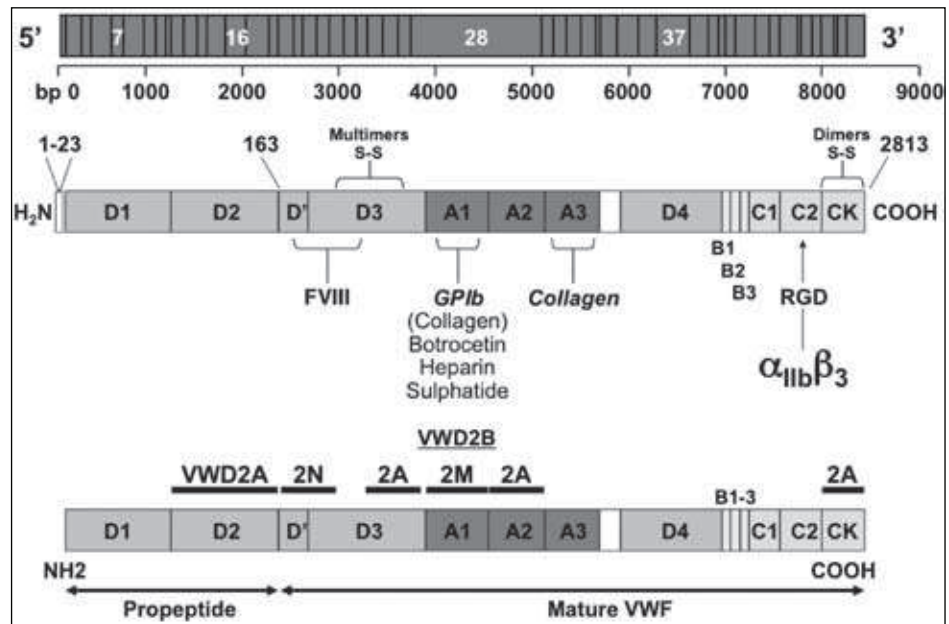


Figure 2. Schematic representation of the VWF gene located in chromosome 12: the main exons are indicated with the number of base pairs from 5' to 3' (upper panel). The structure of VWF functional domains: the pre-pro-VWF is indicated with amino acids numbered from the amino- (aa 1) to carboxy-terminal portions (aa 2813) of VWF. Note the important CK and D3 domains for formation of VWF dimers and multimers. The native mature subunit of VWF, after the cleaving of the pre-pro VWF, is described with its functional domains: the VWF binding sites for factor VIII (D' and D3), GpIb, botrocetin, heparin, sulfatide, collagen (A1), collagen (A3) and the RGD sequence for binding to $\alpha_{IIb}\beta_3$ (intermediate panel). Distribution of VWF mutations in patients with VWD2: the positions of mutations causing VWD2A, VWD2B, VWD2M, VWD2N are indicated with black bars throughout the VWF domains (lower panel).

Tabla 2. Treatment of choice alternative and adjunctive therapy

VWD1	Desmopressin	Antifibrinolytics, estrogens
VWD2A	VWF/FVIII concentrates	Desmopressin for mild bleeding
VWD2B	VWF/FVIII concentrates	Platelet concentrates
VWD2M	Desmopressin	VWF/FVIII concentrates
VWD2N	Desmopressin	VWF/FVIII concentrates
VWD3	VWF/FVIII concentrates	Desmopressin, platelet concentrates
VWD3 with allo-antibodies	Recombinant factor VIII	Recombinant activated factor VII

sible for VWD1 and VWD3 are spread within the entire *VWF* gene.

The genetic causes of VWD1 are still elusive in many cases, especially in those with a mild phenotype and VWF levels above 30 U/dL. More information on the molecular basis of VWD1 has been collected by two multicenter international studies. In the European study, recruitment was based on the historical diagnosis of VWD1, which included 278 affected cases and 312 non-affected family members⁷. The Canadian investigators could recruit 123 families for which the index case had bleeding symptoms and VWF levels between 5 and 50 U/dL¹¹. In this study, subjects with abnormal multimeric patterns or other evidence of qualitative defects were excluded. The most important conclusions from both studies are the following: a) despite the selection of patients based on bleeding history, candidate VWF mutations were not found for 27% (Canadian) and 36% (European) of index cases diagnosed with VWD1; b) the spectrum of VWD1 mutations was different from that found in VWD3. Therefore, VWD1 is not at all like heterozygous VWD3 because VWF defects that occur in VWD1 usually is caused by dominant VWF abnormalities that affect VWF secretion or clearance without altering multimeric patterns or platelet binding.

In VWD3, partial or total gene deletions have been initially reported¹². Notably, homozygosity for gene deletion may be associated with the appearance of allo-antibodies against VWF, which may render replacement therapy ineffective and stimulate anaphylactic reactions to treatment¹². In general, mutations may be scattered over the entire gene, but some (e.g. 2680delC or Arg2535X) are particularly recurrent in Northern Europe¹². Gene defects of VWD3 patients from three different populations have now been studied, but there was no founder effect and mutations were distributed throughout the entire VWF gene¹². Compared to haemophilia, most VWD patients show relatively mild bleeding symptoms. Therefore, prenatal diagnosis is required mainly in case of parents already known to be carrier of VWD3, with gene de-

fects identified in their first affected child¹³. Since young children with VWD3 might carry deletions of VWF gene that predispose to the allo-antibodies to VWF, every new child with VWD3 should be intensively investigated by searching deletions, before starting extensive therapy with exogenous VWF concentrates.

Treatment and prevention of bleeding

The goal of treatment is to correct the dual defects of hemostasis, i.e., abnormal platelet adhesion due to low or defective VWF and abnormal intrinsic coagulation due to low FVIII¹⁴. Two main therapeutic approaches are available: a) desmopressin (DDAVP), that releases endogenous VWF from endothelial cells; b) exogenous VWF contained in VWF/FVIII concentrates. The choice of these two approaches according to VWD types is summarized in Table 3.

- *Desmopressin*. Desmopressin (1-deamino-8-D-arginine vasopressin, DDAVP) is a synthetic analogue of vasopressin that it is relatively inexpensive and carries no risk of transmitting blood-borne infections agents. DDAVP, infused intravenously at a dose of 0.3 µg/Kg diluted in 50 ml saline over 30 minutes, usually increases plasma VWF and FVIII 3 to 5 times above baseline levels within 30-60 minutes and, in general, high VWF and FVIII levels last for 6 to 8 hours. As reported above, a test dose of DDAVP is recommended in VWD patients at the time of diagnosis to establish the individual patterns of biological response and to predict clinical efficacy during bleeding, since the responses in a given patient are consistent on different occasions: the criteria of biological responses have been reported previously^{9,10}. Despite the widespread use of DDAVP in the treatment of VWD, there are no prospective clinical studies on efficacy and safety aimed at determining its benefits and limits: an investigator driven prospective study, recently organized, will correlate biological response with clinical efficacy of DDAVP in more than 200 patients with VWD1 and VWD2.

- *VWF/FVIII concentrates* are indicated in VWD3, in VWD2B because DDAVP can induce transient thrombocytopenia and in all VWD1 or VWD2 patients who are not responsive to DDAVP or who may have contraindications to its use (Table 2). Minimal requirements for plasma-derived *VWF/FVIII concentrates* in VWD management are the following: 1) they must contain active VWF with or without FVIII; 2) they should be treated by virucidal methods; 3) before clinical use, they should be tested for pharmacokinetic

Table 3. Plasma-derived concentrates containing von Willebrand factor (VWF)

A. Concentrates with published activity in VWD subjects						
Concentrate	Purification procedures	Virucidal Rx	VWF:RCo/Ag	VWF:RCo/FVIII	Available in	Manufacturer
Alphanate	Heparin ligand CT	SD; Dry heat	0.6	1.2	GE, IT, UK, US	Grifols (US)
Biostate	Precipitation, heparin ligand CT	SD; Dry heat	0.8	2.0	AU, ASIA	CslBehring
Fandhi	Precipitation, heparin ligand CT	SD; Dry heat	0.6	1.6	SP-IT	Grifols (Sp)
Haemate-P†	Polyelectrolyte precipitations	Pasteurization	0.8	2.5	ASIA, EUR, US	CslBehring
Wilate	Affinity CT, size exclusion	SD; Dry heat	0.7	0.8	GE	Octapharma
Wilfactin	Ion-exchange, affinity CTs	SD; NF; Dry heat	0.7	60	FR	LFB (Lille)
B. Concentrates with limited activity or no published studies in VWD subjects						
Concentrate	Purification procedures	Virucidal Rx	VWF:RCo/Ag*	VWF:RCo/FVIII*	Available in	Manufacturer
Emoclot	Ion-exchange CT	SD; Dry heat	0.5	1.2	BR, IT	Kedrion
Immunate	Ion-exchange CT	SD; Vapor heat	0.2	0.2	EUR	Baxter
Innobrand	Ion-exchange CT	SD	0.7	2.5	FR	LFB (Lille)
Koate DVI	Precipitations, size exclusion	SD; Dry heat	0.5	1.2	US	Talecris
8Y	Heparin/Glycine precipitations	Dry heat	0.3	0.8	UK	BioProducts

CT, chromatography; SD, solvent-detergent (t-N-butyl-PO4 with polysorbate, Tween, or otxynol, Triton); nf, nanofiltration; na, not applicable (multiple countries).

* Ratio of ristocetin cofactor activity (VWF:RCo) to VWF:Ag or FVIII activity expressed as IU/ml (or % of a normal pool).

† Humate P in USA.

ics (PK) and efficacy in retrospective or prospective clinical trials in relatively large numbers of VWD patients^{14,15}. Among many VWF/FVIII concentrates available in the market, only a few can meet these requirements (Table 3). VWF/FVIII concentrates can be given to stop bleeding episodes when they occur (*treatment on demand*), to prevent bleeding during surgery (prophylaxis for surgery), to prevent recurrent bleeding at specific sites (*secondary long-term prophylaxis*). The PK and clinical efficacy results of the first prospective study in VWD were published in 2002¹⁶. This study included 53 patients receiving treatment with a doubly virus-inactivated VWF/FVIII concentrate (Alphanate®) for 87 bleeding episodes and in 39 patients receiving treatment before for 71 surgical or invasive diagnostic procedures. A good clinical response with this VWF/FVIII concentrate was observed in 86% of the spontaneous bleeding episodes and in 71% of surgical or invasive procedures. Two retrospective and one prospective studies have also been performed using Fandhi®, a concentrate manufactured using a process very similar to that of Alphanate® (reviewed in Federici¹⁵). Hae-

mate-P®/Humate-P®, an intermediate-purity VWF/FVIII concentrate, has been widely used in VWD. This product was introduced into clinical practice in Europe (Haemate-P®) in 1984 and in the United States (Humate-P®) in 1999. The first PK study of Haemate-P®, published in 1998, was a single-centre evaluation involving six VWD3 patients. Results of a large retrospective study organized by the Canadian Hemophilia Centers were published in 2002. Other published studies include two retrospective analyses of Haemate P®/Humate-P® efficacy and safety in Italian VWD patients, as well as two prospective, multicenter, open-label, non-randomised studies conducted in the USA on Haemate-P®/Humate-P® used in urgent bleeding and urgent surgical events. The results of another prospective study in elective surgery with HaemateP®/Humate-P® with dosing

based on PK have been recently published (reviewed in Federici¹⁵).

The use of Wilate® in VWD management has been reported in Germany since 2005 and the results of efficacy and safety in acute bleeding episodes, in surgical interventions and in secondary long-term prophylaxis are published (reviewed in Federici¹⁵). Data on the PK and clinical efficacy of Biostate®, a VWF/FVIII concentrate available in Australia and Asia, have been also reported (reviewed in Federici¹⁵). A peculiar plasma-derived VWF concentrate with low FVIII levels was introduced in France in 1992 and the first PK study in VWD3 was published in 1996¹⁵. An improved version of this concentrate (Wilfactin®), which is almost devoid of FVIII, was evaluated in two large French and European studies and data on PK have been already published. Results in VWD3 show no major differences in VWF:RCo and VWF:Ag for the concentrates that did or did not contain FVIII, the only difference was an approximate 6-hour delay in FVIII increase with the concentrate devoid of FVIII; therefore, administration of exogenous FVIII is recommended in VWD3 cases of

acute life-threatening bleeding episodes or emergency surgeries. Clinical efficacy results of the French and European studies have been also reported (reviewed in Federici¹⁵). On the whole, there is no evidence from retrospective or prospective clinical studies that the six *VWF/FVIII concentrates* (Alphanate[®], Biostat[®], Fandhi[®], Haemate-P[®]/Humate-P[®], Wilate[®], Wilfactin[®]) reported in Table 3 differ with regards to efficacy, because no head-to-head clinical study was carried out. Therefore all these *VWF/FVIII concentrates* can be effective to manage or prevent bleeding in patients with VWD¹⁵.

- *Secondary long-term prophylaxis.* Patients with severe forms of VWD may have frequent hemarthroses, especially when FVIII levels are below 10 U/dL, so that some of them develop target joints like patients with moderate hemophilia A. Some patients have recurrent gastrointestinal (GI) bleeding, often without lesions in the GI tract and need treatment every day or every other day. Finally, there are children who have epistaxis frequently and severely enough to cause anemia. In these frequent and severe bleeders, the optimal therapy may be regular prophylaxis with *VWF concentrates* rather than on demand treatment on the occasion of bleeding episodes. The largest experience on secondary prophylaxis in VWD has been collected in Sweden in 35 patients with severe forms of VWD¹⁷. Secondary prophylaxis was also implemented in a cohort of Italian patients with VWD¹⁸. These two retrospective studies suggest that cost-effectiveness of these prophylaxis regimens versus on demand therapy should be further evaluated in larger prospective studies.

Current and future perspectives on VWD management

Despite its complex and heterogeneous nature, nowadays VWD patients can be efficiently diagnosed and classified in most Western Countries. However, an improved diagnosis and classification is still required in many VWD cases in order to provide the best therapeutic approach. The use of the bleeding severity score at the time of diagnosis is important to evaluate the potential risk of bleeding of each VWD patient, as recently proposed in several prospective studies. The phenotypic diagnosis is still the most accessible taking into account the difficulties and costs of molecular diagnosis. The use of more sensitive and precise VWF:RCo assays now available can improve the laboratory diagnosis of VWD. The DDAVP infusion trial should be always performed at diagnosis, because it can provide additional information on the VWF activities released from endothelial cells and identify cases who can benefit of this treatment. Molecular diagnosis can be useful to confirm specific VWF defects

in VWD families, especially those with VWD2A, VWD2B, VWD2M and VWD2N since mutations are clustered in specific exons of VWF gene. In VWD3 patients, no specific mutations can be used as molecular markers for the disease; however, large deletions should be searched for, because they can be associated with the appearance of allo-antibodies against VWF. In VWD1, the probability of finding mutations within the entire *VWF gene* is high only when VWF levels are below 30 U/dL. For patients unresponsive to DDAVP, VWF concentrates are the only form of available treatment. All VWF concentrates with or without FVIII are safe and effective in most VWD patients. There are advanced plans to develop a therapeutic preparation of recombinant VWF. Attempts to partially correct VWD through gene replacement therapy are in progress¹⁵.

References

1. Sadler JE, Budde U, Eikenboom JC, Favaloro EJ, Hill FG, Holmberg L, Ingerslev J, Lee CA, Lillicrap D, Mannucci PM, Mazurier C, Meyer D, Nichols WL, Nishino M, Peake IR, Rodeghiero F, Schneppenheim R, Ruggeri ZM, Srivastava A, Montgomery RR, Federici AB; 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: 2103-14.
2. Federici AB, Canciani MT. Clinical and laboratory versus molecular markers for a correct classification of von Willebrand disease. *Haematologica* 2009; 94 (5): 610-5.
3. Tosetto A, Castaman G, Rodeghiero F. Evidence-based diagnosis of type 1 von Willebrand disease: a Bayes theorem approach. *Blood* 2008; 111: 3998-4003.
4. Tosetto A, Rodeghiero F, Castaman G, Goodeve A, Federici AB, Batlle J, Meyer D, Fressinaud E, Mazurier C, Goudemand J, Eikenboom J, Schneppenheim R, Budde U, Ingerslev J, Vorlova Z, Habart D, Holmberg L, Lethagen S, Pasi J, Hill F, Peake I. 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: 766-73.
5. Federici AB, Mannucci PM, Castaman G, Baronciani L, Bucciarelli P, Canciani MT, Pecci A, Lenting PJ, De Groot PG. Clinical and molecular predictors of thrombocytopenia and risk of bleeding in patients with von Willebrand disease type 2B: A cohort study of 67 patients. *Blood* 2009; 113: 526-34.
6. Federici AB, Canciani MT, Forza I, Mannucci PM, Marchese P, Ware J, Ruggeri ZM. A sensitive ristocetin co-factor activity assay with recombinant glycoprotein Ibalph for the diagnosis of patients with low von Willebrand factor levels. *Haematologica* 2004; 89: 77-85.
7. Goodeve A, Eikenboom J, Castaman G, Rodeghiero F, Federici AB, Batlle J, Meyer D, Mazurier C, Goudemand J, Schneppenheim R, Budde U, Ingerslev J, Habart D, Vorlova Z, Holmberg L, Lethagen S, Pasi J, Hill F, Hashemi Soteh M, Baronciani L, Hallden C, Guillaud A, Lester W, Peake I. 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; 110: 112-21.
8. Habichter SL, Castaman G, Budde U, Peake I, Goodeve A, Rodeghiero F, Federici AB, Batlle J, Meyer D, Mazurier C,

- Goudemand J, Eikenboom J, Schneppenheim R, Ingerslev J, Vorlova Z, Habart D, Holmberg L, Lethagen S, Pasi J, Hill FG, Montgomery RR. 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: 4979-85.
9. Federici AB, Mazurier C, Berntorp E, Lee CA, Scharrer I, Goudemand J, Lethagen S, Nitu I, Ludwig G, Hilbert L, Mannucci PM. Biologic response to desmopressin in patients with severe type 1 and type 2 von Willebrand disease: results of a multicenter European study. *Blood* 2004; 103: 2032-8.
 10. Castaman G, Lethagen S, Federici AB, Tosetto A, Goodeve A, Budde U, Batlle J, Meyer D, Mazurier C, Fressinaud E, Goudemand J, Eikenboom J, Schneppenheim R, Ingerslev J, Vorlova Z, Habart D, Holmberg L, Pasi J, Hill F, Peake I, Rodeghiero F. 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: 3531-9.
 11. James PD, Notley C, Hegadorn C, Leggo J, Tuttle A, Tinlin S, Brown C, Andrews C, Labelle A, Chirinian Y, O'Brian L, Othman M, Rivard G, Rapson D, Hough C, Lillicrap D. The mutational spectrum of type 1 von Willebrand disease: results from a Canadian cohort study. *Blood* 2007; 109: 145-54.
 12. Eikenboom JCJ. Congenital von Willebrand disease type 3: clinical manifestations, pathophysiology and molecular biology. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001; 14: 365-79.
 13. Peake IR, Bowen D, Bignell P, Liddell MB, Sadler JE, Standen G, Bloom AL. Family studies and prenatal diagnosis in severe von Willebrand's disease by polymerase chain reaction amplification of a variable number of tandem repeat region of the von Willebrand factor gene. *Blood* 1990; 76: 555-61.
 14. Mannucci PM, Franchini M, Castaman G, Federici AB; Italian Association of Hemophilia Centers. Evidence-based recommendations on the treatment of von Willebrand disease in Italy. *Blood Transfus* 2009; 7 (2): 117-26.
 15. Federici AB. The safety of plasma-derived von Willebrand factor VIII concentrates in the management of inherited von Willebrand disease. *Expert Opin Drug Saf* 2009; 8 (2): 203-10.
 16. Mannucci PM, Chediack J, Hanna W, et al; for the Alphanate Study Group. Treatment of von Willebrand disease with a high-purity factor VIII/von Willebrand factor concentrate: a prospective, multicenter study. *Blood* 2002; 99: 450-6.
 17. Berntorp E, Petrini P. Long-term prophylaxis in von Willebrand disease. *Blood Coag Fibrin* 2005; 16: S23-S26.
 18. Federici AB, Gianniello F, Canciani MT, Mannucci PM. Secondary long-term prophylaxis in severe patients with von Willebrand disease: an Italian cohort study. *Blood* 2005; 106: 507a, abstract 1782.

ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND EN ESPAÑA

J. BATLLE, A. PÉREZ-RODRÍGUEZ,
J. COSTA PINTO PREGO, E. LOURÉS FRAGA, A.
RODRÍGUEZ TRILLO, M.^aF. LÓPEZ-FERNÁNDEZ

*Servicio de Hematología y Hemoterapia e INIBIC.
Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña.
Departamento de Medicina.
Universidad de Santiago de Compostela. A Coruña*

Introducción

La enfermedad de Von Willebrand (EVW) es un desorden hemorrágico de herencia autosómica, debida a una alteración cualitativa y/o cuantitativa de la proteína del factor Von Willebrand (VWF). Se viene aceptando como el trastorno hemorrágico hereditario más frecuente¹⁻³. Su diagnóstico es difícil debido a la variabilidad en su expresión clínica, así como por las limitaciones de los métodos de laboratorio disponibles. Por ello, con frecuencia no es fácil la clasificación de un paciente determinado en una de las categorías concretas aceptadas⁴⁻¹⁰.

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, y son clave para efectuar un adecuado consejo genético.

Exceptuando algunos países como Escandinavia, Italia y Francia, entre otros, el impacto real de esta enfermedad sigue siendo notablemente desconocido¹. Consciente de esta situación, Favalaro ha propuesto realizar un pequeño estudio que titula "La EVW: una preocupación global", en el que participen algunos países, de forma que se pueda realizar una comparación entre ellos, al mismo tiempo de conocer la magnitud y estado actual del problema. A tal fin contactó con nuestro equipo para incluir la experiencia española. En la Figura 1 se señalan los países participantes inicialmente en este estudio. Con el objeto de unificar criterios, planteó los aspectos y datos más relevantes que cada país debe analizar y exponer.

Aun cuando se está trabajando en la creación de un registro en este sentido¹¹, estimulados por la propuesta de Favalaro, pensamos que la realización de una primera investigación a través de una encuesta sencilla en la que participe el mayor número de centros posibles, permitiría obtener una "fotografía" de la situación actual en España. Estamos seguros de que ambos acercamientos, encuesta y registro, son totalmente com-



Figura 1. Países participantes en el estudio propuesto por Favalaro. Los centros seleccionados se encuentran muy dispersos a lo largo de toda la geografía.

Tabla 1. Encuesta y sus apartados (I)

1. Centro/hospital participante: _____

2. Ciudad: _____

3. Población del área sanitaria que atiende el centro/hospital: _____

4. Nombre del investigador: _____

5. Número total de pacientes vivos con diagnóstico de EVW: _____

5.1. Con diagnóstico claro: _____

5.2. Posibles (Nivel de VWF > de 30% pero < rango de normalidad): _____

5.3. Por tipos y subtipos de EVW (N.º) (en pacientes con diagnóstico claro):
 1 _____; 2A _____; 2B: _____; 2M: _____; 2N: _____; 3: _____
 No clasificables/dudosos _____

Según clasificación: Sadler J. J Thromb Haemost 2006; 4 (10): 2103-14

5.4. Con estudio genético alterado: _____

5.6. N.º de pacientes con pseudo-EVW (EVW plaquetar): _____

Tabla 2. Encuesta y sus apartados (II)

6. Determinaciones empleadas en el diagnóstico (marcar con una X lo que proceda)

Parámetro	Sí				NO
	¿Cuándo?		¿Dónde?		
	Siempre	A veces	En el propio centro	En otro centro/lab. referencia	
FVIII: C					
FVIII: Cr					
VWF: Ag					
VWF: RCo					
VWF: CB					
Dominio VWF: FVIII B					
VWF multimérico					
Estudio genético					
RIPA: 1-1,5 mg/mL					
RIPA 0,2-0,5 mg/mL					

Tabla 3. Encuesta y sus apartados (III)

7. Método empleado (especificar)

Parámetro	Método (reactivo) si automatizado en coagulómetro	ELISA (Sí/No)	Otros (por ejemplo, látex manual, agregometría, etc.)
FVIII: C			
FVIII: Cr			
VWF: Ag			
VWF: RCo			
VWF: CB			
Dominio VWF: FVIII B			

plementarios, ya que probablemente por diversas razones no será posible incluir a todos los pacientes existentes en la actualidad.

En una primera parte expondremos los resultados de esta primera investigación basada en una encuesta. En una segunda parte expondremos el estado actual del proyecto del registro de la EVW en España.

Epidemiología de la EVW en España: una visión preliminar

Rodeghiero fue el pionero de la investigación epidemiológica de la EVW, resaltando la elevada prevalencia de las anomalías del VWF, que llegaba a ser de hasta un 1-2% de la población general¹². Posteriormente, hizo un excelente análisis epidemiológico de la EVW comparando datos de diversos países, señalando la necesidad de centrarse especialmente en las formas clínicamente relevantes. A tal fin, comparó los datos publicados previamente, teniendo en cuenta un segmento de pacientes muy particular, el de los pacientes referidos a centros hospitalarios para su estudio. Este colectivo particular reflejaría a los pacientes que de alguna forma suponen un mayor impacto asistencial, ya que son los que van a ser objeto de estudios más o menos extensos, al mismo tiempo que entre ellos se encontrarían aquellos que precisarían algún tipo de tratamiento. Aun cuando todavía no se ha establecido internacionalmente, cada vez con más frecuencia se viene distinguiendo los pacientes con niveles de VWF > 30% y menor que el rango inferior de normalidad como “posibles”, de aquellos con un diagnóstico de EVW “claro”, independientemente de cuál sea su tipo³.

Escandinavia presenta una prevalencia muy elevada, llegando a ser de 239 pacientes referidos por millón de habitantes. Por el contrario, evaluando una población total de 441 millones de habitantes, que incluía 6.514 pacientes referidos a centros hospitalarios de diferentes países europeos, excluyendo Escandinavia, observó

una prevalencia de 23 pacientes “referidos” por millón de habitantes, cifra muy inferior a la de Escandinavia. Es importante resaltar que en esta revisión de Rodeghiero no se especifica si la población de pacientes referidos incluye o no a los pacientes con EVW “posible”. La distribución promedio de los pacientes por tipos de EVW era de un 70% tipo 1; 17% tipo 2 y 13% tipo 3¹. En este análisis epidemiológico concluye que la prevalencia estimada de pacientes con EVW que requiere tratamiento específico oscila entre 40 a 100 pacientes por millón de habitantes.

Material y métodos

La investigación preliminar realizada por primera vez dirigida a conocer la realidad española se basó en la encuesta cuyos parámetros quedan reflejados en las Tablas 1 a 4. Se envió a 54 centros españoles, que incluían las cinco unidades de hemofilia existentes en el país y los centros de mayor tamaño.

Resultados y su discusión

El porcentaje de respuestas fue del 66,6% (36 centros, incluyendo las cinco unidades de hemofilia españolas), es decir, muy similar al promedio de respuestas señalado por Rodeghiero (65%). Desde un punto de vista epidemiológico, la población total analizada correspondiente a los centros respondedores de 22 millones de habitantes (un 49% de la población global de España) y su amplia distribución a lo largo de toda la geografía española permite hacer una extrapolación de los resultados obtenidos a la población total actual del país.

En las Tablas 5 a 8 se indican los diferentes datos globales obtenidos.

Puede comprobarse en nuestros resultados que la frecuencia de pacientes, tanto con diagnóstico “claro” como “posible”, referidos a los centros españoles y extrapolada a la población total española, es de 214 por millón de habitantes, es decir similar a la observada en Escandinavia. Si se excluyen los pacientes con EVW “posible”, la frecuencia de pacientes con EVW “clara” extrapolada a la población total española es de 123 pacientes referidos por millón de habitantes, es decir, francamente elevada con respecto a la de Europa (excluida Escandinavia). Ello puede ser debido a un franco sobrediagnóstico de la EVW, a una mayor prevalencia de la misma en nuestro país, o, mucho más

probablemente, a ambas causas a la vez. En cualquier caso implica la necesidad de llevar a cabo estudios adicionales que permitan aclarar la magnitud de la EVW en España.

Llama marcadamente la atención que en el segmento de pacientes “clasificados” la distribución porcentual es llamativamente similar a la deducible a partir de los datos del análisis de Rodeghiero, especialmente en los tipos 1 y 2¹. Curiosamente, la proporción del tipo 3 es algo menor, aunque otros estudios europeos han mencionado una cifra similar a la obtenida con esta encuesta¹³. A nuestro entender, esta similitud en la distribución obtenida apoya en cierta medida la hipótesis de una mayor prevalencia de la EVW en España, ya que sería de esperar que un sobrediagnóstico incrementara especialmente la población de pacientes con tipo 1 de EVW (que es la que presenta más dificultades diagnósticas). En definitiva, la frecuencia total de pacientes referidos en nuestra población es de un 0,0214 %, cifra muy por debajo de la estimada por Rodeghiero en su estudio inicial de prevalencia (1-2%)¹².

Por lo que respecta a los parámetros diagnósticos, los más utilizados son el FVIII:C, el VWF:RCo y el VWF:Ag, y en menor medida el VWF:CB y el RIPA, especialmente a concentraciones de ristocetina de 1 a 1,5 mg/mL, y en bastante menor medida a concentraciones bajas. La limitada utilización del RIPA a concentraciones bajas puede facilitar el que algunos pacientes con tipo 2B de EVW pasen inadvertidos (aunque también aquellos afectos de pseudo-EVW). Llama la atención el elevado uso del FVIII, tanto por el método coagulativo como por el cromogénico, aunque con menor frecuencia en este último. Como era de esperar, en la mayoría de los centros estos procedimientos se determinan en autoanalizadores.

La determinación del VWF:FVIIIIB, o capacidad de unión del VWF del paciente al FVIII normal se realiza únicamente en dos centros, y sólo un 38% de los cen-

Tabla 4. Encuesta y sus apartados (IV)

8. Prueba del DDAVP al diagnóstico (marcar con una X lo que proceda)		
En algunos pacientes: _____ En todos: _____		
9. Otros aspectos de interés que desee comentar en relación con el diagnóstico de EVW en tu centro:		
10. ANÁLISIS MULTIMÉRICO: _____ Baja resolución: _____ Alta resolución: _____		
Método empleado:		
Sistema de tampones: discontinuo _____ continuo _____		
Detección: isotópico: _____		
Transferencia a membrana y detección:		
enzimática: _____ luminiscencia _____		
ESTUDIO GENÉTICO : De cribaje: _____ Secuenciación: _____		

Tabla 5. Resultados (I): Datos demográficos y distribución de pacientes por diagnóstico. Se comparan los datos reales obtenidos en la encuesta con los estimados de acuerdo con el estudio de Rodeghiero

	Población investigada	Estimación global de España	Proporción	Teórica Rodeghiero	Proporción
Población total	22.800.000	46.900.000	49%*	46.900.000	49%*
Pacientes con EVW clara	2.941	6.050	129/10 ⁶ **	1.079	23/10 ⁶ **
Diagnóstico claro	2.213	4.522	96/10 ⁶ **		
Tipo no claro	728	1.498	32/10 ⁶ **		
EVW posible	1.936	3.982	85/10 ⁶ **		
Total pacientes (seguro + posibles)	4.877	10.032	214/10 ⁶ **		

Clasificación			%		%
Tipo 1	1.881	3.869	77	755	70
Tipo 2	446	917	18	183	17
2A	254	522	10		
2B	64	132	3		
2M	85	175	3		
2N	43	88	2		
Tipo 3	126	259	5	140	13
Total clasificados	2.453	5.046		1.079	

* Porcentaje de población estudiada con respecto a la total española.

** Número de pacientes por millón de habitantes.

tros solicita esta determinación a un laboratorio externo. Aunque el tipo 2N es poco frecuente por ser recesivo, este dato hace suponer que puedan estar pasándose por alto algunos pacientes con este tipo de patología.

En relación con el análisis multimérico, únicamente seis centros disponen de esta metodología, y uno dejó de utilizarla en el año 2002. Cuatro de ellos usan geles de alta y baja resolución, uno sólo de alta y otro sólo de

baja. Además cuatro centros especifican el uso del sistema continuo de tampones y dos el sistema discontinuo, y todos ellos incorporan el paso de transferencia a membrana. La detección se realiza mediante luminiscencia en tres y por método enzimático en otros tres. No obstante, un 17% de los centros encuestados solicita este análisis a un laboratorio externo, aunque no en todos los pacientes. Aún así, el bajo nivel de empleo de este análisis en los pacientes podría motivar que algunos con anomalías en este sentido pasaran desapercibidos, como es el caso de los heterocigotos de formas recesivas 2A (por ejemplo, el subtipo IIC).

El estudio molecular del gen del VWF lo realizan cinco centros únicamente. Cuatro hacen secuenciación y uno emplea un método de cribaje. Un 29% de los centros solicita este estudio a un laboratorio externo pero en bastante menor proporción que el análisis multimérico. La complejidad

Tabla 6. Resultados (II): Método utilizado

		Siempre	A veces	Nunca	Propio centro	Otro centro	s.r.
FVIII:C	N	35	0	1	36	0	0
	%	97		3	97		
FVIII:Cr	N	10	13	9	22	0	4
	%	31	41	28	69		
VWF: Ag	N	36	0	0	34	0	0
	%	100			94		
VWF: RCo	N	32	3	2	31	0	1
	%	91	9	6	89		
VWF: CB	N	8	13	10	16	5	15
	%	38	62	48	76	24	
VWF:FVIII B	N	1	8	17	2	8	10
	%	3	31	65	8	31	
VWF multimérico	N	3	21	5	5	20	7
	%	10	72	17	17	69	
Estudio genético	N	3	11	14	5	8	8
	%	11	39	50	18	29	
RIPA: 1-1,5 mg/mL	N	17	15	3			1
	%	49	43	9			
RIPA: 0,2-0,5 mg/mL	N	10	20	4			2
	%	29	59	12			

s.r.: sin respuesta.

de esta metodología, junto a su elevado coste y la experiencia que requiere, constituyen sin duda las principales razones de su baja aplicación. Es de esperar que en un futuro no muy lejano este tipo de estudios se simplifique y suponga costes más asequibles, permitiendo todo ello una mayor generalización de los mismos.

La respuesta basal al acetato de desmopresina (DDAVP) de forma mayoritaria se valora en algunos pacientes seleccionados, pero no en todos.

Los resultados de este estudio, al igual que el de los realizados por los restantes países serán objeto de una publicación de *Seminars in Thrombosis and Haemostasis* prevista para principios de 2011.

Conclusiones

1. La frecuencia de la EVW observada en la población de España es notablemente mayor que la que sería previsible en países de nuestro entorno. Ello puede ser debido a un sobrediagnóstico de la EVW, a una mayor prevalencia de la misma en nuestro país, o bien a ambas causas a la vez. En cualquier caso, resalta el elevado interés que adquiere la EVW en España, la cual necesariamente debe ser investigada mediante estudios adicionales.

2. 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, tal como refleja la realidad actual de la EVW en España.

Proyecto “Perfil clínico y molecular de la enfermedad de Von Willebrand en España” (PCM-EVW-ES)

Son varias las razones que propician este proyecto: 1) los resultados del estudio que acabamos de exponer; 2) el diagnóstico de la EVW requiere una metodología amplia, en bastante medida compleja, laboriosa, y no del todo bien estandarizada, además de no siempre estar disponible en todos los centros que atienden este tipo de patología. Conviene resaltar que los diferentes países de la Unión Europea bien disponen ya, o están desarrollando en la actualidad su propio registro estatal; 3) la oferta de diversos proyectos internacionales de investigación de gran relevancia, envergadura e interés en el campo de la salud ofrecen su participación a los centros y países con una población de pacientes adecuadamente caracterizados; 4) a su vez, la adecuada caracterización de los pacientes existentes y el conocimiento del estado real de la EVW en España puede constituir una plataforma que, facilitando la inversión de fondos públicos y privados, permitan el desarrollo de etapas sucesivas en la investigación de la EVW (genómi-

Tabla 7. Resultados (III): Tipo de método utilizado

		Coagulómetro	ELISA	Otros	s.r.
FVIII:C	N	33	0	0	3
	%	100			
FVIII:Cr	N	20	2	0	14
	%	91	9		
WVF: Ag	N	20	14	6	4
	%	63	44	19	
WVF: RCo	N	15	7	17	5
	%	48	52	23	
WVF: CB	N	4	18	1	16
	%	20	90	5	

N: número de centros; %: porcentaje sobre el total de centros; s.r.: sin respuesta.

Tabla 8. Resultados (IV): Evaluación respuesta al acetato de desmopresina (DDAVP)

	N	%	s.r.
Todos los pacientes	4	13	4
Algunos pacientes	28	88	

N: número de centros; %: porcentaje sobre el total de centros; s.r.: sin respuesta.

ca, proteómica); 5) no menos importante es el beneficio que pueden obtener los propios pacientes a partir de los avances que se vayan obteniendo.

De igual forma, el éxito y resultados del Proyecto de la Unión Europea “Molecular and Clinical Markers in the Diagnosis and Management of VWD Type 1” (MCMDM-1VWD)¹⁴⁻²¹ y la experiencia adquirida anima a afrontar esta iniciativa.

Objetivo global principal

Es de gran importancia resaltar que no se trata de un estudio de prevalencia de la EVW en la población española. De igual manera, no es en absoluto un estudio de control de calidad de los centros participantes. Destacamos los siguientes objetivos globales: 1) conocimiento actual de la realidad diagnóstica y terapéutica de la EVW en España en la práctica clínica habitual. Elaboración de una plataforma de pacientes españoles con esta enfermedad lo mejor caracterizados posible; 2) creación de un grupo de trabajo en EVW que asuma este objetivo inicial, así como desarrolle 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); 3) elaboración de guías de consenso en el diagnóstico y tratamiento de la EVW.

Objetivos parciales

Se desea conocer el perfil clínico de los pacientes con diagnóstico de EVW en seguimiento activo en 2010 en los centros de España que atienden este tipo de pacientes, incluyendo la descripción de la edad, número de pacientes seguidos en más de un centro y el porcentaje de pacientes con defectos concomitantes de la coagulación.

Se pretende concretar el diagnóstico del tipo y subtipo hasta el nivel jerárquico más completo posible, basado en la clasificación revisada y actualizada del Subcomité Internacional del VWF de la ISTH⁵. A su vez, y cuando se conozca, se registrará el tipo de defecto genético. Se valorará la modalidad de tratamiento en función de las características del paciente y de la enfermedad (acetato de desmopresina y/o concentrados comerciales de VWF) y su respuesta clínica. Se registrará la frecuencia de determinadas complicaciones de la EVW u otros aspectos en España, tales como: infección por VIH, VHB, VHC y porcentaje de pacientes que siguen tratamiento antirretroviral; prevalencia de vacunación VHA y VHB.

Se valorará la puntuación hemorrágica clínica en base al baremo de Tosetto *et al.*¹⁷, historia de aloanticuerpos anti-VWF, características y su tratamiento.

Antecedentes de cirugía mayor en el año 2010 y tratamiento perioperatorio recibido. Situación de escolarización en niños y adolescentes.

Diseño y metodología

- **Promotor.** Estudio patrocinado por BAXTER. Posteriormente se creará un Registro de la EVW en España en el marco de la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia (SETH).

- **CRO.** Se hará cargo de la confección de la base de datos, sistema de encriptación que asegure el anonimato preceptivo de la Ley de Protección de Datos y elaborará una página web del proyecto que pueda irse ampliando en el futuro con nuevas etapas o parámetros a incluir. El sistema de recogida de datos será *online*. Cada centro tendrá acceso a los datos de sus pacientes, pero no al de los restantes centros.

- **Investigadores principales (coordinadores).** Dr. Javier Batlle. Servicio de Hematología CHU A Coruña; Dr. José Antonio Aznar. Unidad de Coagulopatías Congénitas. S. Hematología. HU La Fe, Valencia. **Comité científico operativo:** Dr. Javier Batlle y Dra. M.ª Fernanda López Fernández. Servicio de Hematología. CHU A Coruña; Dr. José Antonio Aznar y Dra. Pilar Casaña. Unidad de Coagulopatías Congénitas. HU La Fe, Valencia. **Comité científico consultor:** representantes de los centros con mayor densidad de pacientes con EVW. **Grupo de trabajo:** representantes de todos los centros que participen. Este

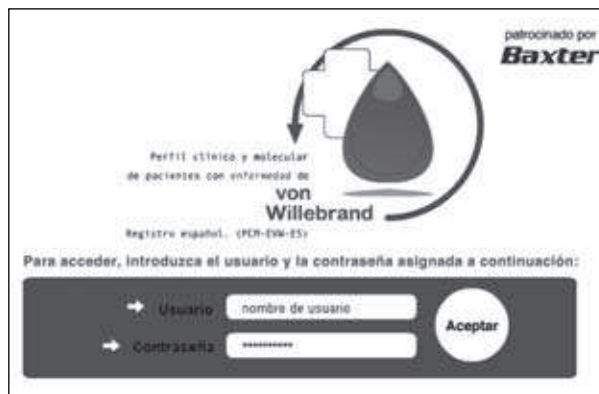


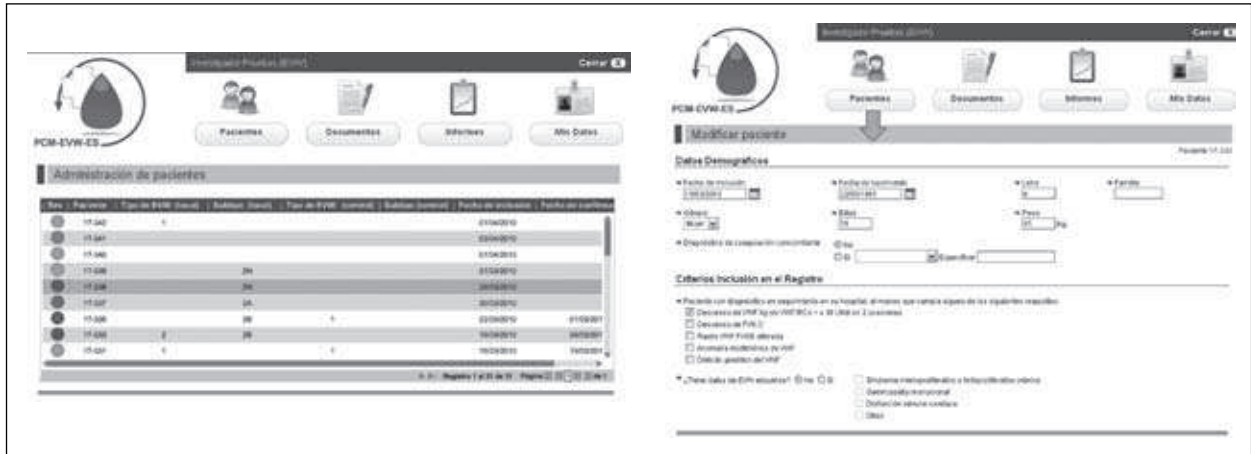
Figura 2. Página web principal y acceso a la base de datos del Proyecto PCM-EVW-ES. Esta base de datos cumple la LOPD y requiere registro y autorización previa a través de la CRO.

proyecto, prospectivo y multicéntrico, ha sido evaluado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) de Galicia. Se ha confeccionado un modelo de documento de información y consentimiento para aquellos centros que lo puedan necesitar.

- **Población de estudio.** Pacientes de cualquier edad, diagnosticados en sus respectivos hospitales previamente de EVW, en seguimiento activo, “referidos” desde cualquier servicio hospitalario o atención primaria, que cumplan uno o más de los siguientes criterios: 1) niveles del VWF:Ag y/o VWF:RC₀ ≤ 30 UI/dL (%), constatados en dos o más ocasiones diferentes; 2) existencia de alguna anomalía de la estructura multimérica, observada en dos o más ocasiones diferentes; 3) en los casos con deficiencia selectiva de FVIII se requerirá la demostración de una anomalía del VWF: FVIIIIB; 4) conocimiento del defecto genético del VWF; 5) observación de RIPA presente a concentraciones bajas de ristocetina.

- **Criterio de exclusión.** Será criterio de exclusión la presencia de datos sugerentes de síndrome de Von Willebrand adquirido (síndromes mieloproliferativos o linfoproliferativos crónicos, gammapatía monoclonal, entre otros).

El diagnóstico definitivo se hará basándose en el análisis fenotípico centralizado de muestras de los pacientes reclutados. En caso de discrepancia, se valorarán y discutirán éstas con el centro reclutador correspondiente. Se recogerán datos de las características sociodemográficas y clínicas de la población de estudio, incluyendo la edad, el género, el peso y la presencia de coagulopatías concomitantes. Se describirán todos los parámetros relacionados con el estado actual de la enfermedad: tipo de tratamiento recibido (acetato de desmopresina y/o concentrados de VWF), y según indicación (a demanda o en profilaxis), la vía de administración y puntuación hemorrágica. También se describirá el porcentaje de pacientes afectados por VIH, hepatitis A, B y C y los



Figuras 3 y 4. Página web y acceso a la base de datos del Proyecto PCM-EVW-ES. Se muestra una de las páginas interiores de esta base de datos.

pacientes que han sido vacunados de hepatitis A o B.

Para conocer las complicaciones derivadas de la enfermedad, se describirá el número de episodios hemorrágicos presentados durante el último año y el grado de absentismo escolar en los pacientes menores de 16 años. Con respecto a la presencia de aloanticuerpos, se describirán los pacientes que hayan presentado o presenten esta complicación y, de éstos, los tratamientos administrados para los aloanticuerpos y los agentes administrados para controlar la hemorragia. Por último, se investigará el porcentaje de pacientes que han sido sometidos a intervenciones quirúrgicas, así como el tipo de intervención, su causa y la forma de administración del factor en el periodo posquirúrgico.

- El *diagnóstico local* se basará en los siguientes parámetros: 1) historia clínica personal y familiar; 2) barmem hemorrágico de cada paciente; 3) recuento plaquetario y frotis de sangre periférica (presencia o no de agregados plaquetares); 4) grupo sanguíneo ABO; 5) TTPA; 6) FVIII; 7) VWF:Ag; 8) VWF:RCo; 9) RIPA con ristocetina 0,5, 1,2 y 2 mg/mL (final); 10) PFA-100® ADP y Epi (opcional).

- A su vez, el *estudio centralizado* se basará en las siguientes determinaciones:

- I. UCC. S. Hematología. HU La Fe, Valencia: 1) FVIII; 2) VWF:Ag; 3) VWF:RCo; 4) VWF:CB.
- II. S. Hematología. CHU A Coruña. 1) análisis multimérico de baja y alta resolución; 2) VWF:FVIIIb.

- *Estudio del defecto genético*. Por razones de limitación de presupuesto, el estudio genético se realizará inicialmente en aquellos casos en los que pueda ser necesario para una confirmación del diagnóstico. Según la evolución del proyecto se contempla la posibilidad de extender este estudio a todos los pacientes reclutados, priorizando de entrada a los pacientes con EVW tipos 2 y 3, en primer lugar. En esta parte centralizada del estudio, participaría también la Unidad de Coagulo-

patías Congénitas del Hospital Vall d'Hebrón de Barcelona. Siguiendo el modelo del Proyecto MCMDM-1VWD, se considera aconsejable que la identificación de una mutación en un centro sea comprobada en al menos otro centro participante.

El inicio de este proyecto estaba previsto para finales de 2009 o principios del 2010. No obstante, debido a problemas técnicos dicho inicio se prevé a partir de septiembre-octubre de 2010. En las Figuras 2, 3 y 4 se exponen algunos aspectos de la página web del presente proyecto.

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). Deseamos expresar nuestro sincero agradecimiento a Baxter Bioscience, España, en especial al Dr. Jaime Camacho, por el interés, patrocinio y ayuda en el desarrollo del proyecto PCM-EVW-ES.

Bibliografía

1. Rodeghiero F, Castaman G. Von Willebrand disease: epidemiology. En: Textbook of hemophilia. CA Lee, EE Berntorp, WK Hoots. Blackwell Publishing; 2005. p. 265-72.
2. Federici AB, Canciani MT. Clinical and laboratory versus molecular markers for a correct classification of von Willebrand disease. *Haematologica* 2009; 94: 610-5.
3. Nichols WL, Hultin MB, James AH, Manco-Johnson MJ, Montgomery RR, Ortel TL, et al. 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.
4. Favaloro EJ. Toward a new paradigm for the identification

- and functional characterization of von Willebrand disease. *Semin Thromb Hemost* 2009; 35 (1): 60-75.
5. Sadler JE, Budde U, Eikenboom JC, Favalaro 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.
 6. Batlle J, Pérez Rodríguez A, López Fernández MF. Clasificación de VWD. In: *Von Willebrand disease: basic and clinical aspects*. Federici A, Lee C, Berntorp E, Lillicrap D, Montgomery B. Oxford: Blackwell Publishing; 2009 [en prensa].
 7. Batlle J, Pérez-Rodríguez A, Lourés E, Rodríguez-Trillo A, López-Fernández MF. Métodos diagnósticos en la enfermedad de Von Willebrand. LI Reunión Nacional de la AEHH; XXV Congreso Nacional de la SETH. Barcelona. *Haematologica* (ed esp) 2009; 93 (Supl 1): 18-22.
 8. Penas N, Pérez-Rodríguez A, Torea JH, Lourés E, Noya MS, López-Fernández MF, et al. 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.
 9. 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.
 10. 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.
 11. Batlle J, Aznar JA. Registro de la enfermedad de Von Willebrand en España: una oportunidad única. *Actualidad y debate*. *Haematologica* (ed esp) 2010 [en prensa].
 12. Rodeghiero F, Castaman G, Dini E. Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease. *Blood* 1987; 69 (2): 454-9.
 13. Federici AB, Castaman G, Mannucci PM. Guidelines for the diagnosis and treatment of von Willebrand disease in Italy. Italian Association of Haemophilia Centers (AICE). *Haemophilia* 2002; 8: 607-11.
 14. Budde U, Schneppenheimer 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.
 15. 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.
 16. 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.
 17. 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.
 18. 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.
 19. 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.
 20. 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.
 21. 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.

AVANCES EN LA PROFILAXIS DE LA HEMOFILIA EN ESPAÑA

J.F. LUCÍA CUESTA

Servicio de Hematología.

Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza

Introducción

La situación de la profilaxis en España se conoce a través del estudio epidemiológico transversal y multicéntrico realizado en España en el año 2006. Este estudio¹ sirvió de base para la confección, en el año 2008, del Registro Español de Hemofilia, en el que se recogió información de 2.897 pacientes, de los cuales 2.513 eran HA y 384 HB. No obstante, la valoración de la profilaxis en España se ha realizado sobre 2.400 pacientes. La profilaxis definida como la infusión regular de factor VIII o IX en personas con hemofilia es, en la actualidad, el mejor tratamiento para impedir o retrasar el daño articular²⁻⁴. De todos los aspectos relacionados con la profilaxis los aquí valorados serán los relacionados con la distribución etaria, fundamentalmente entre niños y adultos, la ponderación objetiva de las lesiones articulares de acuerdo con la escala de Pettersson⁵ y la necesidad de implantación de catéteres centrales necesitados a veces para el cumplimiento de las infusiones⁶.

Tipo de profilaxis

Esencialmente, el tratamiento continuado en hemofilia viene definido en función de la edad y de la primera hemorragia articular, en nuestro medio hemos clasificado los pacientes de acuerdo con las recomendaciones del PEDNET (European Paediatric Network for Haemophilia Treatment)⁷ en:

Tabla 1.

		Hemofilia A		Hemofilia B		Total	
		n	%	n	%	n	%
Gravedad	Leve	1.109	53,29	123	38,56	1.232	51,33
	Moderado	290	13,94	103	32,29	393	16,38
	Grave	682	32,77	93	29,15	775	32,29
	Total	2.081	100	319	100	2.400	100
Grupo de edad	Pediátrico	474	22,78	73	22,88	547	22,79
	Adulto	1.607	77,22	246	77,12	1.853	77,21
	Total	2.081	100	319	100	2.400	100

• *Profilaxis primaria A (PPA)*. Corresponde al tratamiento regular y continuado –mínimo 46 semanas/año– después de la primera hemorragia articular y antes de los dos años de edad.

• *Profilaxis primaria B (PPB)*. Tratamiento regular y continuado –mínimo 46 semanas/año– comenzado antes de los dos años de edad y sin previa hemartrosis.

• *Profilaxis secundaria A (PSA)*. Tratamiento regular y continuado (a largo plazo), comenzado después de dos o más hemorragias articulares o a una edad superior a los dos años.

• *Profilaxis secundaria B (PSB)*. Tratamiento regular pero intermitente (a corto plazo) debido a hemorragias frecuentes.

Distribución total de los pacientes

Con respecto a la distribución de los pacientes (Tabla 1), nuestra serie presenta un porcentaje de hemofilias graves de un 32,29%, similar a la canadiense de Biss *et al.* (30,6%)⁸, la sueca de Larsson *et al.* en torno al 30%⁹ y a la holandesa (39%)¹⁰, y se aleja de la estadounidense de Butler *et al.* (53%)¹¹, de la polaca (59,7% para las HA y 56,6% para la HB)¹², aunque admite que en su clasificación ha existido un sesgo a favor de las formas graves, la de Ono *et al.* (69,5%)¹³ y finalmente de la de Taki *et al.* (73,4%)¹⁴.

Considerando todos los enfermos en total, los datos referidos en la literatura son contradictorios. En nuestra serie existe un 19,37% de pacientes en cualquier tipo de profilaxis, cifra inferior a la referida por Plug *et al.* en Holanda¹⁰ de 29% y similar a la canadiense hallada por Biss *et al.*⁸ en su estudio adaptada a su definición de profilaxis (*vide infra*): 20,34%. La serie japonesa de Ono *et al.*¹³ ofrece un porcentaje más alto en Japón, de 67,25%, y sin embargo, la revisión realizada al año siguiente por Taki *et al.*¹⁴ para la misma nación muestra un porcentaje más bajo, de 11,62%.

Por gravedad (Tablas 1 y 2), el porcentaje del total de pacientes graves en cualquier forma de trata-

miento profiláctico (343) representa el 44,25% con respecto al total de enfermos graves afectos de HA o HB (775) (Tabla 1). En la serie de Butler *et al.* en EEUU¹¹, sin embargo, la comparación con los 1.479 evaluables es difícil de establecer, ya que parten de conceptos diferentes de profilaxis. Entienden que este término no está universalmente aceptado¹⁵ y definen la profilaxis primaria como el tratamiento continuado establecido antes del desarrollo de una articulación diana, concepto que tampoco está bien sentado¹⁶⁻¹⁸, la secundaria tras el establecimiento de la misma y la terciaria como el planteado frente a situaciones concretas, como pueda ser una cirugía, y que correspondería a la forma de profilaxis secundaria B de la clasificación del PEDNET. Con independencia de definiciones, el porcentaje de pacientes en profilaxis del 44% es semejante al nuestro, siendo más bajo que el observado en la serie de Plug, 67,6%. El porcentaje hallado por Biss, de 62,3%, es también más elevado, pero hace referencia a la profilaxis establecida con factor VIII o IX, administrada por lo menos una vez a la semana durante 45 semanas, lo que hace tan complicada su comparación como en el caso de Butler.

En las formas moderadas, el 21,8% de todos los pacientes se hallaban en profilaxis, porcentaje mayor que el de Taki, 17%, y muy superior al de Plug, 11,9%. Este dato puede que esté en relación con el número de pacientes considerado, pero nos debe hacer reflexionar si realmente todos estos pacientes debieran estar en profilaxis.

En las formas moderadas, el 21,8% de todos los pacientes se hallaban en profilaxis, porcentaje mayor que el de Taki, 17%, y muy superior al de Plug, 11,9%. Este dato puede que esté en relación con el número de pacientes considerado, pero nos debe hacer reflexionar si realmente todos estos pacientes debieran estar en profilaxis.

La profilaxis en niños

Con relación a los pacientes pediátricos afectos de hemofilia A grave en nuestra serie (Tablas 3 y 4), estarían en alguna forma de profilaxis el 72,46%, cifra similar al 77% reflejado por Blanchette *et al.*¹⁹ en una valoración conjunta de niños estadounidenses y canadienses. En esta comparación hay que tener en cuenta el corte de edad, que en nuestros casos se estableció a los 14 años mientras que en su estudio fue a los 18; sin embargo, en la serie estadounidense aislada el porcentaje es más bajo: 47%. Con relación a la HB, el porcentaje es del 67,74% en nuestra serie frente al 44% en la serie canadiense y 30% en la norteamericana. En la serie de Plug *et al.* en el año 2001 estarían en profilaxis el 86% de los niños holandeses, considerando tanto las HA y HB graves con el corte de edad a los 16 años¹⁰ frente al 71,85% en la nuestra. Debe existir un porcentaje óp-

Tabla 2

Tiempo de profilaxis (pacientes tratados en profilaxis)		Tipo de hemofilia				Gravedad de la hemofilia						Rango de edad				Total	
		Hemofilia A		Hemofilia B		Leve		Moderado		Grave		Pediátrico		Adulto		n	%
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%		
Hemofilia A	No determinado	15	3,76	-	-	3	14,29	3	4,62	9	2,88	9	4,89	6	2,79	15	3,76
	Profilaxis primaria A	36	9,02	-	-	-	0,00	4	6,15	32	10,22	28	15,22	8	3,72	36	9,02
	Profilaxis primaria B	45	11,28	-	-	4	19,05	3	4,62	38	12,14	40	21,74	5	2,33	45	11,28
	Profilaxis secundaria A	206	51,63	-	-	6	28,57	35	53,85	165	52,72	88	47,83	118	54,88	206	51,63
	Profilaxis secundaria B	97	24,31	-	-	8	38,10	20	30,77	69	22,04	19	10,33	78	36,28	97	24,31
	Total	399	100	-	-	21	100	65	100	313	100	184	100	215	100	399	100
Hemofilia B	No determinado	-	-	-	0,00	-	0,00	-	0,00	-	0,00	-	0,00	-	0,00	-	0,00
	Profilaxis primaria A	-	-	4	6,06	-	0,00	1	4,17	3	7,69	2	6,67	2	5,56	4	6,06
	Profilaxis primaria B	-	-	13	19,70	1	33,33	2	8,33	10	25,64	12	40,00	1	2,78	13	19,70
	Profilaxis secundaria A	-	-	23	34,85	2	2	10	41,67	11	28,21	12	40,00	11	30,56	23	34,85
	Profilaxis secundaria B	-	-	26	39,39	-	0,00	11	45,83	15	38,46	4	13,33	22	61,11	26	39,39
	Total	-	-	66	100	3	100	24	100	39	100	30	100	36	100	66	100
Total	No determinado	15	3,76	-	0,00	3	12,50	3	3,37	9	2,56	9	4,21	6	2,39	15	3,23
	Profilaxis primaria A	36	9,02	4	6,06	-	0,00	5	5,62	9,94	9,94	30	14,02	10	3,98	40	8,60
	Profilaxis primaria B	45	11,28	13	19,70	5	20,83	5	5,62	48	13,64	52	24,30	6	2,39	58	12,47
	Profilaxis secundaria A	206	51,63	23	34,85	8	33,33	45	50,56	176	50,00	100	46,73	129	51,39	229	49,25
	Profilaxis secundaria B	97	24,31	26	39,39	8	33,33	31	34,83	84	23,86	23	10,75	100	39,84	123	26,45
	Total	399	100	66	100	24	100	89	100	352	100	214	100	251	100	465	100

timo de profilaxis para este tipo de enfermos, que no podrá ser nunca del 100% por diversas razones como: menores de 1 año, periodo en el que no se aplica ninguna forma de profilaxis, retraso en el comienzo de la misma, desarrollo de inhibidores que fuerza a otro tipo de terapéutica, resistencia familiar a su aplicación, definición del límite de la edad pediátrica y otras menos conocidas. Es en este tipo de aspectos donde habrá que buscar las razones de estas diferencias.

La profilaxis en adultos

Con relación a los pacientes adultos (mayores de 14 años), se hallaban en profilaxis 251 (Tablas 2 y 5), 215 de HA y 36 de HB. Entre las formas graves, 165 pa-

cientes afectos de HA de 432 estaban en profilaxis (38,15%) e igualmente 18 de 55 (32,72%) en la HB. En total suponían el 37,57%. Con respecto a las formas moderadas, los porcentajes serían de 22,15% para la HA, de 26,22% para la HB y de 23,2% para el total, cifras inferiores a las comunicadas por Biss (53%) para la HA grave, pero superiores para la HB grave (20%). Los resultados en su serie para las formas moderadas es bajo, tanto para la HA (12%) como para la HB (6%)⁸, siendo su corte de edad de 18 años. Valorando en el grupo de Plug *et al.*¹⁰ los mayores de 16 años, las cifras para las HA y HB en conjunto serían para las formas graves y moderadas de 59,3% y de 10,76%, respectivamente. Las diferencias en las formas moderadas deben obedecer al sesgo de edad y el número de pacientes incluidos en las series. Es evidente que en nuestra

serie algunos pacientes adultos de hemofilia A grave no están en alguna forma de profilaxis.

Debido a la naturaleza transversal de nuestro estudio no se han podido establecer valores evolutivos que nos hubieran permitido establecer comparaciones con los trabajos de Richards *et al.*²⁰ o Walsh *et al.*²¹.

Cumplimiento del tratamiento

La valoración del número de infusiones semanales (Tabla 6) ofrece una mediana de 3 en todas las formas de profilaxis con valores extremos de 1 a 7 para la PPA, de 1 a 3 para la PPB, de 1 a 7 para la PSA y de 1 a 4 para la PSB. La dosis óptima de factor para los pacientes en tratamiento profiláctico no ha sido establecida²² ni tampoco los intervalos que podrían ser más individualizados de lo que han sido hasta el presente. Las dosis en los niños toman más en consideración la tendencia actual del modo de tratamiento que la clínica; por otra parte, la dosis en los niños suele ser más alta que en los adultos, simplemente, por la presentación farmacológica. Este estudio, que es transversal, tiene poco peso específico frente a otros que, aun de corta duración, pueden opinar sobre la posología y la frecuencia de infusiones y la progresión del daño articular²². Suponemos, a través de nuestros datos, que los pacientes añosos tienen peor estado articular, ya que han sido tratados menos intensamente, especialmente en la infancia, cuando se comparan con los pacientes más jóvenes. Estamos de acuerdo con Ahnström *et al.*²² en cuanto a que los resultados pueden estar influenciados por el método usado en la valoración articular, que tanto en su caso como el nuestro ha sido el mismo⁵.

Es muy probable que en un futuro próximo la dosis deba ser individualizada, basada esencialmente en estudios farmacocinéticos²³⁻²⁷.

Tabla 3.

Pacientes pediátricos graves	Tratamiento profiláctico	Total	
		n	%
Hemofilia A	No determinado	10	4,83
	No	47	22,71
	Sí	150	72,46
	Total	207	100
Hemofilia B	No determinado	2	6,45
	No	8	25,81
	Sí	21	67,74
	Total	31	100
Total	No determinado	12	5,04
	No	55	23,11
	Sí	171	71,85
	Total	238	100

Tabla 4.

Pacientes pediátricos.	Tipo de profilaxis	Leve		Moderado		Grave		Total	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Hemofilia A	No determinado	2	20,00	1	3,85	6	4,05	9	4,89
	Profilaxis primaria A	-	0,00	2	7,69	26	17,57	28	15,22
	Profilaxis primaria B	3	30,00	3	11,54	34	22,97	40	21,74
	Profilaxis secundaria A	3	30,00	14	53,85	71	47,97	88	47,83
	Profilaxis secundaria B	2	20,00	6	23,08	11	7,43	19	19
	Total	10	100	26	100	148	100	184	100
Hemofilia B	No determinado	-	0,00	-	0,00	-	0,00	-	0,00
	Profilaxis primaria A	-	0,00	-	0,00	2	9,52	2	6,67
	Profilaxis primaria B	1	100	2	25,00	9	42,86	12	40,00
	Profilaxis secundaria A	-	0,00	4	50,00	8	38,10	12	40,00
	Profilaxis secundaria B	-	0,00	2	25,00	2	9,52	4	13,33
	Total	1	100	100	100	21	100	30	100
Total	No determinado	2	18,18	1	2,94	6	3,55	9	4,21
	Profilaxis primaria A	-	0,00	2	5,88	28	16,57	30	14,02
	Profilaxis primaria B	4	36,36	5	14,71	43	25,44	52	24,30
	Profilaxis secundaria A	3	27,27	18	52,94	79	46,75	100	46,73
	Profilaxis secundaria B	2	18,18	8	23,53	13	7,69	23	10,75
	Total	11	100	34	100	169	100	214	100

Tabla 5.

Pacientes adultos Tratamiento profiláctico		Leve		Moderado		Grave		Total	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Hemofilia A	No determinado	6	2,12	4	2,22	1	0,23	11	1,23
	No	266	93,99	137	76,11	267	61,66	670	74,78
	Sí	11	3,89	39	21,67	165	38,11	215	24,00
	Total	283	100	180	100	433	100	896	100
Hemofilia B	No determinado	.	0,00	1	1,61	2	3,51	3	1,91
	No	36	94,74	45	72,58	37	64,91	75,16	75,16
	Sí	2	5,26	16	25,81	18	31,58	22,93	22,93
	Total	38	100	62	100	57	100	157	100
Total	No determinado	6	1,87	5	2,07	3	0,61	14	1,33
	No	302	94,08	182	75,21	304	62,04	788	74,83
	Sí	13	4,05	55	22,73	183	37,35	251	23,84
	Total	321	100	242	100	490	100	1.053	100

Estado articular

En conjunto existe el mismo grado de deterioro articular (Tabla 7) entre los pacientes en tratamiento a

demanda y los que están en profilaxis. Sin embargo, cuando se considera el grupo pediátrico se comprueba que ninguno de los pacientes en PPA y el 4,65% de los que se hallaban en PPB tenían artropatía (Tabla 8); sin embargo, ésta es evidente entre los pacientes en PSA: 35,44% y en PSB: 38,46%. En los pacientes adultos, ninguno de los que se hallaban en PPA o PPB tenían lesiones articulares frente al 69,07% de los que se hallaban en PSA y 74,65% de los que estaban en PSB (Tabla 9). El comienzo temprano de la profilaxis es esencial en la prevención de la artropatía hemofílica (AH), en Holanda la profilaxis se inició al final de los años sesenta¹⁰, mucho antes que en nuestro medio, lo que podría justificar que el porcentaje de AH se haya mantenido constante desde el año 1972, afectando alrededor de un 30% de los pa-

cientes. Las articulaciones más afectadas fueron, por orden decreciente, los tobillos, las rodillas y los codos.

El envejecimiento de la población hemofílica va a suponer un nuevo desafío en lo que hace referen-

Tabla 6.

Número de infusiones a la semana		No determinado	Profilaxis primaria A	Profilaxis primaria B	Profilaxis secundaria A	Profilaxis secundaria B	Total
Hemofilia A	Media	2,91	2,90	2,87	2,69	2,95	2,80
	Desv. est.	0,54	1,03	0,40	0,79	0,72	0,76
	Mínimo	2,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	Mediana	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
	Máximo	4,00	7,00	3,00	7,00	4,00	7,00
	N válida	11	35	45	196	94	381
	N faltante	4	1	0	10	3	18
Hemofilia B	Media	-	2,00	2,23	2,05	1,85	2,01
	Desv. est.	-	0,00	0,44	0,38	0,59	0,49
	Mínimo	-	2,00	2,00	1,00	1,00	1,00
	Mediana	-	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
	Máximo	-	2,00	3,00	3,00	3,00	3,00
	N válida	0	3	13	21	23	60
	N faltante	0	1	0	2	3	6
Total	Media	2,91	2,83	2,72	2,63	2,74	2,69
	Desv. est.	0,54	1,02	0,49	0,78	0,82	0,78
	Mínimo	2,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	Mediana	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
	Máximo	4,00	7,00	3,00	7,00	4,00	7,00
	N válida	11	38	58	217	117	441
	N faltante	4	2	0	12	6	24

Tabla 7.

Estado articular (AHE)		ND		A demanda		Profilaxis		Total	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Hemofilia A	No determinado	-	-	15	1,85	3	0,75	18	1,47
	No	12	75,00	432	53,14	211	52,88	655	53,34
	Sí	4	25,00	366	45,02	185	46,37	555	45,20
	Total	16	100%	813	100	399	100	1228	100
Hemofilia B	No determinado	-	-	1	0,74	1	1,52	2	0,97
	No	4	80,00	72	53,33	42	63,64	118	57,28
	Sí	1	20,00	62	45,93	23	34,85	86	41,75
	Total	5	100	135	100	66	100	206	100
Total	No determinado	-	-	16	1,69	4	0,86	20	1,39
	No	16	76,19	504	53,16	253	54,41	773	53,91
	Sí	5	23,81	428	45,15	208	44,73	641	44,70
	Total	21	100	948	100	465	100	1.434	100

cia las patologías propias de la edad, a la vez que se hace preciso atender a su enfermedad de base para evitar las hemorragias graves y la tendencia degenerativa de las articulaciones.

Tipo de factor y hemorragias

Respecto al tipo de producto infundido, valorado en 465 pacientes, se comprueba que, en conjunto, exis-

te una tendencia clara hacia el empleo de los factores recombinantes (67,31%) frente a los plasmáticos (32,69%). Esta distribución es similar en la HA, pero difiere en la HB, en la que el empleo de ambos productos es semejante: 28% frente a 38% (Tabla 10). La media de infusiones para la HA fue de 2,81 por semana y de 2,01 para la HB (Tabla 11).

La media de hemorragias de todos los pacientes en profilaxis fue superior en los pacientes en PSA y PSB con relación las observadas en los que estaban en PPA y

Tabla 8.

AHE. Pediátricos graves		No determinado		Profilaxis primaria A		Profilaxis primaria B		Profilaxis secundaria A		Profilaxis secundaria B		Total	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Hemofilia A	No determinado	-	0,00	-	0,00	1	2,94	-	0,00	-	0,00	1	0,68
	No	6	100	26	100	31	91,18	44	61,97	7	63,64	114	77,03
	Sí	-	0,00	-	0,00	2	5,88	27	38,03	4	36,36	33	22,30
	Total	6	100	26	100	34	100	71	100	11	100	148	100
Hemofilia B	No determinado	-	-	-	0,00	-	0,00	-	0,00	-	0,00	-	0,00
	No	-	-	2	100	9	100	7	87,50	1	50,00	19	90,48
	Sí	-	-	-	0,00	-	0,00	1	12,50	1	50,00	2	9,52
	Total	-	-	2	100	66	100	8	100	2	100	21	100
Total	No determinado	-	0,00	-	0,00	1	2,33	-	0,00	-	0,00	1	0,59
	No	6	100	28	100	40	93,02	51	64,56	8	61,54	133	78,70
	Sí	-	0,00	-	0,00	2	4,65	28	35,44	5	38,46	35	20,71
	Total	6	100	28	100	43	100	79	100	13	100	169	100

Tabla 9.

AHE. Adultos graves		No determinado		Profilaxis primaria A		Profilaxis primaria B		Profilaxis secundaria A		Profilaxis secundaria B		Total	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Hemofilia A	No determinado	-	0,00	-	0,00	-	0,00	1	1,06	-	0,00	1	0,61
	No	1	33,33	6	100	4	100	28	29,79	16	27,59	55	33,33
	Sí	2	66,67	-	0,00	-	0,00	65	69,15	42	72,41	109	66,06
	Total	3	100	6	100	4	100	94	100	58	100	165	100
Hemofilia B	No determinado	-	-	-	0,00	-	0,00	-	0,00	-	0,00	-	0,00
	No	-	-	1	100	1	100	1	33,33	2	15,38	5	27,78
	Sí	-	-	-	0,00	-	0,00	2	66,67	11	84,62	13	72,22
	Total	-	-	1	100	1	100	3	100	13	100	18	100
Total	No determinado	-	0,00	-	0,00	-	0,00	1	1,03	-	0,00	1	0,55
	No	1	33,33	7	100	5	100	29	29,90	18	25,35	60	32,79
	Sí	2	66,67	-	0,00	-	0,00	67	69,07	53	74,65	122	66,67
	Total	3	100	7	100	5	100	97	100	71	100	183	100

PPB. Considerando a todos los pacientes en profilaxis, la media fue de 2,84 sangrados por año (Tabla 12).

En conjunto, la vía de administración del fármaco en pacientes en profilaxis fue mayoritariamente la vena periférica.

Modo de infusión

El porcentaje implantación de catéteres en nuestra serie es más significativa en los pacientes en PPA,

seguida de la PPB, estos hallazgos son comprensibles si se tiene en cuenta que se trata de pacientes menores de 2 años en el caso de PPA, en los que la infusión intravenosa continuada es difícil de practicar y supone una barrera frente a la aplicación de la profilaxis. En nuestra serie el acceso venoso central en la PPA y PPB supone alrededor de un 25% (Tabla 13), que es un dato similar al reflejado en el metaanálisis de Valentino²⁸, en cambio la reportada por Butler¹¹ nos ofrece unos valores mucho más elevados en profilaxis primaria y lo mismo se puede de-

Tabla 10.

Producto infundido (pacientes en tratamiento)		No determinado		Profilaxis primaria A		Profilaxis primaria B		Profilaxis secundaria A		Profilaxis secundaria B		Total	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Hemofilia A	Tratamiento recombinante	12	80,00	32	88,89	39	86,67	160	77,67	42	43,30	285	71,43
	Tratamiento plasmático	3	20,00	4	11,11	6	13,33	46	22,33	55	56,70	114	28,57
	Total	15	100	36	100	45	100	206	100	97	100	399	100
Hemofilia B	Tratamiento recombinante	-	-	1	25,00	7	53,85	12	52,17	8	30,77	28	42,42
	Tratamiento plasmático	-	-	3	75,00	6	46,15	11	47,83	18	69,23	38	57,58
	Total	-	-	4	100	13	100	23	100	26	100	66	100
Total	Tratamiento recombinante	12	80,00	33	82,50	46	79,31	172	75,11	50	40,65	313	67,31
	Tratamiento plasmático	3	20,00	7	17,50	12	20,69	57	24,89	73	59,35	152	32,69
	Total	15	100	40	100	58	100	229	100	123	100	465	100

Tabla 11.

Número de infusiones a la semana		No determinado	Profilaxis primaria A	Profilaxis primaria B	Profilaxis secundaria A	Profilaxis secundaria B	Total
Hemofilia A	Media	2,91	2,90	2,87	2,69	2,95	2,80
Hemofilia B	Media	-	2,00	2,23	2,05	1,85	2,01
Total	Media	2,91	2,83	2,72	2,63	2,74	2,69

Tabla 12.

Número de episodios emorrágicos durante 2006		No determinado	Profilaxis primaria A	Profilaxis primaria B	Profilaxis secundaria A	Profilaxis secundaria B	Total
Hemofilia A	Media	0,46	1,32	1,18	3,10	4,31	2,92
Hemofilia B	Media	-	2,00	1,62	1,39	3,58	2,33
Total	Media	0,46	1,39	1,28	2,92	4,15	2,84

Tabla 13.

Modo de infusión (vía de administración del fármaco)		No determinado		Profilaxis primaria A		Profilaxis primaria B		Profilaxis secundaria A		Profilaxis secundaria B		Total	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Hemofilia A	No determinado	1	6,67	-	0,00	-	0,00	2	0,97	3	3,09	6	1,50
	Periférica	10	66,67	25	69,44	37	82,22	183	88,83	93	95,88	348	87,22
	Acceso venoso central	4	26,67	9	25,00	6	13,33	18	8,74	1	1,03	38	9,52
	Ambas	-	0,00	2	5,56	2	4,44	3	1,46	-	0,00	7	1,75
	Total	15	100	36	100	45	100	206	100	97	100	399	100
Hemofilia B	No determinado	-	-	-	0,00	-	0,00	-	0,00	-	0,00	-	0,00
	Periférica	-	-	3	75,00	11	84,62	23	100	25	96,15	62	93,94
	Acceso venoso central	-	-	1	25,00	1	7,69	-	0,00	1	3,85	3	4,55
	Ambas	-	-	-	0,00	1	7,69	-	0,00	-	0,00	1	1,52
	Total	-	-	4	100	13	100	23	100	26	100	66	100
Total	No determinado	1	6,67	-	0,00	-	0,00	2	0,87	3	2,44	6	1,29
	Periférica	10	66,67	28	70,00	48	82,76	206	89,96	118	95,93	410	88,17
	Acceso venoso central	4	26,67	10	25,00	7	12,07	18	7,86	2	1,63	41	8,82
	Ambas	-	0,00	2	5,00	3	5,17	3	1,31	-	0,00	8	1,72
	Total	15	100	40	100	58	100	229	100	123	100	465	100

cir de la de Blanchette, tanto en HA (82%) como en HB (77%), en pacientes con dosis "completa" o protocolo de Malmö. Las complicaciones graves de los accesos venosos son poco frecuentes²⁸, las infecciones comunicadas en series publicadas hasta el año 2003 ha oscilado entre el 0,28 y 1,6 en pacientes/

días sin inhibidor²⁹, nuestro valor de 0,73 por mil pacientes/días se ajusta, por tanto, a esta revisión. No se han observado casos de trombosis y, considerando el número de casos con vías centrales, nuestra serie es semejante a la sueca de Ljung³⁰. El funcionamiento inadecuado supuso, en nuestro caso, un

28,12% en el año de seguimiento frente a la serie de Ljung de 18,75% en una media de 13 meses, aunque también parece claro que en esta última serie el problema de funcionamiento anormal está definido como obstrucción del mismo.

Conclusiones

Los resultados de esta serie oscilan dentro y fuera de los obtenidos por otras, existen discrepancias evidentes porque hay que considerar diferentes variables, entre las que se cuentan el corte de edad, las definiciones de profilaxis, los intervalos en la administración de la misma, las desviaciones en el número de los pacientes incluidos en algunas formas de gravedad, las características de las valoraciones: transversales, retrospectivas, progresivas, etc. En nuestra serie será preciso analizar las causas por las que no se alcanza un porcentaje de profilaxis primaria más elevado en niños o de secundaria en adultos. Este estudio transversal nos da una idea estática de la situación de la hemofilia en España en el año 2006 en cuanto a la profilaxis, por tanto estos datos pueden cambiar en muchos aspectos en el tiempo, pero no cabe duda de que los aquí reflejados serán un referente para estudios posteriores.

Agradecimientos

Quisiera expresar mi reconocimiento al Grupo de Estudio Epidemiológico de Hemofilia en España y a todos los hospitales que han contribuido a la realización de este trabajo.

Bibliografía

- Aznar JA, Lucia F, Abad-Franch L, Jiménez-Yuste V, Pérez R, Batlle J, et al. Haemophilia in Spain. *Haemophilia* 2009 May; 15 (3): 665-75.
- Fischer K, van der Bom JG, Molho P, Negrier C, Mauser-Bunschoten EP, Roosendaal G, et al. Prophylactic versus on-demand treatment strategies for severe haemophilia: a comparison of costs and long-term outcome. *Haemophilia* 2002; 8 (6): 745-52.
- Nilsson IM. The management of hemophilia patients with inhibitors. *Transfus Med Rev* 1992; 6 (4): 285-93.
- Manco-Johnson MJ, Abshire TC, Shapiro AD, Riske B, Hacker MR, Kilcoyne R, et al. Prophylaxis versus episodic treatment to prevent joint disease in boys with severe hemophilia. *N Engl J Med* 2007; 357 (6): 535-44.
- Pettersson H, Ahlberg A, Nilsson IM. A radiologic classification of hemophilic arthropathy. *Clin Orthop Relat Res* 1980; 149: 153-9.
- Hacker MR, Geraghty S, Manco-Johnson M. Barriers to compliance with prophylaxis therapy in haemophilia. *Haemophilia* 2001; 7 (4): 392-6.
- Donadel-Claeyssens S. Current co-ordinated activities of the PEDNET (European Paediatric Network for Haemophilia Management). *Haemophilia* 2006; 12 (2): 124-7.
- Biss TT, Chan AK, Blanchette V. The use of prophylaxis in 2663 children and adults with haemophilia: results of the 2006 Canadian national haemophilia prophylaxis survey. *Haemophilia* 2008; 14: 923-30.
- Larsson SA, Nilsson IM, Blombäck M. Current status of Swedish hemophiliacs. I. A demographic survey. *Acta Med Scand* 1982; 212 (4): 195-200.
- Plug I, van der Bom JG, Peter M, Mauser-Bunschoten E, De Goede-Bolder A, Haijnen L, et al. Thirty years of haemophilia treatment in the Netherlands, 1972-2001. *Blood* 2004; 14: 3494-500.
- Butler RB, McClure W, Wulff K. Practice patterns in haemophilia A therapy--a survey of treatment centres in the United States. *Haemophilia* 2003; 9 (5): 549-54.
- Windyga J, Lopaciuk S, Stefanska E, Juszynski A, Wozniak D, Strzelecki O, et al. Haemophilia in Poland. *Haemophilia* 2006; 12 (1): 52-7.
- Ono O, Suzuki Y, Yosikawa K, Wada I, Doi Y, Takano M, et al. Assessment of haemophilia treatment practice pattern in Japan. *Haemophilia* 2009; 15 (5): 1032-8.
- Taki M, Shirahata A. Current situation of regular replacement therapy (prophylaxis) for haemophilia in Japan. *Haemophilia* 2009; 15 (1): 78-82.
- Lofqvist T, Nilsson IM, Berntorp E, Pettersson H. Haemophilia prophylaxis in young patients--a long-term follow-up. *J Intern Med* 1997; 241 (5): 395-400.
- Ota S, McLimont M, Carcao MD, Blanchette VS, Graham N, Paradis E, et al. Definitions for haemophilia prophylaxis and its outcomes: the Canadian consensus study. *Haemophilia* 2007; 13 (1): 12-20.
- Kern M, Blanchette V, Stain AM, Einarson TR, Feldman BM. Clinical and cost implications of target joints in Canadian boys with severe hemophilia A. *J Pediatr* 2004; 145 (5): 628-34.
- Mulder K, Llinas A. The target joint. *Haemophilia* 2004; 10 (Suppl 4): 152-6.
- Blanchette VS, McCready M, Achonu C, Abdolell M, Rivard G, Manco-Johnson MJ. A survey of factor prophylaxis in boys with haemophilia followed in North American haemophilia treatment centres. *Haemophilia* 2003; 9 (Suppl 1): 19-26; discussion.
- Richards M, Altisent C, Batorova A, Chambost H, Dolan G, De Moerloose P, et al. Should prophylaxis be used in adolescents and adult patients with severe haemophilia? An European survey of practice and outcome data. *Haemophilia* 2007; 13: 473-9.
- Walsh CE, Valentino LA. Factor VIII prophylaxis for adult patients with severe haemophilia A: results of a US survey of attitudes and practices. *Haemophilia* 2009; 15 (5): 1014-21.
- Ahnstrom J, Berntorp E, Lindvall K, Björkman S. A 6-year follow-up of dosing, coagulation factor levels and bleedings in relation to joint status in the prophylactic treatment of haemophilia. *Haemophilia* 2004; 10 (6): 689-97.
- Carlsson M, Berntorp E, Björkman S, Lindvall K. Pharmacokinetic dosing in prophylactic treatment of hemophilia A. *Eur J Haematol* 1993; 51 (4): 247-52.
- Björkman S, Carlsson N. The pharmacokinetics of factor VIII and factor IX: methodology, pitfalls and applications. *Haemophilia* 1997; 3: 1-8.
- Carlsson M, Berntorp E, Björkman S, Lethagen S, Ljung R. Improved cost-effectiveness by pharmacokinetic dosing of factor VIII in prophylactic treatment of haemophilia A. *Haemophilia* 1997; 3: 96-101.
- Carlsson M, Björkman S, Berntorp E. Multidose pharmacokinetics of factor IX: implications for dosing in prophylaxis. *Haemophilia* 1998; 4 (2): 83-8.
- Björkman S, Berntorp E. Pharmacokinetics of coagulation factors: clinical relevance for patients with haemophilia. *Clin Pharmacokinet* 2001; 40 (11): 815-32.
- Valentino LA, Ewenstein B, Navickis RJ, Wilkes MM. Central venous access devices in haemophilia. *Haemophilia* 2004; 10 (2): 134-46.

29. Ljung R. Central venous lines in haemophilia. *Haemophilia* 2003; 9 (Suppl 1): 88-92; discussion 3.
30. Ljung R, van den Berg M, Petrini P, Tengborn L, Scheibel E, Kekomaki R, et al. Port-A-Cath usage in children with haemophilia: experience of 53 cases. *Acta Paediatr* 1998; 87 (10): 1051-4.

ACTUALIZACIÓN DE LA PROFILAXIS PRIMARIA EN HEMOFILIA E INHIBIDORES

M.^aF. LÓPEZ FERNÁNDEZ¹, C. ALTISENT²

¹ Servicio de Hematología y Hemoterapia. Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña.

² Unitat d'Hemofília. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona

Los pacientes pediátricos con hemofilia grave que desarrollan anticuerpos neutralizantes, inhibidores de la actividad del factor VIII o IX, constituyen un grupo de pacientes con especial riesgo de hemorragias articulares recurrentes que conducen a la aparición de artropatía hemofílica irreversible y de presentar hemorragias en otras localizaciones. El tratamiento "a demanda" intensivo y precoz de los episodios hemorrágicos controla eficazmente el sangrado con un número reducido de infusiones. Sin embargo, las hemorragias articulares recurrentes conducen invariablemente a la aparición de la artropatía hemofílica. Por ello, es de suma importancia, en estos pacientes, optimizar el tratamiento a corto y largo plazo. La erradicación del inhibidor mediante inmunotolerancia (IT) conlleva importantes beneficios a largo plazo. Sin embargo, mientras se instaura la IT o durante el periodo de tiempo en el que se detecta el inhibidor, siguen produciéndose complicaciones hemorrágicas que conducen a la destrucción articular¹.

La profilaxis primaria es la modalidad terapéutica recomendada, en pacientes hemofílicos sin inhibidor, para reducir los episodios hemorrágicos y prevenir la lesión articular. Un trabajo en el que se analiza la experiencia de 25 años en Suecia con profilaxis primaria en 60 niños con hemofilia A y B grave pone en evidencia que este enfoque reduce la frecuencia de episodios hemorrágicos, el dolor, la incidencia de artropatía, las visitas a los servicios de urgencias, las hospitalizaciones y el absentismo laboral y educacional, a la par que mejora la funcionalidad física y la calidad de vida². Los beneficios de la profilaxis en términos de disminución de las hemartrosis, mejores puntuaciones clínicas articulares y mejor calidad de vida, quedan demostrados en otro estudio efectuado en 38 niños ingleses³. Recientemente, un estudio aleatorizado efectuado en 60 ni-

ños con hemofilia A grave en el que se comparaba la respuesta entre el tratamiento "a demanda" y la administración de al menos tres dosis semanales de FVIII asociado a dosis intensivas de FVIII en caso de hemartrosis ha demostrado la superioridad de la profilaxis sobre el tratamiento sustitutivo "a demanda"⁴. En este estudio se observó (mediante resonancia magnética) que, a los 6 años de edad, el 93% de los niños sometidos al régimen de profilaxis tenían índices articulares normales frente al 55% de los que habían recibido tratamiento "a demanda". Además, la profilaxis reducía de forma significativa el número medio anual de episodios hemorrágicos totales por niño ($0,63 \pm 1,35$ frente a $4,89 \pm 3,57$, $p < 0,001$). Estos resultados demuestran que, al prevenir los episodios hemorrágicos agudos, es posible evitar a largo plazo el daño articular en niños con hemofilia A grave.

El papel emergente de la profilaxis en pacientes con inhibidor

Actualmente existe un interés creciente sobre la posibilidad de extender, utilizando agentes baipás, los beneficios de la profilaxis en pacientes hemofílicos graves sin inhibidor, a pacientes con inhibidor. Sin embargo los datos disponibles en la literatura sobre profilaxis en pacientes con inhibidor es limitada y la evidencia sobre su eficacia en niños, anecdótica. También se debate sobre las dosis y la frecuencia de administración de los agentes baipás necesarias para evitar las hemorragias.

En los últimos años se han publicado casos clínicos o series cortas de pacientes hemofílicos con inhibidores, tratados con agentes baipás administrados de forma periódica y prolongada. La mayoría de estos estudios se han efectuado en pacientes con artropatías bien establecidas, y los resultados ponen en evidencia que la administración profiláctica de estos agentes reduce los episodios hemorrágicos⁵⁻⁷. El grupo de trabajo sobre tratamiento de pacientes hemofílicos con inhibidor de la SETH también efectuó un estudio retrospectivo con el fin de conocer la difusión de la profilaxis secundaria en nuestro país y valorar su eficacia⁸. En 5 de los 9 pacientes incluidos se observó una buena respuesta; en 1, una respuesta parcial, y en los 3 restantes, la profilaxis no se tradujo en una reducción de los hemartrosis. La reducción global de los episodios hemorrágicos fue del 54%.

En 2007, Konkle *et al.*⁹ publicaron el primer estudio prospectivo y aleatorizado de profilaxis secundaria con rFVIIa diseñado con el fin de valorar la eficacia de este agente hemostático en pacientes con alta incidencia de episodios hemorrágicos. En este estudio se administraron diariamente dosis de 90 o 270 $\mu\text{g}/\text{kg}$ durante 3 meses, a 22 pacientes hemofílicos con inhibidor (edad

Tabla 1. Resumen de los episodios hemorrágicos en el periodo inicial

Paciente	Primera hemorragia	Edad en la primera hemorragia (meses)	Indicación para el primer tratamiento con FVIII	Edad de la primera exposición al FVIII (meses)	No de hemartrosis	Otros sangrados	Edad al inicio de la profilaxis temprana con FVIII (meses)
1	HIC parenquimatosa	0	Hemorragia intracraneal	0	0	1 cutánea 1 venopunción	2,23
2	Cefalohematoma	0	Hemartrosis TI	18,6	1 (TI)	1 cutáneo 1 venopunción	18,6
3	Hemoperitoneo	0,03	Hemoperitoneo	0,06	3 (RD)	8 musculares 1 venopunción 1 lengua	24,3
4	Ruptura frenillo lingual	10,4	Ruptura frenillo lingual	10,4	0	1 cutáneo 2 recidivas (frenillo lingual)	-
5	Hematoma femoral pospunción arterial, pseudoaneurisma	0	Hematoma femoral	0	0	1 venopunción	-
6	Cefalohematoma traumático	8,13	Cefalohematoma traumático	8,13	0	5 cutáneos 1 muscular	-
7	Hemartrosis (CI)	7,6	Hemartrosis (CI)	7,6	1 (CI)	1 cutáneo 1 muscular 1 venopunción	20,3
8	Cefalohematoma hemorragia subaracnoidea	0	HIC	0,12	0	1 venopunción	-
9	Cefalohematoma	0	HIC, hematoma subdural	10,0	0	0	-
10	Hematoma cutáneo	7,8	Hemartrosis (CaD)	11,3	2 (CaD)	0	-

HIC: hemorragia intracraneal; TI: tobillo izquierdo; RD: rodilla derecha; CaD: cadera derecha; CI: codo izquierdo.

a media 15,7 años, límites de 5,1-56,1), y se comparaba el número de episodios hemorrágicos durante los 3 meses de profilaxis con periodos de tiempo similares antes y después de la profilaxis, en los cuales los pacientes recibían tratamiento “a demanda”. La frecuencia de hemorragias se redujo un 45% en los pacientes que habían recibido 90 µg/kg y un 59% en el grupo de 270 µg/kg, en comparación al periodo previo a la profilaxis y a los pacientes tratados “a demanda” ($p < 0,0001$). Se observó, asimismo, que la reducción de la frecuencia de sangrados se mantenía durante el periodo posterior a la profilaxis. Los resultados de este estudio demostraron otros beneficios adicionales, tales como la reducción de hospitalizaciones ($p = 0,0026$) y absentismo laboral y educacional ($p = 0,0127$), y la mejora en la calidad de vida de los pacientes¹⁰. Sin embargo, la profilaxis no consiguió modificar la puntuación articular ortopédica de los pacientes⁹.

La experiencia sobre el uso de profilaxis con agentes baipás con el fin de evitar los episodios hemorrágicos en todas las articulaciones desde edades tempranas para prevenir o minimizar el desarrollo y la progresión de la artropatía hemofílica es todavía menor.

Los resultados de un estudio retrospectivo en el que se administraban concentrados del complejo protrombínico activado (CCPa) tres veces por semana a cuatro niños hemofílicos con inhibidor sugieren que la profilaxis puede ser una opción viable, capaz de reducir el número de episodios hemorrágicos y de prevenir el daño articular o de retrasar su progresión, especialmente cuando se instaura antes de que se produzcan cambios osteocondrales¹¹. En España, Víctor *et al.*¹² instauraron profilaxis en 5 niños sin datos de artropatía y candidatos a IT, y observaron una reducción en la frecuencia de complicaciones hemorrágicas.

Profilaxis precoz: experiencia en España

El grupo de trabajo de tratamiento de pacientes hemofílicos con inhibidor de la SETH, con el fin de conocer la experiencia existente en nuestro país sobre el uso profiláctico del rFVIIa en niños hemofílicos con inhibidor, ha efectuado un estudio retrospectivo en el que se incluyeron todos los casos existentes en los hospitales españoles. Se pretendía determinar si la profilaxis

Tabla 2. Resumen de los episodios hemorrágicos en el periodo previo

Paciente	Edad en el momento del diagnóstico del inhibidor (meses)	Duración (meses)	No de hemartrosis	Otros sangrados
1	2,3	0,23	0	1 cutáneo 1 venopunción 1 implantación de Port-A-Cath
2	21,23	3,13	0	2 cutáneo 1 venopunción
3	26,6	8,56	1 (rodilla derecha)	2 intramuscular 1 venopunción
4	11,8	23,19	0	5 cutáneos
5	2,23	20,7	0	1 cutáneo 2 venopunción 1 intramuscular
6	34,1	0,73	0	0
7	20,4	0	0	0
8	14,15	3,46	0	2 cutáneos 2 inserción Port-A-Cath
9	10,7	8,03	0	4 cutáneos 1 intramuscular 1 ruptura del frenillo de la lengua 2 venopunción
10	12,4	3,13	4 (3 tobillo izquierdo, 1 cadera izquierda)	1 intramuscular

con rFVIIa instaurada precozmente tras el diagnóstico del inhibidor podía reducir los episodios hemorrágicos totales y las hemartrosis, prevenir el daño articular y preservar las articulaciones libres de artropatía hasta la erradicación del aloanticuerpo, momento en que el enfermo hemofílico pasaría a beneficiarse de otros tratamientos, tales como la profilaxis convencional con FVIII.

Se diseñó una hoja de recogida de datos en la que se solicitaban datos relacionados con el centro hospitalario, la edad del paciente, tipo de hemofilia, características del inhibidor, la dosis e intervalos de tratamiento, el motivo de la profilaxis y el número y localización de los episodios hemorrágicos totales y el de hemartrosis presentes en 3 diferentes periodos: 1) desde el momento del nacimiento hasta la aparición del inhibidor; 2) desde el diagnóstico del inhibidor hasta el inicio de la profilaxis con rFVIIa, y 3) durante la profilaxis con el rFVIIa. La duración de cada periodo, la simultaneidad con la IT, el número de ingresos y los posibles efectos adversos fueron también recogidos. Se compararon el número de hemorragias totales y hemartrosis por paciente y año observadas en los 3 periodos comentados previamente.

Se incluyeron 10 niños, con hemofilia A e inhibidores de alta respuesta, todos ellos menores de 3 años y con menos de 4 hemorragias intraarticulares antes del inicio de la profilaxis. El tiempo medio transcurrido

desde el nacimiento y el diagnóstico del inhibidor fue de 15,6 meses (límites 2,3-34,1 meses) y el tiempo medio entre el diagnóstico del inhibidor y el inicio de la profilaxis de 7,1 meses (límites 0-23,2 meses), inferior al periodo de profilaxis con rFVIIa que fue 10,3 meses (límites 4,1-32 meses). Los episodios hemorrágicos totales en cada periodo fueron 45, 36 y 17, respectivamente, lo que supone 0,29 y 0,51 hemorragias por paciente y año en los dos periodos previos al inicio de la profilaxis. Durante la profilaxis sólo se produjeron 0,17 hemorragias por paciente y año (Tablas 1, 2, 3 y 4). En los tres periodos del estudio hubo 7, 5 y 5 hemartrosis, respectivamente, siendo la incidencia de por paciente y año en cada periodo 0,032, 0,070 y 0,049, respectivamente (Tablas 1, 2, 3 y 4).

Las dosis de rFVIIa durante la profilaxis fueron, 90 µg/kg de peso administrados 3 veces a la semana (270 µg/kg semanales) en 4 niños y de 90 µg/kg/día (630 µg/kg semanales) en los 6 restantes (Tabla 3). En 6 niños, la profilaxis coincidió al menos en parte con la IT y, en los 4 restantes, la profilaxis con rFVIIa se instauró en espera de que el inhibidor descendiera para iniciar la IT (Tabla 3).

Los resultados de este estudio sugieren que la profilaxis precoz con rFVIIa en niños hemofílicos graves, de corta edad, con inhibidores de alta respuesta, reduce el número de episodios hemorrágicos totales y las hemartrosis. Estos resultados son comparables a los

Tabla 3. Resumen de los episodios hemorrágicos en el periodo de profilaxis

Paciente	Edad al inicio de FVIII (meses)	Dosis de FVIII	Duración de la profilaxis (meses)	Número de hemartrosis	Otros sangrados	Edad al inicio de la IT (meses)	Dosis IT
1	2,53	90 µg/kg x 3 veces por semana	6,5	0	1 cutánea 1 implantación de Porth-A-Cath	2,53	FVIII de 3. ^a generación, 50 U/kg x 3 veces por semana
2	24,36	90 µg/kg x 3 veces por semana	8	0	1 cutánea 1 venopunción	24,36	FVIII de 2. ^a generación, 50 U/kg x 3 veces por semana
3	35,16	90 µg/kg x 3 veces por semana	12	0	3 cutánea 1 intramuscular	26,6	FVIII de 2. ^a generación, 50 U/kg x 3 veces por semana
4	34,99	90 µg/kg/día	>32 en curso	0	1 cutánea 1 hematuria	-	-
5	22,93	90 µg/kg/día	5,6	0	0	5,6	FVIII de 1. ^a generación, 100 U/kg/día
6	34,83	90 µg/kg/día	>12 en curso	0	1 intramuscular	-	-
7	20,4	90 µg/kg/día	6	0	0	27	FVIII de 2. ^a generación, 100 U/kg/día
8	17,85	90 µg/kg x 3 veces por semana	7,3	0	0	17,6	FVIII de 3. ^a generación, 50 U/kg x 3 veces por semana
9	18,73	90 µg/kg/día	4,07	1 (tobillo izquierdo)	1 venopunción	-	-
10	15,53	90 µg/kg/día	8,77	4 (2 tobillo derecho, 2 cadera derecha)	0	-	-

IT: Tratamiento de inmunotolerancia.

descritos por Manco-Johnson et al.⁴ en pacientes hemofílicos sin inhibidor con edad similar sometidos a profilaxis primaria con FVIII. En el estudio de Manco-Johnson hubo 17,7 hemorragias y 4,9 hemartrosis por paciente y año en el grupo que recibía tratamiento “a demanda” y 3,3 y 0,63, respectivamente, en el grupo de niños sometidos a profilaxis primaria. En nuestro estudio, durante el periodo de profilaxis con rFVIIa, el número de hemorragias totales y hemartrosis por paciente y año fue incluso inferior 0,17 y 0,049, respectivamente, aunque hay que tener en cuenta que el periodo de profilaxis fue más corto: 49 meses en el estudio de referencia frente a 10,3 meses en nuestro estudio.

Es importante destacar que en 5 de los 10 niños sometidos a profilaxis con rFVIIa, se consiguió erradicar

el inhibidor y que, en el momento de alcanzarse la tolerancia, todos ellos habían tenido un escaso número de hemartrosis (1 niño, 4 hemartrosis en la misma articulación; 3 niños una única hemartrosis; el paciente restante no presentó ninguna hemorragia intraarticular) y no presentaban datos clínicos de artropatía. Los pacientes que iniciaron la profilaxis más tarde, y en los que la profilaxis no se asoció a IT, tuvieron una peor respuesta, con mayor número de episodios hemorrágicos.

La amplia variación de dosis y regímenes utilizadas en estudios previos hace necesario establecer la dosis mínima necesaria, que permita una respuesta eficaz con una máxima seguridad⁹. En estudios previos, los regímenes profilácticos utilizados están comprendidos entre 200-250 µg/kg/semana a 90-270 µg/kg/

Tabla 4. Número total de hemartrosis y hemorragias en los distintos periodos de tratamiento

Paciente	Periodo inicial (hemorragias/hemartrosis)	Periodo previo (hemorragias/hemartrosis)	Periodo profilaxis (hemorragias/hemartrosis)	No total (hemorragias/hemartrosis)
1	3/0	3/0	2/0	8/0
2	4/1*	3/0	2/0	9/1
3	14/3**	4/1*	4/0	22/4
4	4/0	5/0	2/0	11/0
5	2/0	4/0	0/0	6/0
6	7/0	0/0	1/0	8/0
7	4/1***	0/0	0/0	4/1
8	2/0	4/0	0/0	6/0
9	2/0	8/0	2/1 ⁴	12/1
10	3/2****	5/4**	4/4 ^{4a}	12/10
Total ⁵	45 [0,29]/7 [0,032]	36 [0,51]/5 [0,070]	17 [0,17]/5 [0,049]	108/17

⁵ Número total (episodios/año/paciente); * 1 TI; ** 3 RD; *** 1 TI; **** 2 CaD; * 1 RD; ** 3 CI, 1 CaD; ⁴ 1 TI; ^{4a} 2 TD, 2 CaD.

TD, TI: tobillo derecho e izquierdo; RD, RI: rodilla derecha e izquierda; CaD, Cal: cadera derecha e izquierda; CI, CD: codo derecho e izquierdo.

día, lo que supone en muchos casos dosis de rFVIIa inferiores a las utilizadas “a demanda” en caso de episodios hemorrágicos. En nuestro estudio, se obtuvieron resultados similares utilizando dosis de 270 µg/kg y 630 µg/kg semanales, lo que sugiere que puede ser adecuado el prolongar el periodo los intervalos de dosis. Este aspecto puede ser relevante, pues permite reducir la dosis, la frecuencia, el consumo total de rFVIIa y los costes de la profilaxis. En nuestro estudio se observa también, que la utilización de un programa de profilaxis con rFVIIa administrado tres veces a la semana es igual de eficaz que la administración diaria y que cuando se administra la profilaxis simultáneamente con regímenes de IT en los que se utilizan dosis bajas de FVIII (50 UI/KG/3 veces a la semana) se obtiene la tolerancia con pocas complicaciones hemorrágicas, lo que sugiere que este nuevo enfoque terapéutico puede ser una alternativa a las dosis altas de IT (FVIII 200 UI/kg/día).

En conclusión: aunque este estudio tiene varias limitaciones (retrospectivo, no controlado y es una serie corta), y los pacientes con inhibidor pueden tener un cuadro clínico hemorrágico muy variable, es el primer estudio de profilaxis primaria con rFVIIa en niños hemofílicos con inhibidores de alta respuesta. Sobre la base de estos resultados, en los que se demuestra una alta eficacia, similar a la observada en paciente hemofílicos sin inhibidor sometidos a profilaxis primaria con FVIII, creemos que debe considerarse la instauración precoz de profilaxis con rFVIIa, si es posible asociada a IT, debe considerarse en hemofílicos con inhibidores de alta respuesta. No obstante se precisan estudios bien diseñados que confirmen estos resultados.

Bibliografía

1. Hay CRM, Goldberg I, Foulkes M, Dimechele DM. International prospective randomized immune tolerance study: interim analysis of therapeutic efficacy and safety. 3rd Annual Congress of the European Association for Haemophilia and Allied Disorders. 3-5 February 2010. Edinburgh International Conference Centre. Edinburgh, UK. Haemophilia 2010; 16: 20 (P5).
2. Nilsson IM, Bernotorp E, Löfqvist T, Pettersson H. Twenty-five years 'experience of prophylactic treatment in severe haemophilia A and B. J Intern Med 1992; 232: 25-32.
3. Yee TT, Beeton K, Griffioen A, Harrington C, Miners A, Lee CA, et al. Experience of prophylaxis treatment in children with severe haemophilia. Haemophilia 2002; 8: 76-82.
4. Manco-Johnson MJ, Absheri TC, Shapiro AD, Riske B, Hacker MR, Kilcoyne R, et al. Prophylaxis versus episodic treatment to prevent joint disease in boys with severe hemophilia. N Engl J Med 2007; 535-44.
5. Saxon BR, Shanks D, Jory CB, Williams V. Effective prophylaxis with daily recombinant factor VIIa (rFVIIa NovoSeven) in child with high titre inhibitors and target joint. Thromb Haemost 2001; 86: 1126-7.
6. Young G, McDaniel M, Nugent DJ. Prophylactic recombinant factor VIIa in haemophiliac patients with inhibitors. Haemophilia 2005; 11: 203-7.
7. Morfini M, Ausrswald G, Kobelt RA, et al. Prophylactic treatment of haemophilia patients with inhibitors: clinical experience with recombinant factor VIIa in European Haemophilia Centers. Haemophilia 2007; 13: 502-7.
8. Sedano C, Altisent C, García-Candel F, Giménez F, Mingot E, Núñez R, et al. Retrospective evaluation of secondary episodic prophylaxis with rFVIIa in haemophilia patients with inhibitor. J Coagul Disor (aceptado para su publicación).
9. Konkle BA, Ebbesen LS, Erhardtsen E, Bianco RP, Lissitchkov T, Rusen L, et al. Randomized, prospective clinical trial of recombinant factor VIIa for secondary prophylaxis in haemophilia patients with inhibitors. J Thromb Haemost 2007; 5: 1904-13.
10. Hoots WK, Ebbesen LS, Konkle BA, Auerswald GK, Roberts HR, Weatherall J, et al. Secondary prophylaxis with recombinant activated factor VII improves health-related quality of life of haemophilia. Haemophilia 2008; 14: 466-75.

11. Leissinger CA, Becton DL, Ewing NP, Valentino LA. Prophylactic treatment with activated prothrombin complex concentrate (FEIBA) reduces the frequency of bleeding episodes in pediatric patients with haemophilia A and inhibitors. *Haemophilia* 2007; 13: 249-55.
12. Jiménez-Yuste V, Álvarez MT, Martín-Salces M, Quintana M, Rodríguez-Merchán C, López-Cabarcos C, et al. Prophylaxis in 10 patients with severe haemophilia A and inhibitor: different approaches for different clinical situations. *Haemophilia* 2009; 15: 203-9.

Biología molecular de los SMPC (NMP). Novedades clínico-biológicas

COORDINADORAS: D. COLOMER. *Barcelona*

M.^aT. GÓMEZ. *Las Palmas de Gran Canaria*

Resumen del simposio

Los síndromes mieloproliferativos crónicos, ahora denominados neoplasias mieloproliferativas (NMP), comprenden, según la clasificación de la OMS de 2008, los siguientes cuadros: leucemia mieloide crónica (LMC), policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (TE), mielofibrosis primaria (MFP), mastocitosis, leucemia eosinofílica crónica (LEC), leucemia neutrofílica crónica (LNC) y las NMP inclasificables. De todos ellos, los cuatro primeros reciben el nombre de clásicos o típicos, por ser los que se describieron originalmente. Todas estas entidades clínico-patológicas tienen un origen clonal en la célula *stem* y una gran diversidad fenotípica que está relacionada con distintos eventos oncogénicos (mutaciones y genes de fusión) que frecuentemente involucran a una proteína con actividad tirosincinasa. Los ejemplos más prominentes son el reordenamiento BCR-ABL en la LMC y la mutación V617F en la PV, TE y MFP.

La leucemia mieloide crónica (LMC) es un hemopatía maligna que se desarrolla en tres fases, aunque desde el punto de vista molecular no existe diferencia significativa entre la fase acelerada (FA) y la crisis blástica (CB). En la LMC se sabe que la actividad cinasa de BCR-ABL es la responsable de la leucemia en su fase crónica (FC) y así, el uso de inhibidores de BCR-ABL como el imatinib ha paliado en gran medida el problema clínico de la LMC. Sin embargo, no podemos olvidar que, todavía hoy, la biología de la LMC presenta varios aspectos oscuros que hacen de esta enfermedad un modelo *in vivo* del mayor interés científico. En primer lugar, sigue habiendo un porcentaje significativo de casos refractarios primarios y de BCR-ABL mutantes resistentes a los inhibidores tirosincinasa y, en segundo lugar, desconocemos en gran parte las alteraciones genéticas responsables de la transformación blástica. La ponencia del Dr. Javier León de la Universidad de Cantabria abordará principalmente esta cuestión de los mecanismos genéticos implicados en la transformación de la LMC.

La activación constitutiva de proteínas con actividad tirosincinasa desempeña también, como se ha comentado, un papel fundamental en la patogénesis del resto de las NMP, incluidas las atípicas. En este sentido, ya se han identificado más de 40 genes de fusión que codifican para proteínas con actividad tirosincinasa, la mayoría de los cuales involucran al PDGFRA, PDGFRB, FGFR1, FLT3 o JAK2. Sin embargo, las tirosincinasas también se pueden activar como consecuencia de mutaciones, como ocurre con KIT y JAK2. En los últimos años, se han descrito mutaciones en otros genes como TET2, ASXL1, y CBL que no parecen específicas de las NMP pero pueden ser importantes en el desarrollo de la enfermedad. La revisión presentada por el Dr. Francis Grand, del laboratorio de genética de Salisbury, se centra en los recientes descubrimientos sobre la patogénesis molecular de las NMP atípicas y en las investigaciones que se están realizando actualmente.

Desde el punto de vista clínico, la diferenciación entre las distintas NMP Filadelfia negativas presenta una serie de dificultades que estriban en las similitudes existentes con cuadros reactivos y en el solapamiento entre las propias NMP y los síndromes mielodisplásicos. El descubrimiento de diferentes alteraciones genéticas implicadas en el desarrollo de estas NMP como la mutación de JAK2V617F ha conllevado que las unidades de diagnóstico molecular hematológico hayan adquirido gran relevancia en el campo diagnóstico de las mismas, ya que la detección de estas alteraciones genéticas contribuye en la distinción entre patología reactiva y patología clonal, y en algunos casos, como sucede con la mutación JAK2V617F, en la valoración de la respuesta al tratamiento. La última ponencia presentada por la Dra. Gómez Casares de las Palmas de Gran Canaria, describe las pruebas moleculares aplicables a la rutina diagnóstica de las NMP y al valor de las diferentes determinaciones.

Los coordinadores del simposio esperan que, tanto los temas elegidos como los ponentes, contribuyan a aclarar los aspectos más candentes en el campo de la patogénesis y el diagnóstico molecular de las neoplasias mieloproliferativas.

MECANISMOS MOLECULARES RESPONSABLES DE LA TRANSFORMACIÓN EN LA LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

J. LEÓN¹, M. ALBAJAR²

¹ Departamento de Biología Molecular. Facultad de Medicina. Instituto de Biomedicina y Biotecnología (IBBTEC). Universidad de Cantabria-CSIC. Santander.

² Servicio de Hematología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. IFIMAV. Departamento de Biología Molecular. Facultad de Medicina. Instituto de Biomedicina y Biotecnología (IBBTEC). Santander

La leucemia mieloide crónica (LMC) es un hemopatía maligna clasificada dentro del grupo de los síndromes mieloproliferativos. La LMC supone el ~20% de las leucemias de adultos. Típicamente la LMC se desarrolla en tres fases. Suele diagnosticarse en una fase crónica (FC) caracterizada por la expansión de granulocitos. A pesar de su nombre, la LMC no tratada es en realidad una enfermedad poco “crónica”, pues la FC sólo dura unos pocos años (mediana ~ 4 años) para llegar a una fase acelerada y finalmente a una crisis blástica (CB). Esta fase es terminal, con una supervivencia media de unos 9 meses¹⁻³. En la mitad de los casos, aproximadamente, no hay fase acelerada distinguible clínicamente sino que se pasa de la FC a la CB directamente. Desde el punto de vista molecular, no hay diferencia significativa con la CB⁴, y en esta revisión sólo nos referiremos a FC y CB.

Se han identificado unos 400 “genes del cáncer” según el último censo (Cancer Genome Project, www.sanger.ac.uk/genetics/CGP), incluyendo oncogenes y genes oncosupresores, pero muy pocos de ellos aparecen activados en prácticamente todos los casos de una determinado tumor. La LMC es una de las cuatro neoplasias hematológicas caracterizadas por una anomalía molecular presente en > 95% de los casos: la proteína tirosina quinasa BCR-ABL (las otras tres neoplasias y genes serían el linfoma de Burkitt por MYC, la leucemia promielocítica por PML-RAR α y la policitemia vera por JAK2). En las LMC, la evidencia epidemiológica en humanos junto con los modelos de ratones transgénicos demuestran sin lugar a dudas que es la actividad quinasa de BCR-ABL la responsable de la leucemia. Por esta razón se ha acumulado mucha información sobre la biología molecular de la LMC y el BCR-ABL. A pesar de ello, la biología de la LMC presenta varios aspectos oscuros que hacen de la LMC un reto, no sólo desde el punto de vista clínico, sino también para la biología celular y molecular. Los interrogantes importantes pendientes son:

1) ¿Cuáles son los sustratos de BCR-ABL clave para el origen y desarrollo de leucemia?

2) ¿Cuáles son las células en las que se origina la LMC?

3) ¿Por qué ocurre la transformación de FC a CB? Es decir, ¿qué otras alteraciones genéticas son responsables de la transformación blástica?

La presente ponencia revisará principalmente esta última cuestión. La introducción del imatinib y más recientemente de otros dos inhibidores de BCR-ABL (nilotinib y dasatinib) ha “cronificado” de hecho la LMC, de modo que consiguen evitar la aparición de la CB durante al menos 8 años. Por tanto, el imatinib ha paliado en gran medida el problema clínico de la LMC, aunque sigue habiendo un porcentaje significativo de casos refractarios primarios y de BCR-ABL mutantes resistentes a los inhibidores (10-20% de las LMCs en distintas series publicadas). Sin embargo, la transformación desde una situación donde las células están diferenciadas a otra blástica en la que se acumulan formas inmaduras hace de la LMC un modelo *in vivo* del mayor interés científico.

¿Qué es el BCR-ABL?

Las proteínas quiméricas BCR-ABL se originan por la traslocación t(9;22) (q34;q11), descubierta hace casi 40 años. Se genera así el cromosoma derivado 22q- o Philadelphia (Ph). Al ser una traslocación recíproca, se genera también un gen ABL-BCR en el cromosoma 9 derivado (9-der).

La proteína de fusión BCR-ABL contiene la mayor parte de la quinasa ABL (a excepción de su extremo N-terminal) y buena parte de la proteína BCR. El resultado es una enzima con una actividad tirosina quinasa constitutivamente activada. Se han descrito tres puntos de ruptura que generan tres proteínas BCR-ABL con fragmentos progresivamente mayores de BCR, aunque conservando la parte ABL: p190, p210 y p230. En la LMC las rupturas clásicas son las b2a2 y b3a2, que fusionan el exón 13 (b2) o el 14 (b3) de BCR con el exón 2 (a2) de ABL1, fusión que da lugar a la proteína p210. La p210 es la expresada en la inmensa mayoría de las LMC, aunque ocasionalmente se detectan también la p190 y la p230. Un porcentaje menor (~25% en adultos, mucho menor en niños) de leucemias linfoblásticas agudas (LLA) también presentan el cromosoma Ph, y la mayoría de estas LLA (60%) expresan la forma p190, mientras que el resto expresan la p210. Se desconoce el mecanismo molecular responsable de la especificidad de las formas p210 y p190 por LMC y por leucemia linfoblástica, respectivamente y en esta revisión nos referiremos exclusivamente a la p210^{1,2}.

La diferencia fundamental entre p210 BCR-ABL1 (que a partir de aquí llamaremos BCR-ABL) y ABL1 está en un pequeño dominio N-terminal que le sirve

para anclarse a membranas por un resto miristoílo, característica que, por tanto, está ausente en BCR-ABL. El anclaje a la membrana (típico también de otras tirosina quinasa citoplásmicas, como SRC, FYN, etc.) permite un plegamiento de ABL1 que está ausente en BCR-ABL. Esto y otras razones estructurales hacen que BCR-ABL sea una quinasa constitutivamente activa¹. También aparece una Tyr fosforilada en posición 177. La proteína BCR-ABL tiene otros dominios, entre los que destacan los SH2 y SH3, además del dominio quinasa, que sirven para interactuar con sustratos y otras proteínas efectoras que revisaremos posteriormente^{2,3} (Figura 1).

¿Cómo provoca BCR-ABL la LMC?

Varios modelos murinos, bien transgénicos que expresan BCR-ABL en células de médula ósea o bien con transducción retroviral de BCR-ABL en progenitores hematopoyéticos seguida de trasplante, han demostrado que la expresión de BCR-ABL es suficien-

te para transformar células hematopoyéticas e inducir un síndrome semejante a la LMC. Además, la enfermedad remite con el tratamiento de inhibidores de BCR-ABL como imatinib. Por tanto, no hay duda de que BCR-ABL causa la enfermedad, pero para contestar la pregunta del epígrafe debemos preguntarnos primero ¿cuáles son los sustratos y los interactores de BCR-ABL?, puesto que son estas interacciones las que determinan finalmente la actividad de BCR-ABL y por tanto la leucemia que genera. Veinte años de investigación han generado una lista de sustratos de BCR-ABL, los más importantes de los cuales se esquematizan en la Figura 1.

Algunos de los sustratos más estables de BCR-ABL hasta ahora identificados son GRB2, SHC, HCK y CRKL. La fosforilación de CRKL es el estándar usado hasta ahora para medir la actividad quinasa de BCR-ABL, tanto *in vitro* como en células de pacientes. Sin embargo, son bastantes más las proteínas fosforiladas que aparecen en la célula debido a la actividad de BCR-ABL, aunque en algunos casos la unión de sustrato a la quinasa sea inestable o su fosforilación sea indirecta, a través de otras quinasa.

Gracias a estas interacciones BCR-ABL activa numerosas rutas de transducción de señales intracelulares⁶, que a su vez acaban activando factores de transcripción que promueven la expresión de otros genes de proliferación, supervivencia, etc. Las rutas bioquímicas de señalización más importantes que parten de BCR-ABL serían (revisado en^{1,3}):

1) Activación de la ruta BCR-ABL→RAS. La oncoproteína RAS se activa según la ruta BCR-ABL→GRB2→SOS→RAS. La Tyr-177 fosforilada (que pertenece a la parte BCR de la BCR-ABL) conforma un sitio de unión para GRB2, lo que es necesario para la activación de esta ruta. RAS, a su vez, activaría una cascada de quinasa que culmina en la activación de la quinasa ERK.

2) Activación de la ruta BCR-ABL→PI3K (fosfatidilinositol-3-quinasa)→AKT. Esta quinasa induce supervivencia de las células y es uno de los efectores más importantes de BCR-ABL.

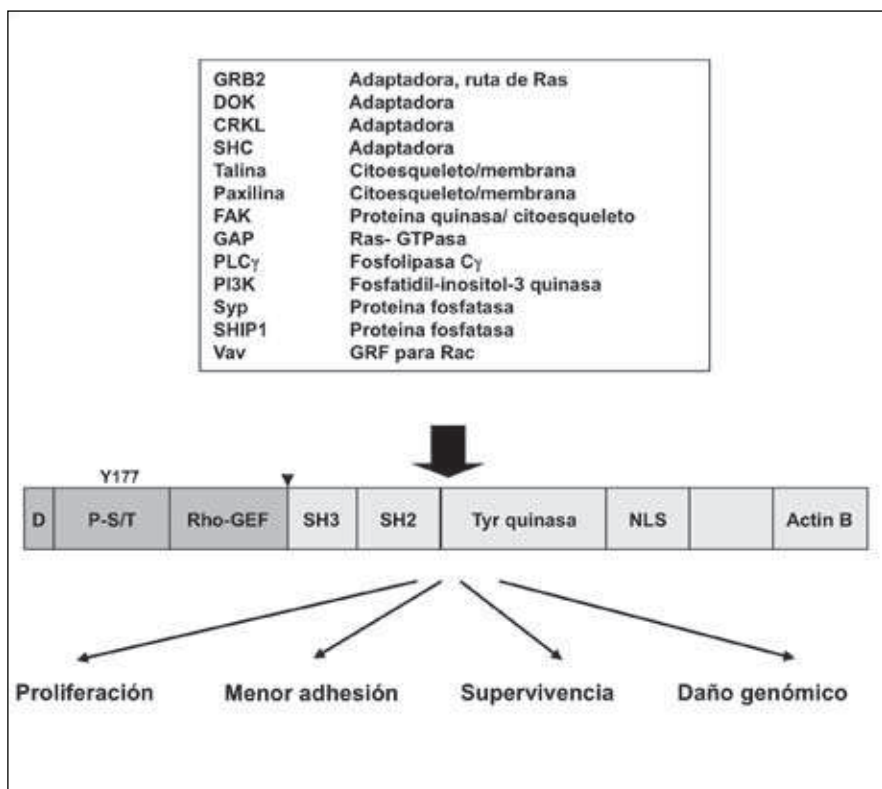


Figura 1. Esquema de la proteína BCR-ABL p210. Se representa en la parte superior una lista de proteínas interactores-sustratos. En la parte inferior se indican los principales efectos biológicos de BCR-ABL en células. El triángulo indica el punto de fusión entre las secuencias de BCR y de ABL. Se indican los distintos dominios de la proteína: D: dominio de dimerización; P-S/T: dominio con Ser y Thr fosforiladas; SH3 y SH2: dominios "Src homology" de interacción con otras proteínas señalizadoras; NLS: región de localización nuclear; actin B: región de unión a actina.

AKT inhibe la actividad de p27/KIP1 (inhibidor del ciclo celular) y de BAD (proteína proapoptótica), además de estimular la síntesis de proteínas.

3) Activación de la ruta BCR-ABL→JAK2→STAT5. STAT5 induce la expresión de MYC y del gen anti-apoptótico BCL-X (BCL2L1) y otros genes pro-proliferativos.

4) Activación de la ruta BCR-ABL→RAC1→JUNK, p38. La importancia de la activación de RAC y de las quinasas finales de su ruta (JUNK y p38) se ha demostrado en modelos animales de LMC⁷.

5) Activación de β-catenina. La actividad de β-catenina a través de factores Wnt es esencial para la renovación de células madre hematopoyéticas (CMH) por estabilización de β-catenina, tanto directamente como indirectamente al bloquear la inhibición de β-catenina por BCR⁸. La activación de la ruta de la β-catenina en CMH de LMC se ha confirmado por estudios de perfil transcripcional⁴.

Estas activaciones se han reproducido en células primarias de LMC, y el uso de silenciamiento específico con siRNAs y de inhibidores químicos demuestra que todas estas rutas son importantes para los efectos transformantes de BCR-ABL en células en cultivo. Son estas interacciones las responsables en último término de los efectos biológicos de BCR-ABL. La larga lista de posibles sustratos sugiere una multiplicidad de funciones *in vivo* de BCR-ABL, y que en conjunto dan cuenta de la actividad leucemogénica.

Actividades oncogénicas de BCR-ABL

En numerosos estudios con modelos celulares se ha demostrado que BCR-ABL es capaz de:

1) Inducir la proliferación celular. BCR-ABL estimula la proliferación y es capaz de transformar líneas de fibroblastos murinos en cooperación con otros oncogenes, así como líneas murinas hematopoyéticas y células primarias de médula ósea⁹. Asimismo, la expresión de BCR-ABL en CD34+ humanas induce proliferación en respuesta a factores crecimiento. Las células progenitoras (CD34+ CD38-) de LMC muestran mayor supervivencia y proliferación en cultivo que las de médula sana, y también se ha demostrado la represión o retención en el citoplasma del inhibidor de ciclo p27/KIP1 en células con expresión de BCR-ABL², lo que favorece la proliferación.

2) Disminuir la adhesión al estroma y promover alteraciones del citoesqueleto, actividades que resultan en pérdida de adherencia en el nicho de la médula de las células del LMC. Las células madre hematopoyéticas de LMC tienen regulados negativamente genes de adhesión y motilidad, y ensayos *in vitro* confirman la pérdida de ambas funciones por parte de las células con expresión de BCR-ABL¹⁰.

3) Proteger de apoptosis frente a diversos agentes. La sobreexpresión de BCR-ABL en líneas celulares hematopoyéticas confiere un elevado grado de resistencia a fármacos y otros agentes proapoptóticos. Esto puede explicarse por la activación de AKT y la inducción de BCL2L1 (BCL-X) mencionadas arriba. Sin embargo, líneas celulares y células primarias de LMC en cultivo se muestran dependientes de BCR-ABL para su supervivencia (un ejemplo del fenómeno conocido como “adicción a oncogenes”).

4) Inducir daño genómico. Se ha demostrado que células con expresión alta de BCR-ABL acumulan anomalías genéticas. Esto puede ser debido en primer lugar a una mayor producción de radicales libres de oxígeno (ROS)¹¹. Por otra parte, BCR-ABL es capaz de inhibir la actividad reparadora de DNA. En la literatura se pueden encontrar datos demostrando un efecto inhibidor de BCR-ABL sobre los mecanismos más importantes de reparación de DNA: reparación de nucleótidos mal apareados (MMR), reparación por excisión de nucleótidos (NER), por unión de extremos no homólogos (NHEJ) o por recombinación homóloga (HRR)¹². También se ha descrito en células de LMC la represión de la actividad de quinasas importantes para la identificación de DNA dañado como ATR y DNA-PK^{3,12}.

Las actividades anteriores de BCR-ABL justifican su actividad leucemogénica. Además, para todas ellas, BCR-ABL es dependiente de la actividad Tyr-quinasa de BCR-ABL, lo que está en concordancia con el control de la enfermedad que ejerce el imatinib y otros inhibidores de esta actividad. Sin embargo, BCR-ABL ya se expresa en una población de células madres de la LMC, como se discute más adelante, y las actividades biológicas de BCR-ABL en esa población, que es la que mantiene la LMC, son más difíciles de estudiar y están sometidas a controversia.

¿Por qué la LMC se transforma a una fase blástica?

A pesar de la abundante información sobre las actividades leucemogénicas de BCR-ABL descritas en el punto anterior, BCR-ABL ya se expresa en FC. Por tanto, la actividad de la proteína BCR-ABL no explicaría por sí sola el dramático cambio que tiene lugar en la LMC desde la FC a la CB, cambio que además es relativamente rápido en comparación con la larga duración de la FC (unos 5 años de mediana en LMC no tratada). La misma relevancia de BCR-ABL en la progresión de la enfermedad no está clara, pero parece que es necesaria para la misma, ya que la expresión de BCR-ABL se mantiene y normalmente aumenta a nivel de mRNA y proteína en la CB, aunque se hayan descrito algunas CB en las que se llega a perder la expresión de BCR-ABL^{3,5}. Sin embargo,

algo ocurre al cabo del tiempo que hace que la LMC evolucione a una fase avanzada aguda, la crisis blástica (CB), en la que se acumulan células indiferenciadas de la estirpe mielóide (aproximadamente el 75% de las CB) o linfoide (el 25%)⁵.

La célula diana de la transformación

La identidad de las células madre de esta leucemia es aún motivo de controversia y no es el tema central de esta revisión. Sin embargo, se suele asumir que los cambios genéticos responsables de la transformación blástica tienen lugar en la misma célula Ph-positiva pluripotente que da lugar a la FC (Figura 2). La LMC es una neoplasia clonal originada en células madre hematopoyéticas (CMH). El hecho de que un ~25% de las CB sean de tipo linfoide ya sugiere que la CB se ha de originar en una célula pluripotente diferente de la célula leucémica acumulada en la FC, que es siempre de tipo granulocito. Por tanto, la LMC se mantiene gracias a una pequeña población (<1% de las células CD34+) de CMH Ph-positivas que expresan BCR-ABL y que son básicamente quiescentes. Sin embargo, también se ha demostrado que el número de progenitores granulocito-macrófago (PGM) (CFU-GM en ensayos de colonias) es mucho mayor en la médula ósea de CB respecto a la de FC, sugiriendo que la CB también se mantiene con una población de células madre tipo PGM ya comprometidas a linaje mielóide¹³, lo que ha llevado a postular que hay dos poblaciones de células madre con capacidad de autorrenovación: las células madre de la LMC y los progenitores granulocito-macrófagos de la CB^{14,15}. Recientemente, se ha demostrado que el perfil transcripcional de las CMH de LMC es semejante al de las CMH sanas, aunque con menor expresión de genes de moléculas de adhesión y motilidad celular, de autorrenovación de célula madre, de diferenciación y de inhibidores de proliferación¹⁰. Esto sugiere que se

trataría de una célula semejante al progenitor mielóide común (PMC) que no ha perdido marcadores inmunofenotípicos de la CMH (CD34+, CD38-).

Desgraciadamente, sea cual sea la identidad de las células madre de la LMC, estas células no son eliminadas por los inhibidores de BCR-ABL, lo que explica que, aunque la LMC haya respondido inicialmente al inhibidor, recidiva si se suspende el tratamiento¹⁵. De acuerdo con este hecho, se ha demostrado que en pacientes en respuesta molecular al imatinib, aún se puede detectar mRNA de BCR-ABL en el compartimento de CMHs pero no en otras poblaciones de la médula ósea. Esta resistencia al imatinib puede deberse a que la actividad quinasa de BCR-ABL no sea necesaria para la supervivencia o autorrenovación de las células madre de la LMC, que su expresión de BCR-ABL sea más alta que las de los granulocitos leucémicos, o bien que posean eficientes sistemas de bombeo del fármaco⁹.

Modelos matemáticos basados en datos epidemiológicos postulan que se requieren 4-5 mutaciones para que se desarrolle una LMC hasta CB⁹. La identidad de los cambios subsiguientes a la translocación que genera el gen BCR-ABL, esta sujeta a investigación. Pero puesto que la expresión de BCR-ABL se mantiene o au-

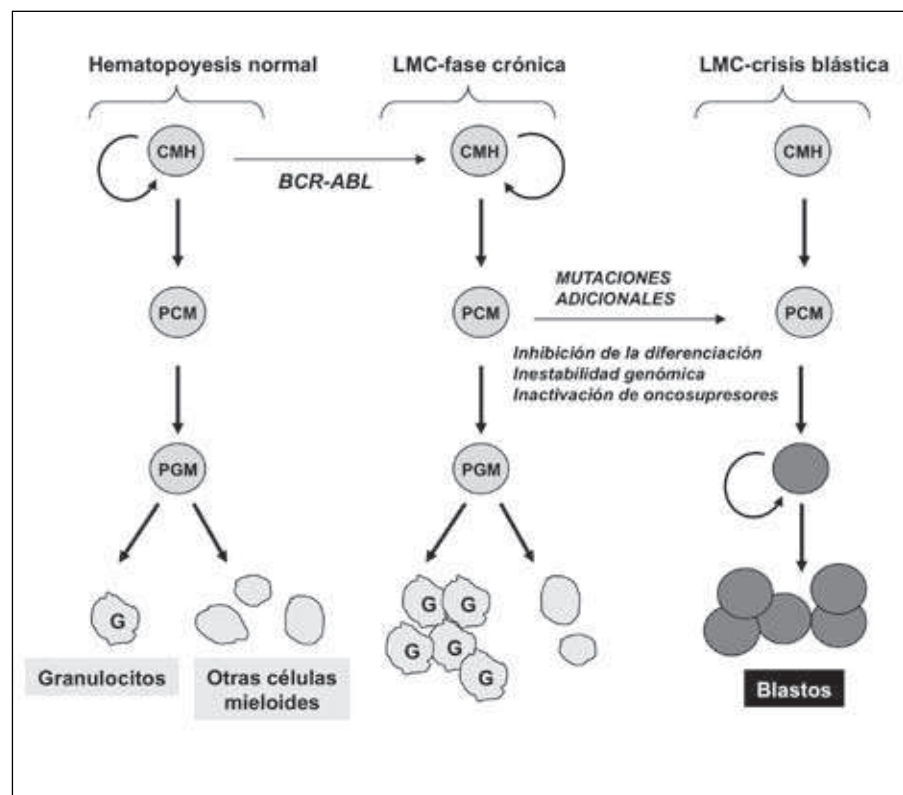


Figura 2. Esquema de la transformación de LMC, basado en Stuart et al.¹⁵. CMH: célula madre hematopoyética; PCM: progenitor común mielóide; PGM: progenitor de granulocitos-macrófagos; G: granulocitos. Se indican los principales cambios biológicos observados en la transformación blástica, producto de mutaciones y cambios genéticos adicionales.

Tabla 1. Aberraciones cromosómicas frecuentes en la crisis blástica de la LMC. Se indica el porcentaje aproximado de casos en cada aberración. Se indica también el gen producto de las translocaciones

Anomalía	Frecuencia
Trisomía 8	40%
Cromosoma Ph adicional	30%
Isocromosoma 17	20%
Trisomía 19	10%
Trisomía 21	7%
Monosomía 7	5%
Deleciones en el crom. 9-der	15%
t(3;21) → RUNX1-EVI1	<5%
t(7;11) → NUP98-HOXA9	<5%
Disomías uniparentales	50%

menta en la CB, los efectos demostrados de BCR-ABL en células en cultivo (estimulación de la proliferación, protección de la apoptosis, daño genómico) se mantendrían *in vivo*. La historia natural de la LMC sugiere que en la FC existe un “umbral anaplásico” que marca la transformación a la CB¹⁴. Comparando la biología de la FC y la CB, en la progresión de la LMC a CB se pueden distinguir tres cambios biológicos importantes que caracterizan esta transformación (resumidos en la Figura 2), que describiremos a continuación:

Bloqueo de la diferenciación celular

El tránsito de FC a CB en la transformación de la LMC es quizá el mejor ejemplo en biología del cáncer de cómo la transformación se asocia a un bloqueo en la diferenciación. Mientras que en la FC hay una acumulación de granulocitos maduros, en la CB se acumulan formas blásticas, normalmente de línea mielóide pero también linfoblastos en un 25% de los casos³. En la transformación de LMC se observan cambios genéticos como la sobreexpresión de MYC y mutaciones activadoras de GATA2 que bloquean diferenciación mielóide, así como represión de genes que median diferenciación mielóide como CEBPA (CEBP α), y SPI1 (PU.1), comentados más abajo. En algunas CB, aparecen traslocaciones que generan el gen RUNX1-EVI1 (Tabla 1), que inhibe diferenciación mielóide.

Inestabilidad genómica

Ésta se manifiesta por aberraciones cromosómicas y genómicas adicionales y defectuosa reparación del DNA genómico¹². Es frecuente que la CB se acompa-

ñe de aberraciones cromosómicas recurrentes, listadas en la Tabla 1. Entre ellas destaca la trisomía del cromosoma 8, un cromosoma Ph adicional o el isocromosoma¹⁷ [i(17q)]^{5,12}. Hay otras trisomías y translocaciones con frecuencias menores. También se han detectado recientemente disomías uniparentales, otro indicador de inestabilidad genómica, que es frecuente en FC (~50%)¹⁶ y deleciones en el 9der¹⁷. En la CB linfóide también se detectan deleciones del gen Ikaros (IKZF1) y de los genes de la cadena pesada de IgG y de receptor de células T. Otro marcador de la inestabilidad genómica es el progresivo acortamiento de telómeros desde la FC a la CB¹⁸. En concordancia con esto, la expresión de telomerasa (hTERT) en células CD34+ de LMC es menor que en las CD34+ normales y la actividad BCR-ABL reprime la expresión de dicha telomerasa¹⁹. Todas estas alteraciones se han usado de marcadores de la progresión, pero no tienen por qué desempeñar un papel causal de la transformación. Dado el efecto inhibitorio de BCR-ABL en la reparación de DNA, es posible que BCR-ABL contribuya directamente a la inestabilidad genómica observada en la transformación blástica.

Inactivación de supresores tumorales

Se ha descrito la inactivación de una serie de oncosupresores en la evolución a CB³. El gen oncosupresor p53 (TP53) está mutado en un 25% de las CB pero en ninguna FC^{20,21}. Además, el isocromosoma i(17q), frecuente en las CB, implica la pérdida de una copia de TP53. El gen del inhibidor del ciclo p16 (CDKN2A) aparece mutado 50% de CB linfóide y ~25% de CB mielóide²², y el RB (retinoblastoma) en el ~20% de las CB, y en mayor frecuencia si son megacarioblásticas²⁰. Uno de los oncosupresores que más atención ha recibido en LMC es la proteína fosfatasa PP2A. Esta fosfatasa es inactivada con la progresión a CB; debido a la regulación positiva de SET, un inhibidor fisiológico de PP2A²³.

¿Qué genes son los responsables de la progresión de la LMC de FC a CB?

La hipótesis más en boga es que durante la progresión de FC, el BCR-ABL promueve una serie de cambios moleculares secundarios. Estos implican la desregulación o la mutación de varios genes clave que son los responsables de la transformación a CB. Por tanto, ha habido una investigación muy intensa en los últimos años para identificar genes cuyo cambio de expresión entre FC y CB pueda: a) explicar la transformación blástica, b) servir de marcadores tempranos de la misma y c) suministrar nuevas dianas para fármacos

que se puedan usar junto con inhibidores de BCR-ABL para controlar la LMC.

Genes regulados en la transformación blástica identificados en estudios individuales

En la Tabla 2, aunque seguramente no están todos, se presenta una lista de genes para los que se ha descrito expresión diferencial entre FC y CB, así como genes que se sobreexpresan en la LMC respecto a la células de médula ósea sana. También se ha demostrado la regulación de otros genes mediada por BCR-ABL en sistemas en cultivo pero en esta tabla sólo se recogen aquellos regulados en células primarias de LMC. Sus funciones, también recogidas en la Tabla 2, son coherentes con su regulación en la transformación blástica. De hecho, la mayoría han sido estudiados en LMC por sus conocidos efectos oncogénicos en otros tumores o modelos. Algunos de los más relevantes serían:

- **CEBP α** : es un factor de transcripción que representa un papel importante en la diferenciación mieloide. Los niveles de proteína CEBP α están bajos en la FC de LMC. Esto se debe a que BCR-ABL aumenta la expresión de una ribonucleoproteína (hnRNPE2) que bloquea la traducción del mRNA de CEBP α ²⁴.

- **SPI1** (también llamado PU.1): es un factor de transcripción de la familia ETS y es también necesario para la diferenciación de varios linajes mieloides²⁵. Nuestro laboratorio ha demostrado que la expresión es reprimida en LMC y que en pacientes que responden al imatinib se restauran los niveles de PU.1 a los niveles altos encontrados en médula ósea sana²⁶. Por tanto, la represión de CEBP α y de PU.1 registrados en la progresión de LMC contribuiría al bloqueo de la diferenciación que caracteriza esta transformación.

- **MYC**: es un gen con actividad antidiferenciadora en múltiples modelos²⁷. Además, MYC contribuye a la inestabilidad genómica²⁸. La actividad transformante de BCR-ABL en células de médula ósea murina requiere MYC²⁹ y la actividad quinasa de BCR-ABL mantiene altos niveles de expresión de MYC en líneas derivadas de LMC humana³⁰. Nuestro laboratorio ha demostrado un aumento de MYC en LMC y que la expresión alta de MYC al diagnóstico implica una menor probabilidad de respuesta al imatinib (M. Albajar *et al.*, manuscrito enviado). El gen MYC mapea en 8q24, lo que implica que estas LMC tienen una dosis génica mayor de este oncogén, aunque no está claro que esto se traduzca en mayor expresión de MYC. Por tanto, un aumento de MYC contribuiría al bloqueo de la diferenciación y al aumento de la inestabilidad genómica.

- **JUNB**: es un factor de transcripción de la familia JUN/FOS cuya expresión es menor en la FC respecto a controles sanos y aún menor en la CB. JUNB es un gen que determina diferenciación mieloeritroide e in-

teresantemente, ratones deficientes en JunB desarrollan un síndrome semejante a la LMC, incluyendo la progresión a CB³¹.

- **LYN** es una quinasa citoplásmica de la familia de SRC, al igual que ABL. Se encuentra sobreexpresada y activada (fosforilada) en fases avanzadas de FC y CB, incluso en presencia de tratamiento con imatinib. Sin embargo, el imatinib inactiva LYN en FC. Esto ilustra el cambio genético que ocurre en la transformación blástica. El silenciamiento de LYN provoca la apoptosis de células de CB, lo que indica que los efectos de BCR-ABL son en parte debidos LYN³².

Genes identificados comparando perfiles transccripcionales de FC y CB

La implantación de la tecnología de hibridación de microrarrays y, más recientemente, el de secuenciación masiva paralela de mRNA permite estudiar la expresión de todo del genoma completo de una muestra. La LMC es especialmente adecuada para determinar el “perfil de expresión genética” por sus fases bien definidas. Recientemente, se han publicado estudios comparativos de los perfiles de expresión entre células de LMC y de médula ósea sana, entre FC y CB, o entre FC de pacientes que responden y que no responden a imatinib. En la Tabla 3 se presenta un resumen describiendo estos estudios, así como los genes que cambian más significativamente en cada uno de ellos. Algunas conclusiones de estos estudios transccripcionales a gran escala son:

- 1) El perfil de expresión de la fase acelerada es muy similar al de la CB4.

- 2) El perfil de expresión de las células de CB de médula ósea es diferente del de CB de sangre periférica³³.

- 3) No aparecen como regulados entre FC y CB la mayoría de los genes validados a nivel individual (Tabla 2), aunque sí algunos (FYN, PRAME, SOCS2). Sin embargo, estos estudios han sacado a la luz nuevos candidatos para su estudio individual en cohortes de muestras mayores.

- 4) Los genes regulados en CB no tienen que ver con la actividad de BCR-ABL, aunque se identifica un grupo significativo de genes relacionados con la ruta de activación de β -catenina⁴.

- 5) La mayoría de los genes identificados como relevantes en estos cribados no aparecen implicados en otros tumores y leucemias.

- 6) En conjunto, el perfil de expresión de los pacientes que no responden al imatinib se asemeja al de fases avanzadas (FC avanzada o CB) de la enfermedad.

- 7) Hay muy poca coincidencia de genes entre los distintos estudios (Tabla 3), e incluso para algún gen, se han descrito resultados opuestos. Sin embargo, sí se detectan algunas coincidencias. Por ejemplo, cinco genes (CSTA, RNASE3, PRTN3, PLAUR y MPO) están regula-

Tabla 2. Genes regulados en LMC versus controles sanos y en FC versus CB. La lista no pretende ser completa. Los genes se han listado por orden alfabético y aparecen según la nomenclatura HUGO. Salvo que se indique otra cosa, los cambios se refieren al nivel de mRNA

<i>Gen</i>	<i>Regulación</i>	<i>Proteína/RNA</i>	<i>Función</i>
AICDA	Aumento en CB (linfoide)	Citidina-deaminasa	Hipermutación de linfocitos
BCL6	Aumento en CB	Factor de transcripción oncogénico	Maduración de linfocitos
BCLX	Aumento en CML vs sanos	Proteína mitocondrial	Inhibición de apoptosis
BMI1	Aumento en CB	Proteína tipo polycomb	Regulación de la expresión y estado de la cromatina
BRCA1	Descenso en CB	Proteína de reparación de DNA	Oncosupresión
CEBPA	Descenso en CB (proteína)	Factor de transcripción (C/EBP α)	Diferenciación mieloide
FYN	Aumento en CB	Proteína-tirosina quinasa de la familia ABL/SRC	Oncoproteína. Promueve proliferación
FZD2	Aumento en CB	Receptor de factores Wnt	Activación de β -catenina
GATA2	Aumento en CB	Factor de transcripción	Diferenciación mieloide
GFI1	Aumento en CML vs. sanos	Factor de transcripción	Hematopoyesis
HCK	Aumenta en CB	Proteína-tirosina quinasa de la familia ABL/SRC	Hematopoyesis. Activado por BCR-ABL
HES1	Aumento en CB	Factor de transcripción	Autorrenovación de células madre. Gen diana de Notch
hnRNPE2	Aumento en CB	Ribonucleoproteína nuclear	Regulación de la traducción de mRNA
HOXA10	Aumento en CB	Factor de transcripción tipo homeodominio	Desarrollo y hematopoyesis
HOXB4	Descensos en CB	Factor de transcripción tipo homeodominio	Desarrollo y hematopoyesis
IKZF1	Descenso/delección en CB linfoide	Factor de transcripción	Diferenciación linfoide
JUNB	Descenso en CML vs. sanos Descenso en CB	Factor de transcripción tipo cremallera de leucinas	Proliferación y diferenciación mieloide
LYN	Aumento en CB	Proteína-tirosina quinasa de la familia ABL/SRC	Proteína-tirosina quinasa de la familia ABL/SRC
miR-328	Descenso en CB	Micro-RNA	Represión génica. Provoca apoptosis de blastos
miR-150	Descenso en CB	Micro-RNA	Represión génica. Reprime Myb y aumenta diferenciación eritroide
MSI2	Aumento en CB	Proteína de unión a RNA	Oncoproteína. Reprime Numb
MYC	Aumento en CML vs. MO sana	Factor de transcripción	Oncoproteína. Promueve proliferación y bloquea diferenciación
NUMB	Descenso en CB	Proteína citoplásmica	Reprime señalización por Notch
PTCH1	Aumento en CB	Receptor de los factores Shh	Desarrollo temprano y mantenimiento de células madre
PP2A	Descenso en CB (actividad)	Proteína fosfatasa	Activación del oncosupresor RB. Inactivación de JAK2 y STAT5
PRAME	Aumento en CB	Proteína nuclear	Represión de RAR α . Elevado en leucemia mieloide e inducido por BCR-ABL
PRDM2	Descenso en CB	Factor de transcripción de tipo dedos de Zn	Regulación transcripcional. Silenciado en tumores
SET	Aumento en CB	Chaperona	Inhibición de PP2A
SOCS2	Aumento en CB	Proteína citoplásmica supresora de señalización por citoquinas	Inhibición de la activación de JAK y STAT
SPI1/PU.1	Descenso en LMC vs. sanos	Factor de transcripción de la familia ETS	Diferenciación mieloide. Oncoproteína en eritroleucemia
SUZ12	Aumento en CB	Proteína tipo polycomb	Regulación de la expresión y estado de la cromatina

Tabla 3. Cambios de expresión entre FC y CB detectado por cribados en gran escala basados en microarrays. La respuesta (meses para alcanzar la respuesta citogenética mayor) es la definida en cada publicación. Se recogen los genes que muestran en cada estudio un mayor cambio entre las cohortes de LMC indicadas en cada caso

Estudio	Comparación	Genes	Cambio	Muestras y plataforma
Ohmine <i>et al.</i> , 2001	FC vs. CB	PIASy, DPAK3	Descenso en CB	Células CD34+ de 7 FC, 2 FA y 4 CB Mi-O (Mergen)
		DDB1, NDUFB8	Aumento en CB	
Nowicki <i>et al.</i> , 2003	FC vs. CB	AML1, AF1Q, ETS2, LYL1, GBDR1, NME1, GRO2, CA4, SNC73 MSF	Aumento	Células de MO de 5 FC y 5 CB. Células de SP de 5 CB mieloides Mi-O (Affymetrix)
McLean <i>et al.</i> , 2004	Respondedores vs. no respondedores a imatinib	RAD9, SMC1L1, RAB2, VRK1, FVT1, GIT2, JKA1, H9G3, MYLK, PKIG, REL, SFRS3	Aumento en no-respondedores	SP de 66 LMC antes y después del tratamiento con imatinib Mi-O (Affymetrix)
		AS3, ADD2, CXCR3, PPP2R2A, SNTB2, CRHR2, PAK1, PI3KR1, PIK3R3, TRAF5, AQP4, CREB1, TRIP6	Descenso en no-respondedores	
Crossman <i>et al.</i> , 2005	Respondedores vs. no respondedores a imatinib	AES, OPTN, CLU	Aumento en no-respondedores (no significativo)	Células de MO y SP de 16 respondedores y 13 no-respondedores Mi-O (Affymetrix)
		UGCG, LMNB1, LMAP2, BAX, MTHFS	Descenso en no-respondedores (no significativo)	
Janssen <i>et al.</i> , 2005	FC vs. CB	MMRN, NACSIN, LARS	Aumento en CB	Células de SP de 1 LMC en al diagnóstico, 2 años de FC y CB) Hibridación sustractiva
		IL8, FPR1, LYZ, MEN	Descenso en CB	
Radich <i>et al.</i> , 2006	FC vs. CB	GLI2, PRAME, SOCS2, WT1, GAS2, MDF1, RRAS2, ITPR1	Aumento en CB	Células de MO de 42 FC, 17 FA y 28 CB Mi-O (Affymetrix)
	Respondedores vs. no respondedores a imatinib	CTRL, MAP21K14, CLK3, MKNK2, FYN, ABCC3	Aumento en la recaída postimatinib	Células de MO de 15 LMC resistentes a imatinib. Mi-O (Affymetrix)
Yong <i>et al.</i> , 2006	LMC indolente vs. LMC agresiva	CD7, SMAA4, CEBPA	Aumento en LMC agresiva	Células CD34+ de 10 casos de LMC indolente (FC larga) y 9 de LMC agresiva (FC de rápida progresión a CB). Validado len 68 LMCs. Mi-O (Affymetix)
		PR3, ELA2, DF, MBP, STARD1	Descenso en LMC agresiva	
Pizzatti <i>et al.</i> , 2006	Controles vs. FC	MYCBP, 53BP1, MDM4, OSBP-RP3, Mortalin	Aumento (proteína)	Células de MO de 13 donantes sanos y 17 FC. Estudio proteómico
Villuendas <i>et al.</i> , 2006	Respondedores vs. no respondedores a imatinib	DSG1, BCL2L2, PTPN22 SRR, FZD5, PTGS1 BIRC4, SOCS2, DEDD FZD7, HD CYP2B6, PPARA	Aumenta en los no-respondedores	Células de MO 32 LMC y 3 controles. Mi-C (Oncochip)
		PRDX2 SLC2A1 TNC	Disminuye en los no-respondedores	
Oehler <i>et al.</i> , 2009	FC vs. CB	NOB1, DDX47, , SCARB1, SLC25A3	Aumento en CB	Células de MO de 42 FC y 51 de FA+CB Mi-O (Rosetta)
		LTB4R, IGSF2	Descenso en CB	
Bruns <i>et al.</i> , 2009	Controles vs. LMC (células madre hematopoyéticas)	CDH2, CXCR4 PDE4B TLE4, NR4A3, MZF1, FOS, FLT3. PROM.MS4A3, RASA3, GTSE1	Descenso No se describen aumentos	Diferentes subpoblaciones de CD34+ de 6 LMC al diagnóstico y 5 controles sanos. Mi-O (Affymetrix)
De Lavallade <i>et al.</i> , 2010	Respondedores vs. no respondedores a imatinib	KIF23, DDX11, CENPP, SLFN13, RAD51L1, BUB1, ORC6L, SMC4, EZH2, NUP85, AURKB, GUSBP1, FANCA, POLQ, PDE4D, DERA	Aumento en los no-respondedores	Células de SP de 8 respondedores y 7 no-respondedores Mi-O (Affymetrix)
McWeeney <i>et al.</i> , 2010	Respondedores vs. no respondedores a imatinib	VWF, ANGPT1, EGFL6, MUC4 MMRN1, ITGA2, ITGB8, EVA1, ZNF44, MEIS1, NFIB ZNF140, ZNF253	Aumento en no-respondedores	Células CD34+ de 23 respondedores y 12 no-respondedores a imatinib Mi-O (Affymetrix)
		CEBPB, MAFB, CSTA, RNASE3, PRTN3, PLAUR, MPO	Descenso en no-respondedores	

FA: fase acelerada; MO: médula ósea; SP: sangre periférica.

Las plataformas de análisis del perfil transcripcional son: Mi-O: microarrays de oligonucleótidos; Mi-C: microarrays de cDNA.

dos negativamente en tres estudios que comparan perfiles de expresión en las LMC de progresión rápida *versus* lenta (FC largas)³⁴ en las CB *versus* FC³⁵ y en no-respondedores *versus* respondedores³⁴. Sin embargo, en un estudio similar a este último no se han encontrado genes coincidentes con los anteriores³⁶. En algún estudio no se llegan a encontrar diferencias estadísticamente significativas entre respondedores y no-respondedores³⁶.

El último punto de arriba llama la atención. En principio, parece sorprendente la poca concordancia entre los genes identificados en los distintos estudios de expresión a larga escala realizados hasta ahora. ¿Por qué no aparecen los mismos genes en los distintos estudios de perfil genético? Se pueden proponer varias explicaciones a este hecho:

1) La LMC es una enfermedad más heterogénea de lo que parece. A pesar de la casi universal presencia del cromosoma Ph y de la expresión de BCR-ABL, la larga evolución en FC hace que cada paciente sea diagnosticado en un estadio diferente en cuanto a cambios genéticos.

2) El origen de las células utilizadas para la preparación de mRNA difiere de un estudio a otro: mononucleares de médula ósea, CD34+ de médula ósea, mononucleares de sangre periférica.

3) Pequeños cambios en los niveles de mRNA (dos veces o menos) pueden ser relevantes según el gen de que se trate, pero son filtrados por las herramientas de análisis estadístico de los datos de microarrays. Por ejemplo, cambios de expresión de sólo dos veces de MYC tiene efectos drásticos en su capacidad transformante²⁷.

4) Los “genes positivos” que resultan de cada experimento de microarray pueden variar mucho según el método estadístico de análisis. Sirva como ejemplo que sólo 11 de 150 genes identificados en muestras de LLC son coincidentes al analizar los mismos datos crudos con tres métodos estadísticos diferentes³⁷.

Por último, es muy importante tener en cuenta que los cambios a nivel de mRNA pueden no correlacionarse con la proteína: la estabilización de ciertas oncoproteínas puede aumentar drásticamente sus niveles y ser determinantes en la progresión de la LMC y, sin embargo, sus genes no van a ser detectados como regulados con análisis de microarrays ni RT-PCR.

Conclusiones

Gracias al imatinib y otros inhibidores de la actividad quinasa de la BCR-ABL se ha conseguido retrasar significativamente la progresión de fase crónica a crisis blástica de la LMC. A pesar de ello, persiste el reto científico de conocer por qué aparece la CB. Dado que la aparición de la CB implica un pronóstico fatal en casi todos los casos, este conocimiento tiene una gran relevancia clínica. La progresión se asocia a un bloqueo de la diferenciación

mieloide, un aumento de la inestabilidad genómica y la inactivación de una serie de genes oncosupresores.

Además de la persistente expresión de BCR-ABL, y posiblemente debida a ella, se acumulan una serie de cambios genéticos adicionales que dan cuenta de la transformación. Se han identificado al menos unos 20 genes que se regulan en dicha transformación y las funciones de muchos de ellos son consistentes con el fenotipo de la crisis blástica. También se han hecho recientemente una docena de estudios transcripcionales a gran escala que confirman que el perfil genético de las células de CB difiere bastante del de FC. Estos estudios han sacado a la luz numerosos genes con expresión diferencial entre ambas fases de la leucemia, así como entre muestras de LMC y de médula ósea sana. Aunque hay poca coincidencia en los estudios publicados, la expectativa es que en los próximos años se aporte información de muchos otros estudios de perfil de expresión en las que los cohortes de muestras sean cada vez mayores y mejor seleccionadas. Esto permitirá ir conformando una “firma genética” capaz de predecir el pronóstico de la LMC, explicar mejor las bases moleculares de la transformación blástica y alumbrar nuevas dianas para fármacos que se puedan usar junto con inhibidores de BCR-ABL para controlar la LMC.

Agradecimientos

El grupo de investigación está financiado por proyectos del Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF08-01581) y del Instituto Carlos III (RD06/0020/017 de la Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer).

Bibliografía

1. Quintas-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood* 2009; 113: 1619-30.
2. Calabretta B, Perrotti D. The biology of CML blast crisis. *Blood* 2004; 103: 4010-22.
3. Melo JV, Bames DJ. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 441-53.
4. Radich JP, Dai H, Mao M, et al. Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 2794-9.
5. Wong S, Witte ON. The BCR-ABL story: bench to bedside and back. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 247-306.
6. Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med* 2003; 349: 1451-64.
7. 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: 467-78.
8. Coluccia AM, Vacca A, Dunach M, et al. Bcr-Abl stabilizes beta-catenin in chronic myeloid leukemia through its tyrosine phosphorylation. *Embo J* 2007; 26: 1456-66.
9. Ren R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 172-183.

10. Bruns I, Czibere A, Fischer JC, et al. The hematopoietic stem cell in chronic phase CML is characterized by a transcriptional profile resembling normal myeloid progenitor cells and reflecting loss of quiescence. *Leukemia* 2009; 23: 892-9.
11. Skorski T. Genomic instability: The cause and effect of BCR/ABL tyrosine kinase. *Curr Hematol Malig Rep* 2007; 2: 69-74.
12. Burke BA, Carroll M. BCR-ABL: a multi-faceted promoter of DNA mutation in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia* 2010.
13. Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, et al. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med* 2004; 351: 657-67.
14. Savona M, Talpaz M. Getting to the stem of chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 341-50.
15. Stuart SA, Minami Y, Wang JY. The CML stem cell: evolution of the progenitor. *Cell Cycle* 2009; 8: 1338-43.
16. Boulwood J, Perry J, Zaman R, et al. High-density single nucleotide polymorphism array analysis and ASXL1 gene mutation screening in chronic myeloid leukemia during disease progression. *Leukemia* 2010.
17. Fourouclas N, Campbell PJ, Bench AJ, et al. Size matters: the prognostic implications of large and small deletions of the derivative 9 chromosome in chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 2006; 91: 952-5.
18. Keller G, Brassat U, Braig M, Heim D, Wege H, Brummendorf TH. Telomeres and telomerase in chronic myeloid leukaemia: impact for pathogenesis, disease progression and targeted therapy. *Hematol Oncol* 2009; 27: 123-9.
19. Drummond M, Lennard A, Brummendorf T, Holyoake T. Telomere shortening correlates with prognostic score at diagnosis and proceeds rapidly during progression of chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2004; 45: 1775-81.
20. Beck Z, Kiss A, Toth FD, et al. Alterations of P53 and RB genes and the evolution of the accelerated phase of chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2000; 38: 587-97.
21. Feinstein E, Cimino G, Gale RP, et al. p53 in chronic myelogenous leukemia in acute phase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88: 6293-7.
22. Sill H, Goldman JM, Cross NC. Homozygous deletions of the p16 tumor-suppressor gene are associated with lymphoid transformation of chronic myeloid leukemia. *Blood* 1995; 85: 2013-6.
23. Neviani P, Santhanam R, Trotta R, et al. The tumor suppressor PP2A is functionally inactivated in blast crisis CML through the inhibitory activity of the BCR/ABL-regulated SET protein. *Cancer Cell* 2005; 8: 355-68.
24. Perrotti D, Cesi V, Trotta R, et al. BCR-ABL suppresses C/EBPalpha expression through inhibitory action of hnRNP E2. *Nat Genet* 2002; 30: 48-58.
25. Koschmieder S, Rosenbauer F, Steidl U, Owens BM, Tenen DG. Role of transcription factors C/EBPalpha and PU.1 in normal hematopoiesis and leukemia. *Int J Hematol* 2005; 81: 368-77.
26. Albajar M, Gutiérrez P, Richard C, et al. PU.1 expression is restored upon treatment of chronic myeloid leukemia patients. *Cancer Lett* 2008; 270: 328-36.
27. Leon J, Ferrandiz N, Acosta JC, Delgado MD. Inhibition of cell differentiation: a critical mechanism for MYC-mediated carcinogenesis? *Cell Cycle* 2009; 8: 1148-57.
28. Prochowik EV. c-Myc: linking transformation and genomic instability. *Curr Mol Med* 2008; 8: 446-58.
29. Sawyers CL, Callahan W, Witte ON. Dominant negative MYC blocks transformation by ABL oncogenes. *Cell* 1992; 70: 901-10.
30. Gómez-Casares MT, Vaque JP, Lemes A, Molero T, Delgado MD, Leon J. C-myc expression in cell lines derived from chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 2004; 89: 241-3.
31. Passegue E, Wagner EF, Weissman IL. JunB deficiency leads to a myeloproliferative disorder arising from hematopoietic stem cells. *Cell* 2004; 119: 431-43.
32. Ptasznik A, Nakata Y, Kalota A, Emerson SG, Gewirtz AM. Short interfering RNA (siRNA) targeting the Lyn kinase induces apoptosis in primary, and drug-resistant, BCR-ABL1(+) leukemia cells. *Nat Med* 2004; 10: 1187-9.
33. Nowicki MO, Pawlowski P, Fischer T, Hess G, Pawlowski T, Skorski T. Chronic myelogenous leukemia molecular signature. *Oncogene* 2003; 22: 3952-63.
34. McWeeney SK, Pemberton LC, Loriaux MM, et al. A gene expression signature of CD34+ cells to predict major cytogenetic response in chronic-phase chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib. *Blood* 2010; 115: 315-25.
35. Zheng C, Li L, Haak M, et al. Gene expression profiling of CD34+ cells identifies a molecular signature of chronic myeloid leukemia blast crisis. *Leukemia* 2006; 20: 1028-34.
36. Crossman LC, Mori M, Hsieh YC, et al. In chronic myeloid leukemia white cells from cytogenetic responders and non-responders to imatinib have very similar gene expression signatures. *Haematologica* 2005; 90: 459-64.
37. Abruzzo LV, Wang J, Kapoor M, et al. Biological validation of differentially expressed genes in chronic lymphocytic leukemia identified by applying multiple statistical methods to oligonucleotide microarrays. *J Mol Diagn* 2005; 7: 337-45.

ATYPICAL MYELOPROLIFERATIVE DISORDERS: NEW INSIGHTS INTO PATHOGENESIS

F. GRAND¹, N.P. CROSS²

¹ Wessex Regional Genetics Laboratory, Salisbury (UK)

² Human Genetics Division, University of Southampton, Southampton (UK)

Introduction

William Dameshek first described the spectrum of MPN in 1951. 'Atypical myeloproliferative disorders' is a general term for a group of myeloproliferative disorders that cannot be categorised as one of the four 'classic' MPNs: chronic myeloid leukaemia (CML), essential thrombocythaemia (ET), polycythaemia vera (PV) or primary myelofibrosis (PMF). Atypical MPNs are highly heterogeneous and span the current WHO subgroups of chronic MPNs and myelodysplastic/myeloproliferative disorders (MDS/MPN).¹ Specific WHO-defined entities within the umbrella term of atypical MPNs include atypical CML (aCML), chronic neutrophilic leukaemia (CNL), chronic eosinophilic leukaemia (CEL), chronic myelomonocytic leukaemia (CMML), CMPN-unclassified and MDS/MPN-unclassified. Many people would also include systemic mastocytosis (SM) under the same category.

Chromosomes and fusion genes

The vast majority of patients with atypical MPNs present with a normal or aneuploid karyotype, i.e. gains or

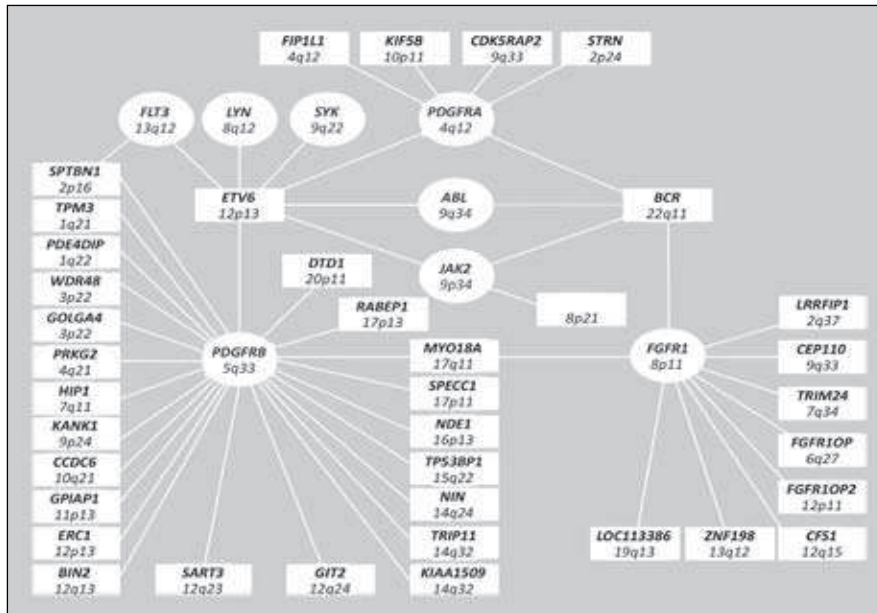


Figure 1.

losses of whole chromosomes. However a small subset of patients (perhaps 1%) harbour reciprocal chromosomal translocations, some of which are recurrent. Molecular investigation has revealed that the predominant consequence of these translocations is the fusion of a gene encoding a tyrosine kinase to another gene (so called partner gene). To date, more than 40 fusions have been identified that involve the tyrosine kinases *ABL*, *FGFR1*, *FLT3*, *JAK2*, *LYN*, *PDGFRA*, *PDGFRB* or *SYK* (Figure 1). Some kinases are highly promiscuous, e.g., 21 fusion partners have been reported for *PDGFRB* and some partners may fuse to several different kinases. In general, the chimaeric proteins encoded by these fusion genes resulting follow the paradigm of *BCR-ABL*: (i) the entire catalytic domain of the kinase is fused to part of an N-terminal partner protein, (ii) the fusion proteins are constitutively activate, transform growth factor dependent cell lines to growth factor independence and induce aggressive, CML-like myeloproliferative disorders in murine models (iii) the transforming ability and constitutive enzymatic activity is dependent on one or more dimerisation or oligomerisation domain within the partner proteins.²

Activation of tyrosine kinases and downstream signalling components by point mutations, *JAK2*, *CBL* and *RAS*

JAK2 (9p24)

Tyrosine kinases can also be activated by a variety of point mutations. Mutations of *KIT* are seen in the

great majority of patients with SM, with > 80% of cases reported to be positive for the D816V mutation.³ Since the malignant clone may be highly focal in the bone marrow and apparently absent in the peripheral blood, sensitive molecular techniques and/or stringent sample selection (e.g. flow sorting or laser microdissection) are required to detect all positive cases.⁴ In other atypical MPNs the most commonly mutated tyrosine kinase is *JAK2* with the V617F mutation seen in 3-20% of cases with aCML/CMML. Activating internal tandem duplications or point mutations of *FLT3*

have been also been described in 5%-13% of atypical MPNs.⁵

CBL mutations (11q23)

CBL functions in the ubiquitylation of multiple cytoplasmic and receptor tyrosines kinases including, *KIT* and *FLT3*.^{6,7,8} *CBL* knockout mice display an expanded hematopoietic stem cell pool and enhanced progenitor sensitivity to growth factors. *CBL* mutations are found in association with chromosome 11 acquired uniparental disomy. In a large study of 577 patients, 8% with *BCR-ABL* negative CML cases had *CBL* mutations. In JMML the frequency of *CBL* mutations was around 13%. The frequency in AML was less than 1%.⁷ The mutations are clustered in exons 8 and 9 that encode the RING and linker domains. These domains function in the transfer of ubiquitin to client proteins including RTK. Interestingly *in vitro* assays require co-transfection of *CBL* with a receptor tyrosine kinase, though the precise role of the kinase remains to be elucidated as the *in vitro* transforming capacity remains in some instances with kinase inactive mutants.

NRAS (1p13.2)

Tyrosine kinases communicate with cellular processes through multiple signal transduction pathways, of which one of the most prominent is *RAS*/*MAPK*. Activating *RAS* mutations are common in malignancy and

around 13% of *BCR-ABL* negative CML cases have activating *NRAS* mutations.⁹ Older reports have suggested that *RAS* mutations are more common in CMML.¹⁰ Activating kinase mutations, kinase fusion genes and *NRAS* mutations are almost always mutually exclusive, presumably because they are functionally redundant.

Point mutations in transcriptional and epigenetic modulators

TET2 (4q24)

TET2 gene name is derived from 'ten-eleven translocation one- TET1' which was identified as a fusion partner of MLL. Based on the function of TET1 the putative activity of TET2 may be to convert 5'-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine, and thus affect the epigenetic regulation of transcription. TET2 mutations include frameshift, nonsense and missense mutations, scattered across several of its twelve exons. Mutations are found in both JAK2 positive and negative MPNs cases at 17% and 7% respectively, with mutational frequencies estimated at 16% in PV, 5% in ET and 14% in MF. Higher frequencies of TET2 mutations were found in systemic mastocytosis and CMML, 29% and 20% respectively. Furthermore, TET2 mutations co-exist with a broad range of leukaemia relevant mutations including NPM1, CEBPA, RAS, MLL, RARA, MPL, KIT and FLT3.¹¹

ASXL1 (20q11.1)

The mutations of ASXL1 frequently truncate around exon 12 and thus affect the C-terminal plant homeodomain (PHD). PHD domains have been found in more than 400 eukaryotic proteins and are characterized by a Cys⁴-His-Cys³ zinc-binding motif that spans 50-80 residues. The protein is thought to disrupt chromatin in localized areas, enhancing transcription of certain genes while repressing the transcription of other genes. ASXL1 is believed to include dual activator/suppressor activity toward transcription and includes of repression of retinoic acid receptor-mediated transcription. This is an interesting functional overlap with the epigenetic modifier EZH2 (see below). ASXL1 mutations occur in both chronic and blast crisis MPN in a study of 64 patients with ET (n = 35), PMF (n = 11), PV (n = 10), blast phase MPN (n = 5) and MPN unclassifiable (n = 3). Heterozygous mutations of ASXL1 were identified in 5 cases (approximately 8%), these patients were all V617F negative.¹¹

IDH1 (2q33.3)/IDH2 (15q26.3)

Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 encode homodimeric NADP⁺ - dependent enzymes that catalyze oxidative decarboxylation of isocitrate to alpha-ketoglutarate, generating NADPH from NADP⁺. IDH1 is localized in the cytoplasm and peroxisomes, where as IDH2 is localized in the mitochondria. Functional analysis suggests the mutations result in reduced isocitrate affinity, and gain of function in catalyzing NADPH-dependent reduction of alpha-ketoglutarate to the (R) enantiomer of 2-hydroxyglutarate with additional activation of the hypoxia-inducible factor 1 alpha pathway. In an unpublished data set 1/140 aMPN had mutations in IDH1, with 4/140 showing IDH2 mutations.¹¹

EZH2 (7q36)

EZH2 encodes the catalytic subunit of the Polycomb repressive complex 2 (PRC2), the highly conserved histone H3 lysine 27 methyltransferase that influences stem cell renewal by epigenetic repression of genes involved in cell fate decisions, and has like ASXL1 been linked to the regulation of retinoic acid receptor-mediated transcription. Homozygous EZH2 mutations have been found in 9 of 12 cases with 7q acquired uniparental disomy. Screening of a total of 614 cases with myeloid disorders revealed 49 monoallelic or biallelic EZH2 mutations in 42 individuals, most commonly myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms (27/219; 12%) and myelofibrosis (4/30; 13%). EZH2 has oncogenic activity and its overexpression has been causally linked to differentiation blocks in epithelial tumors. Unexpectedly, the mutations identified resulted in premature chain termination or direct abrogation of histone methyltransferase activity (Ernst et al., 2010 in press).

Diagnostic detection of molecular abnormalities

Although chromosomal abnormalities are uncommon in atypical MPNs, conventional cytogenetics is critical as a pointer towards the presence of the fusions described above. It is important to stress that all fusions thus far reported are associated with visible karyotypic abnormalities apart from *FIP1L1-PDGFRB* and thus cytogenetics is typically performed as a prelude to further molecular analysis. Due to the large number of possible fusions and the fact that individual fusions may show variability in the positions of breakpoints, it is very expensive to perform a comprehensive RT-PCR screen to exclude, for example, rearrangement of *PDGFRB*. Such an analysis can however usually be performed readily by FISH with break-apart probes. For genes that are not

normally strongly expressed in haematopoietic cells, e.g., *PDGFRA*, semi-quantitative or quantitative RT-PCR analysis may be a useful indicator of an underlying fusion. Previously described fusions that are suspected to be present on the basis of karyotype can be tested for by RT-PCR or FISH, and this confirmation is particularly important if targeted therapy is being considered since cytogenetics alone is insufficient to determine the presence of a specific molecular abnormality.

For patients with a normal or unknown karyotype, we consider that the only fusion gene apart from *BCR-ABL* that should be screened for is *FIP1L1-PDGFR*, but only in cases with blood and/or marrow eosinophilia. Detection of this fusion can be something of a challenge. The deletion breakpoints are widely distributed within *FIP1L1* and therefore a number of different exons can become fused to *PDGFRA*. In addition to breakpoint variability, detection is aggravated by complex alternative splicing which can lead to the presence of multiple mRNA fusions in individual patients and highly variable levels of expression of the fusion mRNA between patients. Consequently, amplification of *FIP1L1-PDGFR* mRNA with standard primer sets is difficult and nested RT-PCR is often required.¹² Even then, occasional cases with variant breakpoints may be missed and therefore comprehensive screening should include an additional approach. This can include *PDGFRA* expression or breakpoint analysis, but is most commonly achieved by FISH to detect deletion of the *CHIC2* gene as a surrogate marker. However deletion FISH has an intrinsically high false positive rate and so this technique may miss cases in which the size of the clone is relatively small.

Targeted therapy

The paradigm of CML has demonstrated that tyrosine kinases are excellent targets for therapeutic intervention and naturally there was interest in using the same approach for the treatment of atypical MPNs. Fusion genes involving *PDGFRA* and *PDGFRB* are particularly important to recognise as they encode proteins that are highly sensitive to treatment with imatinib and other tyrosine kinase inhibitors.^{12,13} The great majority of imatinib-sensitive atypical MPNs are positive for the cytogenetically cryptic *FIP1L1-PDGFR* fusion; all other rearrangements of *PDGFRA* and *PDGFRB* are exceedingly uncommon and all are associated with visible rearrangements at 4q12 or 5q31-33. Targeted therapy will expand to include other molecularly defined subgroups, and a proof of principle for the treatment of very rare cases with *FLT3* fusions has been described. Imatinib is not active against *JAK2* or *FGFR1*, however we anticipate that inhibitors will be available to target patients with abnormalities of these genes in the near future.^{14,15}

Molecular pathogenesis: future directions

Overall, the abnormalities described above are found in approximately one third of atypical MPN cases. The molecular pathogenesis of the remaining cases remains unknown. Several approaches are being undertaken to identify novel abnormalities in both MPNs and AML that impact on tyrosine kinase signalling. Some of these approaches are:

- High resolution array genomic hybridisation hybridisation (CGH) can detect amplifications and deletions, some of which may be associated with cryptic fusion genes. However using custom designed tiling arrays, no novel recurrent tyrosine kinase fusion genes have thus far been identified in atypical MPNs.

- Single nucleotide polymorphisms (SNP) arrays are an alternative technique for detecting copy number changes but can also identify cytogenetically cryptic acquired uniparental disomy (aUPD) resulting from mitotic recombination and selection for homozygosity of genomic segments or large chromosomal regions. This phenomenon was first described in PV at chromosome 9p, and provided an important pointer towards the finding of the V617F *JAK2* mutation.^{16,17} Other regions of aUPD have been shown to mark the presence of activated oncogenes or inactivated tumour suppressor genes in a range of malignancies.¹¹ Studies have indicated that aUPD is uncommon in V617F negative classic MPNs but frequent in atypical MPNs. Several different chromosomes are affected indicating substantial genetic heterogeneity in these diseases.

- High throughput sequencing or mutation scanning is becoming more widely applied as the cost of sequencing falls. However it has become apparent that the majority of sequence changes identified by sequencing are in fact unimportant 'passenger' mutations that happened to be present in a cell that acquired other oncogenic changes. Identification of the relatively small number of pathogenetic 'driver' mutations generally requires functional proof of their activity.¹⁸

- Proteomic analysis has been used to identify activated tyrosine kinases in cell lines, but remains challenging in primary material.¹⁹

- Systematic shRNA screens may be used to individually knock down the expression of target genes, e.g. the tyrosine kinome, and consequent effects on proliferation or survival measured.²⁰

Conclusions

These combined approaches are likely to make significant inroads into our understanding of both classic and atypical MPNs in the near future and will impact on

both disease classification as well as treatment. A summary diagram of interacting mutations can be seen in Figure 2. The increasingly complex modelling of the mutations in mice will help generate new therapeutic models for MPN and new strategies for intervention.

References

- Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002; 100: 2292-302.
- Krause DS, Van Etten RA. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med* 2005; 353: 172-87.
- Nagata H, Worobec AS, Oh CK, et al. Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 10560-4.
- Valent P. Diagnostic evaluation and classification of mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am* 2006; 26: 515-34.
- Grand FH, Iqbal S, Zhang L, et al. A constitutively active SPTBN1-FLT3 fusion in atypical chronic myeloid leukemia is sensitive to tyrosine kinase inhibitors and immunotherapy. *Exp Hematol* 2007; 35: 1723-7.
- Grand FH, Hidalgo-Curtis CE, Ernst T, et al. Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2009; 113 (24): 6182-92.
- Sargin B, Choudhary C, Crosetto N, et al. Flt3-dependent transformation by inactivating c-Cbl mutations in AML. *Blood* 2007; 110 (3): 1004-12.
- Sanada M, Suzuki T, Shih LY, et al. Gain-of-function of mutated C-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms. *Nature* 2009; 460 (7257): 904-8.
- Jones AV, Kreil S, Zoi K, et al. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005; 106: 2162-8.
- Hirsch-Ginsberg C, LeMaistre AC, Kantarjian H, et al. RAS mutations are rare events in Philadelphia chromosome-negative/bcr gene rearrangement-negative chronic myelogenous leukemia, but are prevalent in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 1990; 76: 1214-9.
- Tefferi A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. *Leukemia* 2010.
- Cools J, DeAngelo DJ, Gotlib J, et al. A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *N Engl J Med* 2003; 348: 1201-14.
- David M, Cross NCP, Burgstaller S, et al. Durable responses to imatinib in patients with PDGFRB fusion gene-positive and BCR-ABL-negative chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2007; 109: 61-4.
- Chase A, Grand FH, Cross NCP. Activity of TKI258 against primary cells and cell lines with FGFR1 fusion genes associated with the 8p11 myeloproliferative syndrome. *Blood* 2007; 110: 3729-34.
- Wernig G, Kharas MG, Okabe R, et al. Efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in treatment of a murine model of JAK2V617F-induced polycythemia vera. *Cancer Cell* 2008; 13: 311-20.
- Kralovics R, Guan Y, Prchal JT. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp Hematol* 2002; 30: 229-36.
- Fitzgibbon J, Smith LL, Raghavan M, et al. Association between acquired uniparental disomy and homozygous gene mutation in acute myeloid leukemias. *Cancer Res* 2005; 65: 9152-4.
- Frohling S, Scholl C, Levine RL, et al. Identification of driver and passenger mutations of FLT3 by high-throughput DNA sequence analysis and functional assessment of candidate alleles. *Cancer Cell* 2007; 12: 501-13.
- Gu TL, Goss VL, Reeves C, et al. Phosphotyrosine profiling identifies the KG-1 cell line as a model for the study of FGFR1 fusions in acute myeloid leukemia. *Blood* 2006; 108: 4202-4.
- Tyner JW, Walters DK, Willis SG, et al. RNAi screening of the tyrosine kinome identifies therapeutic targets in acute myeloid leukemia. *Blood* 2008; 111: 2238-45.

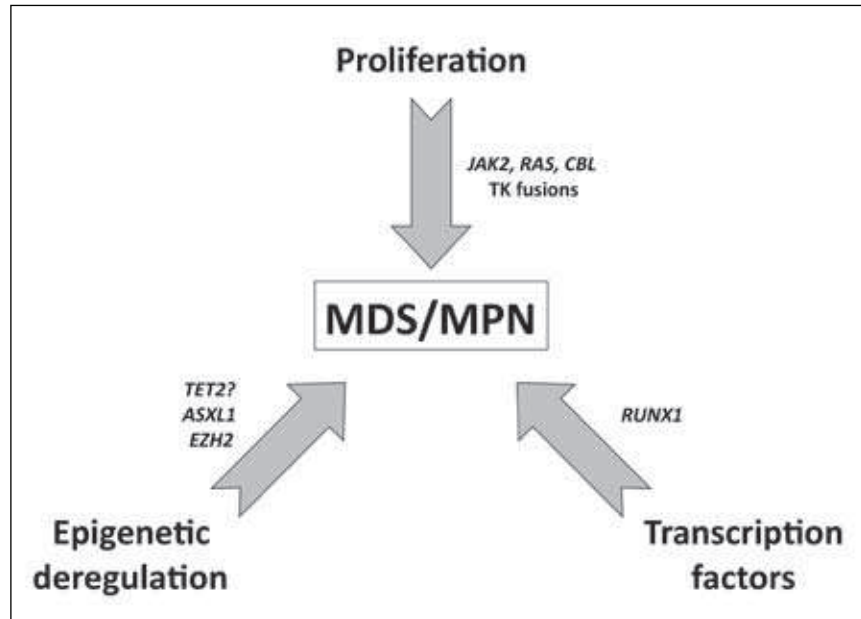


Figure 2.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS FILADELFIA NEGATIVAS EN LA PRÁCTICA DIARIA

M.T. GÓMEZ CASARES, C.E. LÓPEZ JORGE, M. PERERA, T. MOLERO

Servicio de Hematología. Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín. Las Palmas de Gran Canaria

Introducción

Los síndromes mieloproliferativos crónicos, ahora denominados neoplasias mieloproliferativas (NMP), comprenden, según la clasificación de la OMS del 2008, los siguientes cuadros: leucemia mieloide crónica (LMC), policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (TE), mielofibrosis primaria (MFP), mastocitosis, leucemia eosinofílica crónica (LEC), leucemia neutrofilica crónica (LNC) y las NMP inclasificables. De todos ellos, los cuatro primeros reciben el nombre de clásicos por ser los que se describieron originalmente. Todas estas entidades clínico-patológicas tienen un origen clonal en la célula *stem* y una gran diversidad fenotípica que esta relacionada con distintos eventos oncogénicos (mutaciones y genes de fusión) que frecuentemente involucran una proteína con actividad tirosincinasa. Los ejemplos más prominentes son el reordenamiento bcr-abl en la LMC y la mutación V617F en la PV, TE y MFP, pero se han identificado más de 40 proteínas con actividad tirosincinasa involucradas en las NMP. Las principales dificultades diagnósticas en las NMP Filadelfia (Ph) negativas estriban en las similitudes existentes con cuadros reactivos y el solapamiento entre las propias NMP y los síndromes mielodisplásicos (SMD). El diagnóstico de los diferentes subtipos se debe establecer de forma combinada sumando los hallazgos citomorfológicos, citogenéticos y moleculares. En este sentido, los descubrimientos realizados en los últimos años en lo que se refiere a las alteraciones genéticas han creado la necesidad de utilizar métodos moleculares que simplifiquen el diagnóstico de las distintas entidades, proporcionando además posibles dianas terapéuticas a la investiga-

ción¹. Como resultado, las unidades de diagnóstico molecular hematológico han adquirido gran relevancia en el campo de las NMP, ya que la detección de estas alteraciones genéticas (Tabla 1) contribuye en la distinción entre patología reactiva y patología clonal y en algunos casos, como el JAK2V617F, en la valoración de la respuesta al tratamiento.

NMP clásicas Ph negativas (PV, TE, MFP): diagnóstico molecular

En los últimos 5 años los hallazgos moleculares han revolucionado la patogénesis y el diagnóstico de las NMP conocidas como clásicas. El estudio de mutaciones como las de JAK2 y MPL constituye un estándar en el diagnóstico desde el 2008, ya que la aparición de cualquiera de ellas establece el diagnóstico inequívoco de NMP y descarta las proliferaciones reactivas. Sabemos ahora que conocer la mutación no ayuda a establecer el subtipo de neoplasia, pero debemos tener en cuenta que ciertas mutaciones se asocian más a una entidad que a otra (Figura 1). A esto se añade la reciente identificación de otras alteraciones genéticas que pueden influir en el desarrollo y el fenotipo de las diferentes entidades, como son las mutaciones descritas en TET2, CBL y ASXL1 (Figura 2).

Determinación de las alteraciones en JAK2

En el gen *JAK2* localizado en el cromosoma 9 se han descrito diferentes alteraciones genéticas (Tabla 2) que intervienen en el desarrollo de las NMP, cuya detección es importante para demostrar clonalidad. Además, el tipo de alteración puede ayudar, aunque no sea específica como ya hemos mencionado, a diferenciar entre las diferentes neoplasias.

Mutaciones

En el año 2005 se etiquetó la mutación JAK2V617F en la mayoría de los pacientes con PV y hasta en un 50% de los casos de TE y MFP²⁻⁵. Posteriormente, se identificaron otras mutaciones en el exón 12⁶. Ambos mutantes confieren una ganancia de función debido a la activación constitutiva de la señal intracelular JAK-STAT.

Mutación JAK2V617F: es una mutación adquirida en el nucleótido 1849 (G por T) del exón 14 que produce una sustitución de una valina por una fenilalanina en el codón 617. Como consecuencia de la misma se produce un estado constitutivamente fosforilado de JAK2 independientemente

Tabla 1. Alteraciones moleculares asociadas a las NMP Ph negativas

Alteración genética	Enfermedad	Frecuencia
JAK2V617F	Policitemia vera	>95%
	Trombocitemia esencial	60%
	Mielofibrosis primaria	60%
	NMP inclasificable	20%
	Anemia refractaria con sideroblastos en anillo y trombocitosis (ARSA-T)	50%
JAK2 exón 12	Policitemia vera	2%
MPLW515L/K	Mielofibrosis primaria	8%
	Trombocitemia esencial	8%*
PDGFRA	Neoplasias mieloides con eosinofilia	Desconocida
	Mastocitosis	Desconocida
PDGFRB	Neoplasias mieloides con eosinofilia	Desconocida
FGFR1	Neoplasias mieloides con eosinofilia	Desconocida
Mutaciones de KIT	Mastocitosis	Desconocida

* Sobre los casos JAKV617F negativos.

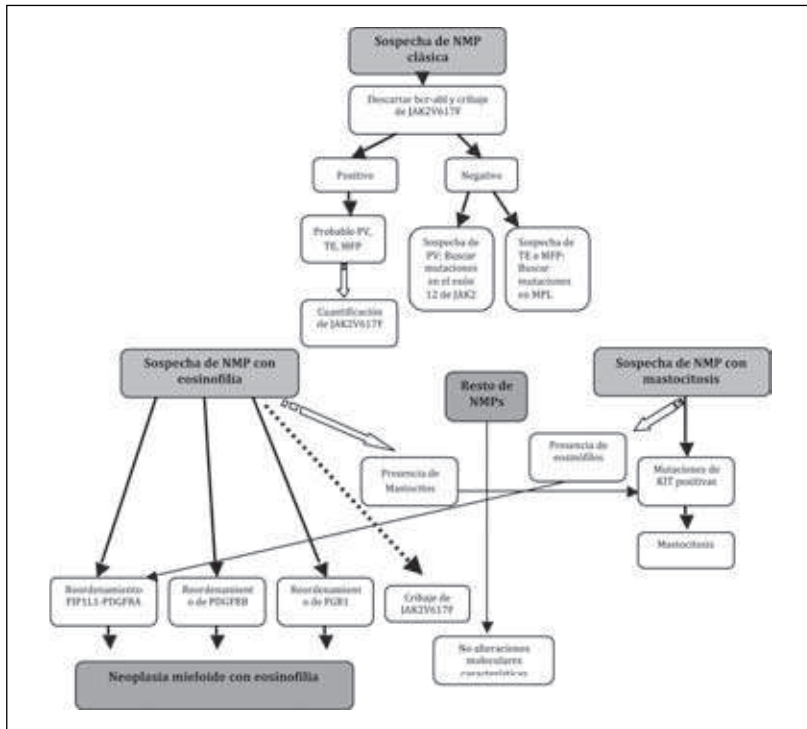


Figura 1. Propuesta de algoritmo para el estudio molecular de las NMP. Las flechas blancas implican que la determinación puede ser útil en algunos casos. La fecha discontinua indica que la determinación es opcional.

de la unión del ligando al receptor que parece ser suficiente, según experimentos realizados en ratones, para inducir cuadros similares a NMP⁷.

La frecuencia de aparición de la mutación JAK2V617F (Tabla 1) se estima en un 95% para las PV, 60% para las TE y MFP, y un 50-70% para las anemias refractarias con sideroblastos en anillo y trombocitosis (ARSA-T). Su incidencia es baja en leucemia mielóide aguda (LMA) y resto de SMD, por tanto, ante la sospecha de una posible NMP la primera determinación molecular que se debe realizar es la detección de la mutación JAK2V617F (Figura 1).

En cuanto a las técnicas para el estudio de la mutación de JAK2V617F, podemos diferenciarlas en dos: las que se realizan en el momento del diagnóstico (cribaje) y las que aplican métodos de cuantificación. Las técnicas de cribaje que se utilizan actualmente son la PCR alelo específica (ASO-PCR), PCR a tiempo real con análisis de curvas de fusión y pirosecuenciación. Todas ellas con sensibilidad suficiente como para poder realizarlas en sangre periférica (SP) y sin necesidad de separar los granulocitos como se pensaba inicialmente⁸. Si a la técnica de PCR le añadimos un análisis con enzimas de restricción,

podremos determinar la presencia en estado heterocigoto u homocigoto de la mutación, lo que parece estar en relación con el tipo de neoplasia mieloproliferativa, puesto que la aparición en estado homocigoto se asocia a PV y MFP, y rara vez a TE. La aplicación de técnicas de cuantificación por PCR nos permite la determinación de las cargas alélicas (relación existente entre el alelo mutado y el alelo normal), lo que también puede ayudar al diagnóstico, ya que las mayores cargas detectadas en granulocitos se encuentran en la PV seguida de la MFP y, por último, en la TE. Sin embargo, el estudio de esta carga alélica no es útil para distinguir entre las diferentes entidades y tiene un dudoso valor pronóstico en el momento del diagnóstico, aunque hay trabajos que relacionan las mayores cantidades de alelo mutado con menor tiempo a las transformaciones fibrótica (en TE y PV) y leucémica⁹ (en la MFP). Por otro lado, también se ha especulado que estas cargas elevadas se asocian

a un incremento del riesgo trombótico, aunque no ha sido demostrado¹⁰. En lo que sí se ha postulado como particularmente útil, la cuantificación de la carga alélica de JAK2, es en el seguimiento de los pacientes trasplantados, tratados con interferón alfa (IFN α) y con los nue-

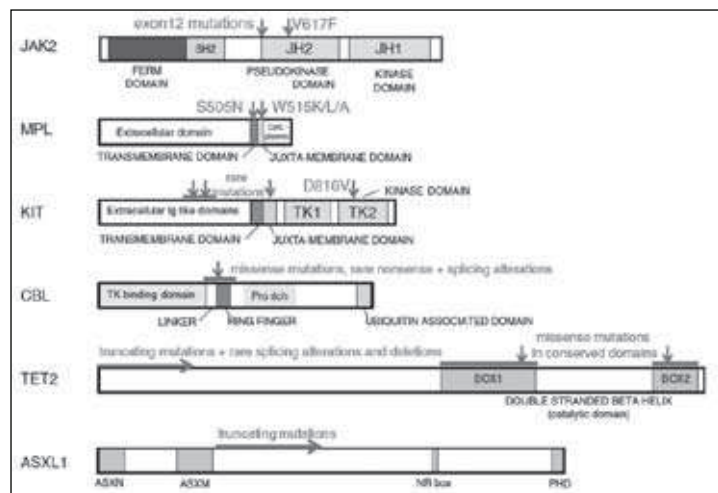


Figura 2. Mutaciones en NMP y genes involucrados. Las alteraciones moleculares aparecen en gris con las mutaciones puntuales señaladas con flechas y las zonas donde se han descrito múltiples alteraciones con barras horizontales. Las flechas horizontales indican mutaciones que dan origen a proteínas truncadas y que pueden aparecer en cualquier lugar de la secuencia codificante. Adaptada de Delhommeau (Int J Hematol 2010; 91: 165-73).

Tabla 2. Alteraciones de JAK2 en neoplasias mieloides. Adaptado de Alabdulla¹⁹

Neoplasia	JAK2V617F	Otras alteraciones de JAK2
Policitemia vera	>95%	
Trombocitemia esencial	50-60%	4% mutaciones exón 12
Mielofibrosis primaria	40-50%	
Leucemia neutrofilica crónica	20%	
Leucemia mielomonocítica crónica	3-13%	
Leucemia mielomonocítica crónica juvenil	20%	
Leucemia mioide crónica	Aisladamente	
Leucemia mioide crónica atípica	20%	Reordenamientos t(8;9) y t(9;12)
NMP/SMD inclasificable	12-20%	
NMP/SMD (ARSA-T)	50-70%	
SMD (AREB, 5q-)	1-7%	Reordenamientos t(9;12)
LMA secundaria	4%	Reordenamientos t(8;9)
LMA (M6)	Casos aislados	
LMA (M7)	15%	Mutación T875N
Mastocitosis	0-25%	Reordenamientos t(8;9), t(9;12) y t(9;22)
Neoplasias con eosinofilia	0-2%	
LLA	No	Reordenamientos t(8;9) y t(9;12) Mutaciones R683G/otras
LLA y síndrome de Down	No	Mutaciones R683G, deleciones, inserciones, otras mutaciones puntuales

vos inhibidores de JAK2. Sin embargo, la cuantificación de JAK2V617F aún se enfrenta a dificultades como establecer claramente la muestra más recomendable para el estudio, estandarizar la técnica y determinar su valor pronóstico. No todas las células clonales tienen la mutación, por lo que parece lógico pensar que lo mejor sería trabajar con la fracción de granulocitos; sin embargo, lo más habitual es trabajar con los leucocitos totales debido a su sencillez. En cuanto a la técnica de cuantificación a aplicar, se necesita de un método con elevada sensibilidad que nos permita detectar la mutación, la carga alélica y la enfermedad mínima residual (EMR). En la literatura, se describen actualmente distintos métodos de cuantificación por PCR que utilizan muestras de referencia y calibración diferentes, cuyos resultados no son comparables entre sí, ya que, por ejemplo, pueden normalizar con curvas de calibración establecidas con la línea celular positiva HEL frente a otros métodos que emplean curvas de calibración con plásmidos. Por tanto, la estandarización es fundamental para asegurar la reproducibilidad y la comparación entre laboratorios. Mientras tanto, se recomienda aplicar el mismo método para el seguimiento completo de cada paciente¹¹.

Mutaciones del exón 12: en los pocos pacientes diagnosticados de PV JAK2V617F negativa se han podido identificar mutaciones en el exón 12 del JAK2 que también producen un aumento de función en la pro-

teína. Estas mutaciones (puntuales, deleciones e inserciones) se describieron en el año 2007 y no han sido detectadas fuera de la PV. Por tanto, en aquellos pacientes en los que se sospeche una PV y en los que la mutación JAK2V617F haya sido negativa debemos estudiar anomalías en el exón 12 de JAK2, aunque su incidencia sea inferior al 2% de los casos¹² (Figura 1). Los casos publicados con mutación del exón 12 se han asociado a pacientes jóvenes, con cuadros de proliferación fundamentalmente eritroide, niveles de EPO disminuidos y con un curso clínico similar al de los pacientes con la mutación V617F. Hoy en día el estudio de cribaje podemos hacerlo por técnicas de High Resolution Melting (HRM), para posteriormente secuenciar los casos sospechosos de ser positivos. Se han encontrado más de 15 mutaciones diferentes, la más frecuente es la N542-E543del¹³.

Otras mutaciones: además de la mutación V617F y de las mutaciones en el exón 12, se han descrito casos aislados de NMP con otras mutaciones

puntuales como la C616Y, y mutaciones afectando a JAK2 en pacientes con otras neoplasias hematológicas como la T875N en la LMA-M7 y R683G en la leucemia linfoblástica aguda (LLA) asociada a síndrome de Down.

Polimorfismos de JAK2

El análisis de los polimorfismos de JAK2 ha identificado que algunos SNP (rs7046736, rs10815148 y rs12342421) se asocian preferentemente a la PV y la TE, lo que presupone que las características hereditarias y no sólo el tipo de mutación pueden también condicionar la variabilidad fenotípica de la NMP; sin embargo, estos hallazgos no tienen aplicación en la rutina diagnóstica¹⁴.

Paralelamente, han aparecido en la literatura distintas evidencias de que JAK2 no es el evento iniciador de la neoplasia, de hecho, las NMP que se transforman pueden hacerlo a través de un clon JAK2 negativo preexistente y, además, un 50% de los casos con mutaciones de JAK2 se asocian a alteraciones citogenéticas recurrentes que en algunos casos se detectan también en células que no portan la mutación^{15,16}. Estas evidencias han llevado a la búsqueda de eventos genéticos heredados que precedan a JAK2, como podría suceder con un grupo de SNP localizados en la región 3 del

gen *JAK2*, denominados haplotipo 46/1 (rs3780367, rs10974944, rs12343867 y rs1159782), pero también de otros adquiridos como las mutaciones de *TET2* y de *ASXL1*^{17,18}. Estos hallazgos no tienen todavía aplicación diagnóstica.

En resumen, el estudio de las mutaciones de *JAK2* es fundamental en el diagnóstico de las NMP, pero en la actualidad no podemos establecer qué papel juegan en la patogénesis o en la variabilidad fenotípica.

Reordenamientos del *JAK2*

Se han comunicado reordenamientos que involucran al gen *JAK2* en algunos casos de NMP, LMA, LLA y SMD. Podemos encontrarlos en la t(9;12) con *TEL*, en la t(9;22) con *BCR*, en la t(8;9) con *PCM1* y en la der(9)t(9;12) con *NF-E2*¹⁹.

Alteraciones numéricas

En la PV y también en el linfoma no Hodgkin (LNH) se han descrito alteraciones numéricas que afectan al gen *JAK2*; éste puede presentarse como trisomía (+9) o sobreexpresado por amplificación y, de esta forma, también contribuir a la patogénesis de las NMP Ph negativas¹⁹.

Determinación de las alteraciones de *MPL515*

En el año 2006, poco después de la identificación de la mutación *JAKV617F*, se describieron a nivel de células progenitoras en algunas NMP, mutaciones en el codón 515 del *MPL*. El gen *MPL*, localizado en el cromosoma 1, codifica para el receptor de la trombopoyetina (TPO), y las dos mutaciones más comunes afectan a la región citoplasmática yuxtamembrana (W515L y W515K). Se detectan en un 5-11% de las MFP y en aproximadamente en un 9% de las TE *JAK2V617F* negativas, pero no se han asociado a PV^{20,21}. También se han descrito otras mutaciones que aparecen en menor frecuencia como son: *MPLW515S*, *MPLW515A* y *MPLS505N*. Todas estas alteraciones inducen en líneas celulares a hipersensibilidad a la TPO y a un crecimiento independiente de los factores de crecimiento, con la consiguiente activación constitutiva de la vía *JAK-STAT*. Los pacientes afectados suelen tener una edad media superior a la de los *JAK2V617F* positivos y una hemoglobina más baja. En algunos de estos pacientes se han observado mutaciones múltiples del gen *MPL* o la coexistencia con la mutación *JAK2V617F*²¹.

Está indicado el estudio de las mutaciones en el gen *MPL* ante la sospecha de NMP *JAK2V617F* negativa tipo TE o MFP. La detección rutinaria podemos hacerla, igual que en el caso de la mutación *V617F* del *JAK2*, tanto en SP como en MO con diversas técnicas: se-

cuenciación directa, PCR alelo específica (ASO-PCR) y PCR a tiempo a real con análisis de curvas de fusión.

Mutaciones de *TET2*

TET2 es un miembro de la familia *TET* y, potencialmente, uno de los genes supresores de tumores. Se localiza en el cromosoma 4q24. Su función en la hematopoyesis no está clara, pero podría estar involucrado en los procesos de proliferación y diferenciación celular. Se han identificado múltiples isoformas aunque la mayoría de las alteraciones observadas afectan a la isoforma A. Se trata generalmente de mutaciones sin sentido o de pequeñas inserciones o deleciones que dan origen a proteínas truncadas. Dichas mutaciones se describieron inicialmente en pacientes con NMP portadores de la mutación *JAK2V617F*, pero posteriormente también se observaron en pacientes sin ella. Las series actuales describen mutaciones de *TET2* en el 17% de los pacientes *JAK2V617F* positivos (16% de PV, 5% de TE y 17% de MFP) sin ninguna correlación con la carga alélica y en un 7% de los negativos. También se han detectado mutaciones en este gen en la mastocitosis sistémica (MS), en NMP inclasificables y en otras patologías mieloides. En ocasiones, las mutaciones en *TET2* pueden aparecer asociadas a otras alteraciones genéticas, incluso un mismo paciente puede presentar más de una mutación¹⁸. Por lo general, se trata de mutaciones adquiridas y que afectan normalmente a una sola de las copias del gen. Habitualmente, existe una relación entre mutaciones de *TET2* y edad avanzada (>65 años). Aunque la mayoría de las veces la mutación de *TET2* es un evento previo a la mutación *JAK2*, en algunos pacientes *JAK2V617F* precede a la del *TET2* y en otros se trata de una enfermedad biclonal. Nos encontramos, por tanto, ante unas alteraciones que pueden aparecer en presencia o no de otras mutaciones y que no son específicas de las NMP aunque puedan participar en la iniciación y/o progresión de la neoplasia. La determinación rutinaria es complicada, ya que se han descrito más de 30 mutaciones y en la actualidad tiene escasa utilidad diagnóstica por su baja frecuencia e inespecificidad. Queda por determinar el papel pronóstico de la detección de mutaciones de *TET2*, aunque hay estudios en NMP clásicas que no lo relacionan con supervivencia, transformación leucémica ni eventos trombóticos²².

Mutaciones en *CBL*

Se localiza en el cromosoma 11 y codifica para una ubiquitina que regula negativamente la transducción de señal por tirosincinasas activadas. Las distintas mutaciones se han identificado en el 17% de las leuce-

mias mielomonocíticas crónicas (LMMC), en un 10% de las MFP, 10% de las LMC atípicas y en LMA secundarias a NMP transformadas. Existe una fuerte asociación entre estas mutaciones y la monosomía uniparental adquirida, que conlleva la pérdida del alelo normal, pero la implicación precisa en la patogénesis de las NMP no está clara²³.

Mutaciones de *ASXL1*

Afectan a un gen localizado en la región cromosómica 20q11 que pertenece a una familia de tres miembros y está involucrado en la remodelación de la cromatina con una función en la hematopoyesis desconocida. Las mutaciones aparecen con más frecuencia de forma heterocigota, se localizan en el exón 12 y dan origen a proteínas truncadas. Se han descrito en un 15% de las NMP y en un 20% de las transformadas a LMA, también en SMD y LMMC²⁴. Normalmente no se asocian a mutaciones en *JAK2* ni en *TET2*. Igual que en el caso de las mutaciones de *TET2*, se trata de alteraciones que no son específicas de las NMP, aunque también puedan participar en la iniciación y en la progresión de la neoplasia. Actualmente, la determinación rutinaria no tiene utilidad diagnóstica.

NMP no clásicas (LNC, LEC, mastocitosis, NMP inclasificables): diagnóstico molecular

En este capítulo se engloba un espectro amplio de enfermedades con un comportamiento clínico que va desde indolente a agresivo. Algunas de las entidades pueden aparecer acompañadas de eosinofilia (LEC, MS) y en otros casos el diagnóstico se realiza principalmente por exclusión. La mayoría de los pacientes afectos, a diferencia del grupo de las NPM clásicas y de las mastocitosis, no presenta alteraciones moleculares detectables por lo que resulta difícil la distinción con cuadros reactivos y el diagnóstico es muchas veces dudoso. Las entidades que se asocian a eosinofilia y presentan alteraciones moleculares del PDGFR o del FGFR1 constituyen para la OMS-2008 un grupo aparte de neoplasias mieloides fuera de las NMP, por tanto, su detección constituye un criterio excluyente.

Determinación de las alteraciones del PDGFR y FGFR1

Los receptores del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR) son tirosincinasas transmembrana con un dominio extracelular de unión a su ligando. Su activación inicia la cascada de señales intracelulares a través de la vía de las MAP cinasas. Se conocen dos isoformas del receptor la α (PDGFA) y la β (PDGFB).

La clasificación de la OMS del 2008 de las neoplasias mieloides reconoce una categoría específica asociada con reordenamientos de estos receptores y del receptor del factor de crecimiento derivado del fibroblasto (FGRF1) (Figura 1). La citogenética convencional es fundamental para la detección de los diferentes genes de fusión salvo el *FIP1L1-PDGFR*.

PDGFR: se ha relacionado con entidades como la LEC, pero también con casos de LMA y de LNH. Puede verse involucrado en al menos cuatro anomalías genéticas diferentes, la más frecuente y mejor caracterizada se produce por una microdelección en el cromosoma 4q12, donde se localiza PDGFR y origina un gen quimérico de fusión: *FIP1L1-PDGFR*²⁵. Este gen de fusión codifica para una proteína con actividad tirosincinasa responsable de la proliferación autónoma de los eosinófilos²⁶. La determinación no puede hacerse por citogenética y se hace generalmente por FISH y nested-PCR. Los pacientes con esta variante de NMP con hipereosinofilia responden a inhibidores tirosincinasa (ITK) como el imatinib, de ahí la importancia de su determinación, y pueden generar resistencias como consecuencia de mutaciones como la T674I.

PDGFRB: localizado en el cromosoma 5q31-32 puede fusionarse con diversos genes, uno de los más comunes es *ETV6/TEL* en el cromosoma 12p13 que codifica para un factor de transcripción. La proteína de fusión generada activa las señales celulares dependientes de PDGFRB y ha demostrado propiedades transformantes en líneas celulares. El reordenamiento del PDGFRB se asocia con más frecuencia a la LMMC con eosinofilia y la supervivencia de los pacientes afectos puede también mejorar con imatinib²⁷. La detección del mismo suele ser citogenética y los casos compatibles se confirman por FISH y/o PCR.

FGFR1: el reordenamiento del FGFR1 se asocia normalmente a linfomas linfoblásticos T con eosinofilia pero también, aunque es raro, a la LEC. La alteración genética se produce por translocaciones que implican a la región cromosómica 8p11 y afecta a la célula pluripotente. No responde claramente a ITK.

Determinación de las alteraciones de KIT en la mastocitosis

KIT se localiza en el cromosoma 4q12 y codifica para una proteína tirosincinasa que es el receptor del factor de crecimiento de la célula *stem* (SCF). Se expresa en mastocitos, células *stem*, melanocitos y células germinales. Puede verse afectado por diversas mutaciones puntuales, deleciones e inserciones que dan lugar a una proteína de actividad desregulada y ligando independiente. Se han encontrado mutaciones en KIT en diversas neoplasias hematológicas como la LMA con afectación de CBF (*core binding factor*) y en la mastocitosis. En esta úl-

tima, las mutaciones se producen normalmente en los exones 11 y 17 y menos frecuentemente en los exones 8, 9 y 10. Se han descrito también casos con más de una mutación. La consecuencia de todas estas mutaciones es un crecimiento independiente de la línea mastocítica, que probablemente no es suficiente por sí misma para conferir agresividad a la enfermedad²⁸. En más del 90% de los pacientes con mastocitosis sistémica se detectan mutaciones en KIT, sobre todo la KITD816V, que se localiza en la región yuxtamembrana y cuya determinación adquiere gran importancia, ya que a diferencia de otras mutaciones es insensible a imatinib²⁹. Para la detección de las mutaciones de KIT (en SP, MO y tejidos) se pueden utilizar técnicas de cribaje por HRM, así como por PCR a tiempo real con análisis de curvas de fusión con posterior secuenciación de los positivos sospechosos. Pero para la detección de todos los casos positivos se necesitan métodos de PCR con elevada sensibilidad para lo que resulta fundamental separar la población de mastocitos.

Estudio de mutaciones en JAK2, TET2 y ASXL1

Las mutaciones que hemos descrito en los genes *JAK2*, *TET2* y *ASXL1* en las NMP clásicas pueden aparecer también asociadas, como ya se ha comentado, a las formas no clásicas de NMP. Su detección tiene un valor clínico muy limitado por su baja frecuencia y se restringe actualmente a diferenciar entre una proliferación clonal y una reactiva.

Conclusiones

Los avances terapéuticos producidos en la LMC como consecuencia de la inhibición de BCR-ABL por ITK han propiciado el descubrimiento de una serie de alteraciones moleculares en el resto de las NMP que ha dado lugar a nuevas clasificaciones que ya no se basan únicamente en los hallazgos clínico-morfológicos. Sin embargo, ninguna de las alteraciones descritas es específica, a diferencia del BCR-ABL, y continuamos sin conocer todavía el significado de alguna de ellas. A las dificultades anteriores, se suma el hecho de que no todas las NMP presentan defectos genéticos conocidos, por lo que se necesitan mejores caracterizaciones moleculares que nos permitan un mejor acercamiento al diagnóstico y tratamiento de estas entidades.

Bibliografía

1. Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization

- criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*. 2008;22(1):14-22.
2. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005; 7(4):387-97.
3. James C, Ugo V, Le Couédic 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.
4. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Paszweg JR et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005; 352 (17): 1779-90.
5. 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. *Cancer Genome Project. Lancet*. 2005;365(9464):1054-61.
6. Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med*. 2007;356(5):459-68.
7. Wernig G, Mercher T, Okabe R, Levine RL, Lee BH, Gilliland DG. Expression of JAK2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model. *Blood*. 2006;107(11):4274-81.
8. Kröger N, Badbaran A, Holler E, Hahn J, Kobbe G, Bornhäuser M et al. Monitoring of the JAK2-V617F mutation by highly sensitive quantitative real-time PCR after allogeneic stem cell transplantation in patients with myelofibrosis. *Blood*. 2007;109(3):1316-21.
9. Tiedt R, Hao-Shen H, Sobas MA, Looser R, Dirnhofer S, Schwaller J et al. Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood*. 2008;111(8):3931-40.
10. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Rambaldi A, Barosi G, Marchioli R, et al. Clinical profile of homozygous JAK2 617V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Blood*. 2007;110(3):840-6.
11. Le Bars H, Boulland ML, Bateau B, Grosbois B, Corolleur M, Lamy T et al. Comparison of JAK2 V617F burden quantitation by two different quantitative-polymerase chain reaction methods. *Int J Lab Hematol*. 2010. [Epub ahead of print]
12. Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med*. 2007;356(5):459-68.
13. Pietra D, Li S, Brisci A, Passamonti F, Rumi E, Theodorides A et al. Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. *Blood*. 2008;111(3):1686-9.
14. Pardanani A, Fridley BL, Lasho TL, Gilliland DG, Tefferi A. Host genetic variation contributes to phenotypic diversity in myeloproliferative disorders. *Blood*. 2008;111(5):2785-9.
15. Theodorides A, Boissinot M, Girodon F, Garand R, Teo SS, Lippert E et al. Leukemic blasts in transformed JAK2-V617F-positive myeloproliferative disorders are frequently negative for the JAK2-V617F mutation. *Blood*. 2007;110(1):375-9.
16. Chloé J. The JAK2V617F mutation in polycythemia vera and other myeloproliferative disorders: one mutation for three diseases?. Review. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2008:69-75.
17. 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(4):446-9.
18. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Massé A et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med*. 2009;360(22):2289-301.
19. Alabdulaali MK. The role of JAK2 abnormalities in hematologic neoplasm. *Hematology Reviews*. 2009:56-61.

- 20 Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood*. 2006;108(10):3472-6.
- 21 Vannucchi AM, Antonioli E, Guclielmelli P, Pancrazzi A, Guerini V, Barosi G et al. Characteristics and clinical correlates of MPL 515W>L/K mutation in essential thrombocythemia. *Blood* 2008; 112:844-847.
- 22 Tefferi A, Pardanani A, Lim KH, Abdel-Wahab O, Lasho TL, Patel J et al. TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. *Leukemia*. 2009;23(5):905-11.
- 23 Grand FH, Hidalgo-Curtis CE, Ernst T, Zoi K, Zoi C, McGuire C et al. Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2009;113(24):6182-92.
- 24 Abdel-Wahab O, Manshouri T, Patel J, Harris K, Yao J, Hedvat C et al. Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias. *Cancer Res*. 2010;70(2):447-52.
- 25 Cools J, DeAngelo DJ, Gotlib J, Stover EH, Legare RD, Cortes J et al. A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFR α and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *N Engl J Med*. 2003;348(13):1201-14.
- 26 Buitenhuis M, Verhagen LP, Cools J, Coffey PJ. Molecular mechanisms underlying FIP1L1-PDGFR α -mediated myeloproliferation. *Cancer Res*. 2007;67(8):3759-66.
- 27 David M, Cross NC, Burgstaller S, Chase A, Curtis C, Dang R et al. Durable responses to imatinib in patients with PDGFRB fusion gene-positive and BCR-ABL-negative chronic myeloproliferative disorders. *Blood*. 2007;109(1):61-4.
- 28 Valent P. Systemic mastocytosis. *Cancer Treat Res*. 2008;142:399-419.
- 29 Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sanchez ML, Nunez R, Prados A et al. KIT mutation in mast cells and other bone marrow hematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood*. 2006;108(7):2366-72.

GECH: avances en las enfermedades linfoproliferativas con linfocitos vellosos circulantes

COORDINADORES: A. DOMINGO. *Barcelona*
J.M.^a RAYA. *Tenerife*

Resumen del simposio

La morfología de los linfocitos en sangre periférica y/o médula ósea en los diversos linfomas/leucemias B de célula pequeña ya hace años que constituye un reto para el citólogo.

El examen cuidadoso de un frotis bien extendido y teñido nos permite orientar algunos de los linfomas/leucemias B crónicos y desarrollar la estrategia diagnóstica correcta para confirmar este diagnóstico. Entre éstos se encuentra la LLC, típica o atípica, el linfoma folicular, el linfoma del manto y la tricoleucemia, que además de una morfología muy sugestiva, presentan marcadores fenotípicos, genéticos y/o moleculares que los caracterizan y nos permiten confirmar el diagnóstico.

En el espectro de las linfocitosis clonales con linfocitos vellosos o con prolongaciones citoplasmáticas, o en aquellos en los que existe una mezcla de los mismos, con elementos linfoplasmocitoides o monocitoides, no siempre, a pesar de toda la batería diagnóstica de la que disponemos actualmente, somos capaces de hacer un diagnóstico definitivo.

El propósito de este simposio es actualizar los datos morfológicos/histológicos, fenotípicos/inmunohistoquímicos, genéticos, clínicos y terapéuticos de los linfomas/leucemias B de célula pequeña con linfocitos con prolongaciones citoplasmáticas.

La presencia de linfocitos vellosos en sangre periférica se identifica habitualmente con el linfoma esplénico de la zona marginal (LEZM). Otros síndromes linfoproliferativos B presentan linfocitos con prolongaciones citoplasmáticas, como la tricoleucemia y la tricoleucemia variante.

La tricoleucemia, como ya hemos comentado, es una entidad bien definida, y con la morfología y el fenotipo podemos distinguirla de otras entidades con linfocitos con prolongaciones citoplasmáticas.

El linfoma esplénico de la zona marginal, con una morfología sugestiva aunque no exclusiva, con presencia de linfocitos vellosos, en ocasiones mezclados con elementos linfoplasmocitoides o monocitoides, con el patrón de infiltración en médula ósea, con un fenotipo que excluye otras entidades más que ser característico, y con anomalías citogenéticas que lo apoyan y una histología del bazo bien definida, se reconoce como una entidad propia.

La clasificación de la OMS 2008, en el capítulo de “Neoplasias de células B maduras”, añade una entidad provisional, “Linfoma/leucemia B esplénico, no clasificable”, donde incluye el linfoma esplénico con afectación de pulpa roja (LEDPR) y la tricoleucemia variante (HCL-v) u otros linfomas esplénicos de célula pequeña con afectación de pulpa roja. La relación entre estas entidades está por definir, así como los criterios diagnósticos que permitan individualizar cada entidad.

La Dra E. Matutes, consultora de hematología del Hospital Royal Marsden de Londres, con una amplísima experiencia en el diagnóstico de las neoplasias linfoides B de célula pequeña, ha hecho una exhaustiva descripción de la morfología, fenotipo y genética de estos síndromes, concluyendo que hasta el presente el diagnóstico puede ser problemático, debido a que no tienen una firma genética que permitan individualizarlos y que se superponen características clínicas y biológicas.

El Dr M.A. Piris, responsable del grupo de investigación en patología molecular de linfomas, en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), y coautor del capítulo de “Linfoma/leucemia B esplénico, no clasificable” de la clasificación OMS 2008, nos ha hablado de los criterios histológicos e inmunohistoquímicos diagnósticos de estas nuevas entidades que están en descripción, centrándose en los linfomas de baja frecuencia en bazo/médula ósea y de las formas prelinfomatosas.

El Dr. Kostas Stamatopoulos, del Hematology Department and HCT Unit, del Hospital G. Papanicolaou de Tesalónica, como experto en eventos moleculares, en el estudio del repertorio de los genes de IGHV y de

las mutaciones somáticas en la LLC y en otros leucemias/linfomas de células pequeña, nos ha expuesto los resultados de estos estudios en el LEZM y la necesidad de clarificar qué relación biológica existe entre esta entidad y la LEDPR y la HCL-v, que probablemente tienen una ontogenia común y distinta histogénesis.

Por último, el Dr C. Montalbán, del Hospital Ramón y Cajal, ha hecho una introducción de la historia natural y la clínica de estos pacientes, la relación de LEZM con estímulos antigénicos como HCV y malaria. La evolución de estas entidades de curso indolente, destacando la mayor supervivencia del grupo de LEDPR respecto al LEZM. Las opciones terapéuticas actuales en el caso de que necesiten tratamiento y la no ventaja de la esplenectomía precoz que históricamente ha sido el tratamiento de elección en estos pacientes.

En resumen, las diferencias que existen entre estas dos entidades provisionales y su relación con el LEZM y la HCL está aún por dilucidar.

DIAGNOSTIC CRITERIA: MORPHOLOGY, IMMUNOPHENOTYPE AND CYTOGENETICS

E. MATUTES

*Reader and Consultant Haematologist.
Haemato-Oncology Unit. Institut of Cancer Research/
Royal Marsden Hospital. London (UK)*

Introduction

B-cell leukaemias and lymphomas with circulating villous lymphocytes comprise four diseases: hairy cell leukaemia (HCL), splenic marginal zone lymphoma (SMZL), diffuse red pulp SMZL (DRPSMZL) and HCL-variant. The two former conditions are recognized as distinct entities in the WHO classification whilst DRPSMZL and HCL-variant are considered provisional entities¹. HCL had been already described over fifty years ago although under different designations such as leukaemic reticuloendotheliosis. Subsequently in the late 1980's and 1990's SMZL with or without villous lymphocytes and the rare form of HCL-variant were documented^{2,3}; it is believed that splenic lymphomas with villous lymphocytes (SLVL) represent the leukaemic manifestation of SMZL⁴. More recently, a possible rare variant of SMZL designated DRPSMZL has been documented⁵. It is uncertain at present whether HCL-variant and DRSMZL represent variant forms of SMZL and they should be considered under the umbrella of SMZL; further, the degree of overlapping between these two diseases has not been well established and this warrants further investigations.

HCL is clearly distinguishable from the other three diseases by its unique clinical and laboratory features; by contrast the diagnosis may be problematic in the other three conditions due to the overlapping on their clinical and laboratory features. Although information on the pattern of spleen infiltration is a key feature for the diagnosis of SMZL⁶, in a substantial proportion of patients this information is not available as splenectomy is not indicated on clinical grounds and/or patients do not present initially with splenomegaly. Indeed, a smouldering form of SMZL is now being recognized in patients in whom a clonal B-cell lymphocytosis is detected in the blood on a routine check-up. This early form of SMZL may be the equivalent to the monoclonal gammopathy of uncertain origin (MGUS) or monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL) preceding overt myeloma and chronic lymphocytic leukaemia (CLL) respectively. The fact that all these diseases, unlike other B-cell lymphomas such as follicular or mantle-cell lymphoma, do not have a genetic signature, makes the diagnosis pro-

blematic. This diagnostic dilemma was addressed in the guidelines proposed by the SMZL Working group⁷. One of the aims of these guidelines was to ensure that a diagnosis of SMZL could be made in cases without available spleen histology providing that other low grade lymphomas were excluded. This is an important issue since it implies that the diagnosis of SMZL can be broadened to patients with only mild lymphocytosis and early stage disease, an interesting subgroup in which further studies may give clues in the initiating events involved in the pathogenesis of the lymphoma. Recommendations were made for the diagnosis of those cases. The diagnosis should be based by compounding peripheral blood lymphocyte morphology (if circulating lymphoma cells) with the bone marrow histology and immunophenotype providing that other small B-cell disorders are excluded by carrying out fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis for the t(14;18) and t(11;14)(q13;q34) particularly in SMZL in which the cells are CD5+. Even with the information derived from all these investigations, diagnostic problems may still arise between SMZL and HCL-variant with few other diseases namely lymphoplasmacytic lymphoma particularly with SMZL cases that have a small serum monoclonal band and show lymphoplasmacytic differentiation on the bone marrow. Further, there may also be problematic cases even when spleen histology is available and this does not show the typical pathological features of SMZL but marked lymphoplasmacytoid differentiation or the presence of large cells. These latter cases are labeled as SMZL variants and it is uncertain whether they represent distinct SMZL subgroups like the DRPSMZL. At present we do not have enough data based on morphology and immunophenotype which unables to establish the diagnosis of DRPSMZL with certainty and therefore the diagnosis of this form of splenic lymphoma requires information on spleen histology.

This is an overview of the laboratory features that help the diagnosis of these disorders outlining the differences and similarities among these diseases and particularly focusing on the diagnostic problems that arise with SMZL, DRPSMZL and HCL-variant.

Morphology

This is better appreciated and should be estimated in the circulating blood lymphocytes on freshly made films in order to avoid artifacts related to the bone marrow aspiration or effect of blood storage in the anti-coagulant.

The circulating cells in SMZL are predominantly small with condensed but not clumped chromatin and scanty cytoplasm with short and thin villi unevenly distributed or localized at one or two poles of the cell; nucleoli are not visualized and, if present in some cells, are small⁴. The presence of lymphoplasmacytic ce-

lls with basophilic cytoplasm is common, particularly in those cases with a small monoclonal band; rouleaux is rare but may be present. In a small proportion of patients, the villi are not prominent in the circulating clonal B cells and instead the cells have a slightly more abundant and pale cytoplasm. Large cells are not seen except in the minority of cases that undergo transformation to a large cell lymphoma⁸. Identification of such cells should alert the clinicians to carry out further investigations to rule out transformation.

Data is limited on the morphological appearances in DRPSMZL as this has only been recently described^{5,9}. In my experience and what has been described, the picture in DRPSMZL resembles that of the typical SMZL and plasmacytic differentiation may also be present; some cells may be larger but represent a minority and nucleoli are not prominent except in a minority of cases with evidence of transformation⁹. By contrast the morphology of the neoplastic cells in HCL-variant is different¹⁰. Overall the predominant cell population is larger in size similar to the typical hairy cells. The nuclear chromatin is condensed and the majority of cells have a prominent single centrally located nucleolus resembling the nucleus of the prolymphocytes and thus, different from the bean-shaped nucleus characteristic of typical hairy cells; the cytoplasm is abundant, often pale and with loose projections; lymphoplasmacytic differentiation is not seen. In a few cases, the cytoplasmic outline is more regular and the cells resemble a fried-egg.

The bone marrow trephine biopsy together with immunohistochemistry is an important investigation not only for diagnosis to rule out other non villous lymphomas but particularly on clinical grounds as it allows to estimate the degree of infiltration and the haemopoietic reserve. These diseases do not have a distinct pattern of infiltration and in all of them intrasinusoidal infiltration may be present⁹⁻¹¹. In addition, intrasinusoidal infiltration may be seen in other low grade lymphomas such as chronic lymphocytic leukaemia (CLL), mantle-cell and follicular lymphomas particularly in patients that present with marked splenomegaly. In SMZL and DRPSMZL there may be intertrabecular nodular aggregates^{4,9} but these are not seen in HCL-variant or HCL. Spacing between the cells ("fried-egg pattern") is a feature more characteristic of HCL-variant and HCL and not seen in SMZL. Of note is that in a significant minority of cases, the infiltration may be very subtle and missed on haematoxylin-eosin stain unless immunohistochemistry is carried out.

Immunophenotype

All four disorders are derived from mature clonal B-cells which express strongly immunoglobulin in the sur-

face (SmIg); rare HCL-variant cases lack membrane and cytoplasmic expression of the Ig heavy chains¹². The immunophenotypic profile is different to that seen in CLL with CLL scores lower than 2. Although CD5 may be expressed by flow cytometry in c.20% of SMZL and in DRPSMZL, CD23 is often negative and FMC7 and CD22 are strongly positive; CD79b expression is often seen in SMZL but may be negative in HCL and HCL-variant¹³. It is important in CD5+ cases that a diagnosis of mantle-cell lymphoma is ruled out by fluorescence in situ hybridization (FISH) or cytogenetics to ensure that cells do not harbour the t(11;14)(q13;q32). Expression of CD5 in HCL and HCL-variant is extremely rare. Reactivity with the monoclonal antibody (McAb) CD27, that detects an antigen in circulating normal marginal zone B-cells has shown to be absent in typical HCL whilst the antigen is expressed in SMZL as well as other B-cell lymphomas and CLL¹⁴. Considering the expression of the Ig heavy chains, the cells in SMZL often are IgM/IgD+ whilst IgG is expressed in close to a third of DRPSMZL and greater than a half of HCL and HCL-variant; in the latter two conditions is not unusual the expression of multiple Ig heavy chains¹³. HCL characteristically express the four or at least three "hairy cell associated markers": CD11c, CD25, CD103 and CD123. This is in contrast to the other three diseases in which expression of more than two hairy cell associated markers is exceedingly rare. The less discriminative marker as it is frequently expressed in all the disorders is CD11c whilst CD25 is as a rule negative in the HCL-variant, rarely expressed in the DRPSMZL but positive in c.25% of cases of SMZL. CD103 may be positive in 60% of cases of HCL-variant and in a third of DRPSMZL; CD123, a McAb that identifies the alpha chain of the IL-3 receptor, is the most specific marker for HCL as it is very rare to be this antigen expressed in SMZL and HCL-variant¹⁵. Thus, the composite phenotype is unique to HCL but there is overlapping in the other conditions with only subtle differences. Therefore, the phenotypic profiles should not be taken in isolation to establish a diagnosis. Markers which are routinely used in tissue sections comprise DBA44, Annexin A and cyclin D1. The latter two are almost consistently positive in HCL and not in the other diseases but DBA44 lacks diagnostic value as it may be positive in all the diseases.

Cytogenetics

As mentioned above, there is no evidence for a recurrent chromosomal abnormality in these diseases. This has been one of the reasons for the difficulties to establish a precise diagnosis, particularly in cases which do not have typical features and/or spleen histology available. Despite of this there are some differences that need to be highlighted. In addition, the relevance of this in-

investigation to be carried out is shown by allowing to rule out the diagnosis of follicular and mantle cell lymphoma. Cytogenetics in SMZL have been documented in several series and this namely included patients with active disease and splenomegaly. The frequency of abnormal karyotypes has been documented in 43-80% of these patients. A large retrospective multicenter study in 330 SMZL cases has shown that 72% had an abnormal karyotype and these included 53% with a complex karyotype¹⁶. As expected, no single case had t(14;18) or t(11;14) (q13;q34) typical of follicular and mantle cell lymphomas respectively. Numerical and/or structural abnormalities were present. The most frequent numerical abnormalities involved chromosomes 7, 3/3q (25%), trisomy 18 (10%) and trisomy 12 (8%). Structural abnormalities involved frequently chromosome 7q22-32 (109 cases), 3q (42 cases), 14q (40 cases), 6q (37 cases), 1q (30 cases) and 8q (29 cases). Translocations involving the locus for the Ig heavy chain gene at 14q32 were present in 12% of cases. A significant minority of cases (8.7%) had del17p13 but TP53 deletion was higher (18%) when cases were analysed by FISH. Of interest is that CD5+ SMZL appear to have a distinct cytogenetic profile when compared to CD5- cases with higher frequency of trisomy 18, trisomy 3/3q and del6q whilst less commonly have del7q. There have been a number of reports suggesting the prognostic impact of some of the abnormalities in SMZL such del7q or TP53 abnormalities being adverse prognostic markers^{17,18}. In this multicenter study, a univariate analysis considering clinical and laboratory features together with cytogenetics has shown that 14q and TP53 deletions but not other abnormalities were adverse prognostic factors for survival. However, on multivariate analysis they lost significance and age greater than 65 years and Hb lower than 12 g/dl were the only variables that remained significant. Data in DRPSZL is limited but like SMZL some cases have del7q and iso3q⁵ and a small proportion abnormalities of TP53⁹. Different

Table 1. Distinguishing features of HCL, HCL-variant and typical and diffuse SMZL

	HCL	HCL-variant	SMZL/SLVL	DRPSMZL
WBC (>30x10)	no	++	+	+
Monocytopenia	yes	no	no	no
Palpable nodes	no	+	+	+
Morphology				
Cell size	medium	medium	small	small
Cytoplasm	villous abundant	villous abundant	villous small	villous small
Nucleolus	no	yes	no	no
Plasmacytoid features	no	no	yes	yes
Immunophenotype*				
CD11c	+++	+++	++	+++
CD25	+++	neg	+	+
CD103	+++	++/+++	neg	+ / ++
CD123	+++	neg	neg	neg
IgG+	++	+++	+	+ / ++
DBA44	+++	++	+	NA
Histology				
BM	spacing Int + Intras	spacing Int + Intras	no spacing nodular + Intras	no spacing nodular + Intras
Spleen	red pulp	red pulp	White pulp (marginal zone)	red pulp
Cytogenetics	5q, 14q, 12p	complex, 17p- 8q24	del7q, +3, 3q+ complex	del7q,+3, 3q+ +18

HCL: hairy cell leukemia; SMZL/SLVL: splenic marginal zone lymphoma/splenic lymphoma with villous lymphocytes; WBC: white blood cell count; Int: interstitial; Intras: intrasinusoidal. * +++: positive in over 60% of cases; ++: positive in 30-60% of cases; +: positive in 10-30% of cases; neg: positive in less than 10% of cases.

from above, are findings in HCL-variant where abnormalities of 7q or iso3q are not found or are extremely rare. In contrast 17p and TP53 deletion as well as mutations of the gene are found in greater than a third of the cases¹². The karyotypes in most cases are very complex and translocations found in Burkitt's lymphoma involving the 8q24 and the loci for the Ig light or heavy chain may be seen.

Summary

Lymphoproliferative disorders with villous lymphocytes are low grade B-cell neoplasms and encompass two distinct diseases HCL and SMZL and two provisional entities HCL-variant and DRPSMZL according to the WHO. These disorders do not have a genetic signature and the diagnosis may be problematic due to the overlapping clinical and laboratory features with the exception of HCL (Table 1). Although spleen histology is a key diagnostic feature, the SMZL Working

group has published guidelines that enable to establish the diagnosis of SMZL in asymptomatic patients with isolated lymphocytosis. This can be achieved by compounding the information derived from cytology, immunophenotype and bone marrow histology providing that other low grade small B-cell lymphomas are excluded. At present, the diagnosis of DRPSMZL should still be made on spleen histology.

References

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al (ed). Who classification of tumours of Haemopoietic and lymphoid tissues. 4th edition. Lyon, France. IARC Press (2008).
2. Schmid C, Kirkham N, Diss T, Isaacson PG. Splenic marginal zone lymphoma. *Am J Surg Pathol* 1992; 16:455-466.
3. Catovsky D, O'Brien M, Melo JV, Wardle J, Brozovic M. Hairy cell leukemia (HCL) variant: an intermediate disease between HCL and B prolymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 1984; 11:362-369.
4. Catovsky D, Matutes E. Splenic lymphoma with circulating villous lymphocytes/splenic marginal zone lymphoma. *Semin Hematol* 1999; 36:148-154.
5. Traverse-Glehen A, Baseggio L, Bauchu EC, Morel D, Gazzo S, French M et al. Splenic red pulp lymphoma with numerous basophilic villous lymphocytes: a distinct clinico-pathological and molecular entity. *Blood* 2008; 111: 2253-2260.
6. Isaacson PG, Matutes E, Burke M, Catovsky D. The histopathology of splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Blood* 1994; 84:3828-3834.
7. Matutes E, Oscier D, Montalban C, Berger F, Callet-Bauchu E, Dogan A et al. Splenic marginal zone lymphoma. Proposals for a revision of diagnostic, staging and therapeutic criteria. *Leukemia* 2008; 22:487-495.
8. Durganwalla M, Appiah-Cubi S, Kulkarni S. et al. High grade transformation in splenic marginal zone lymphoma with circulating villous lymphocytes: the site of transformation influences response to therapy and prognosis. *Br. J. Haematol* 2008; 14:71-74.
9. Kanellis G, Mollejo M, Montes-Moreno S, Rodriguez-Pinilla SM, Cigudosa JC, Algara P. et al. Splenic diffuse red pulp small B cell lymphoma. Revision of a series of cases reveals characteristic clinico-pathological features. *Haematologica* 2010; 95: 1122-1129.
10. Matutes E, Wotherspoon A, Brito-Babapulle V, Catovsky D. The natural history and clinico-pathological features of the variant form of hairy cell leukemia. *Leukemia* 2001; 15: 184-186.
11. Franco V, Florena AM, Campesi G. Intrasinusoidal bone marrow infiltration: a possible hallmark of splenic lymphoma. *Histopathology* 1996; 29:571-575.
12. Matutes E, Wotherspoon A, Catovsky D. The variant form of hairy-cell leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2003; 16: 41-56.
13. Matutes E. Immunophenotyping and differential diagnosis of hairy cell leukaemia. *Hematol Oncol Clin N Am* 2006; 20:1051-1063.
14. Forconi F, Raspadori D, Lenoci M, Lauria F. Absence of surface CD27 distinguishes hairy cell leukemia from other leukemic B-cell malignancies. *Haematologica* 2005; 90:266-268.
15. Del Giudice I, Matutes E, Morilla R, Morilla A, Owusu-Ankomah K, Rafiq F et al. The diagnostic value of CD123 in B-cell disorders with hairy or villous lymphocytes. *Haematologica* 2004; 89:303-308.
16. Salido M, Baro C, Oscier D, Stamatoopoulos K, Dierlamm J, Matutes E et al. Cytogenetic aberrations and their prognostic value in a series of 330 splenic marginal zone B-cell lymphomas: a multicenter study of the B-cell lymphoma group. *Blood* 2010; 116: 1479-1488.

17. Gruszka-Westwood AM, Hamoudi RA, Matutes E, Tuset E, Catovsky D. p53 abnormalities in splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Blood* 2001; 97:3552-3558.
18. Algara P, Mateo MS, Sanchez-Beato M, Mollejo M, Navas IC, Romero L. et al. Analysis of the IgV (H) somatic mutations in splenic marginal zone lymphoma defines a group of unmutated cases with frequent 7q deletion and adverse clinical course. *Blood* 2002; 99:1299-1304.

NUEVAS ENTIDADES EMERGENTES: CRITERIOS HISTOLÓGICOS E INMUNOHISTOQUÍMICOS DIAGNÓSTICOS

M.Á. PIRIS

Molecular Pathology Program.

Spanish National Cancer Research Centre (CNIO)

La clasificación de linfomas se enriquece con el reconocimiento de nuevos desórdenes linfoproliferativos, en la mayoría de los casos como consecuencia del uso generalizado de tecnología de reconocimiento de clones que ahora nos permite identificar formas preleucémicas. También hay un avance importante en la caracterización de enfermedades de baja frecuencia, o aquellas con distribución geográfica irregular. Algunas de las nuevas entidades en descripción son:

Prelinfomas

Neoplasia intrafolicular¹.

Linfocitosis monoclonal²:

- Con fenotipo CLL.
- Con fenotipo CLL-atípico.
- Fenotipo no-CLL.

Linfocitosis monoclonal asociada con VHC.

Linfomas de baja frecuencia

Bazo/médula ósea

- Linfoma esplénico difuso de la pulpa roja³⁻⁵.
- Variante de tricoleucemia⁶.
- Leucemia prolinfocítica⁷.

Linfoma folicular

- Linfoma folicular del tracto gastrointestinal.
- Linfoma folicular pediátrico.

Formas intermedias

- Linfoma con rasgos intermedios entre linfoma de Hodgkin y linfoma difuso de células grandes.
- Linfomas con rasgos intermedios entre linfoma de Burkitt y linfoma difuso de células grandes.

Linfomas asociados con situaciones clínicas singulares

- Linfomas B EBV+ asociados con la edad.
- Linfoma T cutáneo tipo Hydroa.

Durante la reunión se discutirán los linfomas de baja frecuencia en bazo/médula ósea así como las formas prelinfomatosas.

Bibliografía

1. Cong P, Raffeld M, Teruya-Feldstein J, Sorbara L, Pittaluga S, Jaffe ES. In situ localization of follicular lymphoma: description and analysis by laser capture microdissection. *Blood*. May 1 2002;99(9):3376-3382.
2. Shanafelt TD, Ghia P, Lanasa MC, Landgren O, Rawstron AC. Monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL): biology, natural history and clinical management. *Leukemia*. Mar;24(3):512-520.
3. Kanellis G, Mollejo M, Montes-Moreno S, et al. Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma: revision of a series of cases reveals characteristic clinico-pathological features. *Haematologica*. Mar 10.
4. Traverse-Glehen A, Baseggio L, Bauchu EC, et al. Splenic red pulp lymphoma with numerous basophilic villous lymphocytes: a distinct clinicopathologic and molecular entity? *Blood*. Feb 15 2008;111(4):2253-2260.
5. Matutes E, Oscier D, Montalban C, et al. Splenic marginal zone lymphoma proposals for a revision of diagnostic, staging and therapeutic criteria. *Leukemia*. Mar 2008;22(3):487-495.
6. Matutes E, Wotherspoon A, Catovsky D. The variant form of hairy-cell leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. Mar 2003;16(1):41-56.
7. Del Giudice I, Davis Z, Matutes E, et al. IgVH genes mutation and usage, ZAP-70 and CD38 expression provide new insights on B-cell prolymphocytic leukemia (B-PLL). *Leukemia*. Jul 2006;20(7):1231-1237.

IMMUNOGENETIC ANALYSIS OF PRIMARY SPLENIC SMALL B CELL LYMPHOMAS: ONTOGENIC IMPLICATIONS

K. STAMATOPOULOS

G. Papanicolaou Hospital. Thessaloniki (Greece)

Studies of the immunoglobulin (IG) gene repertoire can provide valuable information regarding the ontogeny and activation status of B-cell populations. In B-cell lymphomas, this approach has proven instrumental in tracing the developmental stage at which neoplastic transformation occurred and assigning the lymphomatous cells to their corresponding normal counterparts¹.

In addition, immunogenetic analysis has offered various kinds of evidence that the development of mature B-cell malignancies might be influenced by antigen recognition and/or selection through their B-cell receptor^{1,2}. Restrictions in the IG gene repertoire have been reported for different types of B cell lymphoproliferative disorders, alluding to antigen selection of progenitor cells expressing IG receptors with distinctive molecular and functional features². Further support for this argument is provided by the examination of somatic hypermutation (SHM) in the clonogenic IG genes, which is often strongly suggestive of functional selection; noticeably, for some B-cell malignancies there is evidence for ongoing mutational activity post-transformation, pointing to a continuous interaction of the malignant cells with their cognate antigen(s).

Splenic marginal zone lymphoma (SMZL) is a distinct clinical and pathological entity according to the 2008 Classification of Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid tissues³. SMZL is characterized by splenomegaly and almost ubiquitous involvement of bone marrow and peripheral blood. Until recently, histological examination of splenectomy specimens was considered as a prerequisite for the diagnosis of SMZL though, due to the recent advancement in chemo-immunotherapy therapies, splenectomy is no longer performed in most cases and, in such cases, the diagnosis is based on a constellation of findings from lymphocyte morphology, immunophenotype, cytogenetic abnormalities and histopathological findings in the bone marrow biopsy⁴. This raises issues of reliable documentation of the diagnosis and, related to this, differential diagnosis from other primary splenic B cell lymphomas of (presumably) marginal zone origin assigned by the 2008 WHO Classification to a provisional category of "splenic lymphomas/leukemias unclassifiable" [e.g. splenic diffuse red pulp lymphoma (SDRL), hairy cell leukemia variant (HCL-v)]³.

The published studies on the IG gene repertoire in primary splenic small B cells lymphomas of marginal zone origin have focused, not unexpectedly, on SMZL. Until recently, considerably less was known about the provisional entities; however, this has started to change, offering interesting immunopathogenic hints (see below). It should be emphasized that the biological implications of these studies have to be taken with some caution, given potential confounding factors such as sample size or case selection brought by the analysis of

exclusively blood or bone marrow samples vs. exclusively spleen specimens vs. a mixture of the three. The issue of the origin of tissue for analysis is critical, as it relates to the reliable documentation of SMZL and its distinction from other primary splenic small B cell lymphomas, which, as already mentioned, is possible only by examination of spleen specimens.

Against this warning, it is noteworthy that the results of most studies are consistent⁵⁻¹². SMZL is characterized by a remarkably biased IG gene repertoire with predominant usage of the IGHV1-2 gene (reported frequencies ranging from 10% to 20%), followed by the IGHV3-23 and IGHV4-34 genes: these three genes may collectively account for ~30-35% of cases. An interesting study from the Lyon group first raised the possibility that the provisional entities may have a distinct IG gene repertoire from SMZL¹². In that study, SDRL was distinguished by overrepresentation of the IGHV3-23 and IGHV4-34 genes, whereas the IGHV1-2 gene was used by only 1/33 cases. This was one of the various pieces of the biological “puzzle” which has led the authors to propose that SDRL represents a homogeneous group distinct from SMZL, perhaps corresponding to a separate lymphoma entity¹³. Very recently, the Institute of Cancer Research/Marsden group published a comprehensive study of the IG gene repertoire in HCL-v and also performed comparisons to SMZL and “classic” HCL. This analysis revealed analogies between HCL-v and SMZL in terms of both IGHV gene repertoire (frequent usage of the IGHV4-34 gene) and SHM patterns, alluding to shared ontogenetic derivation (see below) and related immunogenetic pathways¹⁴.

In SMZL, only a minor proportion of cases (~15%) carry truly unmutated IGHV genes (100% identity to germline); the remaining cases carry somatically mutated IGHV genes with a variable mutational “load”, ranging from minimal to pronounced⁵⁻¹². A few studies have explored potential biological associations and prognostic implications of IGHV gene mutational status in SMZL^{5,15,16}, on the working hypothesis that, similar to CLL¹⁷, patients with unmutated IGHV genes may follow a more aggressive clinical course than patients carrying mutated IGHV genes. The results in SMZL using the “CLL cut-off” of 98% germline identity are somewhat equivocal: this could be attributed to the lack of consistent inclusion criteria, the retrospective nature of most series and the heterogeneity of therapeutic regimens. In addition, it could reflect an overall different functional impact of SHM on the biological behaviour of SMZL vs. CLL that could affect the functional output of interactions with the cognate antigen(s) and, potentially, underlie clinical presentation and outcome. Clearly, larger, ideally prospective, series are required to resolve this issue.

At the individual IGHV gene level, the distribution of rearrangements of certain IGHV genes according to mutational status differs significantly among SMZL cases; for instance, the great majority of IGHV1-2 rearrangements can be assigned to a borderline-minimally mutated category (97-99.9% identity to germline). Interestingly, these rearrangements are also characterized by other distinctive IG repertoire features, including: (i) the existence of shared somatic mutations (i.e. identical amino acid changes at the same codons of the VH domain); (ii) biased association with the IGHD3-3 gene, leading to the creation of restricted antigen-binding site amino acid motifs; and (iii) increased CDR3 length. Furthermore, a recent large-scale collaborative cytogenetic study has identified a biased cytogenetic profile for IGVH cases who exhibit a significant association with deletion 7q, 14q alterations and abnormal karyotype¹⁸. Overall, the constellation of the aforementioned sequence features argues against serendipity and is highly suggestive of selection for functionality by as yet unidentified antigen(s). Further evidence in support of this notion is provided by the finding of intraclonal diversification through ongoing mutational activity in at least some SMZL cases, likely within the context of continuous interactions with the selecting antigen(s)¹⁹.

Taken together, these findings indicate that SMZL derives from the neoplastic transformation of antigen-experienced and selected B cells with several features consistent with an origin from the various resident populations of the normal splenic marginal zone^{20,21}. Future studies will clarify the biological relationship of SMZL to other entities with presumed common ontogenesis but distinct histogenesis, including SDRL and HCL-v.

References

1. Stevenson FK, Sahota SS, Ottensmeier CH, et al. The occurrence and significance of V gene mutations in B cell-derived human malignancy. *Adv Cancer Res.* 2001;83:81-116.
2. Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, et al. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood.* 2007;109:259-270.
3. Swerdlow SH. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2008.
4. Matutes E, Oscier D, Montalban C, et al. Splenic marginal zone lymphoma proposals for a revision of diagnostic, staging and therapeutic criteria. *Leukemia.* 2008;22:487-495.
5. Zhu D, Oscier DG, Stevenson FK. Splenic lymphoma with villous lymphocytes involves B cells with extensively mutated Ig heavy chain variable region genes. *Blood.* 1995; 85:1603-1607.
6. Dunn-Walters DK, Boursier L, Spencer J, Isaacson PG. Analysis of immunoglobulin genes in splenic marginal zone lymphoma suggests ongoing mutation. *Hum Pathol.* 1998; 29:585-593.

7. Algara P, Mateo MS, Sanchez-Beato M, et al. Analysis of the IgV(H) somatic mutations in splenic marginal zone lymphoma defines a group of unmutated cases with frequent 7q deletion and adverse clinical course. *Blood*. 2002;99:1299-1304.
8. Bahler DW, Pindzola JA, Swerdlow SH. Splenic marginal zone lymphomas appear to originate from different B cell types. *Am J Pathol*. 2002; 161:81-88
9. Stamatopoulos K, Belessi C, Papadaki T, et al. Immunoglobulin heavy- and light-chain repertoire in splenic marginal zone lymphoma. *Mol Med*. 2004;10:89-95.
10. Tierens A, Delabie J, Malecka A, Wang J, Gruszka-Westwood A, Catovsky D, Matutes E. Splenic marginal zone lymphoma with villous lymphocytes shows on-going immunoglobulin gene mutations. *Am J Pathol*. 2003; 162:681-689.
11. Traverse-Glehen A, Davi F, Ben Simon E, et al. Analysis of VH genes in marginal zone lymphoma reveals marked heterogeneity between splenic and nodal tumors and suggests the existence of clonal selection. *Haematologica*. 2005;90:470-478.
12. Papadaki T, Stamatopoulos K, Belessi C, et al. Splenic marginal-zone lymphoma: one or more entities? A histologic, immunohistochemical, and molecular study of 42 cases. *Am J Surg Pathol*. 2007;31:438-446.
13. Traverse-Glehen A, Baseggio L, Bauchu EC, et al. Splenic red pulp lymphoma with numerous basophilic villous lymphocytes: a distinct clinicopathologic and molecular entity? *Blood*. 2008;111:2253-2260.
14. Hockley SL, Giannouli S, Morilla A, et al. Insight into the molecular pathogenesis of hairy cell leukaemia, hairy cell leukaemia variant and splenic marginal zone lymphoma, provided by the analysis of their IGH rearrangements and somatic hypermutation patterns. *Br J Haematol*. 2010;148:666-669.
15. Arcaini L, Zibellini S, Passamonti F, et al. Splenic marginal zone lymphoma: Clinical clustering of immunoglobulin heavy chain repertoires. *Blood Cells Mol Dis*. 2009.42:286-291.
16. Kalpadakis C, Pangalis GA, Dimitriadou E, et al. Mutation Analysis of IgVH Genes in Splenic Marginal Zone Lymphomas: Correlation with Clinical Characteristics and Outcome. *Anticancer Res*. 2009;29:1811-1816.
17. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005;352:804-815.
18. Salido M, Baro C, Oscier D, et al. Cytogenetic aberrations and their prognostic value in a series of 330 splenic marginal zone B-cell lymphomas. A multicenter study of the splenic B-cell lymphoma group. *Blood* 2010; accepted for publication.
19. Tracey L, Aggarwal M, García-Cosío M, et al. Somatic hypermutation signature in B-cell low-grade lymphomas. *Haematologica*. 2008;93:1186-1194.
20. Weller S, Braun MC, Tan BK, et al. Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood*. 2004;104:3647-3654.
21. Weill JC, Weller S, Reynaud CA. Human marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:267-85.

LINFOMAS DE LINFOCITOS VELLOSO. ASPECTOS CLÍNICOS Y NUEVAS APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS

C. MONTALBÁN

*Servicio de Medicina Interna.
Hospital Ramón y Cajal. Madrid*

El linfoma de linfocitos vellosos no es una entidad única, sino una serie de procesos linfoproliferativos B crónicos que cursan con esplenomegalia, linfocitos e infiltración medular, eventualmente citopenias y un curso habitualmente indolente. En ellos se pueden encontrar (aunque no siempre) linfocitos vellosos, es decir, linfocitos con prolongaciones citoplásmicas. Las clasificaciones de la OMS de 2001 y de 2008 reconocen como una entidad separada el linfoma de la zona marginal esplénica/linfoma de linfocitos vellosos (LZME/LELV) y la del 2008 separa otro grupo de linfomas/leucemias B inclasificables, que incluye el linfoma B difuso de la pulpa roja esplénica (LEDPR) y la variante de la tricoleucosis (HCLv). De este grupo de linfomas esplénicos, el mejor conocido y el más frecuente es el LZME/LELV. Sus rasgos clínicos se superponen con los de otros linfomas indolentes con afectación esplénica y leucemización, pero su escasa frecuencia y la ausencia de patrones inmunofenotípico y citogenético específicos han condicionado gran confusión sobre su incidencia, historia natural, características clínicas y su tratamiento. Para clarificar esta situación, el Splenic Marginal Lymphoma Group ha presentado en 2008 una propuesta para establecer criterios diagnósticos morfológicos y clínicos, estadiaje y posibilidades de tratamiento¹. Hay aún mayor imprecisión en el conocimiento de los otros dos tipos de linfomas, LEDPR y HCLv, así que nos referiremos en general al grupo dominante, LZME/LELV y puntualmente a los diferentes aspectos de los otros tipos.

Relación entre LZME/LELV y estímulos antigénicos

El LZME/LELV es uno de los procesos linfoproliferativos relacionados con estimulación antigénica. La detección de hipermutaciones somáticas y la relación epidemiológica con algunas infecciones apoyan esta relación. El factor mejor conocido es la infección por HCV. La respuesta del LZME/LELV al tratamiento del HCV es una prueba imbatible de su importancia patogénica² y hay también datos epidemiológicos que lo sustentan. Esta asociación ocurre con mayor frecuencia en zonas geográficas con mayor prevalencia de HCV como en sur de Italia, Japón y el sur de EE. UU. En España la prevalencia de HCV en donantes de sangre sanos es de 3.7/100.000 personas/año³ y en un estudio caso-control en población hospitalaria (utilizando HCV-RNA), fue del 3,8% en la población control no HIV, el 5,9% en los pacientes con linfoma y el 4% en los casos con LZME/LELV⁴. En Italia en un estudio similar, la prevalencia fue 5,6% en la población control, 17,5% en los pacientes con linfoma y 26% en pacientes con linfomas de la zona marginal⁵. También se ha demostrado esta elevada prevalencia

de HCV en pacientes con linfomas en el estudio europeo multicéntrico EPILYMPH⁶ y en un metaanálisis sistemático⁷, aunque sin poder determinar específicamente la influencia en el LZME/LELV. Con la aproximación contraria, en Italia varios estudios han demostrado HCV en el 19-35% de los pacientes con LZME^{8,9}. Por el contrario en Francia, Inglaterra y norte de EE. UU. la prevalencia de HCV es muy baja (menos del 1%) y también lo es la asociación con LZME/LELV.

La asociación de la infección crónica por malaria con el LZME/SMZL es especialmente interesante, aunque muy imprecisa por las obvias dificultades en la obtención de datos epidemiológicos y clínicos fiables. En 1992 se describieron en Ghana (área hiperendémica para malaria) pacientes con un cuadro idéntico al LSLV¹⁰. Esta situación es superponible (y muy dudosamente diferenciable) a la esplenomegalia tropical o esplenomegalia malarica hiperreactiva (EMHR) y en ambas el tratamiento antimalárico conduce a la mejoría de los síntomas. La exposición crónica a los diferentes tipos de *Plasmodium* produce el estímulo antigénico mantenido para la proliferación policlonal y eventual selección clonal que daría lugar a EMHR/LELV. En el África subsahariana es muy frecuente la coinfección por HCV, malaria y muchas otras infecciones bacterianas y parasitarias, y es imposible separar la influencia relativa de cada una. Cabe suponer que, al igual que ocurre en los pacientes con sida, que se infectan con lo que hay en su medio, infecciones predominantes (solas o combinadas) en diferentes áreas geográficas aportarían el estímulo antigénico que podría poner en marcha esta secuencia de acontecimientos hasta la aparición del linfoma.

Historia natural y clínica

No está claro si hay diferencias en el comportamiento clínico de los diferentes subgrupos patológicos que constituyen este grupo. La frecuencia estimada del LZME está alrededor del 1% de las neoplasias linfoides, pero esta cifra es claramente inferior a la real porque la ausencia de criterios específicos ha hecho que muchos casos de LZME se diagnostiquen como LLC o linfoma leucemizado. Cuando se ha empezado a considerar este diagnóstico, la frecuencia ha aumentado y en Francia representa el 2,7% de los linfomas¹¹ y en España del 3,4% (R. Arranz, Fundación Leucemia Linfoma, 2005) al 4,8%⁴. El LEDPR es muy poco frecuente, sólo el 9% de los casos de linfomas esplénicos en la serie del CNIO¹² y el 0,5% de todas neoplasias linfoides crónicas¹³.

Aparecen en personas de edad avanzada (media de 65 años), con esplenomegalia, linfocitosis y citopenias^{1,14}. Una parte de los pacientes no tienen ningún síntoma en el momento del diagnóstico y tienen sólo

linfocitosis con o sin esplenomegalia (asintomática). Hay linfocitosis clonal, por encima de 5.000/mm³, que no suele ser masiva, pero que tiende a progresar. La ocurrencia de linfocitosis clonal CD5- asintomática y su relación con el LZME plantea una situación similar a la de la linfocitosis clonal CD5+ con la LLC. No hay datos del riesgo que implica esta población ni de su ritmo de progresión o si representa una población clonal más o menos reversible y más o menos fisiológica en respuesta a antígenos. Sólo en el 15% de los casos hay linfocitos vellosos, que aparecen en proporción variable del 5-90%¹, y hay diferencias citomorfológicas sutiles entre los diferentes grupos. La anemia y la trombopenia son las citopenias más frecuentes y se deben más a hiperesplenismo que a ocupación medular. Puede haber también trombopenia y anemia hemolítica (AHAI) autoinmunes y en el 20% de los casos hay otros fenómenos autoinmunes¹¹, que pueden asociarse o no con enfermedad activa (cirrosis biliar, tiroiditis). En un tercio de los casos aparece un pico monoclonal¹¹, más frecuentemente IgM. Suele haber elevación de β 2mg, pero no de LDH. No suele haber síntomas B sistémicos.

El LZME/LELV no se comporta "como un linfoma" y aunque puede haber adenopatías pequeñas en el hilio esplénico, no suele haber adenopatías sistémicas. La médula ósea y el bazo están afectados en la gran mayoría de los casos (si no en todos)^{11,14,15}. Cuando hay leucemización e infiltración medular y esplenomegalia, el hígado probablemente también tiene que estar infiltrado (aunque sin aumento de tamaño ni alteraciones analíticas), pero la frecuencia de este dato no se conoce. Como en todos los linfomas indolentes puede ocurrir progresión y transformación, bien en el momento del diagnóstico o durante la evolución de la enfermedad. En la progresión pueden crecer la esplenomegalia y aparecer adenopatías sistémicas y afectación extranodal y seguir un curso más rápido con mala respuesta a quimioterapia^{14,15}. En un 10-13% puede haber transformación a LBDCG¹⁶, con elevación de LDH, afectación sistémica, síntomas B, aparición de lesiones ocupantes de espacio en el bazo y comportamiento clínicamente agresivo. Cuando hay asociación con HCV puede haber alteraciones y síntomas debidos a la hepatopatía, que se superponen a los del propio LZME. En el 10-28% de los casos la causa de muerte es la aparición de una segunda neoplasia¹⁷ y un tercio fallece por enfermedades cardiovasculares u otras patologías concomitantes.

La clínica del LEDPR es similar, y la esplenomegalia está presente en el 94% de los casos, que en su mayoría están asintomáticos y en buena situación clínica y tienen un curso muy indolente que no requiere tratamiento durante años^{12,13}. No se encuentra asociación con HCV. La linfocitosis es moderada y sólo la mitad por encima de 5.000/mm³, similar a la del LZME/LELV

y son frecuentes los característicos linfocitos basófilos vellosos¹³. La anemia y la trombopenia son moderadas y poco frecuentes (8-12% y 22-30%, respectivamente). La médula está afectada en todos, pero tampoco suele haber adenopatías fuera del hilio esplénico. La enfermedad también puede, aunque raramente, progresar y transformarse¹³. Un 12% fallecen de progresión de la enfermedad y un 23% por otras causas, incluidas segundas neoplasias, pero el 93% está vivo a los 65 meses de seguimiento, muy por encima del 60-70% en el LZME/LELV. Igualmente desarrollan segundas neoplasias. La HCLv presenta un cuadro indolente similar con esplenomegalia, linfocitosis y anemia y trombopenia en el 30 y 43% de los casos, respectivamente¹³.

Diagnóstico

Los aspectos diagnósticos del LZME/LELV y de los otros linfomas de este grupo se detallan en otras comunicaciones de este symposium y, en general, se basan en una combinación de datos citológicos, inmunofenotípicos, patológicos y citogenéticos¹. Hay que insistir que el aspecto “velloso” de los linfocitos no es exclusivo del LZME/LELV (y variantes) y se pueden encontrar en otros procesos B crónicos con diseminación leucémica. Los diferentes tipos (LZME/LELV, LEDPR y HCLv) tienen particularidades citológicas que los distinguen. En el LZME/LELV el inmunofenotipo en la mayoría de los casos es CD5-, CD10, CD20+, CD22+, CD24+, CD27+, FMC7+, CD79b+ intenso y hay expresión intensa de IgM o IgM más IgD¹. Algunas alteraciones cromosómicas son frecuentes (trisomía del 3) y características (deleción de 7q32). En el LEDPR los linfocitos expresan CD103 con mucha frecuencia, pero no CD 123 ni CD 25 y en la HCLv se expresa habitualmente CD103 pero no CD123. La infiltración medular varía durante la evolución de la enfermedad¹⁸, pero en todo este grupo tiene patrones de infiltración similares, con variable proporción de infiltración intersticial, nodular e intrasinusoidal, que permite separarlas de otros grupos de procesos linfoproliferativos B crónicos, pero no diferenciar entre ellas (LZME/LELV, LEDPR, HCLv)¹⁹.

El diagnóstico, obviamente, se puede hacer en el bazo (donde en el LZME/LELV hay afectación de la pulpa blanca con patrón micronodular “miliar” e infiltración de la zona marginal folicular, mientras que en el LEDPR hay infiltración difusa de la pulpa roja) pero la combinación de los hallazgos morfológicos e inmunofenotípicos de la sangre y de la médula suelen ser suficientes para hacer el diagnóstico (o por lo menos para encuadrarlas en este grupo global) y hace innecesaria en la mayoría de los casos la esplenectomía diagnóstica¹.

Tratamiento. Esplenectomía, quimioterapia e inmunoterapia

El LZME/LELV y sus variantes son poco frecuentes y su historia natural no es bien conocida. La evolución suele ser indolente, pero la mitad de los pacientes van a necesitar tratamiento entre los 12 y 60 meses después del diagnóstico^{11,14}. El 80% de los pacientes que no necesitó tratamiento en el momento del diagnóstico estaban vivos a los 10 años, frente al 70% de los que sí lo requirieron^{11,9} y el 72% de todos los pacientes lo están a los 13 años²⁰. La evolución es aún más indolente en el LEDPR, con mejor supervivencia que en el LZME/LELV^{13,14}. La indicación de tratamiento es la presencia de citopenias sintomáticas (trombopenia, anemia, infecciones), los síntomas locales derivados de la esplenomegalia o la progresión nodal o extranodal. No se ha demostrado ninguna ventaja de la esplenectomía precoz en la evolución de la enfermedad, así que lo mejor es esperar a que haya síntomas para iniciar cualquier tipo de tratamiento. La AHAI suele responder a tratamiento con esteroides, independientemente de la situación general de la enfermedad. Como en otros linfomas indolentes, la finalidad del tratamiento no es alcanzar remisión completa (RC) estricta, que sólo se consigue en el 30% de los casos, sino mantener una buena situación hematológica y clínica. La esplenectomía controla las citopenias debidas a hiperesplenismo, pero no hace desaparecer la población clonal, que persiste en la sangre y en la médula ósea. Aunque cabe esperar control clínico de la enfermedad, un tercio de los pacientes progresan a los 4-5 años^{11,14}. El efecto de la esplenectomía es difícil de valorar, porque muchas veces se ha utilizado más para hacer un diagnóstico que por necesidad de tratamiento y porque en otras ocasiones, además de la esplenectomía, se ha utilizado quimioterapia, por lo que el efecto relativo de cada uno de ellos es aún menos claro. En una serie de 60 pacientes tratados con esplenectomía (más quimioterapia en 29 de ellos), 38% alcanzaron RC y 55% RP, la supervivencia libre de enfermedad fue de 40 meses y la supervivencia media de 103 meses. El 22% de los que tuvieron RC recayó y el 45% de los que no alcanzaron RC progresó¹⁵. La repuesta (más o menos brillante) a la esplenectomía no depende de que se realice como tratamiento inicial o durante la evolución de la enfermedad o como tratamiento de rescate²¹ y no parece influir en el pronóstico⁹, aunque en alguna serie los pacientes esplenectomizados tuvieron mejor supervivencia²⁰. Hay experiencia práctica de pacientes en fases avanzadas de la enfermedad que responden mal a quimioterapia, en los que la esplenectomía puede mejorar la respuesta al mejorar las citopenias debidas al hiperesplenismo y, por tanto, la tolerancia a la quimioterapia.

La esplenectomía ha sido históricamente la primera línea de actuación en los pacientes que necesitan tra-

tamiento, pero es muy dudoso que en este momento (en que ya no es imprescindible para el diagnóstico) sea un tratamiento inicial adecuado. Hay que tener en cuenta que la esplenectomía tiene morbilidad y mortalidad no despreciables en pacientes de edad avanzada y, además, puede eventualmente favorecer un aumento de la infiltración medular^{17,18,22} y, desde luego, no produce la desaparición de la enfermedad, sólo mejoría de los efectos del hiperesplenismo. No hay datos específicos del valor de la esplenectomía en el LEDPR. En alguna serie el diagnóstico se ha hecho sistemáticamente tras esplenectomía, que no siempre ha sido requerida por la existencia de síntomas, sino estrictamente diagnóstica en muchas ocasiones¹², y en la serie francesa la mayoría no requirieron tratamiento por su curso especialmente indolente y, a largo plazo, mejor que el del LZME/LELV, y sólo el 26% de los pacientes fueron esplenectomizados¹³.

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

No hay datos precisos en el tratamiento con quimioterapia, ya que toda la información está basada en un número escaso de pacientes. El tratamiento sólo con alquilantes (clorambucil, ciclofosfamida) es poco eficaz²¹ y probablemente es mayor la toxicidad que el beneficio. Hay consenso en que no deben utilizarse como droga única¹. Se han empleado con éxito los análogos de las purinas, especialmente fludarabina y en una serie de 10 pacientes tratados en primera o segunda línea la respuesta a largo plazo ha sido buena, con enfermedad libre de evento de 4,7 años²⁴. Se ha utilizado deoxicoformicina en primera y segunda línea, con respuesta en 11 de 16 pacientes, enfermedad libre de progresión de 18 meses y supervivencia global de 40 meses²⁵. Los resultados del tratamiento con 2CdA son contradictorios. En algunas series sólo ha conseguido respuestas parciales y de corta duración (a diferencia de lo que sucede en la tricoleucosis y en los linfomas MALT), pero en otras han sido relativamente mejores con respuestas en torno al 21%²⁶.

Se ha utilizado rituximab como tratamiento único en dos series prospectivas. En un estudio se consiguieron respuestas en 10 de 11 pacientes previamente tratados, con una duración media de 21 meses y mantenidas hasta 46 y 86 meses²⁷. En otra serie se empleó rituximab como primera línea de tratamiento en 16 pacientes²⁸ se alcanzó respuesta rápida en el 100%, con 15 RC (88%). En 12 pacientes se hizo tratamiento de mantenimiento durante 1 año, permaneciendo 11 estables después de una media de 28 meses. La evolución a más largo plazo de estas dos series ha confirmado la consistencia de estas respuestas. La combinación de rituximab con quimioterapia parece ser muy eficaz y hay datos anecdóticos de buenas respuestas de rituximab

asociado con vincristina y ciclofosfamida²⁹. A pesar de la limitada eficacia de 2CdA, la adición de rituximab permite mejorar espectacularmente el nivel de las respuestas, que alcanzan un 62% con tiempo a progresión a 48 meses del 83%, permitiendo además alcanzar respuesta molecular en el 81%²⁶. En un estudio retrospectivo se valoró la respuesta de 70 pacientes a tres tipos de tratamiento: rituximab, rituximab más quimioterapia (fludarabina con ciclofosfamida o con mitoxantrone) o quimioterapia sola, obteniendo respuestas en el 88, 83 y 55%, respectivamente, y supervivencia libre de enfermedad a los 3 años de 86, 100 y 45%¹⁷. Estos datos indican que el tratamiento con rituximab puede sustituir a la esplenectomía como primer paso de tratamiento^{27,28} y que la combinación de rituximab y análogos de las purinas muestra en los estudios iniciales una especial eficacia, que será necesario confirmar. Rituximab es también eficaz en la AHAI que no responde a los esteroides²⁸.

El tratamiento inicial de la transformación debe ser igual que el de otros linfomas B de alto grado, CHOP-rituximab.

LZME/LELV asociado a HCV. Tratamiento antiviral

En el LZME/LELV asociado a HCV se ha descrito que el tratamiento antiviral puede conseguir la desaparición del linfoma. En una serie de 9 pacientes con LELV (algunos previamente tratados con esplenectomía o quimioterapia) el tratamiento con interferón α -2b (y ocasionalmente ribavirina) durante 6-12 meses consiguió la desaparición de la viremia y RC del linfoma². La ampliación de la serie confirmó los resultados: 14 de los 18 (78%) alcanzaron RC hematológica³⁰. La respuesta hematológica fue paralela a la disminución de la carga viral y los pacientes con negativización del HCV-RNA mantuvieron RC una media de 62 meses. Sin embargo, no hay datos posteriores a los de las publicaciones iniciales y sólo resultados a corto plazo en algunas otras series cortas³¹, por lo no está definitivamente establecido el efecto del tratamiento antiviral en el grupo de LZME/LELV asociadas a HCV. Cuando no hay respuesta a la terapia antiviral, los pacientes que requieren más tratamiento pueden tratarse como los casos no asociados a HCV.

Valoración de la respuesta al tratamiento

Los criterios de respuesta varían en las diferentes publicaciones^{15,27,28}. En las propuestas de 2008¹ se considera como RC la desaparición de la esplenomegalia, mejoría de la hemoglobina (>2 g/dL), más de 100.000/mm³ plaquetas y más de 1.500 neutrófilos/mm³, ausencia de población clonal circulante y ausencia o mínima in-

filtración medular. Una mejoría del 50% de la esplenomegalia y de las citopenias se acepta como RP. Sin embargo, a pesar de la normalización de las citopenias, en muchos casos se detecta población clonal circulante residual. En la mayoría de los estudios, la disminución de la infiltración medular sigue de forma paralela la mejoría de las citopenias y de la linfocitosis, pero después de la esplenectomía la infiltración medular puede progresar^{17,18,22}. Por el contrario, el tratamiento con rituximab y con quimioterapia¹⁸ puede conseguir la desaparición de la población residual clonal en sangre y la disminución de la infiltración medular¹⁷.

Bibliografía

- Matutes E, Oscier D, Montalban C, et al. Splenic marginal zone lymphoma proposals for a revision of diagnostic, staging and therapeutic criteria. *Leukemia*, 2008;22:487-495.
- Hermine O, Lefrere F, Bronowicki JP, et al. Regression of splenic lymphoma with villous lymphocytes after treatment of hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*, 2002;347:89-94.
- Alvarez M, Oyonarte S, Rodriguez M et al. Estimated risk of transfusion transmitted viral infections in Spain. *Transfusion*, 2002, 42;994-998.
- De San José S, Nieters A, Godert J et al. Role of hepatitis C virus in malignant lymphoma in Spain. *Int J Cancer*, 2004;111;81.
- Mele A Pulsoni A, Bianco E et al. Hepatitis C virus and B-cell non-Hodgkin lymphoma: an Italian multicenter case-control study. *Blood*, 2003;102;996-999.
- Nieters A, Kallinowski B, Brennan P et al. Hepatitis C and risk of lymphoma: Results of the European Multicenter Case-Control study EPILYMPH. *Gastroenterology*, 2006;131;1879-1886.
- Gisbert JP, García-Buey L, Pajares JM, Moreno R. Prevalence of hepatitis C virus infection in B-cell non-Hodgkin's lymphoma: Systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology*, 2003;125:1723-1732.
- Arcaini L, Paulli, Boveri E et al. Splenic and nodal Marginal Zone Lymphomas are indolent disorders at high hepatitis C virus seroprevalence with distinct presenting features but similar morphologic and phenotypic profiles. *Cancer*, 2004;100;107-115.
- Arcaini L, Lazzarino M, Colombo N et al. Splenic marginal zone lymphoma: a prognostic model for clinical use. *Blood*, 2006;107; 4643-4649.
- Bates I, Bedu-Addo G, Rutherford T, Bevan D. Splenic lymphoma with villous lymphocytes in tropical West Africa. *Lancet*, 1992;340;575-577.
- Thieblemont C, Felman P, Berger F, et al. Treatment of splenic marginal zone B-cell lymphoma: an analysis of 81 patients. *Clin Lymphoma*, 2002;3;41-47.
- Kanellis G, Mollejo M, Montes S, et al. Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma: a revision of a series of cases reveals characteristic clinico-pathological features. *Haematologica*, 2010.
- Traverse-Glehen A, Baseggio L, Callet-Bachu E et al. Splenic red pulp lymphoma with numerous basophilic villous lymphocytes: a distinct clinicopathologic and molecular entity?. *Blood*, 2008;111;2253-2260.
- Troussard X, Valensi F, Duchayne E, et al. Splenic lymphoma with villous lymphocytes: clinical presentation, biology and prognostic factors in a series of 100 patients. *Groupe Français d'Hématologie Cellulaire (GFHC). Br J Haematol*, 1996; 93:731-736.
- Chacon J, Mollejo M, Munoz E, et al. Splenic marginal zone lymphoma: clinical characteristics and prognostic factors in a series of 60 patients. *Blood*, 2002;100:1648-1654.
- Camacho FI, Mollejo M, Mateo MS, et al. Progression to large B-cell lymphoma in splenic marginal zone lymphoma. A description of a series of 12 cases. *Am J Surg Pathol*, 2001;25:1268-1276.
- Tsimberidou AM, Catovsky D, Schlette E, et al. Outcomes in patients with splenic marginal zone lymphoma and marginal zone lymphoma treated with rituximab with or without chemotherapy or chemotherapy alone. *Cancer*. 2006;107:125-135.
- Audouin J, Le Tourneau A, Molina T, et al. Patterns of bone marrow involvement in 58 patients presenting primary splenic marginal zone lymphoma with or without circulating villous lymphocytes. *Br J Haematol*, 2003;122;404-412.
- Ponzoni M, Kanellis, Poulidou E, et al. Histopathological examination of bone marrow biopsy in primary splenic B-cell lymphomas of marginal zone origin (PSMZL). A reliable substitute for spleen pathology? *Blood*, 2009 Abs, #1924.
- Parry-Jones, N, Matutes S, Gruszka-Westwood AM et al. Prognostic features of splenic lymphoma with villous lymphocytes: a report of 129 patients *Br J Haematol*, 2003;120;659-764.
- Iannitto E, Ambrosetti A, Ammatuna E et al. Splenic marginal zone lymphoma with or without villous lymphocytes. Hematologic findings and outcomes in a series of 57 patients. *Cancer*, 2004;101:2050-2057.
- Franco V, Florena AM, Stella M, et al. Splenectomy influences bone marrow infiltration in patients with splenic marginal zone lymphoma with or without villous lymphocytes. *Cancer*, 2001;91:294-301.
- El Weshi A, Ribrag V, Girinski T et al. Low and medium dose spleen radiation therapy are able to induce long term responses in splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Br J Haematol*, 1998,103;1212-1213.
- Lefrere F, Hermine O, Bellanger C et al. Fludarabine therapy in patients with splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Leukemia*, 2004;18;1924-1925.
- Iannitto E, Minardi V, Calvaruso G, et al. Deoxycoformycin (pentostatin) in the treatment of splenic marginal zone lymphoma (SMZL) with or without villous lymphocytes. *Eur J Haematol*, 2005;75:130-135.
- Cervetti G, Galimberti S, Sordi E, et al. Significant efficacy of 2-CdA with or without Rituximab in the treatment of splenic marginal zone lymphoma (SMZL). *Ann Oncol*, 2010;21;851-854.
- Bennet M, Yegena S, Dave HP, Schechter GP. Rituximab monotherapy is highly effective in splenic marginal zone lymphoma. *Hematol Oncol*, 2008;26;114.
- Kalpadakis C, Pangalis GA, Dimopoulos MN et al. Rituximab monotherapy is highly effective in splenic marginal zone lymphoma. *Hematol Oncol*, 2007;25;127-131.
- Arcaini L, Orlandi E, Scotti M, et al. Combination of rituximab, cyclophosphamide, and vincristine induces complete hematologic remission of splenic marginal zone lymphoma. *Clin Lymphoma*. 2004;4:250-252.
- Sadoun D, Suarez F, Lefrere F et al. Splenic lymphoma with villous lymphocytes, associated with type II cryoglobulinemia and HCV infection: a new entity?. *Blood*, 2005;105;74-76.
- Kelaidi C, Rollot F, Park S et al. Response to antiviral treatment in hepatitis C virus-associated marginal zone lymphomas. *Leukemia*, 2004;18;1711-1716.

Avances en medicina transfusional

COORDINADORES: E. CASTRO. *Madrid*
R. ROIG. *Valencia*

Resumen del simposio

En primer lugar, la Dra. Mercedes Corral nos presentará los resultados de un programa de contención del uso de sangre en el Hospital Clínico de Salamanca. Durante su exposición nos hablará del fundamento del programa, de las intervenciones proyectadas y de los resultados conseguidos. Es relevante el rigor del estudio y la solidez de las conclusiones, otorgada en buena medida por la extensión del estudio y el gran número de pacientes incluidos en el mismo. El análisis de los datos ha permitido incluso obtener una serie de parámetros que permiten predecir la necesidad de transfusión perquirúrgica. Tras su presentación la audiencia tomará conciencia de la importancia de este tipo de abordajes de la terapia transfusional y de las implicaciones que tienen, tanto para el paciente como para el abastecimiento de sangre de los hospitales. Un ejemplo a seguir por los hospitales españoles, que contribuirá a mejorar el abastecimiento de sangre y la seguridad de los pacientes.

A continuación, la Dra. Lily Lin hará una completa revisión de los sistemas para prevenir la enfermedad del injerto contra el huésped postransfusional (TA-GVHD), y más específicamente del empleo del tratamiento con psoralenos y luz UVA (INTERCEPT). Comenzando por los estudios *in vitro* e *in vivo* sobre la inactivación de leucocitos que se consigue con el sistema INTERCEPT, siguiendo con una extensa revisión de toda la experiencia clínica acumulada, de más de 400.000 transfusiones de plaquetas tratadas con INTERCEPT en 24 centros en 12 países europeos, que emplean este sistema de inactivación de patógenos en lugar de la gamma irradiación, en diferentes tipos de pacientes oncohematológicos, tanto adultos como pediátricos. Asimismo, aporta información sobre los aspectos regulatorios respecto al uso del sistema INTERCEPT en lugar de la irradiación gamma para la prevención del a TA-GVHD, que incluye tanto la Formal pan-European CE Mark Registration como la aprobación de las autoridades específicas en Francia, Alemania y Suiza. Para concluir, finalmente, que el tratamiento de los componentes sanguíneos con INTERCEPT elimina la necesidad de la irradiación gamma para la prevención de la enfermedad injerto contra huésped transfusional.

La última de las tres conferencias será dictada por la Dra. Emma Castro, que hablará de la amenaza que supone para el suministro de sangre la aparición de nuevas enfermedades infecciosas emergentes y de los sistemas de protección disponibles en los bancos de sangre.

La exposición comienza por una revisión del concepto de patógenos emergentes y de cómo se determina la importancia de un agente infeccioso para el sistema transfusional. A continuación, se describen los agentes emergentes más relevantes en estos momentos para la transfusión y las nuevas amenazas que aparecen en el horizonte. Hablará tanto de agentes parasitarios como los causantes de la enfermedad de Chagas, malaria, leishmaniasis o babesiosis, así como de diferentes virus: West Nile virus, Chikungunya virus y Dengue virus. Mucho más recientemente se ha descrito un nuevo agente, el retrovirus XMRV, cuyas implicaciones con la transfusión están estudiándose en estos momentos y en medio de una gran controversia. Para, finalmente, revisar extensamente los diferentes abordajes posibles del problema, con especial hincapié en los sistemas proactivos, como son los sistemas de inactivación de patógenos de los componentes sanguíneos lábiles.

ESTRATEGIAS PARA LA REDUCCIÓN EN EL CONSUMO DE CS ALOGÉNICOS

M. CORRAL ALONSO, J.R. GONZÁLEZ PORRAS

Servicio de Hematología.

Hospital Clínico Universitario de Salamanca

Introducción

La terminología de “programas de conservación de sangre” o “programas de ahorro de sangre” es relativamente reciente, pero no lo es la filosofía de usar diferentes estrategias con el objetivo de reducir la exposición del enfermo a componentes sanguíneos (CS) alogénicos, para evitar los riesgos transfusionales que aún persisten: enfermedades infecciosas emergentes, efectos adversos de la inmunomodulación asociada a transfusión de componentes sanguíneos (CS) alogénicos, errores administrativos que pueden conducir a la transfusión de concentrados de hematíes ABO incompatibles (aún hoy la causa más frecuente de muerte evitable ocasionada por transfusión), la lesión pulmonar aguda relacionada con la transfusión (TRALI), etc.

Es, además, éticamente obligado optimizar el uso de un recurso limitado, al que cada vez acceden más enfermos de más edad y que debe administrarse solo en situaciones clínicas en las que no hay otra alternativa de tratamiento y en las que existe evidencia suficiente de su beneficio. Existen también ensayos clínicos, tanto en contextos médicos como quirúrgicos, que vinculan directamente la reducción de las transfusiones a menor morbilidad; los resultados no son definitivos, pero están ayudando a convencer a clínicos y cirujanos de la importancia del uso apropiado de la transfusión, y de la necesidad de usar las alternativas disponibles.

Por último, existen ciudadanos que, rechazando la transfusión por razones religiosas o de otro tipo, reivindican su derecho a las ventajas de los nuevos tratamientos médicos y quirúrgicos, reclamando medidas alternativas a la transfusión, que debemos facilitarles.

Las estrategias de ahorro de CS son variables en su eficacia, momento de aplicación, mecanismos de acción, nivel de conocimiento que requiere su uso, costos, riesgos que conllevan, etc.

La eficacia del programa de conservación de sangre dependerá de la capacidad de adaptarse a las necesidades del paciente individual: es obvio que no existe una estrategia única, universal, de conservación de sangre aplicable a todos los enfermos que van a la cirugía. La selección de las más adecuadas en un enfermo concreto, con una situación clínica específica, debe ser el objetivo clave del programa.

El principio de partida de todos los programas de ahorro de sangre, para que sea eficaz, requiere la implicación de todos los que participan en el tratamiento del enfermo: hematólogos, anestesiólogos, internistas, intensivistas y cirujanos. El programa debe iniciarse mucho antes de que el enfermo esté en la antesala del quirófano o tenga una situación clínica en la que se plantee la posibilidad de la transfusión como parte del tratamiento y no debe darse por concluido hasta que el enfermo vuelva a su casa en una situación funcional normal.

El desarrollo de una estrategia efectiva comienza con un sistema de recogida de datos en todos los servicios que participan en el tratamiento del enfermo, como única vía para poder evaluar la eficacia en el pronóstico clínico del enfermo de la/s estrategia/s seleccionadas, algo que es imposible hacer en la mayor parte de los estudios publicados.

Un programa de conservación o de ahorro de sangre descansa en tres pilares:

a) Uso óptimo de los componentes sanguíneos, desde nuestro punto de vista la estrategia más costo/eficaz en cualquier programa de ahorro de sangre.

b) Aumento de la masa de células rojas del enfermo.

c) Reducción de pérdidas de sangre perioperatoria.

Con los criterios y filosofía expuestos, nuestro programa de ahorro de sangre lo hemos basado en las estrategias a y b. En nuestra intervención revisaremos cómo iniciamos nuestro programa y los resultados de nuestra intervención en los últimos años

Promoción del uso óptimo de los componentes sanguíneos

La preocupación por el uso óptimo proviene de la extraordinaria variabilidad en el uso de la transfusión detectada en los análisis de práctica transfusional. La disparidad en el criterio de uso de los componentes sanguíneos (CS), en idénticas situaciones clínicas, incluso dentro del mismo hospital, demuestra que la “evidencia científica” disponible no se tiene en cuenta, y ello conlleva altos índices de uso inapropiado, que exponiendo al enfermo a riesgos posibles no se traducen en una mejora del pronóstico. Cuando hablamos de uso óptimo nos referimos a un uso de los CS que mejore el pronóstico del enfermo: que le aporte un beneficio real, evitando sus síntomas, o haciendo posible que otros tratamientos para él esenciales puedan realizarse. Se trata de promover prácticas de uso de CS en situaciones clínicas en las que exista una base de evidencia de sus beneficios, y de desterrar el uso no justificado.

Tanto el Consejo de Europa como la OMS, a través de conferencias y distintos foros, han generado reco-

mendaciones para mejorar el uso de la sangre y sus componentes, pero en el año 2010 el uso óptimo de los componentes sanguíneos sigue siendo un reto para la medicina. La investigación clínica dirigida a definir mejor las indicaciones de los componentes sanguíneos y, por tanto, a facilitar su uso apropiado y seguro, debería potenciarse.

¿Cómo trabajar para lograr el uso óptimo de los componentes sanguíneos?

En el año 1995 conscientes de que en nuestro hospital el uso innecesario de los CS era una realidad en numerosas situaciones clínicas, y que ello se traduciría en situaciones de escasez que podrían haberse reducido o incluso evitado, nos planteamos el desarrollo de un programa de ahorro de sangre a través de la promoción del uso apropiado de los CS.

El programa se desarrolló en las siguientes fases:

Año 1995:

1. Elaboración de unas Guías de Uso de Componentes Sanguíneos.
2. Revisión concurrente de uso de componentes sanguíneos basada en criterios clínicos consensuados en las guías durante 6 meses.
3. Análisis de los datos de la revisión de uso.

Año 1996:

4. Intervención educativa en el año 1996 en todos los Servicios del hospital que transfundían. La intervención incluía la presentación de los resultados del análisis, tanto generales como del propio Servicio, así como las propuestas de mejora.

Año 1997:

5. Evaluación de la intervención: nueva auditoría de práctica y análisis de los datos.

El programa demostró:

- que en nuestro hospital existía uso inapropiado: 32% en el uso de CH y plasma en nuestra primera revisión en el año 1995.

- que la intervención redujo el uso inapropiado de for-

ma significativa (inferior al 5% en CH, y al 6% en plasma en nuestra primera evaluación de eficacia).

- se redujeron las situaciones de escasez, y de forma significativa la suspensión de cirugía.

Desde el año 2000, el Comité Hospitalario de Transfusión:

- Revisa y actualiza las guías de uso de componentes sanguíneos.
- Monitoriza y evalúa el uso clínico de los componentes sanguíneos de forma sistemática, 1 mes al año.
- Realiza una jornada hospitalaria anual en la que:
 - Difunde los resultados de la auditoría.
 - Expone los datos anuales de hemovigilancia.
 - Analiza el programa prequirúrgico de ahorro de sangre.

Protocolo preoperatorio para el ahorro de sangre

Basamos nuestro programa en:

1. El hecho demostrado de que la hemoglobina (Hb) prequirúrgica es el predictor independiente de riesgo transfusional más importante (Nuttall *et al.*, 1996, Keating *et al.* 1998, Bierbaum *et al.* 1999). El estudio prospectivo de Guerin y cols. (2007) en 162 enfermos consecutivos sometidos a artroplastia de cadera y rodilla, demostró que los pacientes con Hb prequirúrgica < 13 g/dL tenían 4 veces más probabilidades de ser transfundidos que aquellos cuya Hb prequirúrgica era > 15 g/dL.

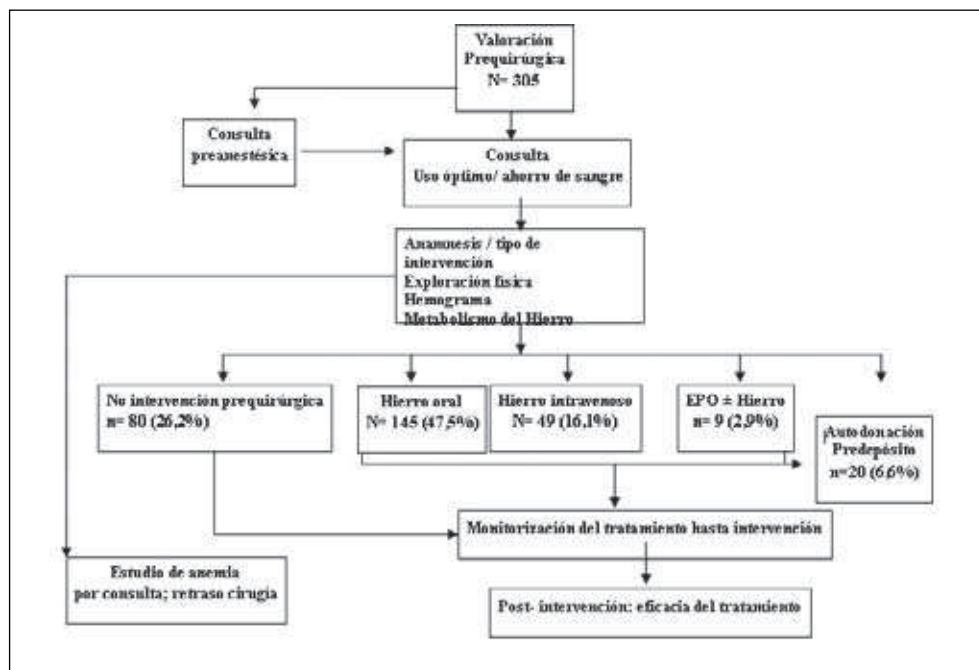


Figura 1. Protocolo individualizado de ahorro de sangre en cirugía ortopédica electiva de cadera y rodilla.

Decisión terapéutica individualizada	
- Hb \leq 10 gr/dl: ESTUDIO/Trat. ANEMIA	
- No intervención:	<ul style="list-style-type: none"> >Hb > 14.5 gr/dl >Ferritina > 200 >Índice de saturación de la ferritina > 40%
- Hb > 13 gr/dl:	<ul style="list-style-type: none"> >Ferritina normal: Fe oral + ácido fólico >Ferritina baja: Fe i.v. 200 mg/semana
- Hb 10-13 gr/dl:	<ul style="list-style-type: none"> >Si déficit de hierro: Fe i.v. >Si "déficit funcional": EPO 40.000 UI sc + >Fe 200 mg i.v. semanal

Figura 2. Decisión terapéutica individualizada.

2. Es posible optimizar la Hb prequirúrgica de los enfermos con diferentes estrategias de tratamiento: hierro oral o iv, rhEPO.

Dado que en nuestro hospital no disponemos de una planificación quirúrgica anticipada segura de más de 3 semanas, el programa se basa en evaluar a cualquier paciente en lista de espera para cirugía electiva de artroplastia de cadera y rodilla que sea referido al S. de transfusión desde la consulta preanestésica de acuerdo con el protocolo resumido en las Figuras 1 y 2.

cuyo pronóstico "transfusional" fue comparado con un grupo control histórico (año 2005) apareados por edad, sexo, y tipo de intervención quirúrgica. Además, ambos grupos, estudio y control, fueron intervenidos por el mismo equipo de cirujanos.

Los datos demográficos y las características clínicas del grupo histórico y de los 305 enfermos evaluados las recoge la Tabla 1.

La Tabla 2 recoge los niveles de Hb y los datos del estudio del hierro basales y en el periodo de seguimiento en los diferentes grupos.

De manera secundaria, analizamos los requerimientos transfusionales de este grupo de enfermos (Tabla 3). Analizamos también los factores capaces de predecir el riesgo transfusional, que concuerdan con lo comunicado en buen número de estudios: el tipo de cirugía (artroplastia de cadera *versus* artroplastia de rodilla, la volemia, la Hb prequirúrgica, y haber o no hecho autodonación predépósito, son predictores del riesgo transfusional (Tabla 4).

Tabla 1. Características clínico-biológicas de ambas poblaciones de estudio

Variable	Grupo de estudio (n = 305)	Grupo control (n = 305)
Edad (años) (media \pm DE)	68,1 \pm 10,6	68,8 \pm 9,9
Sexo (masculino/femenino) (n)	124/181	124/181
Peso (kg) (media \pm DE)	72 \pm 12,6	74 \pm 10,5
Tipo de artroplastia, n (%)		
Artroplastia total de rodilla	142 (46,6)	142 (46,6)
Artroplastia total de cadera	163 (53,4)	163 (53,4)
Hemoglobina (g dL-1) (media \pm DE)	13,8 \pm 1,3	13,8 \pm 1,4
Pacientes con Hb > 14 g dL-1 (%)	62	60
Ferritina (μ g L-1) (media \pm DE)	127 \pm 227	129 \pm 126
Índice de saturación de la transferrina (%) (media \pm DE)	28,6 \pm 9,82	31,2 \pm 10,1
Hemoglobina al alta (g dL-1) (media \pm DE)	-	10,7 \pm 0,8
Ferritina al alta (mg L-1) (media \pm DE)	-	-
Pacientes transfundidos (%)	-	96 (31,5)
CH transfundidos (n) (media \pm DE)	-	233 \pm 1,36

DE: desviación estándar; CH: concentrados de hemáties.

Conclusiones

Los programas de conservación o ahorro de sangre son parte de la estrategia global de buena práctica clínica con la que todos estamos comprometidos.

La promoción del uso apropiado de los componentes sanguíneos y la consulta preoperatoria, específicamente dirigida a que el enfermo vaya a la cirugía con niveles de hemoglobina óptimos, son dos estrategias muy eficaces para reducir el consumo de componentes san-

Tabla 2. Hemoglobina y ferritina pre- y postratamiento

	No intervención (n = 80)	Fe oral (n = 145)	Fe IV (n = 49)	Autodonación + Fe oral (n = 20)	EPO + Fe IV (n = 9)	Todos los pacientes (n = 303)	Todos excepto autodonación (n = 283)
Cifra de Hb (g dL-1)							
Basal (media ± DE)	14,9 ± 0,4	14,1 ± 0,9	13,3 ± 0,2	14,3 ± 0,5	11,1 ± 0,7	13,8 ± 1,3	13,7 ± 1,2
Previo a IQ	14,9 ± 0,4	14,3 ± 0,8	14,3 ± 0,2	13 ± 0,6	13,5 ± 0,6	14,6 ± 1,1	14,5 ± 1,1
Incremento (media)	-	0,2	1	-1,3	2,4	0,8	0,8
Al alta (media ± DE)	11,1 ± 0,8	10,7 ± 0,1	10,3 ± 0,8	11,0 ± 0,7	10,8 ± 0,8	10,9 ± 0,9	10,9 ± 0,9
Pacientes con Hb 14 (%)	Pacientes con Hb 14 (%)	Pacientes con Hb 14 (%)					
Basal	Basal	Basal	27	82	0	62	70
Antes de la IQ	Antes de la IQ	Antes de la IQ	81	15	55	82	86
Ferritina							
Basal (media ± DE)	306 ± 21	69,6 ± 6	22 ± 9	191 ± 272	50 ± 10	127 ± 227	111 ± 265
Previo a IQ	300 ± 25	101 ± 43	330 ± 441	121 ± 196	251 ± 148	264 ± 284	237 ± 216
Incremento (media)	-	32	307	-70	201	137	126
Al alta (media ± DE)	178 ± 63	65 ± 61	168 ± 108	98 ± 143	107 ± 69	154 ± 204	165 ± 215
Días previos a la IQ (mediana, rango)	26 (7-109)	31 (6-151)	29 (7-91)	17 (7-39)	29 (28-32)	29 (6-151)	29 (6-151)

Fe: Hierro; IV: intravenoso; EPO: eritropoyetina; DE: desviación estándar; Hb: hemoglobina; IQ: Intervención quirúrgica.

guíneos, favorecer una disponibilidad puntual de los mismos, evitar riesgos asociados a la transfusión innecesaria, y reducir costes.

Implantar guías de uso clínico de los componentes y productos sanguíneos, basadas en la evidencia disponible, o en las indicaciones aprobadas por conferencias de consenso.

Establecer los mecanismos que garanticen que las guías consensuadas se aplican.

Monitorizar y evaluar el uso clínico de los componentes sanguíneos de forma sistemática y periódica, y estimular la realización de estudios sobre el uso clínico de los CS, recogiendo y comparando indicadores de uso en contextos médicos y quirúrgicos específicos.

Anticiparse a las previsibles necesidades del enfermo, colocándole mediante tratamientos alternativos a la transfusión (uso de hierro, eritropoyetina, etc.) en la mejor situación posible para abordar los tratamientos médicos y o quirúrgicos.

No son las únicas, pero sí parte esencial de cualquier programa de ahorro de sangre.

El comité de transfusión hospitalario, multidisciplinar, es la estructura básica para garantizar que un programa concebido con esta filosofía funcionará y será eficaz.

Bibliografía

- Aderinto, J. & Brenkel, I.J. (2004) Pre-operative predictors of the requirement for blood transfusion following total hip replacement. *Journal of Bone and Joint Surgery* 2004, 86, 970-973.
- American Association of Blood Banks. About Blood and Cellular Therapies. Facts About Blood. Autologous (Self-donated) Blood as an Alternative to Allogeneic (Donor-donated) Blood Transfusion [WWW document] (2005) URL http://www.aabb.org/Content/About_Blood/Facts_About_Blood_and_Blood_Banking/fabloodautoallo.htm (accessed on 14 August 2006).

Tabla 3. Requerimientos transfusionales

	No intervención (n = 80)	Fe oral (n = 145)	Fe IV (n = 49)	Autodonación + Fe oral (n = 20)	AEEs + Fe IV (n = 9)	Todos los pacientes (n = 303)	Grupo histórico (n = 305)	p
Pacientes transfundidos, n (%)	11 (13,7)	29 (20)	10 (20,4)	7 (35)	0	57 (18,8)	96 (31,5)	< 0,001
CH transfundidos								
Total	20	46	18	16	0	100	233	
Media ± DE	0,25 ± 0,41	0,31 ± 0,47	0,37 ± 0,52	0,8 ± 1,42	-	0,33 ± 0,6	0,77 ± 1,36	< 0,001
Transfusión inapropiada (%)	4,8	5	5,2	15	-	5,6	5,1	

Fe: hierro; IV: intravenoso; EPO: eritropoyetina; DE: desviación estándar; Hb: hemoglobina; IQ: Intervención quirúrgica.

Tabla 4. Factores capaces de predecir el riesgo transfusional

Variable	Transfusión (n = 154)	No transfusión (n = 454)	p
Edad en años	69,3 ± 10,4	70,1 ± 10,6	0,435
Sexo femenino, n (%)	93 (60,4)	267 (58,8)	0,776
Peso (kg)	67,1 ± 12,3	72,9 ± 9,5	< 0,001
Artroplastia de cadera, n (%)	123 (79,9)	202 (44,5)	< 0,001
No inclusión en nuestro programa de ahorro de sangre, n (%)	96 (62,3)	209 (46)	< 0,001
Hb precirugía (g dL-1)	13,4 ± 1,3	14,3 ± 1,1	< 0,001
Ferritina precirugía (g dL-1)	206 ± 167,4	250 ± 285,9	

Los datos se expresan en media DE y se analizan por χ^2 o t-Student.

- Beris P, Muñoz M, García-Erce JA, et al. Perioperative anemia management: consensus statement on the role of intravenous iron. *Br J Anesth* 2008; 100: 599-604
- Bierbaum, B.E., Callaghan, J.J., Galante, J.O., Rubash, H.E., Tooms, R.E. & Welch, R.B. An analysis of blood management in patients having a total hip or knee arthroplasty. *Journal of Bone and Joint Surgery* 1999, 81, 2-10.
- Billote DB., Glisson SN., Green D. et al. A prospective randomised study of preoperative autologous donation in hip replacement surgery. *J of Bone and Joint Surgery*. 2002; 84: 1299-13045.
- Blajchman MA. Landmark studies that have changed the practice of transfusion medicine. *Transfusion* 2005; 45: 1523-1530.
- Brecher ME, Goodnough LT. The rise and fall of preoperative autologous blood donation. *Transfusion* 2002; 42: 1618-1622.
- Carless P., Moxey A., O'Connell and Henry D. Autologous transfusion techniques: a systematic review of their efficacy. *Transfusion Medicine*, 2004; 14: 123-144.
- Coubret C, Laffon M, Annick B et al. A Restrictive use of both Autologous Donation and Recombinant Human Erythropoietin Is an Efficient Policy for Primary Total Hip or Knee Arthroplasty. *Anesth Analg* 2004; 99: 262-271.
- Eindhoven GB, Diercks RL, Richardson FJ, et al. Adjusted transfusion triggers improve transfusion practice in orthopedic surgery. *Transfusion Medicine*, 2005; 15 : 13-18.
- Feagan, B.G., Wong, C.J., Kirkley, A., Johnston, D.W., Smith, F.C., Whitsitt, P., Wheeler, S.L. & Lau, C.Y. Erythropoietin with iron supplementation to prevent allogeneic blood transfusion in total hip joint arthroplasty. A randomized, controlled trial. *Annals of Internal Medicine* 2000 133, 845-854.
- Feagan BG, Wong CJ, Johnston WC, et al. Transfusion practices for elective orthopaedic surgery. *CMAJ* 2002; 166: 310-314.
- Faris, P.M., Spence, R.K., Larholt, K.M., Sampson, A.R. & Frei, D. The predictive power of baseline haemoglobin for transfusion risk in surgery patients. *Orthopedics* 1999, 22, S135-S140.
- García-Erce, J.A., Cuenca, J., Martínez, F., Cardona, R., Pérez-Serrano, L. & Muñoz, M. Perioperative intravenous iron preserves iron stores and may hasten the recovery from post-operative anaemia after knee replacement surgery. *Transfusion Medicine* 2006, 16, 335-341.
- Garrioch M, Sandbach J, Pirie E et al. Reducing red cell transfusion by audit, education and a new guideline in a large teaching hospital. *Transfusion medicine* 2004; 14: 25-31.
- Gombotz H, Rehak PH, Shander A ET AL. Blood use in elective surgery: the Austrian benchmark study. *Transfusion* 2007; 47: 1468-1480.
- Gonzalez-Porras JR, Colado E, Conde MP et al. An individualized pre-operative blood saving protocol can increase pre-operative haemoglobin levels and reduce the need for transfusion in elective total hip or knee arthroplasty.
- Goodnough L, Shander A, Spence R. Bloodless medicine: clinical care without allogeneic blood transfusion. *Transfusion* 2003; 43: 668-676.
- Guerin S., Collins C., Kapoor H. et al. Blood transfusion requirement prediction in patients undergoing primary total hip and knee arthroplasty. *Transfusion Medicine* 2007; 17: 37-43.
- Guidelines for policies on Alternatives to Allogeneic Blood Transfusion. 1. Predeposit Autologous Blood Donation and Transfusion. British Committee for Standards in Haematology. 2006.
- Keating, E.M., Meding, J.B., Faris, P.M. & Ritter, M.A. Predictors of transfusion risk in elective knee surgery. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1998 357, 50-59.
- Larocque, B.J., Gilbert, K. & Brien, W.F. Prospective validation of a point score system for predicting blood transfusion following hip or knee replacement. *Transfusion* 1998 38, 932-937.
- Muñoz M., García-Erce JA, Villar I, and Thomas D. Blood Conservation Strategies in major surgery: efficacy, safety and European regulations. *Vox Sanguinis* 2008; 96: 1-13.
- Nuttall GA, Santrach PJ, Oliver WC et al. The predictors of red cell transfusion in total hip arthroplasties. *Transfusion*, 1996; 36: 144-149.
- Nuttall, G.A., Santrach, P.J., Oliver, W.C. Jr. et al. A prospective randomized trial of the surgical blood order equation for ordering red cells for total hip arthroplasty patients. *Transfusion* 1998, 38, 828-833.
- Pierson JL., Hannon TJ., and Earles DR. 1A Blood Conservation Algorithm to Reduce Blood Transfusions After Total Hip and Knee Arthroplasty. -The Journal of Bone and Joint Surgery 2004; 86:1512-1518.
- Roberts, M., Ahya, R., Greaves, M. & Maffulli, N. A one-centre prospective audit of peri- and postoperative blood loss and transfusion practice in patients undergoing hip or knee replacement surgery. *Annals of the Royal College of Surgeons of England* 2000 82, 44-48.
- Rock G, Berger R, Bormanis J, et al A review of nearly two decades in an autologous blood programme: the rise and fall of activity.. *Transfusion Medicine* 2006; 16: 307-311.
- Rosef SD. Guidelines for transfusion: A way to decrease transfusion. *Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine* 2004; 6: 27-36.
- Rosencher N, Kerckamp HEM, Macheras G et al. Orthopedic Surgery Transfusion Hemoglobin European Overview (OSTHEO) study: blood management in elective knee and hip arthroplasty in Europe. *Transfusion* 2003; 43: 459-467.
- Salido, J.A., Marin, L.A., Gomez, L.A., Zorrilla, P. & Martinez, C. Preoperative haemoglobin levels and the need for transfusion after prosthetic hip and knee surgery: analysis of predictive factors. *Journal of Bone and Joint Surgery* 2002 84, 216-220.
- Tinmouth AT, McIntyre LA, Fowler RA. Blood conservation strategies to reduce the need for red blood cell transfusion in critically ill patients. *CCMAJ* 2008; 178: 49-57.
- Walsh, M., Preston, C., Bong, M., Patel, V. & Di Cesare, P.E. Relative risk factors for requirement of blood transfusion after total hip arthroplasty. *Journal of Arthroplasty* 2007 22, 1162-1167.
- Was CT., Long TR., Faust RJ., et al. Changes in red blood cell transfusion practice during the past two decades: a retrospective analysis, with the Mayo database, of adult pa-

- tients undergoing mayor spine surgery. *Transfusion* 2007; 47: 1022-1027.
35. Weiskopf RB. Pharmacologic approach to decreasing transfusion in the perioperative period. *ISBT Science Series* 2008; 3: 91-94.
36. Wong CJ., Vandervoort MK., Vandervoort SL., et al. A cluster-randomized controlled trial of a blood conservation algorithm I patient undergoing total hip joint arthroplasty. *Transfusion* 2007; 47: 832-841.

PROTECTION AGAINST TA-GVHD DUE TO PLATELET TRANSFUSION BY USING PATHOGEN INACTIVATION WITH THE INTERCEPT BLOOD SYSTEM™. GAMMA IRRADIATION IS NOT THE ONLY ANSWER

L. LIN¹, L. CORASH¹, J.C. OSSELAER²

¹ *Cerus Corporation. Concord, CA (USA).* ² *Transfusion Center. Cliniques Universitaires de Mont Godinne. Université Catholique de Louvain. Yvoir (Belgium)*

Introduction

Transfusion-associated graft versus host disease (TA-GVHD) is a rare complication of blood transfusion, in which the donor T lymphocytes (T cells) mount an immune response against the recipient's lymphoid tissue.¹ Following transfusion, donor lymphocytes are usually identified as foreign and destroyed by the recipient's immune system. However, in situations where the recipient is immunocompromised, or when the donor is homozygous and the recipient is heterozygous for an HLA haplotype (as can occur in directed donations from first-degree relatives), the recipient's immune system is not able to recognize or destroy the donor lymphocytes. This can result in TA-GVHD. There is no effective treatment of TA-GVHD and the mortality rate is extremely high.² Therefore, the prevention of TA-GVHD is essential.

For many years the standard of care for prevention of TA-GVHD has been gamma irradiation of cellular blood components.² Gamma radiation renders the donor T cells non-viable and protects the recipient from potentially developing TA-GVHD. The most commonly used dose of gamma radiation is 2,500 cGy, which has been demonstrated by a clonal expansion assay with limiting dilutions to inactivate 5-6 logs of T cells.³ Gamma irradiation of platelet and red cell components is generally employed on a selective basis for patients identified at risk for TA-GVHD to avoid unnecessary irradiation of blood components due to potential negative effects on component function. Guideli-

nes have been produced by the American Association of Blood Banks in the United States and the British Committee for Standards in Haematology in the UK recommending for which patients gamma-irradiated products should be available.^{4,5}

However, there are potential problems with this approach. Patients at risk for TA-GVHD may not be recognized at the time of transfusion and thus may be transfused with non-gamma irradiated cellular components. In addition, although extremely rare, gamma-irradiated blood components have been reported to cause TA-GVHD due to mechanical failures.⁶

The INTERCEPT Blood System™ has been developed to inactivate viruses, bacteria, parasites, and leukocytes in labile blood components. This system uses a photoactive compound, amotosalen, which is activated by UVA (320-400 nm) light to form covalent adducts with pyrimidine bases of the nucleic acids.⁷ Nucleic acids covalently bound by amotosalen can no longer replicate. A broad range of pathogens that depend on nucleic acid replication for function are therefore inactivated by INTERCEPT treatment and can no longer cause diseases in transfusion recipients. Leukocytes contain nuclei and large quantities of DNA and are highly sensitive targets for amotosalen-UVA inactivation. Therefore the INTERCEPT process is an effective process that inactivates contaminating viruses, bacteria, and parasites in platelet and plasma components, and at the same time, inactivates contaminating leukocytes.⁸

Two INTERCEPT™ systems, one for platelets and the other for plasma, have been CE Mark approved and are currently in routine clinical use in many European countries. In addition, a specific indication that INTERCEPT treatment is equivalent to gamma irradiation for prevention of TA-GVHD was CE Mark approved in 2008. Subsequently, country-specific regulatory agencies such as the Paul Ehrlich Institute (PEI) of Germany, the Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (Afsaps) of France, and the SwissMedic of Switzerland separately approved that INTERCEPT treated platelet components without use of gamma irradiation can be given to severely immunocompromised patients who otherwise require gamma irradiated platelet components. Selective identification of patients at risk for TA-GVHD is not required for components treated with the INTERCEPT process.

This report summarizes the preclinical in vitro and in vivo studies that demonstrated the level of T cell inactivation after treatment of platelet components with the INTERCEPT process and evaluated the efficacy of T cell inactivation for prevention of TA-GVHD. In addition, this report summarizes the cumulative clinical experience with routine use of INTERCEPT treated platelet components without gamma irradiation transfused to immunocompromised hematology-oncology patients who are at risk for TA-GVHD.

Intercept Blood System for platelets

The INTERCEPT Blood System consists of a UVA illuminator and an integrated processing disposable set (Figure 1). The disposable set provides a single-use closed system for pathogen inactivation treatment of platelet components containing $2.5\text{-}7.0 \times 10^{11}$ platelets either in 255-420 mL of a mixture of 32-47% plasma and 53-68% InterSol™ or in 255-390 mL of plasma alone without platelet additive solution. Amotosalen (150 μM) is added to the platelet mixture, which is then illuminated with UVA light ($3 \text{ J}/\text{cm}^2$). After photochemical treatment, residual amotosalen and free photoproducts in the platelet mixture are reduced to low levels by incubation in a compound adsorption device (CAD) prior to transfusion.

Summary of in vitro and in vivo studies to demonstrate T-cell inactivation and prevention of TA-GVHD

Four independent but complimentary in vitro assay systems were used to assess the efficacy of the INTERCEPT Blood System to inactivate T-cells in

platelet components: 1) T-cell proliferation, 2) chemical modification of cellular DNA, 3) replication competence of cellular DNA, and 4) cellular protein expression (Table 1).⁸ Results were compared where ever possible in parallel studies with 2,500 cGy gamma irradiation. Using a T-cell clonal expansion assay measuring cell viability, INTERCEPT treatment of platelet concentrates inactivated >5.4 logs of T cells compared to 5-6 logs of inactivation after irradiation with 2,500 cGy gamma. INTERCEPT treatment maintained the same level of T-cell inactivation even when the concentration of amotosalen was reduced by 1,500-fold and the UVA dose was reduced by 3-fold. In contrast, a two-fold decrease in the gamma irradiation dose (2,500 cGy to 1,250 cGy) resulted in a 100-fold reduction in T-cell inactivation (5 logs to 3 logs). After INTERCEPT treatment, cellular DNA was modified at an adduct density of one amotosalen molecule per 83 base pairs (bp), compared to approximately one strand break per 37,000 bp induced by 2,500 cGy gamma irradiation. Amotosalen-DNA adducts inhibit T-cell DNA replication and transcription. This large discrepancy in the DNA modification density between the two methods has profound effects on the replication

competence and gene expression of the modified DNA. Using INTERCEPT treated DNA as the template, PCR amplification of the 242 bp HLA-DQ α sequence or the 439 bp β -globin sequence was significantly inhibited. As a result, no cytokine synthesis by contaminating lymphocytes could be detected during platelet storage after INTERCEPT treatment. In contrast, PCR amplification of both the HLA-DQ α and β -globin sequences was not inhibited using gamma irradiated DNA template and cytokine synthesis by contaminating lymphocytes was only partially inhibited during platelet storage after gamma irradiation. These results demonstrated that INTERCEPT treatment can inactivate high levels of T-cells, significantly modify the genomic DNA, and provide

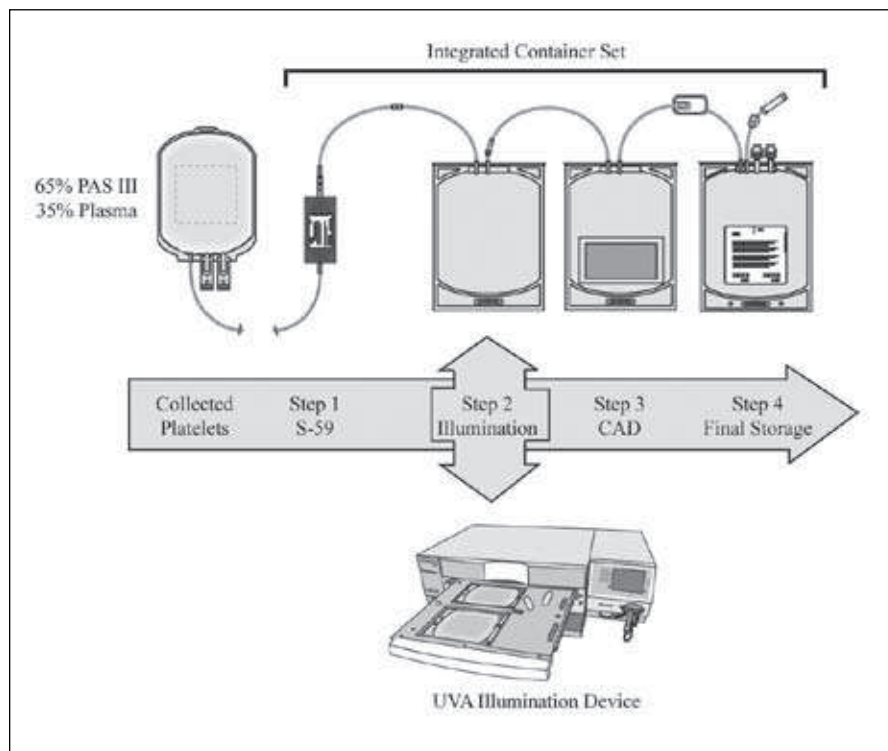


Figure 1. The INTERCEPT Blood System for Platelets. Using a sterile connecting device (SCD), the platelet container is sterily connected to the integrated INTERCEPT processing set. Amotosalen (Step 1), also known as S-59, is added by gravity flow and the platelet mixture is illuminated with UVA light (Step 2). Residual amotosalen and free photoproducts in the platelet mixture are reduced to low levels using a compound adsorption device (CAD) (Step 3) before the platelets are transferred to the storage container (Step 4).

a greater inactivation efficacy margin than gamma irradiation.

Two murine transfusion models were used to evaluate the efficacy of INTERCEPT treatment for prevention of TA-GVHD in vivo. Both models have been well characterized and utilized as models of TA-GVHD in humans. In one model the recipient mice were immunocompromised.⁹ These animals are sensitive to GVHD and are analogous to immunosuppressed patients undergoing ablative therapy with T-cell suppressive treatments. In this model, recipient mice transplanted with T-cell depleted bone marrow, which was supplemented with 3×10^6 viable allogenic donor T-cells, rapidly developed fatal TA-GVHD. In contrast, recipient mice transplanted with T-cell treated with INTERCEPT, survived without developing TA-GVHD. These results demonstrated that INTERCEPT treated T-cells can no longer cause TA-GVHD when transfused into severely immunocompromised recipients. In a second model analogous to the parent to child or first degree related-donor transfusion setting, the recipient mice were immunocompetent. In this model, transfusion of splenocytes from an MHC homozygous parent to an immunocompetent heterozygous F1 hybrid recipient results in TA-GVHD.¹⁰ However, pre-transfusion treatment of donor splenocytes (10^8 per recipient) with INTERCEPT, or gamma irradiation, prevented TA-GVHD. The results of experiments with these animal transfusion models are consistent with the in vitro studies of T-cell inactivation and demonstrated that INTERCEPT treatment is equivalent to, if not more efficacious than, gamma irradiation for prevention of TA-GVHD.^{8,11}

Clinical experience with transfusion of INTERCEPT platelet components without gamma irradiation treatment

Transfusion experience with INTERCEPT platelet components in clinical trial settings

INTERCEPT platelet components prepared without gamma irradiation were administered to patients in 3 European Phase-III clinical trials conducted from 1998 to 2001. Patients in 2 trials (103 and 43 patients, respectively) were randomized

Table 1. Summary of leukocyte and T cell inactivation after INTERCEPT treatment

Assay System	N	Significant Finding
In vitro		
LDA for viable T cells	4 2	Inactivation of $> 10^{5.4 \pm 0.3}$ T cells/mL >1500-fold efficacy margin
DNA modification	1	One amotosalen adduct per 83 base pair
PCR	1	Amotosalen-DNA adducts inhibit PCR amplification
Cytokine synthesis	2	Eliminated during platelet storage
Murine transfusion model		
Immunocompetent recipients	2-13	INTERCEPT treatment prevents TA-GVHD
Immunocompromised recipients	6-9	INTERCEPT treatment prevents TA-GVHD

LDA: T-cell clonal expansion assay by limiting dilution analysis; PCR: polymerase chain reaction
TA-GVHD: transfusion-associated graft-versus-host disease.

into either the Control arm or the INTERCEPT arm in multiple clinical trial sites.^{12,13} The third trial was a single site, single arm, open label study with 20 patients. A total of 166 patients (94 patients in the INTERCEPT arm and 72 patients in the Control arm) were evaluable. Many of them had malignancies or therapies that would put them at risk for TA-GVHD. Patients on study were supported with transfusions of INTERCEPT treated or conventional platelet components (whole blood derived pooled buffy coat or single donor apheresis) for up to 56 days. The data from these trials constitute the first documentation of the clinical efficacy of INTERCEPT treatment for prevention of TA-GVHD in hematology-oncology patients.

Of the 94 patients receiving INTERCEPT platelet components, 87 patients (93%, 87/94) received only INTERCEPT platelet components prepared without gamma irradiation (Table 2). The mean age of these patients was 48 years and 57% were male. Eighty-two of these patients had hematology-oncology malignancies as the primary disease including 45 patients (52%, 45/87) diagnosed with acute leukemia (Table 3). Twenty-eight (28) patients (32%, 28/87) received hematopoietic stem cell transplants (HSCT) while the other 59 patients (68%, 59/87) received chemothera-

Table 2. Proportion of patients receiving non-gamma-irradiated or gamma-irradiated platelet components in 3 European Phase-III Clinical Trials

	INTERCEPT (n=94)	Control (n=72)
Non-gamma-irradiated platelet components	87 (93%)	21 (29%)
Gamma-irradiated platelet components only	7 (7%)	51 (71%)

Table 3. Patients transfused with non-gamma-irradiated INTERCEPT platelet components in 3 European Phase-III Clinical Trials: Diagnosis and Therapies

<i>Patient diagnosis and therapy</i>	<i>Number of patient (%). Total N=87</i>
Diagnosis	
Acute Leukemia	45 (52%)
Lymphoma	17 (19%)
Plasma Cell Dyscrasia	6 (7%)
Myelodysplasia	6 (7%)
Solid Tumor	8 (9%)
Other/Unknown	5 (6%)
Therapy	
Stem Cell Transplant (SCT)	28 (32%)
Chemotherapy Without SCT	58 (67%)
Underlying Disease	1 (1%)

py-radiation therapy only. The 87 patients received a total of 575 transfusions of non-gamma irradiated INTERCEPT platelet components averaging 6.1 transfusions per patient (range 1-21 transfusions).

The 72 patients in the Control arm were managed according to the standard of care per local clinical practices. Fifty-one (51) patients were judged by the physicians as to be at risk for TA-GVHD and gamma-irradiated conventional platelet components were transfused (Table 2). Patients in the at-risk group received a total of 268 transfusions of gamma-irradiated conventional platelet component averaging 5.4 transfusions per patient (range 1-26 transfusions).

All patients were monitored for development of TA-GVHD during the transfusion support period (up to 56 days) and for up to 28 days after the last transfusion. No cases of TA-GVHD were identified in at-risk patients in either study arm. These findings complemented the in vitro and animal data, supporting that INTERCEPT treatment is effective in preventing TA-GVHD in an at-risk patient population.

Transfusion Experience with INTERCEPT platelet components in a post-marketing hemovigilance program

Following commercialization of the INTERCEPT Blood System for platelets in 2003, an active hemovigilance (HV) program was established to document and characterize the safety profile of INTERCEPT treated platelet components in routine use. The objective of the HV program was to gain additional safety experience with INTERCEPT platelet components as they are prepared and transfused under routine blood bank and clinical conditions, respectively, and to gain additional experience in broad patient populations. Of more than 400,000 transfusions

of INTERCEPT platelet components administered to thrombocytopenic patients, safety data on >30,000 transfusions have been collected in several HV studies from 24 participating centers in 12 European countries. In the HV1 study, 5,106 transfusions were administered to 651 patients. 14 Three hundred seventy eight patients (378) had hematology-oncology disorders as the primary disease and 47 of these patients received HSCT. The majority of the transfused INTERCEPT platelet components (97.3%) were not treated with gamma irradiation. Only one participating center elected to gamma irradiate INTERCEPT platelet components for patients at risk of TA-GVHD. In the HV2 study, 7,437 transfusions were administered to 1,400 patients.¹⁵ Among the 748 patients with hematology-oncology disorders, 121 patients received HSCT. As in the HV1 study, 98.9% of the transfused INTERCEPT platelet components were non-gamma irradiated. All but two sites elected to use INTERCEPT platelet components non-gamma irradiated for patients at risk of TA-GVHD. There were no reports of TA-GVHD events related to the transfusion to date.

Experience with transfusion of INTERCEPT components in HSCT patients

In 2003 the Blood Transfusion Center of the University of Louvain, Mont Godinne, Yvoir, Belgium implemented the INTERCEPT Blood System for pathogen inactivation of all platelet components. A retrospective study was conducted to analyze the utilization of platelet components and red blood cell components for three years before and three years after introduction of INTERCEPT.¹⁶ The data demonstrated that pathogen inactivation had no adverse impact on component usage in routine clinical practice. With routine implementation of INTERCEPT, gamma irradiation was discontinued for all platelet components including patients receiving HSCT. A retrospective survey of transplant patients for evidence of TA-GVHD from 2003 to 2009 was conducted. TA-GVHD was diagnosed using established criteria.¹⁷

Platelet components were collected on the Amicus Cell Separator® (Fenwal Inc, Lake Zurich, IL) with process leukoreduction. Platelets were suspended in InterSol with a ratio to plasma of approximately 65:35%. Platelet components containing 2.5 to 7.0 x10¹¹ platelets in 255-420 mL were prepared using integrated INTERCEPT processing sets to inactivate pathogens and leukocytes. INTERCEPT platelet components were issued the day after collection and stored for up to 7 days.

Table 4. Distribution by Diagnosis for Hematopoietic Stem Cell Transplant (HSCT) Patients Supported with INTERCEPT Platelet Components at BTC UCL1

Diagnosis	Auto-HSCT	Allo-HSCT	Mini-allo-HSCT	Total	%
Myeloma	81		1	82	44.1
Non-Hodgkin's Lymphoma	48		2	50	26.9
Hodgkin's Disease	10			10	5.4
Acute Myelogenous Leukemia	6	13	2	21	11.3
Acute Lymphocytic Leukemia	1	4		5	2.7
Chronic Myelogenous Leukemia		1		1	0.5
Chronic Lymphocytic Leukemia	3		1	4	2.2
Acute Myelofibrosis			3	3	1.6
Myelodysplasia			3	3	1.6
Solid Tumor	1		2	3	1.6
Amyloidosis	1			1	0.5
Agnogenic aplasia		2		2	1.1
Polycythemia Vera			1	1	0.5
Total	151	20	15	186	100

Transfusion Center, Cliniques Universitaires de Mont Godinne, Université Catholique de Louvain, Yvoir, Belgium.

Between November 2003 and December 2009, a total of 186 patients received HSCT (Table 4). One-hundred-fifty-one (151) patients received autologous HSCT with myeloma (n=81) and non-Hodgkin's lymphoma (n=48) being the most frequently diagnosed malignancies. Twenty (20) patients received allogeneic HSCT with acute myelogenous leukemia (n=13) being the most frequent malignancy. Fifteen (15) patients received mini-allogeneic HSCT with a variety of hematology-oncology disorders. After transplant, these patients received a total of 3,645 transfusions of INTERCEPT platelet components non-gamma irradiated. The mean number of platelet transfusions/patient was 19.6 (range 1-158). No patient developed evidence of TA-GVHD during the 6-year period (Table 5). These results show that INTERCEPT treatment alone, without gamma irradiation, provides effective prophylaxis for TA-GVHD in patients undergoing HSCT.

Experience with transfusion of INTERCEPT platelet components in pediatric hematology-oncology patients

Following CE marking, an investigator study of INTERCEPT transfusions in pediatric patients was conducted in a routine clinical setting. An interim report on 472 transfusions has been described.¹⁸ The final results on 500 transfusions are summarized here. In this study, INTERCEPT platelet components prepared by the whole blood derived buffy coat method were transfused to pediatric patients with predominately hematology-oncology diagnoses. The platelet components were prepared by pooling 5 whole blood derived buffy coats, suspended in a mixture of approximately 35% plasma and 65% InterSol, and leukoreduced by filtration. The platelet components were treated with INTERCEPT according to manufacturer's instructions. The INTERCEPT platelet components were not gamma irradiated. Platelet transfusions were ordered according to hospital guidelines and patients managed according to hospital clinical practice. Eligible pediatric patients were thrombocytopenic, expected to develop thrombocytopenia, diagnosed with a condition associated with thrombocytopenia or receiving therapy

that resulted in severe thrombocytopenia.

Five hundred (500) INTERCEPT platelet components were transfused into 83 pediatric patients (57.8% leukemia, 28.9% solid tumor, 3.6% aplastic anemia, and 9.6% others). The age of the patients ranged from 27 days to 18 years with one patient at 19 years. Twelve percent (12%) of the patients underwent HSCT while 79% of the patients had chemotherapy. There were no cases of TA-GVHD reported in this study (Table 5).

Experience with transfusion of INTERCEPT platelet components in hematology-oncology patients at a University Hospital (Basel, Switzerland)

This was an observational, single arm, open label study. INTERCEPT platelet components were transfused into thrombocytopenic patients according to standard local practices. The primary endpoint was the frequen-

Table 5. Summary of TA-GVHD Outcome of Hematopoietic Stem Cell Transplant (HSCT) Patients Receiving Non-Gamma Irradiated INTERCEPT Platelet Components in Clinical Trials and HV Studies

Study	Number of Transfusion	Non-gamma irradiated	Number of Patients	Hem-Onc Patients	HSCT Patients	Incidence of TA-GVHD
Phase III Trials ¹	575	100%	87	82	28	0
HV1 ²	5,106	97.3%	651	378	47	0
HV2 ³	7,437	98.9%	1,400	748	121	0
Mont Godinne ⁴	3,645	100%	186	186	186	0
Pediatric ⁵	500	100%	83	48	10	0
Basel ⁶	551	100%	46	38	15	0
Lübeck ⁷	560	100%	52	52	17	0

¹ van Rhenen et al: *Blood* 2003;101:2426-33 and Janetzko et al: *Transfusion* 2005;45:1443-52; ² Osselaer et al: *Transfusion* 2008;48:1061-71; ³ Osselaer et al: *Vox Sang* 2008;94:315-23; ⁴ Abstract submitted to ISBT (Berlin) 2010; ⁵ van Haute et al: *Vox Sang* 2006;91:177; ⁶ Stebler et al: *Vox Sang* 2007;93:172; ⁷ Schlenke et al: *Vox Sang* 2007;93:171.

cy of acute transfusion reactions. An interim report on 359 transfusions has been described.¹⁹ The final results on 551 transfusions are summarized here. In this study, double-dose apheresis platelet units were collected in a combination of plasma and InterSol (Amicus Cell Separator, Fenwal Inc). Each double-dose collection was treated with a single INTERCEPT processing set and split into two components for transfusion. The average yield of the INTERCEPT platelet components was $2.6 \pm 0.3 \times 10^{11}$ platelets. INTERCEPT platelet components were not gamma irradiated.

Forty-six (46) patients (61% male / 39% female) with a median age of 52.8 years (range 22-80 years) received at least one INTERCEPT platelet component. Thirty-eight patients (82.6%, 38/46) had a hematology malignancy as the primary disease with the largest proportion (47.4%, 18/38) having a diagnosis of acute myelogenous leukemia (AML). Twenty-two patients (47.8%, 22/46) received chemotherapy without HSCT and 15 patients (32.6%, 15/46) received a HSCT with preparative chemotherapy and/or radiotherapy. The majority (80%, 12/15) of the HSCT utilized allogeneic peripheral blood derived stem cells. A total of 551 INTERCEPT platelet components were administered. The mean number of transfusions per patient was 12.0 ± 12.5 (median = 7.5, range 1-58).

The patients in this study required platelet transfusion support due to hypoproliferative thrombocytopenia resulting from malignant disease and ablative chemotherapy. The majority of recipients (89.1%, 41/46) received multiple INTERCEPT platelet transfusions (up to 58) during time on study. This study de-

monstrated that transfusions with INTERCEPT platelet components were well tolerated in routine use and exhibited a safety profile consistent with that generally observed with conventional platelet components. There were no reports of TA-GVHD events in the study population (Table 5).

Experience with transfusion of INTERCEPT platelet components in hematology-oncology patients at a University Hospital (Lübeck, Germany)

This was an observational, single arm, open label study.²⁰ INTERCEPT platelet components were transfused into thrombocytopenic patients according to standard local practices. The primary endpoint was the frequency of acute transfusion reactions. INTERCEPT treated platelet components were not gamma irradiated and were administered to immunocompromised patients. Fifty-two patients were enrolled (54% male/ 46% female) with a median age of 57.5 years (range 22-78 years). All patients had hematology malignancies as primary disease with the largest proportion 40.4% (21/52) having a diagnosis of AML. The majority of patients (65.4%, 34/52) received chemotherapy without stem cell transplant and 32.7% (17/52) of patients received a stem cell transplant with preparative chemotherapy and/or radiotherapy. All of the HSCT were autologous. A total of 560 INTERCEPT platelet components (262 apheresis and 298 pooled buffy coat components) were administered with the mean number of transfusio-

ns per patient being 11.0 ± 12.7 (median = 6, range 1-71).

The patients in this study were thrombocytopenic resulting from malignant disease and ablative chemotherapy thus requiring platelet transfusion support. The majority of patients (88.2%) received multiple INTERCEPT platelet components (up to 71) during time on study. There were no reports of TA-GVHD events in the study population (Table 5). The results obtained in this study were consistent to those observed in previously described clinical studies in which INTERCEPT platelet components non-gamma irradiated were administered.

Conclusions

This report summarizes the in vitro and in vivo studies of leukocyte inactivation after INTERCEPT treatment of platelet components. High levels of contaminating donor T cells were inactivated by INTERCEPT treatment. In vivo studies demonstrated that inactivated T cells did not cause TA-GVHD in two well-characterized murine transfusion models. This report also summarizes the cumulative clinical outcomes of transfusing INTERCEPT platelet components non-gamma irradiated in hematology-oncology patients at risk for TA-GVHD, including pediatric patients, from 24 centers in 12 European countries. Among the HSCT patients evaluated in clinical trials and HV studies, no cases of TA-GVHD were reported (Table 5). Formal pan-European CE Mark registration and country-specific regulatory approvals have been received in France, Germany, and Switzerland for use of the INTERCEPT process in place of gamma irradiation treatment to prevent TA-GVHD. Thus, INTERCEPT treatment is established as a replacement to gamma irradiation for prevention of TA-GVHD. INTERCEPT treated platelet components can be administered into severely immunocompromised patients who would otherwise require gamma irradiated platelet components. As of March 2010, more than 400,000 transfusions of INTERCEPT platelet components, the majority of which were non-gamma irradiated components, have been administered to patients in routine clinical practice. No cases of TA-GVHD have been reported to be associated with transfusion of INTERCEPT platelet components. Cumulatively, this experience supports the use of INTERCEPT treatment without gamma irradiation to prevent TA-GVHD in at risk patients.

References

- Ruehl H, Bein G, Sachs UJ: Transfusion-associated graft-versus-host disease. *Transfusion Med Rev* 2009;23: 62-71.

- Mintz PD, Wehrli G: Irradiation eradication and pathogen reduction. *Cesium irradiation of blood products. Bone Marrow Transplant* 2009;44: 205-11.
- Pelszynski M, Moroff G, Luban NLC, Taylor BJ, Quinones RR: Effect of gamma irradiation on T-cell inactivation as assessed by limiting dilution Analysis: Implications for Preventing transfusion associated graft vs. host disease. *Blood* 1994; 83: 1683-9.
- AABB Standards for Blood Banks and Transfusion Services : page 38 Standard # 5.17.3. 26th ed: AABB, 2009.
- Prepared by the BCSH Blood Transfusion Task Force (Chairman: D. Voak): Guidelines on gamma irradiation of blood components for the prevention of transfusion-associated graft-versus-host disease. *Transfusion Medicine* 1996;6: 261-71.
- Lowenthal RM, Challis DR, Griffiths AE: Transfusion-associated graft-versus-host disease: Report of an occurrence following administration of irradiated blood. *Transfusion* 1993;33: 524-9.
- Wollowitz S: Fundamentals of the psoralen-based Helinx technology for inactivation of infectious pathogens and leukocytes in platelets and plasma. *Seminars in Hematology* 2001;38 (Suppl 11): 4-11.
- Corash L, Lin L: Novel processes for inactivation of leukocytes to prevent transfusion-associated graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplantation* 2004;33: 1-7.
- Truitt R, Johnson BD, Hanke C, Talib S, Hearst JE: Photochemical treatment with S-59 psoralen and ultraviolet A light to control the fate of naive or primed T lymphocytes in vivo after allogeneic bone marrow transplantation. *J Immunol* 1999;163: 5145-56.
- Fast LD, Valeri CR, Crowley JP: Immune responses to major histocompatibility complex homozygous cells in murine F 1 hybrid recipients: implications for transfusion-associated graft-versus-host disease. *Blood* 1995;86: 3090-6.
- Grass JA, Wafa T, Reames A, Wages D, Corash L, Ferrara J, et al: Prevention of transfusion-associated graft-versus-host disease by photochemical treatment. *Blood* 1999;93: 3140-47.
- van Rhenen D, Gulliksson H, Cazenave JP, Pamphilon D, Ljungman P, Kluter H, et al: Transfusion of pooled buffy coat platelet components prepared with photochemical pathogen inactivation treatment: the euroSPRITE trial. *Blood* 2003;101: 2426-33.
- Janetzko K, Cazenave JP, Kluter H, Kientz D, Michel M, Beris P, et al: Therapeutic efficacy and safety of photochemically treated apheresis platelets processed with an optimized integrated set. *Transfusion* 2005;45: 1443-52.
- Osselaer JC, Messe N, Hervig T, Bueno J, Castro E, Espinosa A, et al: A prospective observational cohort safety study of 5106 platelet transfusions with components prepared with photochemical pathogen inactivation treatment. *Transfusion* 2008;48: 1061-71.
- Osselaer JC, Cazenave JP, Lambermont M, Garraud O, Hida-jat M, Barbolla L, et al: An active haemovigilance programme characterizing the safety profile of 7437 platelet transfusions prepared with amotosalen photochemical treatment. *Vox Sang* 2008;94: 315-23.
- Osselaer JC, Doyen C, Defoin L, Debry C, Goffaux M, Messe N, et al: Universal adoption of pathogen inactivation of platelet components: impact on platelet and red blood cell component use. *Transfusion* 2009;49: 1412-22.
- Anderson KC, Weinstein HJ: Transfusion-associated graft-versus-host disease. *N Eng J Med* 1990;323: 315-21.
- Van haute I, Benoit Y, Bordon V, De Moerloose B, Vandercruys E, Lancker SV, et al: Therapeutic efficacy and safety of transfusion of pathogen-inactivated platelets to pediatric patients. *Vox Sang* 2006;91: 177.
- Stebler C, Infanti L, Ruesch M, Luscher H, Job S, Pfenninger J, et al: A comparison of transfusion of standard and patho-

gen inactivated (INTERCEPT) platelets with regards to CCI and acute transfusion reactions in hematological patients. *Vox Sang* 2007;93: 172.

20. Schlenke P, Hagenah W, Andresen S, Bauhaus M, Sundin D, Lin L, et al: Platelet components treated with pathogen inactivation using the INTERCEPT Blood System: clinical outcomes of the first single-centre clinical trial in Germany. *Vox Sang* 2007;93: 171.

ENFERMEDADES INFECCIOSAS EMERGENTES: POTENCIAL AMENAZA PARA LA SEGURIDAD TRANSFUSIONAL Y MEDIDAS DE CONTROL

E. CASTRO

Centro de Transfusión de Cruz Roja Española en Madrid

Introducción

Cualquier agente infeccioso que tenga una fase sanguínea en su ciclo reproductivo-infectivo tiene la capacidad de ser transmitido a través de la transfusión de sangre. Existen multitud de agentes patógenos con estas características, pero el grado de preocupación para los bancos de sangre depende de la gravedad de la enfermedad que produzcan.

Entre los agentes patógenos transmisibles por transfusión se encuentran: virus, bacterias, parásitos y priones. Unos son conocidos desde hace muchos años, como los virus VHB, VIH, VHC y el *Treponema pallidum*, mientras que otros son absolutamente nuevos, como los priones. Entre ellos reseñar que existen alrededor de 69 agentes infecciosos emergentes y reemergentes que constituyen una amenaza potencial para el suministro de sangre.

En las últimas décadas hemos visto aparecer en el panorama transfusional agentes emergentes importados, como la malaria o la enfermedad de Chagas, que han dejado de estar restringidos a sus áreas endémicas tradicionales, para pasar a constituir una seria amenaza para la salud pública de varios países europeos y EE. UU.

Recientemente, han aparecido en el panorama de la medicina transfusional nuevos agentes emergentes con capacidad de constituir una amenaza para la seguridad transfusional, entre los que destacan: West Nile virus, *Babesia microti*, Chikungunya virus y Dengue virus. Mucho más recientemente se ha descrito un nuevo agente, el retrovirus XMRV, que se ha encontrado en los linfocitos de enfermos con síndrome de fatiga crónica y de cáncer de próstata y que está suscitando una gran controversia. Lo que todos estos agentes emergentes tienen en común es que no existen accio-

nes disponibles para reducir el riesgo de transmisión transfusional, salvo en contadas excepciones.

Se considera que, en el momento actual, el suministro de sangre ha alcanzado los más altos niveles de seguridad. Pero esto sólo es cierto en los países más desarrollados, que disponen de tecnologías de alta sensibilidad para la detección de agentes infecciosos, y más todavía en aquellos que disponen de tecnologías de inactivación de patógenos en componentes sanguíneos lábiles.

Agentes emergentes y reemergentes

Se consideran emergentes todos los agentes infecciosos nuevos, reemergentes, migratorios o resistentes a los fármacos, cuya incidencia de infección ha aumentado en las pasadas dos décadas o que existe la amenaza de que aumente en un futuro próximo. Esta categoría incluye tanto agentes completamente nuevos como agentes que han evolucionado. Esta evolución la propician los cambios y la degeneración medioambientales, el calentamiento global, los movimientos migratorios de personas desde las áreas rurales a áreas urbanas o la falta de políticas de calidad de la prestación sanitarias en muchas partes del mundo. Otros factores también influyen en la aparición de nuevos patógenos, como son los cambios demográficos humanos, los efectos de las nuevas tecnologías y de la industria, los viajes y el comercio internacional, y los cambios y adaptaciones que experimentan los microbios¹.

Los agentes patógenos experimentan mutaciones como respuesta a la presión de medidas terapéuticas como los antibióticos, las vacunas o las inmunoterapias. Como consecuencia, las técnicas de detección de patógenos pueden experimentar una disminución en su sensibilidad¹ y propiciar así la transmisión. Ante tan amplia variedad de factores en la aparición de agentes infecciosos emergentes, es imposible predecir cuando aparecerán y cuál puede ser la siguiente epidemia.

La mayoría de los agentes patógenos a los que tenemos que hacer frente en los bancos de sangre son de origen zoonótico. Bien por haber infectado a los humanos como huésped accidental (VIH) o bien adquiridos a través de la cadena alimentaria (vCJD) o por una transmisión vectorial. Los mosquitos, las garrapatas y otros insectos vectores, están en el centro de la transmisión de la mayoría de las infecciones que actualmente nos preocupan en los bancos de sangre: malaria, enfermedad de Chagas, WNV, *Babesia*, *Leishmania*, *Ehrlichia*, etc. Este tipo de transmisión vectorial tiene una gran movilidad y resulta incontrolable, como ha quedado patente en la reciente pandemia de WNV en EE. UU., que en 3 años se ha extendido por todo el país.

Parásitos

Malaria

La malaria constituye un motivo de preocupación para los bancos de sangre de todo el mundo. La enfermedad la produce un parásito denominado *Plasmodium* sp., del que se conocen 4 especies diferentes (*P. falciparum*, *P. Vivax*, *P. ovale*, y *P. malariae*) y que se transmite a través de la picadura de un mosquito del género *Anopheles*.

Para los países endémicos mantener un suministro de sangre seguro es extremadamente difícil y, a pesar de que traten de identificar a los donantes más seguros, en la mayoría de los casos la única alternativa es administrar fármacos antipalúdicos a todos los receptores de transfusión. En los países no endémicos la amenaza para el suministro de sangre viene de la mano de personas que provienen de los países endémicos, bien inmigrantes, cooperantes o viajeros. Los movimientos demográficos y los viajes internacionales son cada vez más abundantes y cada vez son más las personas que pueden acercarse a donar sangre y ser portadoras del parásito. La incidencia de casos postransfusionales en países no endémicos es difícil de establecer, pero se estima en alrededor de 50 casos por millón. En los países endémicos los casos conocidos son escasos y se estima una incidencia de entre 1 y 2 casos por millón de transfusiones.

Los países no endémicos abordan la seguridad respecto a este agente mediante la exclusión de los donantes en los que se detecta un riesgo elevado en la entrevista pre-donación. Pero esta estrategia tiene el problema de que con poblaciones emigrantes de países endémicos cada vez más numerosas y con el creciente número de personas que viajan a países exóticos, supone la pérdida de muchos donantes. El reciente Real Decreto 1088 de 2005 permite la admisión de donantes de riesgo si se les practica una prueba de detección del parásito. El empleo de este tipo de test en donantes de riesgo permite aceptar a muchos donantes, que de otra manera tendrían que ser excluidos de forma temporal.

Enfermedad de Chagas

Con los cambios demográficos y la inmigración, otra enfermedad transmitida por un vector, la enfermedad de Chagas, comienza a plantear una seria amenaza para la transfusión en países no endémicos. La enfermedad la produce un protozoo denominado *Trypanosoma cruzi*, y la transmite un vector de la familia de los triatomínidos (*Triatoma infectans* y otros). La transmisión vectorial es exclusiva de las áreas endémicas, donde la vía transfusional también se produce, además de la vertical de madre a hijo, la accidental y la oral. En los países endémicos es obligatorio realizar técnicas de

detección de anticuerpo anti-*T. cruzi* a todas las donaciones de sangre.

Aunque las medidas de control vectorial y en los bancos de sangre han hecho disminuir la incidencia de la enfermedad, la realidad es que todavía no está erradicada. Hay millones de personas infectadas y la mayoría se encuentran en una fase crónica y asintomática. Los individuos infectados en la fase crónica son portadores del parásito y podrían infectar si donaran sangre sin ser identificados.

Los países no endémicos han optado en un principio por la exclusión de estos donantes, pero estas medidas no son totalmente eficaces y además producen una pérdida innecesaria de donantes. Los movimientos demográficos han hecho que este problema ya no esté limitado a Latinoamérica y que sea un problema global. EE. UU. lleva más de 30 años recibiendo inmigrantes de Latinoamérica y en varios estudios epidemiológicos en donantes han detectado una prevalencia creciente de donantes con anticuerpos anti-*T. cruzi*. Las estimaciones preveían que 1 de cada 25.000 donantes americanos tendrían anticuerpos frente a *T. cruzi* y que de éstos, el 63% serían portadores del parásito en su sangre². En el año 2002 la AABB recomendó analizar las donaciones para detectar la enfermedad en cuanto existiera un test validado. Desde 2007 en EEUU los bancos de sangre analizan a todos los donantes y no solo a los de origen latinoamericano. Hasta el 21 de junio de 2007 se habían analizado más de 3,5 millones de donaciones de sangre y la proyección de prevalencia estimada a partir de los datos de este estudio es de 1 donante infectado cada 26.000.

España es el país de Europa con mayor población latinoamericana, alrededor de 2.000.000 en enero de 2007. En el año 2002 se comenzó a analizar la presencia de anti-*T. cruzi* en donantes latinoamericanos, encontrándose una prevalencia de 0,8%^{3,4}. Desde la entrada en vigor del Real Decreto 1088 de 2005, que permite la aceptación de donantes con riesgo epidémico de ser portadores de la enfermedad de Chagas, todos los centros de transfusión realizan una prueba de detección de anti-*T. cruzi* en donantes seleccionados de riesgo. Con más de 30.000 donantes procedentes de países endémicos analizados, la prevalencia encontrada en esta población es del 0,4%⁵. La adopción de esta medida permite aceptar a un número mayor de donantes, que de otra manera serían excluidos de forma permanente. En Francia se ha adoptado la misma estrategia, a pesar de que la población inmigrante desde zonas endémicas es mucho menor que en España⁶.

Hasta el momento, se han reportado 7 casos de enfermedad de Chagas transmitida por transfusión en EE. UU. y Canadá, y 5 casos en España⁷⁻¹⁶, todos ellos anteriores a la aplicación de los test para detección de anticuerpos frente al *T. cruzi* en los bancos de sangre. Del análisis de los mismos destaca el hecho de que en

todos ellos la transmisión ha sido producida por las plaquetas y ninguno de los casos se ha relacionado con la transmisión de hematíes o plasma.

Babesiosis

La babesiosis produce un parásito intraeritrocitario denominado *Babesia* (*B. microti*, *B. Duncan*, *B. variant* y *B. divergens*) que tienen una apariencia al microscopio similar a los plasmodium. La transmisión es vectorial, a través de la picadura de una garrapata que pica a los ciervos y eventualmente a los humanos. La enfermedad puede ser particularmente grave en pacientes inmunodeprimidos, anesplénicos, ancianos y niños. En EE. UU. existen varias zonas endémicas en el noreste y se han comunicado más de 70 casos transmitidos por transfusión. La mayoría de los casos se han producido en EE. UU., pero también se han dado en Canadá, en Japón y más recientemente en Alemania¹⁷. En un estudio de seroprevalencia realizado en el estado de Connecticut, se ha encontrado a través de 5 años y con 2.000 donantes analizados, una prevalencia que ha evolucionado del 0,8 al 1,7%¹⁸. Aunque durante muchos años la amenaza que supone para la transfusión ha sido ignorada, la evolución que está experimentando está planteando la adopción de medidas de protección en los bancos de sangre. Para su detección se han hecho algunos estudios con test ELISA, pero todavía no existe ninguno validado para ser usado en las donaciones de sangre.

Leishmaniasis

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria producida por un protozoo del género *Leishmania* (familia *Trypanosomatidae*) intracelular en macrófagos/monocitos y transmitida por un vector de la familia de los flebotominos (*Ph. Genus*). Tiene la potencialidad de ser transmitida por transfusión, aunque se han comunicado tan sólo 15 casos en la literatura que sugieren esta posibilidad. El empleo de filtros de leucorreducción podría contribuir a la seguridad de la sangre transfundida¹⁹. Este parásito se encuentra en muchos países, pero es de especial relevancia en los países de la cuenca mediterránea. Un estudio realizado en donantes de las Islas Baleares encontró una prevalencia en donantes de sangre del 4,6%²⁰.

Priones

La nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vCJD) es una nueva patología priónica humana producida por el agente de la encefalopatía espongiforme

bovina. La enfermedad está causada por la conversión de una proteína priónica normal en una estructura con un plegamiento anormal. Aunque ya desde su primera aparición se especuló con la posibilidad de que fuera transmitida por transfusión, tras casi 10 años se han comunicado los primeros casos con una alta probabilidad de haber sido transmitidos por transfusión^{21,22}. Por el momento, no existe ningún ensayo de laboratorio para su detección en la sangre que haya sido validado para su empleo en el escrutinio de donaciones de sangre y las únicas medidas preventivas aplicables son la selección de donantes y los recientemente desarrollados filtros de reducción de la carga priónica en hematíes.

Virus

Hay al menos 35 especies de arbovirus (virus transmitidos por artrópodos) que tienen la potencialidad de transmitirse a través de las transfusiones si se dieran las condiciones específicas. Pertenecen a esta familia los flavivirus WNV, los DEN 1 al DEN 4, que causan el dengue clásico y hemorrágico, el virus de la encefalitis de St. Louis y los virus de las encefalitis equinas²³. Las enfermedades que producen van desde mínimos síndromes gripales a encefalitis graves con una elevada mortalidad en pacientes susceptibles. La amenaza para los bancos de sangre estriba en que la mayoría de los individuos infectados no tienen síntomas y pueden donar sangre sin ser detectados.

WNV (West Nile Virus)

Se trata de un virus de la familia *Flavivirus*, detectado por primera vez en África, que mantiene un ciclo vital entre mosquitos del género *Culex* y pájaros, y en el que el ser humano es un huésped accidental. Su inclusión en la categoría de agentes emergentes se debe a su irrupción en un área nueva, Estados Unidos, donde se detectó por primera vez en 1999, y que experimentó una expansión extraordinariamente rápida. Este virus es neuropatógeno en humanos, equinos y aves. La mayoría de los pacientes infectados permanecen asintomáticos o se ven afectados por un síndrome pseudogripal, que dura entre 3-15 días desde que se produce la infección. Pero en algunos casos el cuadro es más grave, pudiendo cursar con encefalitis y llegar a ser fatal. Se ha reportado la transmisión secundaria en humanos a través del trasplante de órganos y la transfusión de sangre. Los primeros 21 casos de sospecha de transmisión transfusional fueron detectados y confirmados por el CDC en el año 2002. Todos los tipos de componentes sanguíneos estuvieron implicados: Hematíes, plaquetas y plasma.

En un plazo muy corto se desarrolló un ensayo NAT para aplicar al análisis de las donaciones de sangre, que empezó a emplearse en julio de 2003, en mini-pool en las épocas no epidémicas y en muestras individuales en épocas epidémicas. En el periodo 2003-2005, ya se habían detectado 1.500 donantes infectados²⁴.

Dengue

También conocida como fiebre dengue, o fiebre dengue hemorrágica, es una enfermedad producida por los virus del dengue y transmitida por mosquitos del género *Aedes*. Se trata de virus de la familia *Flaviridae*, de la que existen 4 serotipos diferentes: DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4. Es una de las enfermedades transmitidas por mosquitos más importantes del mundo, que afecta a áreas tropicales de Asia, Oceanía, Australia y América, con millones de personas afectadas cada año. Su fase virémica puede ser asintomática, lo que puede traducirse en una potencial transmisión a través de las transfusiones.

El dengue está adquiriendo carácter epidémico en varias zonas de Asia y de Latinoamérica, y se han dado ya dos casos, un en Hong Kong y otro en Singapur, en los que se ha demostrado su transmisión a través de componentes sanguíneos²⁵. Por el momento, no existe ningún test serológico para su empleo en el cribado de las donaciones de sangre, aunque sí un NAT para uso en investigación.

Virus Chikungunya

La fiebre de Chikungunya es una enfermedad transmitida a humanos por picadura de mosquitos infectados. El virus causante, virus Chikungunya (CHIKV), es un arbovirus (*Alphavirus* de la familia de los *Togaviridae*), aislado por primera vez en Tanzania, en 1953, y que desde entonces aparece de forma repetida, en el oeste, centro y sur de África, así como en varias zonas de Asia. En Europa, se han descrito casos de fiebre CHIKV principalmente en Francia, reflejo de la alta frecuencia de viajes entre Europa y las zonas endémicas del CHIKV, especialmente las islas del Océano Índico.

La transmisión del virus a los humanos se produce de hombre a hombre por mediación de la picadura de mosquitos del género *Aedes* infectados con sangre de una persona previamente infectada. Teóricamente, el virus puede ser transmitido por transfusión, trasplante de tejidos, órganos y células. Si bien hasta hoy no se ha descrito ningún caso secundario a transfusión, sí se ha referido infección por exposición a sangre. Ante la existencia de epidemias y la amplia distribución mundial de los mosquitos *Aedes*, surge la preocupación del riesgo de transmisión del CHIKV a través de viajeros

infectados. Hasta hoy no se conoce ningún caso autóctono en Europa, ni en otras áreas no endémicas.

Los criterios de selección de donantes de sangre deben incluir la exclusión temporal de los turistas que visitan las áreas afectadas, así como los residentes en las mismas. La mayoría de zonas en las que se detecta el CHIKV son al mismo tiempo zonas endémicas de paludismo (malaria), por lo que quedarían excluidas de la donación al quedar incluidas dentro de los criterios de exclusión del paludismo. Las personas provenientes de zonas en las que existe el virus, pero no paludismo, como es el caso de las Islas Reunión, Mauricio y Seychelles, serán excluidas durante 4 semanas (28 días) desde su regreso, y si han presentado o se ha sospechado fiebre de CHIKV durante su estancia en la zona, o a su regreso, se excluirán durante 6 meses.

Virus XMRV (*Xenotropic Murine Leukemia Virus-Related*)

Se trata de un virus de la familia *Retroviridae* y del género *Gammaretrovirus*. Tiene envoltura y su genoma está compuesto de RNA. Aunque se ha encontrado su genoma en las células tumorales de cánceres de próstata y más recientemente en los linfocitos de sangre periférica en el 67% de los enfermos con síndrome de fatiga crónica²⁶, no se ha demostrado que sea el agente causal de ninguno de ellos. La publicación de estos hallazgos ha estado marcada por la controversia, ya que estudios realizados en Europa no encuentran esta correlación. La preocupación para los bancos de sangre deriva de la potencial transmisión sanguínea, ya que otros retrovirus, como el HTLV y el VIH, se transmiten por esta vía. Aunque la relación causal no ha sido formalmente establecida, y en función del principio de precaución, algunos sistemas de salud como el canadiense, el australiano, el neozelandés y el británico, han decidido excluir de la donación de sangre a las personas diagnosticadas de SFC. Asimismo, la AABB ha creado un grupo de estudio que tomará decisiones al respecto en EE. UU. Sus características virales hacen suponer que los sistemas de inactivación de patógenos aplicados al plasma y plasmaderivados sean eficaces en su inactivación. Recientemente se ha estudiado la eficacia del sistema de inactivación de patógenos en plaquetas y plasma basado en amotosaleno y UVA, encontrándose que es eficaz también en la eliminación del XMRV.

Medidas de control

Lo que todos estos agentes emergentes tienen en común es que no existen acciones eficaces disponibles para reducir el riesgo de transmisión transfusional. Las

medidas clásicas como la exclusión temporal o definitiva de los donantes de sangre considerados de riesgo o con antecedentes de la enfermedad son, con la mayoría de los agentes, la única forma de prevenir su extensión a través del suministro de sangre. Dichas medidas tienen muchos puntos débiles, entre otros, la innecesaria pérdida de gran cantidad de donantes. En algunos casos se dispone de test de laboratorio específicos y en formatos que permiten el cribado de las donaciones de sangre a gran escala, como en el caso de la enfermedad de Chagas o el WNV, pero en la mayoría de los casos, estos test no están disponibles.

Sistemas de inactivación de patógenos: Acción versus reacción

Las medidas adoptadas en los bancos de sangre para prevenir la transmisión de diferentes agentes infecciosos han sido muy eficaces y, en la actualidad, el riesgo de adquirir una infección postransfusional es muy bajo. Pero el sistema no ofrece una protección adecuada ante nuevas infecciones emergentes o reemergentes. Es ante este tipo de agentes donde un sistema proactivo basado en la inactivación de una amplia gama de patógenos resulta sumamente interesante.

La importancia de disponer de sistemas de inactivación ha quedado demostrada en la industria fraccionadora de plasma que prepara hemoderivados, que ha eliminado la transmisión de los patógenos por completo²⁷. Durante la reciente epidemia de WNV en EE. UU., la industria del plasma no se vio afectada y no tuvo que retener sus productos.

Pero los sistemas de esterilización clásicos aplicables al plasma y hemoderivados no son aplicables a los componentes lábiles que se preparan en los bancos de sangre. Estos sistemas emplean tecnologías que afectan a las membranas celulares y que los hacen por tanto inaplicables a las plaquetas y los hematíes. El desarrollo de sistemas de inactivación de patógenos aplicables a los componentes celulares precisa una tecnología diferente.

En la actualidad, hay varias tecnologías para la inactivación de patógenos en componentes sanguíneos lábiles, unas ya en uso como las basadas en amotosaleno y UVA (INTERCEPT™) o la riboflavina más UV (Mirasol) y otras en fases avanzadas de desarrollo, como el sistema basado en UVC. Todas ellas tienen como principio el bloqueo de los ácidos nucleicos genómicos, impidiendo así la replicación de una amplia gama de agentes infecciosos. El objetivo de estas tecnologías es lograr impedir la replicación de los patógenos, sin dañar a las células vitales del componente sanguíneo, con la menor pérdida de actividad posible y sin ocasionar efectos adversos en el paciente receptor.

Estos sistemas han demostrado en estudios de laboratorio una gran capacidad de reducción de diferentes patógenos: virus, bacterias y parásitos²⁸⁻³².

El sistema tiene obviamente algunas limitaciones, entre las que destacan su ineficacia ante los priones, la baja eficacia frente a algunos virus con envolturas muy fuertes y la limitada eficacia frente a las esporas bacterianas.

En la actualidad, hay varios países europeos que han adoptado esta tecnología para aumentar la seguridad de los concentrados de plaquetas y plasma, con resultados excelentes y sin la observación de efectos adversos en los pacientes^{33,34}, siendo España uno de los países que fueron pioneros en su empleo que se inició en algunos centros de transfusión en 2004.

Las tecnologías de inactivación o reducción de patógenos constituyen el nuevo paradigma en el abordaje de la mejora de la seguridad transfusional. Seguir añadiendo test de cribado en los bancos de sangre tiene un límite y no protege el suministro de forma rápida ante un agente emergente. Los sistemas de inactivación brindan una estrategia proactiva y su probada eficacia frente a un panel de virus, bacterias y parásitos muy variado permite inferir que conferirán también cobertura frente a nuevos agentes. Una reciente epidemia de virus Chikungunya en la Isla de la Reunión francesa pudo ser abordada de forma rápida y segura gracias a la implantación del sistema INTERCEPT™ para el tratamiento de las plaquetas³⁵.

El gran reto de los sistemas de inactivación es su desarrollo para los tres componentes lábiles, plaquetas, plasma y hematíes, e idealmente para el tratamiento de la sangre total antes de la obtención de las tres fracciones. Cuando todos estos sistemas estén disponibles, entonces el potencial de esta estrategia, incluido el poder limitar el número de análisis aplicados, será una realidad. Mientras tanto, su disponibilidad para el tratamiento de las plaquetas y plasma permite mejorar notablemente la seguridad de los mismos.

Bibliografía

1. Allain JP, Bianco C, Blajchman MA, Brecher ME, Busch M, Leiby D, et al. Protecting the blood supply from emerging pathogens: the role of pathogen inactivation. *Transfusion Medicine Review* 2005; 19:110-126.
2. Leiby DA, Read EJ, Lenes BA, Yund AJ, Stumpf RJ, Kirchhoff LV et al. Seroepidemiology of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas' disease, in US blood donors. *J Infect Dis* 1997; 176(4):1047-1052.
3. Barea L, González R, Bueno JL, Cañavate C, Flores M, Rodríguez M et al. Seroprevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en donantes de sangre. *Enfermedades Emergentes* 2005; 8:40-42.
4. Castro E. Transfusión sanguínea y enfermedad de Chagas: iniciativas en Centros de Transfusión de España. *Enfermedades Emergentes* 2006; 8:48-50.

5. Castro E. Chagas' disease: lessons from routine donation testing. *Transfus Med* 2009; 19(1):16-23.
6. Assal A, Aznar C. Chagas' disease screening in the French blood donor population. Screening assays and donor selection. *Enfermedades Emergentes* 2007; 9:36-40.
7. Grant IH, Gold JW, Wittner M, Tanowitz HB, Nathan C, Mayer K et al. Transfusion-associated acute Chagas disease acquired in the United States. *Ann Intern Med* 1989; 111(10):849-851.
8. Nickerson P, Orr P, Schroeder ML, Sekla L, Johnston JB. Transfusion-associated *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic area. *Ann Intern Med* 1989; 111(10):851-853.
9. Cimo PL, Luper WE, Scouros MA. Transfusion-associated Chagas' disease in Texas: report of a case. *Tex Med* 1993; 89(12):48-50.
10. Leiby DA, Fucci MH, Stumpf RJ. *Trypanosoma cruzi* in a low- to moderate-risk blood donor population: seroprevalence and possible congenital transmission. *Transfusion* 1999; 39(3):310-315.
11. Leiby DA, Lenes BA, Tibbals MA, Tames-Olmedo MT. Prospective evaluation of a patient with *Trypanosoma cruzi* infection transmitted by transfusion. *N Engl J Med* 1999; 341(16):1237-1239.
12. Lane DJ, Sher G, Ward B. Investigation of the second case of transfusion transmitted Chagas disease in Canada. *Blood* 96[60A]. 2000. Ref Type: Abstract
13. Young C, Losikoff P, Chawla A, Glasser L, Forman E. Transfusion-acquired *Trypanosoma cruzi* infection. *Transfusion* 2007; 47(3):540-544.
14. Fores R, Sanjuan I, Portero F, Ruiz E, Regidor C, Lopez-Velez R et al. Chagas disease in a recipient of cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2007; 39(2):127-128.
15. Flores-Chavez M, Fernandez B, Puente S, Torres P, Rodriguez M, Monedero C et al. Transfusional chagas disease: parasitological and serological monitoring of an infected recipient and blood donor. *Clin Infect Dis* 2008; 46(5):e44-e47.
16. Abalo M, Adelantado M, Areal C, Castrillo A, Castro A, Cid J et al. Tracing of one year of Chagas screening at the Centro de Transfusión de Galicia (C.T.G.) concerning a positive blood donor. *Vox Sanguinis* 93, 140. 2007. Ref Type: Abstract.
17. Stramer SL, Hollinger FB, Katz LM, Kleinman S, Metzler PS, Gregory KR et al. Emerging infectious disease agents and their potential threat to transfusion safety. *Transfusion* 2009; 49 Suppl 2:1S-29S.
18. Leiby DA, Chung AP, Cable RG, Trouern-Trend J, McCullough J, Homer MJ et al. Relationship between tick bites and the seroprevalence of *Babesia microti* and *Anaplasma phagocytophila* (previously *Ehrlichia* sp.) in blood donors. *Transfusion* 2002; 42(12):1585-1591.
19. Riera C, López Chejade P, Fisa R, Serra T, Sedeño M, Jimenez M et al. Efficacy of the Leukoreduction to Reduce the Risk of *Leishmania infantum* transfusion transmission. Study in blood donors from the Majorca Island (Balearic Islands, Spain). *Vox Sang.* 91[Supl. 3], 99. 2006. Ref Type: Abstract.
20. Riera C, Fisa R, Lopez-Chejade P, Serra T, Girona E, Jimenez M et al. Asymptomatic infection by *Leishmania infantum* in blood donors from the Balearic Islands (Spain). *Transfusion* 2008; 48(7):1383-1389.
21. Hewitt PE, Llewelyn CA, Mackenzie J, Will RG. Creutzfeldt-Jakob disease and blood transfusion: results of the UK Transfusion Medicine Epidemiological Review study. *Vox Sang* 2006; 91(3):221-230.
22. Houston F, McCutcheon S, Goldmann W, Chong A, Foster J, Siso S et al. Prion diseases are efficiently transmitted by blood transfusion in sheep. *Blood* 2008; 112(12):4739-4745.
23. Allain JP, Bianco C, Blajchman MA, Brecher ME, Busch M, Leiby D et al. Protecting the blood supply from emerging pathogens: the role of pathogen inactivation. *Transfus Med Rev* 2005; 19(2):110-126.
24. Stramer SL. Current risks of transfusion-transmitted agents: a review. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131(5):702-707.
25. Allain JP, Bianco C, Blajchman MA, Brecher ME, Busch M, Leiby D et al. Protecting the blood supply from emerging pathogens: the role of pathogen inactivation. *Transfus Med Rev* 2005; 19(2):110-126.
26. Lombardi VC, Ruscetti FW, Das GJ, Pfof MA, Hagen KS, Peterson DL et al. Detection of an infectious retrovirus, XMRV, in blood cells of patients with chronic fatigue syndrome. *Science* 2009; 326(5952):585-589.
27. Burnouf T, Radosevich M. Reducing the risk of infection from plasma products: specific preventative strategies. *Blood Rev* 2000; 14(2):94-110.
28. Castro E, Girones N, Bueno JL, Carrion J, Lin L, Fresno M. The efficacy of photochemical treatment with amotosalen HCl and ultraviolet A (INTERCEPT) for inactivation of *Trypanosoma cruzi* in pooled buffy-coat platelets. *Transfusion* 2007; 47(3):434-441.
29. Eastman RT, Barrett LK, Dupuis K, Buckner FS, Van Voorhis WC. *Leishmania* inactivation in human pheresis platelets by a psoralen (amotosalen HCl) and long-wavelength ultraviolet irradiation. *Transfusion* 2005; 45(9):1459-1463.
30. Lin L, Hanson CV, Alter HJ, Jauvin V, Bernard KA, Murthy KK et al. Inactivation of viruses in platelet concentrates by photochemical treatment with amotosalen and long-wavelength ultraviolet light. *Transfusion* 2005; 45(4):580-590.
31. Pinna D, Sampson-Johannes A, Clementi M, Poli G, Rossini S, Lin L et al. Amotosalen photochemical inactivation of severe acute respiratory syndrome coronavirus in human platelet concentrates. *Transfus Med* 2005; 15(4):269-276.
32. Sawyer L, Hanson D, Castro G, Luckett W, Dubensky TW, Jr., Stassinopoulos A. Inactivation of parvovirus B19 in human platelet concentrates by treatment with amotosalen and ultraviolet A illumination. *Transfusion* 2007; 47(6):1062-1070.
33. Castro E, Bueno JL, Rodríguez P, Barea L, González R. Three years of experience with the INTERCEPT™ blood system for apheresis platelets in routine use. *Vox Sanguinis* 2007; 93 (supl. 1):163.
34. Osselaer JC, Messe N, Hervig T, Bueno J, Castro E, Espinosa A et al. A prospective observational cohort safety study of 5106 platelet transfusions with components prepared with photochemical pathogen inactivation treatment. *Transfusion* 2008; 48(6):1061-1071.
35. Rasongles P, Isola H, Kientz D, Cazenave JP, Sawyer L, Corash L. Rapid implementation of photochemical pathogen inactivation (Intercept) for preparation of platelet components during an epidemic of chikungunya virus. *Vox Sanguinis* 2006; 91 (Supl. 3):32.

El laboratorio en la hemostasia

COORDINADORES: J. HERMIDA. *Pamplona*
J.C. REVERTER. *Barcelona*

Resumen del simposio

El simposio está dedicado a ofrecer una visión amplia sobre las nuevas perspectivas que se presentan dentro del laboratorio de hemostasia, pretendiendo ir desde la prospección del futuro y estudios básicos hasta la aplicación clínica.

Se inicia con la presentación del Javier Roncalés, del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol de Badalona (Barcelona), el cual nos introduce en el novedoso campo de la nanotecnología y su potencial aplicación a la hemostasia. En ella revisa primero el sorprendente mundo de la producción de materiales y estructuras a partir del reordenamiento de átomos y moléculas. Con las fascinantes propiedades que confiere a los materiales producidos, se pueden diseñar sistemas novedosos con propiedades únicas y poco costosos. Tras una primera parte resaltando las fases de evolución de la nanotecnología, la ponencia se adentra en su aplicación a la medicina y su actual y presumible futuro en el laboratorio de hemostasia. Así, los nanotubos de carbono pueden servir para fabricar chips capaces de realizar múltiples de determinaciones analíticas con un volumen de muestra ínfimo, siendo, además, multifuncionales. Finalmente, valora un panel de posibles chips que pudieran desarrollarse para el laboratorio de hemostasia.

La segunda ponencia la imparte la Dra. Cristina Duboscq, de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad de Buenos Aires. En ella desarrolla la aplicación de las curvas de generación de trombina, en sus diferentes parámetros, a valorar la potencial hipercoagulabilidad del plasma de los pacientes que han padecido un evento trombotico y cuya única alteración es la elevación del FVIII, FIX y FXI. Los pacientes con las tres alteraciones referidas no incrementan el potencial endógeno de trombina. Sin embargo, destaca que la elevación de los factores VII y IX puede asociarse a una fase de latencia más corta, una mayor velocidad de generación trombina y un tiempo menor hasta el pico máximo de generación de trombina y que, por su parte, los niveles elevados de FXI mantienen la generación de trombina en forma sostenida por más tiempo. Con estos datos sugiere que estas modificaciones, en la forma en que se genera trombina, podrían causar que la estructura de la red de fibrina fuese diferente a la normal, conllevando una menor lisabilidad.

En la tercera ponencia, el Dr. Marco, del Hospital General Universitario de Alicante, revisa los marcadores clínicos y biológicos que se han descrito para clasificar a los pacientes como de alto o bajo riesgo de recurrencia de la enfermedad tromboembólica venosa. Entre estos biomarcadores destaca el valor del dímero D, del VIII:C persistentemente elevado, el análisis de la generación de trombina en sus diferentes variantes, el TAFI elevado, la interrelación entre ellos y su plasmación en sistemas de *store* de riesgo. Asimismo, destaca la dificultad que hay actualmente para identificar biomarcadores de la recidiva trombotica que tengan un valor basado en la evidencia, especialmente si deseamos que sean pruebas sencillas, reproducibles y con un adecuado control de calidad. Remarca, por último, el valor que han de tener estudios multicéntricos que incluyan un gran número de pacientes, como el proyecto que está iniciándose en el grupo de trabajo de biología y patología trombotica de la SETH, para disponer de un "buen" nivel de evidencia.

En la ponencia final, el Dr. Preissner, de la Medical School Justus-Liebig de la Universidad de Giessen (Alemania), revisa el valor del RNA extracelular en la patología trombotica. Los ácidos nucleicos se liberan de las células destruidas o muertas y tienen *per se*, una vez en el torrente circulatorio, una actividad biológica reseñable. De este modo, se ha visto su efecto en el cáncer, en la inmunidad natural y en los procesos inflamatorios. En la hemostasia, el RNA extracelular es un cofactor para la autoactivación de los fac-

tores XII y XI y, además, puede actuar como una superficie 'extraña' para el inicio de la coagulación por clásica la vía intrínseca. Asimismo, los trombos formados en presencia de RNA extracelular en el territorio arterial son más ricos en fibrina. Por último, su liberación en el ictus puede contribuir a los procesos inflamatorios y en la extensión de éste, abriendo una puerta a potenciales nuevos agentes terapéuticos que inhiban tal efecto.

NANOTECNOLOGÍA EN EL LABORATORIO DE HEMOSTASIA

F.J. RONCALÉS MATEO

Laboratorio ICO Hematología.

Hospital Germans Trias i Pujol. Badalona (Barcelona)

Introducción a la nanotecnología

Con respecto a qué es la nanotecnología, empecemos por aclarar el significado del prefijo “nano”: éste hace referencia a la milmillonésima parte de un metro o lo que es lo mismo 10^{-9} (o de cualquier otra unidad de medida). Para hacernos idea de a qué escala nos referimos, piensa que un átomo es la quinta parte de esa medida, es decir, cinco átomos puestos en línea suman un nanómetro. Bien, pues todos los materiales, dispositivos, instrumental, etc., que entren en esa escala, desde 5 a 50 o 100 átomos es lo que llamamos nanotecnología.

La palabra nanotecnología es usada extensivamente para definir las ciencias y técnicas que se aplican a un nivel de nanoescala, que permiten trabajar y manipular las estructuras moleculares y sus átomos. En síntesis, nos llevaría a la posibilidad de fabricar materiales y máquinas a partir del reordenamiento de átomos y moléculas.

La nanotecnología es el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales a través del control de la materia a nanoescala, y la explotación de fenómenos y propiedades de la materia a nanoescala.

Cuando se manipula la materia a la escala tan minúscula de átomos y moléculas, demuestra fenómenos y propiedades totalmente nuevas. Por lo tanto, científicos utilizan la nanotecnología para crear materiales, aparatos y sistemas novedosos y poco costosos con propiedades únicas.

El padre de la “nanociencia” es considerado Richard Feynman, premio Nobel de Física, quien en 1959 propuso fabricar productos sobre la base de un reordenamiento de átomos y moléculas. En 1959, el gran físico escribió un artículo que analizaba cómo los ordenadores, trabajando con átomos individuales podrían consumir poquísimas energías y conseguir velocidades asombrosas.

Existe un gran consenso en que la nanotecnología nos llevará a una segunda revolución industrial en el siglo XXI, tal como anunció hace unos años, Charles Vest (ex presidente del MIT).

Supondrá numerosos avances para muchas industrias y nuevos materiales con propiedades extraordinarias (desarrollar materiales más fuertes que el acero pero con solamente diez por ciento del peso), nuevas aplicaciones informáticas con componentes increíble-

mente más rápidos o sensores moleculares capaces de detectar y destruir células cancerígenas en las partes más delicadas del cuerpo humano como el cerebro, entre otras muchas aplicaciones.

Podemos decir que muchos progresos de la nanociencia estarán entre los grandes avances tecnológicos que cambiarán el mundo¹.

Los nanotubos de carbono representan probablemente hasta el momento el más importante producto derivado de la investigación en fullerenes (los científicos españoles no se ponen de acuerdo sobre la traducción de la palabra “fullerene” –en distintos trabajos se pueden encontrar la palabra original, o fullerenos...–).

Los nanotubos llevaron a los científicos y premios Nobel Robert Curl, Harold Kroto y Richard Smalley a descubrir el buckyball C₆₀.

Los nanotubos de carbono son láminas formadas por átomos de carbono, enrolladas cilíndricamente sobre sí mismos. Tienen un diámetro del orden de los nanómetros y pueden estar formados por una sola capa de nanotubos o por varias. Los nanotubos de una sola capa se llaman *single wall nanotubes* (SWNTS) y los de varias capas, *multiple wall nanotubes* (MWNT).

Los nanotubos tienen un diámetro de unos nanómetros y, sin embargo, su longitud puede ser de hasta un milímetro, por lo que dispone de una relación longitud: anchura tremendamente alta y hasta ahora sin precedentes.

La investigación sobre nanotubos de carbono es tan apasionante (por sus múltiples aplicaciones y posibilidades) como compleja (por la variedad de sus propiedades electrónicas, térmicas y estructurales que cambian según el diámetro, la longitud, la forma de enrollarse)².

Los nanotubos de carbono son las fibras más fuertes que se conocen. Un solo nanotubo perfecto es de 10 a 100 veces más fuerte que el acero por peso de unidad y poseen propiedades eléctricas muy interesantes, conduciendo la corriente eléctrica cientos de veces más eficazmente que los tradicionales cables de cobre.

El grafito (sustancia utilizada en lápices) es formado por átomos de carbono estructurados en forma de panel. Estas capas tipo panel se colocan una encima de otra. Una sola capa de grafito es muy estable, fuerte y flexible. Dado que una capa de grafito es tan estable sola, se adhiere de forma débil a las capas vecinas, por esto se utiliza en lápices –porque mientras se escribe, se caen pequeñas escamas de grafito–.

Otra forma de estructura son las fibras de carbono, capas individuales de grafito son mucho más grandes que en lápices, y forman una estructura larga, ondulada y fina, tipo espiral. Estas fibras se pueden pegar unas a otras y formar así una sustancia muy fuerte, ligera (y cara) utilizada en aviones, raquetas de tenis, bicicletas de carrera, etc.

Pero existe otra forma de estructurar las capas que produce un material más fuerte todavía, enrollando la

estructura tipo panel para que forme un tubo de grafito. Este tubo es un nanotubo de carbono.

Los nanotubos de carbono, además de ser tremendamente resistentes, poseen propiedades eléctricas interesantes. Una capa de grafito es un semimetal. Esto quiere decir que tiene propiedades intermedias entre semiconductores (como la silicón en microchips de ordenador, cuando los electrones se muevan con restricciones) y metales (como el cobre utilizado en cables cuando los electrones se mueven sin restricción). Cuando se enrolla una capa de grafito en un nanotubo, además de tener que alinearse los átomos de carbono alrededor de la circunferencia del tubo, las funciones de onda estilo mecánica cuántica de los electrones deben también ajustarse. Este ajuste restringe las clases de función de onda que puedan tener los electrones, lo que a su vez afecta el movimiento de éstos. Dependiendo de la forma exacta en la que se enrolla, el nanotubo puede ser un semiconductor o un metal.

En una conferencia impartida en 1959 por uno de los grandes físicos del siglo pasado, el gran teórico y divulgador Richard Feynman, ya predijo que “había un montón de espacio al fondo” (el título original de la conferencia fue “There’s plenty of room at the bottom”) y auguraba una gran cantidad de nuevos descubrimientos si se pudiera fabricar materiales de dimensiones atómicas o moleculares. Hubo que esperar varios años para que el avance en las técnicas experimentales, culminado en los años 80 con la aparición de la microscopía túnel de barrido (STM) o de fuerza atómica (AFM) hiciera posible primero observar los materiales a escala atómica y, después, manipular átomos individuales.

Su impacto en la vida moderna aún parece una historia de ciencia ficción. Fármacos que trabajan a nivel atómico, microchips capaces de realizar complejos análisis genéticos, generación de fuentes de energía inagotables, construcción de edificios con microrrobots, lucha contra las plagas y la contaminación a escala molecular son sólo algunos de los campos de investigación que se desarrollan con el uso de la nanotecnología, conocimiento que permite manipular la materia a escala nanométrica, es decir, átomo por átomo.

Vinculado a la investigación científica desarrollada por las principales instituciones públicas de educación superior, la nanotecnología fomenta un modelo de colaboración interdisciplinario en campos como la llamada nanomedicina –aplicación de técnicas que permitan el diseño de fármacos a nivel molecular–, la nanobiología y el desarrollo de microconductores.

La Unión Europea considera la investigación nanotecnológica como uno de los ejes de investigación a impulsar en el seno de la Unión, con medidas como el programa ENIAC³.

A pesar de que hace sólo una década que comenzó el “despegue mundial” de este nuevo campo cien-

tífico, hoy existen cerca de 3.000 productos generados con nanotecnología, la mayoría para usos industriales, aunque las investigaciones más avanzadas se registran en el campo de la medicina y la biología.

La nanotecnología es un campo científico que requiere de una colaboración multidisciplinaria muy estrecha que impida que los países menos desarrollados sigan rezagados ante los niveles alcanzados en Estados Unidos, Inglaterra y Japón, donde existe una opinión generalizada de que el futuro de la ciencia y el bienestar que pueda alcanzar la humanidad está estrechamente vinculado con nuevas técnicas a nivel molecular⁴.

Hoy día, este campo científico está orientado a la ciencia molecular que hace posible diseñar microchips electrónicos capaces de identificar en sólo ocho minutos, al colocar una gota de sangre, las enfermedades que padeció la familia del paciente y a cuáles puede ser propenso, el diseño de modernos fármacos capaces de atacar el cáncer a nivel atómico sin causar daño a las células sanas o bien pueden utilizarse para la distribución de fármacos⁵.

Sin embargo, a pesar de que se avanza continuamente en el diseño de nuevos medicamentos y técnicas con capacidad de manipular la materia átomo por átomo, no existen fechas precisas para que todos estos adelantos sean una realidad en la vida cotidiana de millones de personas, pues la ciencia, al igual que el arte, también tiene a la imaginación y la creatividad como motores.

Algunas de las investigaciones más recientes en la búsqueda de tratamientos alternativos contra el cáncer fueron difundidas por un grupo de investigadores estadounidenses. En ellas se usaron nanopartículas de oro para el tratamiento del mismo, lo que representa un gran logro para el combate contra esta enfermedad. A pesar de esto, pueden transcurrir varios años antes de que se puedan aplicar a seres humanos^{6,7}.

La “excelente” calidad de las investigaciones desarrolladas por especialistas requiere de mayor impulso financiero que garantice el futuro de importantes proyectos y de un cambio en la cultura científica que permita que la mayoría de la población conozca el potencial de un nuevo campo científico que puede cambiar el futuro de la humanidad.

Sin un programa de divulgación que informe a la sociedad y al sector industrial de los avances que puede generar la nanotecnología, se agudizará el retraso científico en el que se ubican muchos de los países en desarrollo, a pesar de disponer de científicos altamente capacitados, pero sin recursos ni difusión⁸.

La nanomedicina engloba las diversas aplicaciones directas de la nanobiotecnología en el tratamiento, prevención y diagnóstico de enfermedades humanas. La nanobiotecnología es el uso de materiales y estruc-

turas a escala nanométrica (0,000000001 metros) en interacción con materia biológica⁹.

Existen dispositivos biosensores a escalas micro- y nanométrica, utilizando transducción fotónica y nanomecánica. La fabricación de los dispositivos se lleva a cabo con microtecnologías tipo MEMS, junto con su integración en microsistemas tipo *lab on a chip*. Se han desarrollado sensores de resonancia de plasmón superficial ópticos y magnetoópticos (actualmente en comercialización), sensores nanofotónicos de extrema sensibilidad, biochips integrados basado en micropalanca nanomecánicas y un novedoso dispositivo mecanoóptico de micropalanca óptica. Además, se cuenta con una amplia experiencia en biofuncionalización de superficies a escala nanométrica con proteínas, ADN y receptores biológicos en general. Los campos de aplicación hacia la que se dirigen estos dispositivos son el control medioambiental *in situ*, el análisis clínico descentralizado y el diagnóstico precoz de cáncer y enfermedades infecciosas, la genómica funcional y la proteómica, principalmente¹⁰.

Aplicaciones de los chip basados en nanotubos de carbono en el diagnóstico en el laboratorio de hemostasia

Cada chip es capaz de realizar 5 determinaciones diferentes lo que nos permite hablar de “el laboratorio en un chip”.

Los chip nos permiten trabajar con aparatos a la cabecera del paciente o *point of care* con sólo una gota de sangre capilar.

Los chips no sólo nos permiten medir las reacciones antígeno anticuerpo con una sensibilidad y especificidad muy superiores a las técnicas actuales, como el ELISA, sino que además detectan cambios en ADN y mutaciones génicas.

En el laboratorio de hemostasia y trombosis podemos tener chips con los cuales se determinen los diferentes perfiles que se estudian en ese tipo de laboratorio como:

TromboSip®

Un perfil para trombofilia que mida antitrombina, resistencia a la proteína C, proteína C, proteína S, gen de la protrombina 20210A y el factor V Leiden.

AutoSip®

Un perfil de autoinmunidad en hemostasia que diagnostique trombopenia inducida por heparina tipo II, hemofilia adquirida y anticoagulante tipo lupus.

TAO Sip®

En el campo del tratamiento con antivitaminas K, el actual INR lo podríamos sustituir por el CP (complejo protrombínico, factores II, VII, IX y X) que son todos los factores que deprimen los antivitamina K y no el INR que mide el factor V que no es Vitamina K dependiente y no mide el factor IX, que si lo es. Además, en el mismo chip y con la misma gota de sangre capilar mediríamos un factor de activación de la hemostasia como el D-dímero que nos permitiría individualizar mucho más el tratamiento.

Eight Level®

En el campo de la hemofilia:

La posibilidad de detectar el factor VIII en sangre capilar de forma eficaz y eficiente con un aparato *point of care* será un paso muy importante en el campo de la hemofilia, sobre todo en el campo de la pediatría, ya que de esta forma los niños que reciben diariamente infusión de factor VIII ajustarán la cantidad en función del nivel del mismo, de forma similar a los diabéticos con la insulina, lo cual ahorrará muchas punciones venosas en pacientes tan especiales como los pediátricos.

Nuevos anticoagulantes

Los nuevos anticoagulantes como el dabigatrán y el rivaroxabán no necesitan controles periódicos, pero quizás sería de interés disponer de una forma rápida y en sangre capilar de determinar su acción midiendo el antifactor II o el anti-X activado.

En urgencias

Determinación del D-Dímero Sip®. Como exclusión de enfermedad tromboembólica venosa¹¹.

Conclusiones

La aplicación de la nanotecnología va a ser una auténtica revolución en todos los ámbitos de la vida. Su influencia, tanto en el tratamiento como en el diagnóstico, cambiará el concepto que tenemos actualmente sobre la medicina. En el campo del laboratorio de hemostasia la aparición de aparatos *point of care* que realicen determinaciones por perfiles es un auténtico reto para los hematólogos dedicados a dicha subespecialidad. El desafío del futuro consistirá en que el hematólogo dedicado a la hemostasia sea capaz de integrar la información de los diferentes *point of care* que aparezcan,

no sólo los que estén físicamente en su laboratorio, sino todos los del hospital, como por ejemplo, urgencias y, por qué no, los que estén en atención primaria.

Mediante las nuevas tecnologías, como Internet, asumir el reto es posible, sin olvidar que el control de esos nuevos aparatos que nos trae el futuro necesitará de revisión de la calidad de los mismos y estadísticas y esta función debe continuar en manos del especialista en hemostasia y trombosis.

Bibliografía

1. www.euroresidentes.com/futuro/nanotecnologia/nanotecnologia_que_es.htm (Visto el 13 Abril 2010).
2. Biosensing using nanomaterials. Arben Merkoçi. John Wiley & Sons, Inc New Jersey, 2009.
3. www.eniac.eu/ (Visto el 3 de Mayo 2010).
4. Seven challenges for nanomedicine. 2008. Wendy R. Sanhai, Jason H. Sakamoto, Richard Canady, Mauro Ferrari. Nature Nanotechnology 3, 242-244.
5. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. 2005. Alberto Bianco, Kostas Kostarelos and Maurizio Prato. Current Opinion in Chemical Biology 9, 674-679.
6. Nanomedicine and Society. 2009. M. Ferrari, M. A. Philibert, W.R. Sanhai. Clinical pharmacology & Therapeutics 85 (5) 466-467.
7. Tumor Targeting with Antibody-Functionalized, Radiolabeled Carbon Nanotubes. 2007. Michael R. McDevitt, Debjit Chattopadhyay, Barry J. Kappell, Jaspreet Singh Jaggi et al. The Journal of Nuclear Medicine, 48 (7) 1180-1189.
8. www.portalcienza.net/nanotecnologia/ (Visto el 15 Abril 2010).
9. www.nanomedspain.net/ (Visto el 6 Mayo 2010).
10. www.cin2.es/~biosensores/ (Visto el 6 Mayo 2010).
11. www.alphasip.es/ (Visto el 30 Abril 2010).

GENERACIÓN DE TROMBINA EN PACIENTES CON TROMBOSIS VENOSA PROFUNDA Y NIVELES ELEVADOS DE FVIII, FIX Y FXI COMO ÚNICA ALTERACIÓN TROMBOFÍLICA

C. DUBOSCQ, J. CERESSETTO, C. SHANLEY, G. STEMMELIN, O. RABINOVICH, C.G. CASTEDO, M. MELGAR, E. BULLORSKY

Servicio de Hematología.

Hospital Británico de Buenos Aires (Argentina)

La trombosis venosa es una enfermedad multifactorial. Actualmente se conocen numerosos factores de riesgo para la trombosis venosa, entre los cuales se encuentran defectos genéticos, condiciones adquiridas y alteraciones de los distintos fenotipos plasmáticos^{1,2}. También se sabe, a través de estudios en familias con eventos tromboembólicos, que existirían factores genéticos que aún

no han sido identificados³. Durante la última década, se han establecido una serie de fenotipos plasmáticos que contribuyen al estado de hipercoagulabilidad, como el incremento de la concentración plasmática de ciertos factores de coagulación. Existen en la literatura diversos reportes que demuestran que niveles elevados de FVIII, FIX y FXI están asociados a un aumento del riesgo trombótico^{4,10}. Estudios diferentes reportan que los niveles de FVIII están asociados a aumento de riesgo de recurrencia^{11,12}, un solo reporte asocia niveles elevados de FIX con recurrencia¹³ y hasta el momento no hay investigaciones que asocien recurrencia con el incremento del FXI plasmático. Por otro lado, no se conocen los valores de *cutt off* para esos niveles elevados, ni hay suficientes estudios prospectivos que demuestren que la determinación de estos tres factores de coagulación deban ser incluidos en el estudio de trombofilia o que cambien el riesgo de recurrencia. Los mecanismos por los cuales los niveles altos de FVIII, FXI y FIX contribuirían a un estado de hipercoagulabilidad no están esclarecidos aún. Hasta el momento, no existe una prueba global que permita cuantificar el estado de hipercoagulabilidad; sin embargo, en los últimos años ha tomado impulso el test de generación de trombina^{14,15}. Aunque todavía falta estandarización entre las distintas metodologías, la curva de reacción concentración de trombina vs. tiempo obtenida refleja el total de los mecanismos hemostáticos. De la curva se puede obtener el potencial endógeno de trombina (PET), definido como el área bajo la curva, la concentración máxima de trombina (Tmax) y el tiempo al cual se alcanza esa concentración (tmax). Se han desarrollado test de generación en plasma pobre y rico en plaquetas, en presencia de proteína C activada (PCa) y utilizando distintos iniciadores. EL PET está descendido en pacientes hemofílicos y bajo tratamiento con dicumarínicos, y está incrementado en pacientes con alteraciones trombofílicas¹⁵. Existen pocos reportes sobre cómo varía la generación de trombina en función de la concentración de los factores de coagulación.

El objetivo del presente trabajo es evaluar los parámetros de la curva de generación de trombina en el plasma de pacientes con un evento trombótico cuya única alteración trombofílica es la elevación del FVIII, FIX y FXI.

Materiales y métodos

Población: 99 pacientes menores de 55 años con un evento trombótico en territorio venoso profundo (TVP) sin factores desencadenantes, confirmado por eco-Doppler y un aumento en los niveles de los factores de coagulación VIII, IX u XI como única alteración trombofílica detectable en plasma. Las determinaciones se realizaron tres meses después del evento trombótico espontáneo y fueron confirmadas en dos muestras independientes.

Teniendo en cuenta el valor del percentil 95 th de la población general para el FVIII, FIX y FXI, se establecieron los valores de *cut off* y los pacientes se clasificaron según el siguiente criterio:

Grupo A: 41 pacientes (edad 40-55 años) con niveles de FVIII superiores al 150%.

Grupo B: 34 pacientes (edad 28-53 años) con niveles de FIX superiores al 129%.

Grupo C: 24 pacientes (edad 33-54 años) con niveles de FXI superiores al 120%.

Se establecieron dos grupos controles, detallados a continuación:

Grupo D: 35 individuos normales menores de 60 años sin historia de enfermedad tromboembólica. Fueron excluidos factores trombofílicos genéticos o adquiridos.

Grupo E: 25 pacientes con TVP sin ninguna alteración trombofílica detectable.

Test de generación de trombina en PPP: Se midió la generación de trombina en PPP defibrinado iniciando la reacción con 15 uM de factor tisular recombinante y CaCl₂ (Cf 10 nm). Cada 30 seg se tomó una alícuota de 10 ul, diluyó en EDTA 0,025 M (1:200) 0,25 ul se incubaron con 175 ul de S-2238 0,2 Mm y se leyó la absorbancia a 405 nm. La actividad amidolítica de trombina fue determinada por comparación de la absorbancia producida por una cantidad conocida de trombina purificada. La trombina libre fue calculada restando la trombina unida a la alfa-2-macroglobulina de acuerdo a lo descrito por Hemker¹⁶. Por último, se grafica concentración de trombina en nM vs. tiempo de reacción para obtener la curva de generación de cada paciente. De esta última, se calcula la velocidad de generación normalizada (Vg), el potencial endógeno de trombina (PET), la concentración máxima de trombina (Tmax), el tiempo para alcanzar esa concentración máxima (tmax).

Determinación de FVIII, FIX y FXI: Se determinaron utilizando el método coagulable en una etapa con actin FSL, el correspondiente sustrato deficiente en un coagulómetro BCT (DADE Bering, Marburg, Alemania). Si la concentración era mayor de 150%, la determinación se repetía con plasma diluido.

Otras determinaciones:

Se determinaron el tiempo de protrombina (Thromborel S de, Dade Behring, Alemania), el APTT (Actin FSL, Dade Behring, Alemania), el fibrinógeno por el método de Clauss (fibrinógeno Reagent, Roche, Alemania) y el FII por método coagulable en una etapa.

Se determinó antitrombina III y proteína C por sustrato cromogénico, proteína S libre

por métodos inmuniturbidimétrico. La homocisteína se determinó por HPLC, las anticardiolipinas por ELISA y se excluyó la presencia de inhibidor lúpico de acuerdo a las normas de la ISTH (PTT-LA, Staclot LA, de Roche, Alemania; LAC Screen y LAC Confirm de IL, España). La presencia de la mutación FV de Leiden y Protrombina 20210 fue investigada por biología molecular.

Análisis estadístico: Se realizó el test t de Student para analizar las diferencias entre grupos; se consideró significativo un valor de $p < 0,05$.

Resultados

Niveles de FVIII, FIX y FX: La Tabla 1 muestra las características de los pacientes estudiados. Los valores de FVIII en grupo A, IX en grupo B y FXI en grupo C fueron significativamente mayores respecto a los dos grupos controles. El resto de los parámetros hemostáticos no mostraron diferencias significativas. No hubo diferencias entre las localizaciones de las trombosis entre los distintos grupos (A, B, C y E).

Todos los pacientes fueron anticoagulados con dicumarínicos durante 6 meses. Sólo 4 de 41 pacientes con FVIII > 150% tuvieron recurrencia (2 después de suspendido el tratamiento y 2 estando en rango de anticoagulación oral), mientras que en los otros grupos no se observó recurrencia. No hubo diferencias significativas en los niveles de FVIII, FIX y FXI a los 3 y 6 meses.

Generación de trombina: Los valores de PET no mostraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos. Los pacientes del grupo C (FXI > 129%) son los que mayor variabilidad muestran en los valores de PET. Los grupos A (FVIII > 150%) y B (FIX > 129%) muestran una fase lag más corta, una mayor velocidad de generación trombina y alcanzan el máximo de generación, Tmax, en menor tiempo (Tabla 2). No existen diferencias significativas en los perfiles de generación de trombina entre el grupo A y B.

Tabla 1. Características de los pacientes

	Grupo A (n = 41)	Grupo B (n = 34)	Grupo C (n = 24)	Grupo D (n = 35)	Grupo E (n = 25)
Fbg (mg%)	336 ± 42	348 ± 54	322 ± 58	252 ± 48	330 ± 47
FVIII (%)	198 ± 36*	100 ± 20	104 ± 10	105 ± 18	107 ± 15
FIX (%)	104 ± 11	146 ± 17*	101 ± 9	101 ± 12	104 ± 10
FXI (%)	98 ± 11	102 ± 15	135 ± 11*	98 ± 14	99 ± 12
PC (%)	95 ± 30	112 ± 28	115 ± 25	102 ± 28	105 ± 22
PS libre (%)	92 ± 42	102 ± 31	112 ± 38	98 ± 40	96 ± 37
ATIII (%)	98 ± 12	100 ± 18	98 ± 19	101 ± 9	99 ± 12

* $p < 0,001$. Todos los pacientes fueron negativos para la mutación G1691A (FV Leiden) y protrombina G20210A. Fueron inhibidor lúpico negativo. Presentaron anticuerpos anticardiolipinas < 20 UGPS y < 20 UGM, y niveles de homocisteína < 12 μ M.

Tabla 2. Parámetros de una prueba de generación de trombina

	FVIII (%)	FIX (%)	FXI (%)	Vg	Tmax (nM)	tmax (min)	PET (nM/min)
Grupo A	198 ± 36*	104 ± 11	98 ± 11	1,3*	122 ± 20*	1,8 ± 0,5*	387 ± 24
Grupo B	100 ± 20	146 ± 17*	102 ± 15	1,2*	115 ± 18*	2,1 ± 1,2*	385 ± 21
Grupo C	104 ± 10	101 ± 9	135 ± 11*	1,1	96 ± 25	4,1 ± 2,4	382 ± 40
Grupo D	105 ± 18	101 ± 12	98 ± 14	1,0	85 ± 11	5,0 ± 2,0	380 ± 16
Grupo E	107 ± 15	104 ± 10	99 ± 12	1,0	83 ± 9	4,9 ± 2,0	379 ± 18

PET, Vg, Tmax y tmax calculado según lo descrito en materiales y métodos.

* $p < 0,05$ para la comparación con los grupos D y E.

Los perfiles de generación de los pacientes con elevados niveles de FXI son los que muestran mayor variabilidad y mantienen la generación de trombina de forma sostenida por más tiempo.

Discusión

Diversos estudios han reportado que niveles elevados de FVIII, FIX y FXI son factores de riesgo independientes para el tromboembolismo venoso. Un posible mecanismo fisiopatológico para esta situación podría ser un aumento en la generación de trombina debido al incremento del nivel plasmático de estos factores. El potencial endógeno de trombina (PET) describe el proceso global de la formación de trombina y, por tanto, ha sido propuesto en sus diversas variantes como una prueba global para identificar individuos con un fenotipo de hipercoagulabilidad. Wielders *et al.* señalaron que un déficit de antitrombina causa un gran aumento en el PET¹⁷. Héazard *et al.* han demostrado que esta prueba es una herramienta promisoriosa para el *screening* del FV Leiden, de la Protrombina 20210 y de la deficiencia de proteína S¹⁸.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que en los tres grupos estudiados el perfil de generación de trombina es diferente pero no hay un incremento significativo del PET. Los grupos A (FVIII > 150%) y B (FIX > 129%) aumentan la velocidad de generación y la cantidad de trombina máxima producida, mientras que los del grupo C generan un pico de trombina menor, pero sostienen la generación por más tiempo. Estos resultados están de acuerdo con los descritos por Allen *et al.*, donde se señala trabajando con factores de la coagulación puros que las variaciones en los factores VIII, IX y XI afectan la velocidad y el pico de la producción de trombina mas que la producción total de la enzima¹⁹. Por último, Siegemund *et al.* que el PET expresado en unidades arbitrarias está incrementado en pacientes con niveles de FXI superiores al 131% (alrededor de un 12%) y con niveles FIX superiores al 141%, pero no reporta nada de la velocidad de generación ni de la concentración de trombina máxima²¹.

Estas diferencias podrían deberse a las distintas metodologías utilizadas en la prueba de generación y que los puntos de corte para el FIX y FXI establecidos por Siegemund fueron mayores que el utilizado en este trabajo. Por otro lado, es muy difícil comparar los distintos trabajos con la prueba de generación de trombina, ya que hay diversas formas de realizar la prueba y falta aún una mayor estandarización.

En conclusión, se puede decir que estos pacientes con trombosis venosa espontánea cuya única alteración trombofílica detectable fue presentar niveles de FVIII, FIX o F XI por encima del percentil 95 th de la población normal, mostraron *in vitro* un perfil de generación de trombina diferente al de los grupos controles. Estos cambios en la generación de trombina podrían conducir a formar una estructura de la red de fibrina diferente a la normal con menor lisabilidad. Sin embargo, son necesarios mayores estudios que permitan establecer cuáles son los valores de corte para estos factores, si deben medirse como rutina dentro de los estudios de trombofilia y definir cuál sería el mecanismo fisiopatológico por el cual niveles elevados de estos factores originan un evento trombótico.

Bibliografía

- Bertina RM. The role of procoagulants and anticoagulants in the development of venous thromboembolism. *Thromb Res.* 2009;123 Suppl 4:S41-5. Review.
- Bezemer ID, Rosendaal FR. Predictive genetic variants for venous thrombosis: what's new? *Semin Hematol.* 2007 Apr;44(2):85-92. Review.
- Bertina RM. Molecular risk factors for thrombosis. *Thromb Haemost.* 2001;86:92-103.
- Tripodi A. Levels of coagulation factors and venous thromboembolism. *Haematologica.* 2003 Jun;88(6):705-11. Review.
- Bertina RM. Elevated clotting factor levels and venous thrombosis. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2003 Sep-2004 Dec;33(5-6):395-400. Review.
- O'Donnell J, Laffan M. Elevated plasma factor VIII levels--a novel risk factor for venous thromboembolism. *Clin Lab.* 2001;47(1-2):1-6.
- Bank I, van de Poel MH, Coppens M, Hamulyák K, Prins MH, van der Meer J, Veeger NJ, Büller HR, Middeldorp S. Absolute annual incidences of first events of venous thromboembolism and arterial vascular events in individuals with elevated FVIII:c. A prospective family cohort study. *Thromb Haemost.* 2007 Nov;98(5):1040-4.
- Bank I, Libourel EJ, Middeldorp S, Hamulyák K, van Pampus EC, Koopman MM, Prins MH, van der Meer J, Büller HR. Elevated levels of FVIII:C within families are associated with an increased risk for venous and arterial thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2005 Jan;3(1):79-84.

9. van Hylckama Vlieg A, van der Linden IK, Bertina RM, Rosendaal FR High levels of factor IX increase the risk of venous thrombosis. *Blood*. 2000 Jun 15;95(12):3678-82.
10. Meijers JC, Tekelenburg WL, Bouma BN, Bertina RM, Rosendaal FR. High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis. *N Engl J Med*. 2000 Mar 9;342(10):696-701.
11. Kyrle PA, Minar E, Hirschl M, Bialonczyk C, Stain M, Schneider B et al. High plasma levels of factor VIII and the risk of recurrent venous thromboembolism. *N Engl J Med*. 2000 Aug 17;343(7):457-62.
12. Cristina L, Benilde C, Michela C, Mirella F, Giuliana G, Gualtiero P. High plasma levels of factor VIII and risk of recurrence of venous thromboembolism. *Br J Haematol*. 2004 Feb;124(4):504-10.
13. Weltermann A, Eichinger S, Bialonczyk C, Minar E, Hirschl M, Quehenberger P, Schönauer V, Kyrle PA. The risk of recurrent venous thromboembolism among patients with high factor IX levels. *J Thromb Haemost*. 2003 Jan;1(1):28-32.
14. Baglin T The measurement and application of thrombin generation. *Br J Haematol*. 2005 Sep;130(5):653-61. Review.
15. Tripodi A, Martinelli I, Chantarangkul V, Battaglioli T, Clerici M, Mannucci PM. The endogenous thrombin potential and the risk of venous thromboembolism. *Thromb Res*. 2007;121(3):353-9.
16. Hemker HC, Willems GM, Béguin S. A computer assisted method to obtain the prothrombin activation velocity in whole plasma independent of thrombin decay processes. *Thromb Haemost*. 1986 Aug 20;56(1):9-17.
17. Wieters S, Mukherjee M, Michiels J, Rijkers DT, Cambus JP, Knebel RW, Kakkar V, Hemker HC, Béguin S. The routine determination of the endogenous thrombin potential, first results in different forms of hyper- and hypocoagulability. *Thromb Haemost*. 1997 Apr;77(4):629-36.
18. Hézarard N, Bouaziz-Borgi L, Remy MG, Nguyen P. Utility of thrombin-generation assay in the screening of factor V G1691A (Leiden) and prothrombin G20210A mutations and protein S deficiency. *Clin Chem*. 2006 Apr;52(4):665-70.
19. Allen GA, Wolberg AS, Oliver JA, Hoffman M, Roberts HR, Monroe DM. Impact of procoagulant concentration on rate, peak and total thrombin generation in a model system. *J Thromb Haemost*. 2004 Mar;2(3):402-13.
20. Siegemund A, Petros S, Siegemund T, Scholz U, Seyfarth HJ, Engelmann T. The endogenous thrombin potential and high levels of coagulation factor VIII, factor IX and factor XI. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2004 Apr;15(3):241-4.

UTILIDAD DE LAS PRUEBAS DE LABORATORIO DE HEMOSTASIA PARA PREDECIR LAS RECIDIVAS DE LA ENFERMEDAD TROMBOEMBÓLICA VENOSA

P. MARCO, J. BERNABEU

Servicio de Hematología y Hemoterapia.

Sección de Hemostasia y Trombosis.

Hospital General Universitario. Alicante

Las recidivas o recurrencias trombóticas de la enfermedad tromboembólica venosa (ETV) constituyen en la actualidad un problema clínico y terapéutico. En la

literatura encontramos datos acerca de algunos marcadores clínicos y biológicos que ayudan a clasificar a los pacientes como de alto o bajo riesgo de recurrencia. Esta estratificación del riesgo ayudará a identificar grupos de pacientes que por su contexto clínico (patologías predisponentes), factores desencadenantes y su asociación a trombofilia tendrán más probabilidad de desarrollar una nueva trombosis. La incidencia de recurrencia trombótica en los pacientes con ETV oscila de forma global entre el 7-20% en el primer año después de haber suspendido el tratamiento anticoagulante¹, aunque al analizar los diferentes factores de riesgo, se pueden establecer tres categorías: los pacientes de baja probabilidad de recurrencia estará formado por aquellos con factores de riesgo altamente modificables (cirugía general no neoplásica, cirugía ortopédica): 3% durante el primer año de la suspensión de la anticoagulación y 10% a lo largo de los 5 años; los pacientes con probabilidad intermedia serán los que presentan factores de riesgo menos reversibles o parcialmente modificables (terapias estrogénicas, inmovilizaciones...): 5% en el primer año de suspensión de la anticoagulación y 15% a lo largo de los 10 años; los pacientes con alta probabilidad de recurrencia (cáncer, trombofilia de alto grado, factores de riesgo permanentes): 10% en el primer año y 30% a lo largo de 5 años de haber suspendido la anticoagulación².

Pero, además de los factores de riesgo clínico para la recidiva trombótica, también podemos encontrar datos acerca de parámetros obtenidos en el laboratorio clínico de hemostasia que ayudan a establecer el riesgo. El más estudiado es el dímero-D, debido a su alto valor predictivo negativo. Son conocidos los estudios de Palaretti y su grupo^{3,4}, que fueron los primeros en establecer el alto valor predictivo negativo de este producto de la fibrinólisis, al año de haber suspendido la anticoagulación oral. Basados en este estudio prospectivo, el valor predictivo negativo del dímero-D oscila entre el 92,9 y el 95,8% en el primer mes de la suspensión del anticoagulante, incluso aunque el paciente presentara una trombofilia. Los mismos autores indican que este marcador puede ser útil a la hora de ajustar la duración del tratamiento anticoagulante en pacientes con ETV idiopática⁴. Así, los pacientes con un nivel patológico de dímero-D que suspenden la anticoagulación presentan un 15% de recidivas (OR 2,27; IC 95% 1,15-4,46); sin embargo, en los pacientes con nivel normal, su tasa de recidivas fue del 6,2%. En el mismo sentido, una revisión sistemática de 7 estudios, que analizan el dímero-D después de suspender la anticoagulación, muestra que la tasa de recurrencia anual tras la suspensión de la anticoagulación con niveles elevados era del 8,9% *versus* el 3,5% en pacientes con niveles normales⁵. Un dato complementario obtenido de otro estudio analiza el riesgo de recidiva en los pacientes con trombo residual tras la anticoagulación

y el nivel de dímero-D, y los autores concluyen que en estos pacientes sólo el nivel de dímero-D es un factor independiente de recurrencia⁶.

También el factor VIII:C persistentemente elevado en pacientes con ETV se considera un indicador de riesgo de recurrencia. Así lo indica el estudio de Leiden Thrombophilia Study, que muestra que niveles superiores al 166% suponen un aumento de RR de 1,3 (IC 95% 0,8-2,1)⁷. Datos que coinciden con los de grupo de Viena, que indican que niveles superiores de factor VIII:C superiores al percentil 90 supone un incremento del riesgo de retrombosis de casi 7 veces⁸. En la misma línea, Cosmi *et al.* estudian el nivel de dímero-D asociado a tasas elevadas de factor VIII:C como factores de riesgo independientes de recurrencia en pacientes con ETV idiopática tras la retirada del tratamiento anticoagulante con antivitaminas K^{9,10}. Incluyen para el análisis a 336 pacientes, con una duración media de seguimiento de 22 meses y una duración media de la anticoagulación de 6,3 meses. Encuentran que en el análisis univariado separado del dímero-D indica que una elevación por encima de 500 ng/dL se asocia una HR de recurrencia de 2,14, de igual forma un nivel elevado de factor VIII:C superior a los percentiles 75 y 90 refleja un HR de 2,9 en ambos casos. Cuando los autores analizan la asociación de dímero-D elevado junto niveles de factor VIII:C superiores al percentil 75, la HR en el análisis multivariado fue de 7 (IC 95% 2,8-17,6) $p < 0,0001$. El 37% de los pacientes incluidos en el estudio presentaron la combinación de dímero-D elevado con factor VIII:C superior al percentil 75. De igual forma, la tercera parte de los pacientes no tienen ninguno de los 2 parámetros elevados, y éste será el grupo de bajo riesgo de recurrencia tras la retirada de la anticoagulación⁹.

La determinación de la generación de trombina, mediante pruebas semiautomáticas con fluorimetría basados en la metodología desarrollada por Hemker, ha sido también de utilidad para ayudar a estratificar el riesgo de recurrencia trombótica. En una publicación de *JAMA*, del grupo de Viena, Hron *et al.*¹¹ plantean analizar el riesgo de recurrencia mediante la valoración de los parámetros que aporta una prueba global de la hemostasia como la prueba de generación de trombina *in vitro*. Es un estudio prospectivo con un número de pacientes importante, 914, con un primer episodio de ETV idiopática, seguidos durante una media de 47 meses. Tuvieron una tasa de recurrencia del 11%. Encuentran que las mujeres presentaban niveles mayores de pico de trombina generada que los hombres ($p < 0,01$), así como en los portadores de la mutación de la protrombina G20210A. El análisis de los datos les lleva a identificar a un subgrupo de bajo riesgo de recaída, que tiene una tasa de pico de trombina < 400 nM, y que la mayoría eran jóvenes con niveles de factor VIII:C y IX:C más bajos. Apoyan el uso

de la prueba de generación de trombina para identificar a ese grupo de bajo riesgo, que representan en su serie las dos terceras partes del total de pacientes. No obstante, no pueden establecer si el grupo de pacientes con pico de trombina > 400 nM representan el grupo de muy alto riesgo de recidiva, y en concreto en los pacientes portadores de la mutación de la protrombina G20210A. Un amplio estudio publicado por el grupo de Marsella¹² en pacientes con esta mutación, y más modestamente nuestro grupo¹³, encuentran aumento del pico de trombina en los pacientes con ETV con esta mutación, sin poder concluir no obstante que suponga un factor de riesgo independiente de recidiva.

Así pues, los datos de la literatura no son homogéneos¹⁴, o se limitan exclusivamente a las recurrencias de las trombosis idiopáticas¹⁵.

Similar a los trabajos de generación de trombina es una variante técnica publicada por Tripodi *et al.*¹⁶ que desarrolla una prueba cromogénica, que induce la generación de trombina a partir de factor tisular. Basada en la activación de la proteína C endógena con un veneno de serpiente, mide la inhibición de la generación de trombina por la proteína C activada, y tiene la ventaja de que está diseñado para realizarse en un coagulómetro automatizado. Incluyen a 190 pacientes consecutivos con ETV, después de un mes de haber suspendido la anticoagulación con antivitaminas K. El grado de inhibición relaciona con la generación de trombina, y ello les permite identificar a los pacientes de alto riesgo de recurrencia, y establecen que es independiente del nivel de dímero-D (analiza a los pacientes incluidos en el estudio PROLONG), y de la trombofilia congénita, y consideran que esta prueba de laboratorio de hemostasia refleja el efecto compuesto de los diferentes factores que pueden influir en las recidivas trombóticas (HR 3,38; IC 95% 1,16-9,84), ajustado por edad, género, duración de la anticoagulación, nivel de dímero-D y presencia o no de una trombofilia congénita.

Por fin algunos estudios han valorado los niveles de TAFI como predictores de recurrencia trombótica o asociado a enfermedad tromboembólica venosa^{17,18}. El TAFI elevado es un factor de riesgo asociado a trombosis venosa, especialmente cuando se asocia a niveles elevados de factor VIII:C, o asociado a algunos polimorfismos; sin embargo, Eichinger *et al.*¹⁹ encuentran que niveles elevados de TAFI se asocian a mayor riesgo de recurrencia trombótica cuando se asocia también a niveles elevados de factor VIII:C (RR 6,5; IC 95% 2,9-14-8).

Recientemente y también publicado por Eichinger *et al.*²⁰ establecen un modelo predictivo, basado en un sistema de puntuación para estratificar el riesgo de recurrencia trombótica (Vienna Predictive Model). Incluyen 929 pacientes consecutivos diagnosticados de ETV, después de al menos 3 meses de anticoagulación.

Se excluyeron a los pacientes con ETV provocada, trombofilias por déficit de inhibidores (proteína C y S y antitrombina), y anticoagulante lúpico. Las variables estudiadas fueron: edad, género, localización proximal o distal de la ETV en MMII, índice de masa corporal, factor V Leiden y mutación de la protrombina G20210A, dímero-D y generación de trombina. De esta forma, desarrollan un normograma que mediante un sistema de puntuación establece la probabilidad acumulada de recidiva en un paciente individualizado mediante una puntuación. El modelo ha sido validado por los autores y concluyen que es válido para estratificar el riesgo de recidiva, e incluso para estudios sucesivos como criterios de aleatorización de pacientes para futuros estudios.

En conclusión, es complicado, a pesar de las publicaciones, decantarse a favor de alguna prueba del laboratorio de hemostasia que tenga un valor basado en la evidencia, como factor predictivo de riesgo de recidiva trombótica, especialmente si deseamos que sea una prueba sencilla, reproducible, con un control de calidad adecuado interlaboratorios y que permita diseñar correctamente estudios que incluyan un gran número de pacientes bien aleatorizados, que nos ayuden a disponer de un "buen" nivel de evidencia.

Bibliografía

- Prandoni P, Noventa F, Chiraraduzzi A, Pengo V, et al. The risk of recurrent venous thromboembolism after discontinuing anticoagulation in patients with acute deep proximal venous thrombosis or pulmonary embolism: a prospective cohort study in 1626 patients. *Haematologica*. 2007; 92:199-205.
- Rodger MA, Khan SR, Wells PS, Anderson DA, et al. Identifying unprovoked thromboembolism patients at low risk for recurrence who can discontinue anticoagulant therapy. *CMAJ* 2008; 179:417-426.
- Palareti G, Legnani C, Cosmi B, Guazzaloca G et al. Risk of thromboembolism recurrence: high negative predictive value of D-dimer preformed after oral anticoagulation is stopped. *Thromb Haemost* 2002; 87:7-12.
- Palareti G, Cosmi B, Legnani C, Tossetto A et al. PROLONG investigators. D-dimer testing to determine the duration of anticoagulant therapy. *N Engl J Med* 2006; 355:2797-2806S.
- Verhovsek M, Douketis JD, Yi Q, Shrivastava S, et al. Systematic review: D-dimer to predict recurrent disease after stopping anticoagulant therapy for unprovoked venous thromboembolism. *Ann Intern Med* 2008; 149:481-490.
- Cosmi B, Legnani C, Iorio A, Pengo V et al. Residual venous obstruction, alone and in combination with D-dimer as risk factor for recurrence after anticoagulation withdrawal following a first idiopathic deep vein thrombosis in the PROLONG study. *Eur J Endovasc Surg* 2010;39:356-65.
- Christiansen S, Cannegieter S, Koster T, Vandenbroucke J, and Rosendaal F. Thrombophilia, clinical factors and recurrent venous thrombotic events. *JAMA* 2005; 293:2352-2361.
- Kyrle PA, Minar E, Hirschl M, Bialonczyk K C et al. High plasma levels of factor VIII and the risk of recurrent venous thromboembolism. *N Engl J Med* 2000; 343:457-62.
- Legnani C, Cosmi B, Cini M, Frascaro M, et al. High plasma level of factor VIII and risk of recurrence of venous thromboembolism. *Br J Haematol* 2004; 124:504-10.
- Cosmi B, Legnani C, Cini M, Favaretto E and Palareti G. D-dimer and factor VIII are independent risk factors for recurrence after anticoagulation withdrawal for a first idiopathic deep venous thrombosis. *Tromb Res* 2008; 122:610-617.
- Hron G, Kollars M, Binder B, Eichinger S, and Kyrle P. Identification of patients at low risk for recurrent venous thromboembolism by measuring thrombin generation. *JAMA* 2006; 296:397-402.
- Lavigne-Lissalde G, Sánchez C, Castelli C, Alonso S, et al. In prothrombin G20210A carriers the genetic mutation and the history of Venous Thrombosis contribute both to thrombin generation independently of factor II plasma levels. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2010. 8: 942-949.
- Brocal C, Bastande N, López-Abadía E, Brocal I, Beneit P, Lucas J, Marco P. Estudio de la Generación de Trombina en pacientes con la variante alélica de la Protrombina G20210A. 25 Congreso Nacional de la SETH. Barcelona. Noviembre 2009.
- Van Hylckama A, Christiansen SC, Luddington R, Cannegieter SC et al. Elevated endogenous thrombin potential is associated with an increased risk of a first deep venous thrombosis but not with the risk of recurrence. *Br J Med* 2007;138:769-774.
- Besser M, Baglin C, Luddington R, van Hylckama A, et al. High rate of unprovoked recurrent venous thrombosis is associated with high thrombin-generation potential in a prospective cohort study. *J Thromb Haemost* 2008; 6:1720-1725.
- Tripodi A, Legnani C, Lemma L, Cosmi B, et al. Abnormal Protac-induced coagulation inhibition chromogenesis assay results are associated with an increase risk of recurrent venous thromboembolism. *J Thromb Thrombolysis* 2004. On line publication. DOI 10.1007/s11239-010-0479z.
- Meltzer ME, Lisman T, de Groot PG, Meijers JC et al. Venous thrombosis risk associated with plasma hypofibrinolysis is explained by elevated plasma levels of TAFI and PAI-1. *Blood* 2010 (on line 2010-02-267740).
- Verduj, Marco P, Benlloch S, Sanchez J and Lucas J. TAFI polymorphisms and plasma TAFI levels measured by an ELISA insensitive to isoforms in patients with venous thrombosis disease. *Thromb Haemost* 2006; 95:585-586.
- Eichinger S, Schönauer V, Weltermann A, Minar E et al. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for recurrent venous thromboembolism. *Blood* 2004;103:3773-6
- Eichinger S, Heinze G, Jandek L and Kyrle P. Risk assessment of recurrence in patients with unprovoked deep venous thrombosis or pulmonary thromboembolism: the Vienna prediction model. *Circulation* 2010; 121:1630-1636.

Nuevas fronteras en el trasplante hemopoyético

COORDINADORES: J.L. Díez-MARTÍN. *Madrid*

G. BAUTISTA. *Madrid*

Resumen del simposio

A lo largo de los más de 50 años de historia de utilización terapéutica del trasplante hemopoyético (TPH), éste ha sido motor del desarrollo y de avances importantes en lo que ahora se reconoce, de forma más amplia, como “terapia celular” y disciplinas afines (inmunología, cultivos celulares, criobiología...). En este periodo, el TPH ha experimentado una amplia metamorfosis en todos sus aspectos, sus indicaciones, su metodología, fuente de progenitores, regímenes de acondicionamiento, inmunosupresión, la edad de los pacientes candidatos, etc. De hecho, hemos observado cómo en enfermedades graves cuya curación sólo era posible gracias al TPH, los avances médicos las han relegado a ser subsidiarias del mismo sólo en casos de refractariedad a los nuevos tratamientos (aplasia severa, LMC...). Por el contrario, otras que inicialmente no se beneficiaban del TPH constituyen hoy en día la indicación más frecuente del mismo (mieloma, síndromes linfoproliferativos...).

Todo ello ha contribuido a hacer del TPH una disciplina fecunda y eficaz en el tratamiento y rescate de múltiples enfermedades hematológicas, y a perfeccionar la tecnología de obtención, manipulación y cultivo de los progenitores hemopoyéticos, en circunstancias de máxima esterilidad, para extender su aplicación al mayor número de pacientes.

El complejo entramado médico-sanitario que el TPH exige para la buena práctica del mismo y la interdependencia transnacional de los equipos de obtención e implante han condicionado una regulación técnico-legal creciente, que ha cristalizado en la implantación de programas de certificación y acreditación avalados por las sociedades científicas internacionales.

En este simposio, sobre los nuevos retos a abordar por los profesionales del TPH, contamos con la colaboración de la Dra. Bautista que hablará sobre las células mesenquimales, su obtención y su aplicación en la prevención y tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped (EICH); el Dr. O'Donnell, que comentará la experiencia de los centros americanos, J. Hopkins y Fred Hutchinson C.R.C., en el uso de altas dosis de ciclofosfamida administrada post-alo-TPH para prevenir el EICH, en un contexto de donante haploidéntico y, más recientemente, de donante HLA idéntico. El Dr. Díaz comentará su experiencia en TPH pediátricos a partir de donantes HLA parcialmente idénticos, utilizando inóculos manipulados con doble selección por medio de anticuerpos monoclonales anti-B y anti-T. Finalmente, P. Balsalobre hablará sobre el impacto y las dificultades que los programas de acreditación y gestión de la calidad suponen a los servicios de hematología con unidades de TPH.

TRATAMIENTO DE LA EICH CON CÉLULAS MESENQUIMALES: BENEFICIOS Y DIFICULTADES

G. BAUTISTA, C. REGIDOR,
R. GONZALO-DAGANZO, R. CABRERA

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

Células mesenquimales estromales: introducción

Las células mesenquimales estromales (CME) son células espiculadas, con capacidad de adherencia al plástico y que se aíslan fácilmente de médula ósea (MO), grasa y otros tejidos. Son células multipotentes con capacidad de migración, diferenciación a diferentes líneas celulares y regeneración de tejidos. En médula ósea se encuentran en baja cantidad ($10^{-4}/10^{-6}$) y disminuyen con la edad. Forman parte del microambiente medular, donde tienen un papel fundamental en el desarrollo y la diferenciación del sistema linfo-hemopoyético, a través de la secreción de citocinas y de interacciones célula-célula; recientemente se considera a los osteoblastos (progenie de las CME) como células fundamentales del nicho celular hemopoyético.

Las CME son poco inmunogénicas, modulan/suprimen las respuestas inmunológicas a través de interacciones con las células del sistema inmune, y son capaces de migrar a lugares de inflamación y daño tisular participando en los procesos de regeneración tisular. Según la definición de la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) (Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee) (Horwitz y cols., *Cytherapy*, 2006), que estableció los criterios mínimos para su caracterización, las CME son células adherentes (CFU-F), de morfología fusiforme, sin marcador inmunofenotípico específico, y tripotenciales para diferenciación osteo, adipó y condrogénica.

Historia

Fueron identificadas por primera vez por Friedenstein en 1968 como células de la médula ósea que soportan el microambiente y el estroma medular, con capacidad de diferenciación a hueso y un vasto potencial de expansión *ex vivo*. Demostró que era una población celular con alto potencial proliferativo, capaz de generar colonias clonales en cultivos de baja densidad, y las identificó como las denominadas CFU-F. Hasta ese momento, las únicas células madre conocidas en profundidad eran las células madre hemopoyéticas. Owen en 1988 propuso la existencia de células ma-

dre estromales, análogas a las *Stem Cells* hematopoyéticas (HSC), capaces de reconstruir el microambiente de la médula ósea, y postula que son las CFU-F. Caplan en 1991 fue el primero que utilizó el término de MSC (*mesenchymal stem cells*), aludiendo a su capacidad para diferenciarse en otras células de diferentes líneas mesenquimales, como grasa y cartílago. Llamativamente, tres décadas después de su identificación, todavía hay controversia sobre su localización anatómica exacta en la MO, su papel fisiológico y su capacidad real de diferenciación multilineal. Para reflejar de forma más fidedigna la naturaleza de estas células, se acordó el término células mesenquimales estromales (CME, MSC) en vez de células madre mesenquimales (*mesenchymal stem cells*, MSC), con el mismo acrónimo en inglés, y se establecieron por parte de la ISCT los criterios de caracterización referidos anteriormente, para evitar confusiones y poder comparar resultados entre diferentes estudios. No obstante, en los cultivos se obtienen poblaciones celulares heterogéneas que pueden aumentar sus diferencias dependiendo de la fuente y del método de expansión, como luego veremos. Además de sus propiedades inmunológicas, las CME pueden tener una amplia aplicación en medicina regenerativa, bien por propia capacidad de diferenciación o debido a otro aspecto, posiblemente más importante, que sería el de facilitar la reparación tisular a partir de células del propio tejido mediante la producción de citocinas.

Características y propiedades funcionales

Inmunofenotipo

Las CME no tienen un marcador inmunofenotípico específico; son negativas para marcadores hemopoyéticos y endoteliales (CD45, CD34, CD14, CD11b, CD33, CD133, CD80, CD86, HLA-DR) y positivas para moléculas de adhesión, receptores de citocinas y factores de crecimiento (CD105, CD73, CD90, CD106, CD166, CD29, CD271).

Se han intentado aislar poblaciones puras de CME a partir de algunos antígenos como CD105, CD73, CD106, STRO-1, anticuerpos antirreceptor para PDGF (plaquetas) y EGF (epitelial), y más recientemente con anti-ZUC3 y CD271.

Propiedades inmunológicas

Las CME poseen propiedades inmunosupresoras y antiinflamatorias y poca capacidad inmunogénica. No expresan ABO, HLA-II, ni moléculas coestimuladoras, y expresan bajos niveles de HLA de clase I. Estas características las protegen de la lisis alorreactiva media-

1. Diferenciarse en células maduras y repoblar el tejido del huésped en la medicina regenerativa.

2. Secretar citocinas y otros mediadores solubles: **inmunosupresión** y control de inflamación.

3. Servir como vehículo para liberación *in situ* de proteínas en la terapia génica.

Aplicaciones en el trasplante hemopoyético

Existen dos aplicaciones fundamentales de las CME en el contexto del trasplante hemopoyético, que son la prevención y tratamiento de la enfermedad del injerto contra huésped y la mejora del prendimiento. Numerosos estudios animales apoyan estos planteamientos.

Actualmente el tratamiento de la EICH aguda refractaria es una de las aplicaciones de las CME con mayor experiencia de uso exitoso en humanos y de eficacia más documentada a nivel clínico. En cualquier caso, existen grandes diferencias en las tasas de respuesta reportadas por los diferentes grupos, entre el 15 y el 83%, y en todos los grupos de pacientes pediátricos las respuestas son mejores. Además, debido a sus características, las CME también pueden tener aplicación en reparación tisular en el contexto de lesiones secundarias a TPH. Este punto, objetivo de la charla, se desarrolla más adelante en las aplicaciones clínicas (Figura 2).

Medicina regenerativa

Las CME han generado mucho interés en el campo de la medicina regenerativa en la última década debido a su potencial de diferenciación en diferentes líneas celulares, su capacidad de migración al lecho del daño tisular tras su infusión intravenosa, su capacidad para estimular la proliferación y diferenciación de las células progenitoras residentes, y promover la recuperación de tejidos dañados a través de la secreción de múltiples citocinas. Por su capacidad de producción y expansión *ex vivo*, CME de MO y también de otras fuentes han sido utilizadas en múltiples ensayos en fase I y II para una gran variedad de patologías no hematológicas, como osteogénesis imperfecta, enfermedad de Hurler, leucodistrofia metacromática, infarto de miocardio, esclerosis lateral amiotrófica, ictus, enfermedad de Crohn, diabetes mellitus, úlceras refractarias, y otras. Se han utilizado localmente para mejorar la cicatrización de lesiones producidas por radiación (radioterapia o accidentes nucleares), de fístulas en enfermedad inflamatoria intestinal; asimismo, hay datos de eficacia en enfermedades autoinmunes.

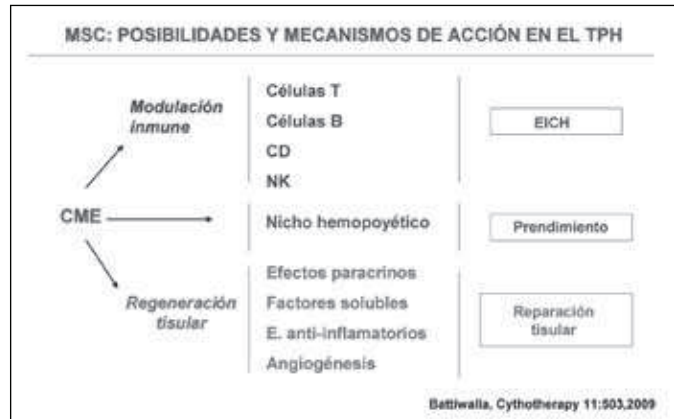


Figura 2. MSC: posibilidades y mecanismos de acción en el TPH.

Recientemente se ha comunicado la presencia de CME infundidas i.v. en sistema nervioso central, demostrando la capacidad de las CME para atravesar la barrera hematoencefálica en su migración a lugares de daño tisular (EBMT 2010), hallazgo de gran importancia para su aplicación en enfermedades neurodegenerativas y como vehículos de terapia génica en patología neurológica.

Mecanismo de acción sistémica

En los numerosos casos de utilización exitosa de CME, tanto en el campo del TPH como en la regeneración tisular, la demostración de prendimiento celular en los tejidos tratados es escasa o nula. No hay evidencia de efecto terapéutico directo mediante prendimiento y diferenciación de las CME a células terminales. En modelos animales, las CME del donante migran inicialmente al pulmón y a otros órganos como el bazo o el intestino, para desaparecer posteriormente. Estudios recientes demuestran que realmente no es necesario un prendimiento eficaz para que las CME ejerzan su efecto, que no actúan como “ladrillos” para “reconstruir” los tejidos, sino que su efecto sistémico se debe a la secreción de factores solubles, que actuarían localmente pero sobre todo a distancia: en definitiva, las CME actúan como *factorías celulares de mediadores solubles* que inducen la reparación tisular o modulan el microambiente para ejercer su efecto terapéutico. Potencialmente es una propiedad ventajosa ya que las células infundidas ejercerían su efecto beneficioso y luego desaparecerían, eliminando el riesgo de inducción posterior de efectos indeseados. Esto explicaría también la habitual necesidad de infusiones repetidas de CME para obtener el efecto terapéutico completo de las mismas.

Si mecanismo fundamental de la actividad biológica de las CME tras la infusión sistémica es la se-

creación de citocinas, son muy trascendentes las características del *método de expansión*, ya que como veremos a continuación ésta puede tener implicaciones importantes en las características finales de las CME obtenidas y su perfil de secreción de citocinas.

Producción para uso clínico

Procedimiento

Existen múltiples y variados procedimientos de expansión y obtención de CME para uso clínico, lo cual dificulta la posibilidad de comparar de manera fiable los resultados entre los diferentes ensayos. Las CME se obtienen habitualmente de médula ósea (MO), a partir de un volumen relativamente pequeño (25-50 mL), mediante cultivo de las células mononucleadas (CMN) separadas por gradiente de densidad. Las CMN se siembran en recipientes cerrados de plástico con medio de cultivo que contenga suero bovino fetal (SBE, FCS) u otros factores de crecimiento. Después de 24-72 horas se retira el sobrenadante con las células no adheridas, hemopoyéticas en su mayor parte, y se añade nuevo medio, dejando las células que se han adherido al plástico (CME). Dicho medio se recambia cada 3-4 días y, cuando las células adherentes confluyen en un 80-90%, se despegan mediante tripsinización, se resuspenden y resiembran hasta conseguir en los sucesivos "pases" la cantidad deseada. Estas CME se pueden criopreservar, ya que conservan adecuadamente su viabilidad y función tras la misma, para utilizarse en el momento que se necesiten.

Variabilidad

Con el procedimiento de expansión obtendremos células de morfología similar, y que cumplan adecuadamente los criterios establecidos por el ISCT, pero van a tener características biológicas diferentes según los diferentes factores del método de obtención:

1. La *fente celular para las CME* (MO, tejido adiposo [AT], membrana amniótica, placenta, cordón umbilical, tejidos fetales, etc.) puede ser fundamental en determinar su actividad biológica. A pesar de su relativa uniformidad morfológica e inmunofenotípica, diferentes estudios de expresión génica muestran que las poblaciones de CME obtenidas de diferentes tejidos son heterogéneas. Las diferentes fuentes de CME podrían generar productos con diferentes perfiles de secreción, y por lo tanto diferentes espectros de acción terapéutica.

2. El método de aislamiento y las condiciones de cultivo para expansión podrán afectar significativamente

el perfil de expresión génica, y por lo tanto su actividad. Estas condiciones incluyen el *medio de cultivo* utilizado (FCS, lisado plaquetario humano (hPL), suero autólogo, etc.), la *densidad celular*, los suplementos de suero, el recipiente de cultivo (plástico), etc. Esto sugiere que los protocolos de procesamiento podrían ser modificados para potenciar o inhibir la expresión de determinados genes y así modular el efecto terapéutico.

3. Recientemente se postulan otros métodos de obtención, mediante *selección positiva con marcadores "específicos"* (CD271), con lo que se obtienen poblaciones de CME con propiedades funcionales diferentes (EBMT 2010, #893).

4. Para su uso alogénico, clásicamente se ha considerado la *edad del donante* como un factor determinante en la posibilidad de obtención de CME en número y calidad adecuada, dada la disminución fisiológica de su cantidad en MO con la edad. Lund y cols. (Tandem Meeting 2010, #152) analizaron las CME obtenidas de MO de donantes de diferentes edades concluyendo que la calidad y capacidad funcional no varía, si bien el crecimiento durante la expansión es algo más lento.

Problemas y potenciales riesgos

El uso del medio estándar, el suero bovino fetal, tiene implicaciones potencialmente peligrosas como son la transmisión de zoonosis o de inmunización xenogénica frente a antígenos animales. Las alternativas investigadas, como el suero autólogo, plasma fresco congelado, medios libres de suero, y el más estudiado *lisado plaquetario humano* (HPL), podrían facilitar en algún caso los protocolos de obtención de CME expandidas, pero con ellos se podrían seleccionar poblaciones de CME distintas de las obtenidas con suero bovino fetal (FCS), con perfil inmunomodulador diferente, como se deduce de los diferentes estudios publicados recientemente (EBMT 2010). En este sentido, en nuestro país el Hospital Universitario de Salamanca lidera el ensayo de utilización de CME expandidas con lisado plaquetario (hPL) en el tratamiento de la EICH aguda y crónica, en el que entre otros centros participa nuestro hospital.

La expansión *ex vivo* de CME puede conducir a inestabilidad genética y potencial transformación tumoral. El uso de CME obtenidas en pases tardíos del proceso de expansión aumenta este riesgo, ya que la transformación en cultivo es un proceso que lleva tiempo. CME obtenidas en cultivo de duración normal y que alcancen < 25 duplicaciones nunca han sufrido transformación. De todas formas, las CME se usan en ensayos clínicos desde 1995, y hay registrados en Cli-

nicalTrials.gov más de 80 ensayos sin que se hayan reportado efectos adversos significativos. En cualquier caso, todos estos riesgos exigen la utilización previa de estudios animales, la aplicación de controles adecuados y utilización de protocolos diseñados por instituciones científicas.

Utilización clínica de las CME en TPH

Las CME forman parte del microambiente del estroma medular. Durante el trasplante alogénico, habitualmente la mayor parte de las CME del receptor sobreviven al acondicionamiento y, analizadas en el postrasplante, continúan siendo de este origen. Aunque en el inóculo la fracción de CME del donante que se infunde es de cuantía parecida a la dosis habitual para favorecer el prendimiento o tratar el EICH ($1-2 \times 10^6/\text{kg}$), curiosamente no sustituyen a las CME del receptor, a pesar de producirse un quimerismo linfohemopoyético completo del donante. Posiblemente esto se deba a factores como su bajo número y su escaso prendimiento detectado tras la infusión sistémica. Se han analizado las diferencias en el prendimiento en los trasplantes alogénicos según la cantidad de CME infundidas del donante en el inóculo, concluyendo (en una serie pequeña) que prendían antes los que recibieron más cantidad de CME (EBMT 2009, #494).

Prendimiento y prevención de la EICH

Como ya se ha referido, los primeros ensayos exploraron la seguridad de la administración de CME autólogas expandidas y su efecto sobre el prendimiento. Koc en 2000 publicó los resultados de 28 mujeres sometidas a trasplante autólogo por carcinoma de mama, con prendimiento muy precoz (mediana CAN > 500 8 días) y excelente tolerancia. El ensayo era abierto, por lo que no pudo demostrar mejoría en el prendimiento.

En 2002 Frassoni presentó en EBMT 31 trasplantes alogénicos HLA-id, en los que $1-2 \times 10^6$ CME/kg del mismo donante de TPH acortaron el prendimiento, con menor incidencia de EICH agudo y crónico respecto a controles históricos y sin aumento de recaídas. Desde entonces se han presentado series heterogéneas de pacientes en las que las CME parecen producir mejoría y acortamiento del prendimiento, incluso en pacientes con fracasos del injerto previos, y disminución de la incidencia de EICH agudo y crónico, y sin evidencia de aumento de las recaídas en la mayoría de los estudios. A este respecto, en 2008 Ning y cols. (Leukemia) publicaron los resultados de su ensayo clínico de coin fusión de CME en TPH alo-

génico, en el que no se demostraba mejoría en el prendimiento, y evidenciaba la prevención de la aparición de EICH agudo, pero se produjo un alto índice de recaídas en el brazo de coin fusión de CME (6/10 frente a 3/15, 60% frente a 20%), resultado que provocó el cierre precoz del ensayo. Curiosamente, la dosis de CME administrada en estos pacientes ($0,03-1,5 \times 10^6/\text{kg}$) es mucho menor a la habitual y utilizada en otras series. Estos resultados de aumento de las recaídas *no se han reportado en otras publicaciones*, pero se hace necesaria la cautela y el trabajo según protocolos controlados y aleatorizados.

Se han utilizado CME generadas con los protocolos desarrollados por el Consorcio para la Expansión Clínica de las CME (Developmental Committee, EBMT) en diversos centros con resultados similares de mejoría del prendimiento, consecución del mismo en pacientes con fallo del implante previo, y disminución de la EICH sin aumento de las infecciones o las recaídas. La tolerancia a la infusión de CME es muy buena, a pesar de no haber compatibilidad HLA entre donante y receptor. No se han descrito acontecimientos adversos graves. Los resultados se resumen en la Tabla 1.

Tratamiento de la EICH aguda refractaria

Desde el mencionado primer caso publicado en 2004 por Le Blanc, ha habido múltiples reportes de series pequeñas de pacientes con respuesta completa a infusiones de CME en EICH aguda refractaria. Hasta este año, la serie más importante publicada era la de K Le Blanc, Lancet 2008, en la que se exponían los 55 pacientes (30 adultos y 25 niños; leucemias 53/55), con EICH aguda grave refractaria a corticoides y diferentes líneas de tratamiento (EICH II/III/IV 5/25/25), tratados con CME generadas con los protocolos desarrollados por el Consorcio para la Expansión Clínica de las CME (Developmental Committee, EBMT), en un ensayo multicéntrico, en fase II. La mediana de CME infundidas fue de $1,4 \times 10^6/\text{kg}$ (0,4-9), de diferentes donantes sin restricción HLA y sin efectos secundarios. Obtuvieron respuestas globales del 69% y completas en el 56% (80% y 64% en niños). La supervivencia a los 2 años de los respondedores fue del 53%, y de los no respondedores, del 16%. Este estudio demostró la eficacia de CME alogénicas independientemente de la identidad HLA del donante, lo que abrió la posibilidad de obtener CME de donantes alogénicos para su eventual utilización en cualquier paciente.

En 2010 se han comunicado los detalles de los esperados estudios de Prochymal, por el alto número de pacientes reclutados en el primer ensayo publicado aleatorizado doble ciego en uso de CME: se analiza el

Tabla 1. Uso clínico MSC: prendimiento y prevención de la EICH

Diagnóstico	Tipo de trasplante	N.º casos	MSC origen Dosis/kg	Resultado	Referencia
Hemopatías malignas	HLA-id MO,SP	31	HLA-id MO 1-2x10 ⁶	Respecto controles históricos <EICHa grado II-IV y <EICHc >supervivencia no ↑ recidiva	Frassoni EBMT 2002, #75
Hemopatías malignas	HLA-id MO, SP	46 (adultos)	HLA-id MO 1-5x10 ⁶	EICHa grado II-IV 28% EICHc 61%	Lazarus Biol Blood Marrow Transplant 2005; 11: 389
LA, SCID, AA	HLA-id, DNE SCU	7 (adultos y niños)	HLA-haplo MO 1x10 ⁶	EICHa grado II→2 (1 desarrolló EICHc) Pocas infecciones bacterianas y CMV	Le Blanc Leukemia 2007; :1733
Hemopatías malignas (11) y otras	HLA-haplo SP	14 (niños)	HLA-haplo MO 1-5x10 ⁶	Respecto a controles históricos EICHa I-II:14% vs. 26% EICHa III-IV 0% vs. 4% EICHc 7% vs. 13% No recidiva > supervivencia	Ball Blood, 2007; 110: 2764
Hemopatías malignas Aleatorizado	HLA-id, MO, SP	10 + MSC 15 sin CME (adultos)	HLA-id MO 0,03-1,53x10 ⁶	Prendimiento igual EICHa II-IV 11,1% vs. 53,3% Recaída 60% vs. 20%	Ning Leukemia 2008; 22: 593
β-talasemia	HLA-id, MO, SP	10	HLA-id, MO 1-2,24 x10 ⁶	No diferencia en EICHa respecto a controles históricos	Ghavamzadeh EBMT 2008, #657
Hemopatías malignas	HLA-id, HLA-haplo NE MO, SP	8	Donante y origen no especificado ¿MO? "Trans-Technology" 2 x10 ⁶	No EICHa II-IV	Stankevich EBMT 2008, #1029
Hemopatías malignas (5) y otros	SCU	9 (niños)	HLA-haplo 1-3,3x10 ⁶	Respecto a controles, no mejor prendimiento No EICHa II-IV vs. 30% No EICHc vs. 5%	Bernardo EBMT 2008, comunicación oral
Hemopatías malignas	SCU + céls. CD34+ de donante auxiliar (trasplante dual)	9 (adultos)	Donante auxiliar HLA-haplo o incompatible MO 1-2,15x10 ⁶	Respecto a controles, no mejor prendimiento de la SCU ni < incidencia de EICHa	Gonzalo-Daganzo EBMT 2008, #1009

resultado de la infusión de CME (obtenidas de *pools* de donantes voluntarios según método de cultivo no detallado) en el tratamiento de EICH agudo refractario a corticoides. Se aleatorizaron 244 pacientes, 2:1, CME vs. placebo (los pacientes podían recibir además tratamiento de 2.ª línea elegido por el centro), a los que se administraban 8 dosis (2 veces a la semana, 4 semanas) de 2 × 10⁶/kg de CME: si había respuesta parcial, se podían administrar otras 4 dosis (semanales). Si la respuesta era completa o no había respuesta, no se administraban más dosis. Se admitía la adminis-

tración de otra tanda de 8 dosis en caso de empeoramiento > 72 h posterior a la respuesta completa. *El objetivo primario fue la RC primaria a los 28 días de la 1.ª infusión.* 244 pacientes con EICH agudo (piel 144, GI 179, hígado 61) recibieron Prochymal 163, placebo 81. No había diferencias en edad, acondicionamiento, fuente celular, identidad HLA o tratamientos de 2.ª línea entre los 2 grupos. En la aleatorización no había diferencias en la distribución de casos salvo en grado IV (general 27% Prochymal vs. 16% placebo, cutánea grado IV 13 pacientes brazo Prochymal y 2 en placebo), con lo que los resultados en este grupo fueron de RG 86% Prochymal vs. 100% placebo. Ésta es posiblemente una de las causas de que no se demuestre diferencia significativa entre Prochymal y placebo en el grupo de afectación cutánea y el grupo general, junto con la elección

Tabla 2. Overall complete or partial response rates in patients according to organ involvement

Organ	Day 100 response rate		Odds ratio	95% CI	P value
	Prochymal	Placebo			
Overall	82%	73%	1.7	0.9-3.1	0.12
Skin	78%	77%	1.1	0.5-2.4	0.9
Liver	76%	47%	3.6	1.1-11.2	< 0.05
Gut	82%	68%	2.2	1.1-4.4	< 0.05

del objetivo primario tan ambicioso. En los pacientes con afectación de 3 órganos hubo RC duradera en 63% vs. 0%, y se demostró menor progresión en el brazo de Prochymal en la afectación hepática. La respuesta fue significativamente mejor en los casos de afectación hepática y digestiva con Prochymal; no así en el global y en la afectación cutánea. Los datos de esta serie se presentan en la Tabla 2.

No hubo diferencias en la tasa de infecciones, de recaídas (8 vs. 9%), en los efectos secundarios ni hubo toxicidad significativa.

Dentro del mismo ensayo se ha publicado un subanálisis de los pacientes pediátricos incluidos (n = 28, entre 6 meses y 17 años), con el mismo diseño, y resultados significativamente favorables para el brazo de CME, tanto en respuesta global como en tasa de progresión y en supervivencia a día 100. No hubo toxicidad ni formación de tejido ectópico (Tabla 3).

Estos datos se confirman en otra serie pediátrica de 59 niños, presentada en Tandem Meeting y EBMT de este año, del uso de Prochymal como acceso expandido del protocolo en pacientes refractarios, con 63% de respuestas globales a día +28, 62% de supervivencia global a día +100, y tolerancia excelente.

También en EBMT 2010 se presentan la implicación del uso de CME en la supervivencia de niños con EICH aguda refractaria tratados con o sin CME ($1 \times 10^6/\text{kg}$ (0,7-1,2) (1 a 5 dosis), con diferencias entre los respondedores frente a los no respondedores en TRM del 10% frente al 83%. En esta serie no hay casos de recaídas en los pacientes tratados con CME (Figura 3).

Los datos de uso de CME en el tratamiento de la EICH se resumen en la Tabla 4.

Utilización en trasplante de sangre de cordón umbilical

La coin fusión de progenitores hemopoyéticos seleccionados de un tercer donante, deplecionadas de células T, como método para acortar el periodo de neutropenia y disminuir las infecciones en pacientes sometidos a trasplante no emparentado de sangre de cordón umbilical, se ha utilizado por nuestro grupo desde 1999, con buenos resultados en cuanto al prendimiento y a la supervivencia global (trasplante "dual") (Bautista, BMT 2009). En un ensayo piloto publicado en Cytotherapy en 2009 se investigó el efecto de la coin fusión de CME del mismo donante auxiliar en el prendimiento y la incidencia de EICH, en un subgrupo de pacientes sometidos a trasplante "dual", sin encontrarse diferencias signi-

Tabla 3. Results for SR-GVHD in children following treatment with Prochymal or placebo

	CR	OR (CR + PR)	Progression	Survival
	Prochymal/Placebo	Prochymal/Placebo	Prochymal/Placebo	Prochymal/Placebo
Day 28	36%/21%	64%/36%	14%/50%	93%/86%
Day 42	57%/21%	64%/50%	29%/43%	79%/79%
Day 100	64%/29%	71%/50%	21%/43%	79%/50%

ficativas en estos parámetros en los 9 pacientes respecto de los 46 del grupo control, aunque no hubo casos de EICH de grados II-IV en el grupo que recibió mesenquimales. Se utilizaron CME como tratamiento en 2 de los pacientes que desarrollaron EICH agudo refractario a corticoides, con resolución completa del mismo.

Tratamiento de la EICH crónica refractaria

En los últimos años se han comunicado casos puntuales de utilización eficaz de CME en el tratamiento de EICH crónica grave refractaria. En este año ha habido dos publicaciones de grupos chinos. Zhou publica, en Biol Blood Marrow Transplant 2010, 4 pacientes con EICH cutáneo esclerodermiforme, tratados con CME expandidas, con mejoría progresiva de la piel en los 4 casos, sin efectos secundarios y sin recaídas. Zhang publica en una revista nacional los resultados de 12 pacientes con EICH crónico refractario, tratados con 3 dosis de aprox $1 \times 10^6/\text{kg}$ de CME, con respuestas globales del 75% y SLE del 92%.

Son datos esperanzadores para pacientes con alta tasa de morbilidad y deterioro importante de la calidad de vida, para los que sería conveniente disponer de resultados avalados por estudios aleatorizados.

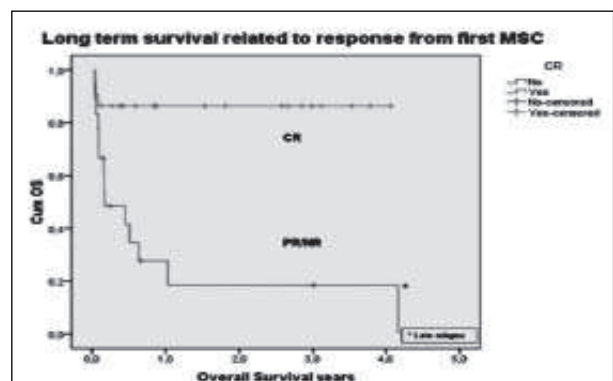


Figura 3. Long term survival related to response from first MSC. LM Ball EBMT 2010, #853.

Tabla 4. Uso clínico MSC: tratamiento de la EICH

Diagnóstico	Tipo de trasplante/ Afectación	N.º casos	MSC origen Dosis/kg	Resultado	Referencia
LLA	HLA-haploid EICHa IV, intestino, hepático	1 (niño)	HLA-haplo MO 2 y 1 x10 ⁶	Respuesta completa	Le Blanc, Lancett 2004; 363: 1439
Hemopatías malignas y Ca próstata	HLA-id, No Emp; SP y SCU EICHa II-IV, 2 post ILD y 1 EICHc	9 (adultos y niños)	HLA-id, y donantes auxiliares incompatibles, MO 0,7 a 9 x10 ⁶	EICHa respuesta completa 6/8, > supervivencia respecto a controles históricos EICHc respuesta transitoria (linfoma EBV)	Ringdén Transplantation 2006; 81: 1390
Hemopatías malignas	HLA-id familiar y NE EICHa III-IV	6 (adultos)	MSC de tejido adiposo, donantes HLA-haplo y NE 1 x10 ⁶	Respuesta completa 5/6 Cuatro pacientes vivos en buen estado clínico. 1 recidiva	Fang Transplantation Proceedings 2007; 39: 3358
Ensayo multicéntrico	SCU y donantes NE EICHa III-IV todos o piel en 6 intestinal + hígado	12 (niños)	CME de donantes auxiliares NE, MO (Prochymal, Osiris) 2 y 8 x10 ⁶ de 3 a 21 dosis	Respuesta global 100%; completa 6 pacientes	Vinod ASH 2007, #2971
Ensayo multicéntrico Consorcio EBMT	EICHa II-IV (II y IV 50 casos)	55 (adultos y niño)	HLA-id, haplo y donante auxiliar incompatible 0,4-9 x10 ⁶	Respuesta completa 55% Respuesta global 69%, adultos 60%, niños 80%; 3 recidivas y una LMA nueva (receptor)	Le Blanc Lancet 2008, May 10; 371 (9624)
Hemopatías malignas	EICHa III-IV	13	CME generadas con lisado plaquetario 0,6-1,1 x10 ⁶ 1 a 5 infusiones	Respuesta completa 15% Respuesta parcial 45% Supervivencia 31% 9 meses	von Bonin Bone Marrow Transplantation (2009) 43, 245-251
Hemopatías malignas	HLA-id, haplo y NE MO y SP EICHa y crónico	9	Donante y origen no especificado ¿MO? "Trans-Technology" 2 x10 ⁶ 1 a 3 dosis	Respuesta global 85%, completa en 3, parcial 3 EICHa y en 1 EICHc. No efectos adversos	Stankevich EBMT 2008, # 1029
Ensayo multicéntrico Prochymal, Osiris	Donantes familiares y NE; ILD EICHa II-IV piel 144, GI 179, hígado 61	244 (adultos)	CME de donantes auxiliares NE, MO (Prochymal, Osiris) Aleatorizado 2:1 (2 CME: 1 placebo) 2 x10 ⁶ ; 8 infusiones	Respuesta global 83% vs. 77%, (76 vs. 47 hígado, 82 vs. 68 intestino), no diferencia en infecciones ni recaídas	Martin, Tandem Meeting 2010 #41, EBMT 2010 #136
Ensayo multicéntrico Prochymal, Osiris, subgrupo pediátrico	Donantes familiares y NE; EICHa II-IV	28 (niños)	CME de donantes auxiliares NE, MO (Prochymal, Osiris) Aleatorizado 2:1 (2 CME: 1 placebo) 2 x10 ⁶ ; 8 infusiones	Remisión Completa 64 vs. 29%, Rglobal 71 vs. 50%, Progresión 21 vs. 43%, SG día 100 79 vs. 50%	Szabolcs Tandem Meeting 2010, #381, EBMT 2010, #137
Acceso expandido Prochymal, Osiris	Donantes familiares y NE; EICHa II-IV, 60% piel, 87% gastrointestinal, 38% hígado	59 (niños)	CME de donantes auxiliares NE, MO (Prochymal, Osiris) 2 x10 ⁶ ; 8 infusiones	Respuesta global día +28 63%, SG día +100 62% Recaídas 3%	Kurtzberg, Tandem Meeting 2010, #40, EBMT 2010, #510

Otras aplicaciones en TPH

Las CME se han utilizado por vía sistémica como tratamiento de toxicidad de acondicionamiento de TPH (cistitis hemorrágicas, neumomediastino, perforación intestinal), con resolución o mejoría de los síntomas en la mayoría de los casos. Asimismo hay comunicado un caso de resolución completa de púrpura trombótica trombocitopénica postrasplante que había sido refractaria a los tratamientos ensayados previamente (EBMT 2009).

Posibles efectos sobre respuesta antiinfecciosa y antitumoral

Debido a su potencial inmunosupresor e inmunomodulador, desde el comienzo de su utilización clínica ha habido expectativas sobre su potencial efecto perjudicial sobre las respuestas antiinfecciosa y antileucémica. En general, en los trabajos publicados no hay descrita mayor incidencia de episodios infecciosos ni de recidivas. No obstante, los datos aportados por la re-

ferida publicación de Ning en 2008, aunque no corroborados por otras series, hace necesaria la cautela y la utilización de las CME dentro de protocolos diseñados por instituciones científicas avaladas.

Conclusiones

Los datos hasta el momento sobre el uso de CME son muy esperanzadores, fundamentalmente en el tratamiento de la EICH aguda refractaria, donde se demuestra su eficacia tras refractariedad a corticoides, mejorando de forma significativa la supervivencia de este grupo de pacientes de por sí con muy mal pronóstico.

A pesar de esto, quedan muchas cuestiones por resolver, entre ellas, la influencia de las variables del método de obtención (número de pases, medios libres de suero, etc.) en las propiedades inmunomoduladoras del producto celular, la estandarización del proceso de expansión, la elección del medio de cultivo y proceso de expansión adecuado para cada indicación, la dosis, frecuencia y vía de administración, qué métodos de control debemos utilizar para asegurar la estabilidad genética y fenotípica de las CME, cuál es el destino final de las CME infundidas, etc.

Un aspecto muy importante y aún por aclarar es la repercusión de las CME sobre la respuesta inmune antiinfecciosa y antileucémica.

La secreción de mediadores solubles parece ser el mecanismo predominante de acción de las CME tras su infusión sistémica.

Podemos deducir que determinadas fuentes celulares y protocolos de procesamiento pueden ser desarrollados para generar poblaciones especiales de CME para un determinado uso terapéutico. Para ello es necesario, además de aplicar en su obtención las Normas de Correcta Fabricación según la legislación vigente, trabajar con protocolos estandarizados y dentro de ensayos diseñados por instituciones científicas, teniendo en cuenta los datos que aporta la investigación básica y según las normas que rigen la buena práctica clínica.

Bibliografía

- Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells* 2007 Nov;25(11):2896-902.
- Wu JY, Scadden DT, Kronenberg HM. Role of the osteoblast lineage in the bone marrow hematopoietic niches. *J Bone Miner Res* 2009 May;24(5):759-64. [PubMed: 19257832]
- Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968 Mar;6(2):230-47. [PubMed: 5654088]
- Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991 Sep;9(5):641-50. [PubMed: 1870029]
- Dominici M, Le BK, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8(4):315-7. [PubMed: 16923606]
- Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nature medicine* 1999 Mar;5(3):309-13.
- Tremain N, Korkko J, Ibberson D, Kopen GC, DiGirolamo C, Phinney DG. MicroSAGE analysis of 2,353 expressed genes in a single cell-derived colony of undifferentiated human mesenchymal stem cells reveals mRNAs of multiple cell lineages. *Stem Cells*. 2001;19(5):408-18. PMID: 11553849
- Rieger K, Marinets O, Fietz T, Korper S, Sommer D, Mucke C, et al. Mesenchymal stem cells remain of host origin even a long time after allogeneic peripheral blood stem cell or bone marrow transplantation. *Experimental hematology* 2005 May;33(5):605-11. [PubMed: 15850839]
- Samuelsson H, Ringden O, Lonnie H, Le Blanc K. Optimizing in vitro conditions for immunomodulation and expansion of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 2009;11(2):129-36. [PubMed: 19152151]
- Le Blanc K, Samuelsson H, Lonnie L, Sundin M, Ringden O. Generation of immunosuppressive mesenchymal stem cells in allogeneic human serum. *Transplantation* 2007 Oct 27;84(8):1055-9. [PubMed: 17989613]
- Prigozhina TB, Khitrin S, Elkin G, Eizik O, Morecki S, Slavin S. Mesenchymal stromal cells lose their immunosuppressive potential after allotransplantation. *Exp Hematol*. 2008 Oct;36(10):1370-6. Epub 2008 Jul 10. PMID: 18619727
- Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, Rosenthal NS, Caplan AI. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone marrow transplantation* 1995 Oct;16(4): [PubMed: 8528172]
- Koc ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI, et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfection of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000 Jan;18(2):307-16. [PubMed: 10637244]
- Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, Curtin P, Maziarz RT, Holland HK, et al. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005 May;11(5):389-98. [PubMed: 15846293]
- Le Blanc K, Samuelsson H, Gustafsson B, Remberger M, Sundberg B, Arvidson J, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia* 2007 Aug;21(8):1733-8. [PubMed: 17541394]
- Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H, Lankester A, Cometa A, Egeler RM, et al. Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood* 2007 Oct 1;110(7): 2764-7. [PubMed: 17638847]
- Macmillan ML, Blazar BR, DeFor TE, Wagner JE. Transplantation of ex-vivo culture-expanded parental haploidentical mesenchymal stem cells to promote engraftment in pediatric recipients of unrelated donor umbilical cord blood: results of a phase I-II clinical trial. *Bone marrow transplantation* 2009 Mar;43(6):447-54. [PubMed: 18955980]

18. Fang B, Li N, Song Y, Li J, Zhao RC, Ma Y. Cotransplantation of haploidentical mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells and to reduce the risk of graft failure in two children with severe aplastic anemia. *Pediatric transplantation*. 2008 Jul 30;
19. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004 May 1;363(9419):1439–41. [PubMed: 15121408]
20. Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lonnie H, et al. Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Therapy-Resistant Graft-versus-Host Disease. *Transplantation* 2006;81(10):1390–7. [PubMed: 16732175]
21. Le Blanc K, Frasson F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 2008 May 10;371(9624):1579–86. [PubMed: 18468541]
22. von Bonin M, Stolzel F, Goedecke A, Richter K, Wuschek N, Holig K, et al. Treatment of refractory acute GVHD with third-party CME expanded in platelet lysate-containing medium. *Bone marrow transplantation* 2009 Feb;43(3):245–51. [PubMed: 18820709]
23. Muller I, Kordowich S, Holzwarth C, Isensee G, Lang P, Neunhoffer F, et al. Application of multipotent mesenchymal stromal cells in pediatric patients following allogeneic stem cell transplantation. *Blood cells, molecules & diseases* 2008 Jan-Feb;40(1):25–32.
24. Ning H, Yang F, Jiang M, Hu L, Feng K, Zhang J, et al. The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study. *Leukemia* 2008 Mar;22(3):593–9. [PubMed: 18185520]
25. P.J. Martin (US) et al. Prochymal® improves response rates in patients with steroid-refractory acute graft-versus-host disease involving the liver and gut: results of a randomized, placebo-controlled, multicentre phase III trial in GvHD Tandem Meeting 2010 #41, EBMT 2010 #136.
26. Szabolcs et al. Treatment of steroid-refractory acute GvHD with mesenchymal stem cells improves outcomes in paediatric patients. Results of the paediatric subset in a phase III randomized, placebo-controlled study. Tandem Meeting 2010, #381, EBMT 2010, #137.
27. Kurtzberg, M.D. US. Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Therapy (Prochymal®) as a Rescue Agent for Treatment Resistant GvHD in Pediatric Patients. Tandem Meeting 2010, #40, EBMT 2010, #510.
28. LM Ball. Children responding to treatment with mesenchymal stromal cells for refractory severe graft versus host disease have excellent long term outcome. EBMT 2010, #853
29. Ringden O, Uzunel M, Sundberg B, Lonnie L, Nava S, Gustafsson J, et al. Tissue repair using allogeneic mesenchymal stem cells for hemorrhagic cystitis, pneumome
30. Bautista G, Cabrera JR, Regidor C, Forés R, García-Marco JA, Ojeda E, et al. Cord blood transplants supported by co-infusion of mobilized hematopoietic stem cells from a third-party donor. *Bone Marrow Transplant*. 2009 Mar, 43(5):365-73. Epub 2008 Oct 13. [PubMed: 18850019]
31. Gonzalo-Daganzo R, Regidor C, Martin-Donaire T, Rico MA, Bautista G, Krsnik I, et al. Results of a pilot study on the use of third-party donor mesenchymal stromal cells in cord blood transplantation in adults. *Cytotherapy* 2009 Mar;23:1–11.
32. Zhou H, Guo M, Bian C, Sun Z, Yang Z, Zeng Y, Ai H, Zhao RC. Efficacy of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of sclerodermatous chronic graft-versus-host disease: clinical report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010 Mar;16(3):403-12. Epub 2009 Nov 17.
33. Zhang LS, Liu QF, Huang K, Zhang Y, Fan ZP, Huang SL. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant chronic graft-versus-host disease [Article in Chinese] *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*. 2009 Jul;48(7):542-6.
34. Battiwalla M, Hematti P. Mesenchymal Stem Cells in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Cytotherapy*, 2009; 11 (5): 503-515.

CYCLOPHOSPHAMIDE-INDUCED TOLERANCE FOLLOWING BONE MARROW TRANSPLANTATION FROM HAPLOIDENTICAL DONORS

P.V. O'DONNELL^{1,2}, E. HARRINGTON¹, T.A. GOOLEY^{1,2}, J.M. PAGEL^{1,2}, S.E. PEREIRA^{1,2}, M.E. FLOWERS^{1,2}, J.A. HANSEN^{1,2}, L.M. BURROUGHS^{1,2}, B.M. SANDMAIER^{1,2}, R.F. STORB^{1,2}, L. LUZNIK³, R.J. JONES³, H.J. SYMONS³, Y.L. KASAMON³, E.J. FUCHS³

Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA (USA)

Introduction

Hematopoietic cell transplantation (HCT) from HLA-mismatched related (haploidentical) donors provides a potentially curative treatment option for patients with hematologic malignancies who lack suitable HLA-matched related or unrelated donors, i.e., about one-third of all potential candidates for HCT. Haploidentical HCT has been associated with significant risks of graft rejection and severe GVHD¹, which are manifestations of excessive alloreactivity by host² and donor T cells³, respectively. The risk of severe GVHD in intensively conditioned recipients may be reduced by use of grafts that have been rigorously depleted of mature T cells or selectively depleted of alloreactive T cells, but the risks of serious infection and death from prolonged immune compromise in these patients remain high⁴. In order to reduce the toxicity of haploidentical BMT, methods to selectively inhibit alloreactivity while preserving immunity to infection and the malignancy are clearly required.

Cyclophosphamide (Cy) is a highly immunosuppressive anti-neoplastic agent that has an established role in conditioning for HCT. Typically, Cy is administered prior to HCT to prevent graft rejection by suppressing the host immune system. However, pre-transplantation conditioning with Cy increases the risk of GVHD following allogeneic T cell infusion in mouse models⁵. In contrast, administration of a properly timed, high dose of Cy after BMT inhibits both graft rejection and GVHD by targeting alloreactive donor and host cells, respective-

ly^{6,7}. In light of this observation, we have conducted Phase II trials of high-dose Cy after nonmyeloablative conditioning and transplantation of non-T cell-depleted, HLA-haploidentical marrow for patients with advanced hematologic malignancies^{8,9}. These trials demonstrated that partially HLA-mismatched bone marrow can engraft rapidly and stably after conditioning that includes post-HCT Cy. The incidences of graft rejection, severe (Grades III/IV) acute GvHD and nonrelapse mortality (NRM) were low and comparable to those observed after transplants from HLA-matched donors. Cumulative incidence of extensive, chronic GvHD appears to depend on the total dose of post-HCT Cy. Treatment failure was due primarily to the high rate of relapse which may approach 45% at 3 years depending on diagnosis. This report summarizes our results to date and describes a novel approach to overcoming relapse by including radiolabeled antibody to CD45 in the conditioning regimen.

Patients and methods

Cohorts of patients with high-risk hematologic malignancies received nonmyeloablative HCT from related haploidentical donors on protocols approved by the Institutional Review Boards at the Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA or Johns Hopkins University, Baltimore, MD as described previously⁹. The conditioning regimen and postgrafting immunosuppression are shown in Figure 1. All patients were intended to be treated as outpatients. Transplantation conditioning was modified from the regimen developed by Storb and colleagues^{10,11} and consisted of Cy 14.5 mg/kg/day IV on days -6 and -5, fludarabine 30 mg/m²/day IV ad-

justed for creatinine clearance on days -6 to -2, and 200 cGy of TBI on day -1 as reported previously⁹. On day 0, patients received donor marrow, which was obtained in a targeted collection of 4×10^8 nucleated cells/kg recipient weight. Allografts were depleted of red blood cells for all patients in the Seattle cohort and only if there was a major ABO incompatibility in the Baltimore cohort. On day 3 (Seattle) or on days 3 and 4 (Baltimore), 50 mg/kg Cy was administered over 90 min together with Mesna (80% dose of Cy in 4 divided doses over 8 hr) by IV infusion. Pharmacologic prophylaxis of GVHD with tacrolimus and mycophenolate mofetil was not initiated until the day following completion of post-HCT Cy to avoid blocking Cy-induced tolerance¹². All patients received tacrolimus, which was initiated at a dose of 1 mg IV daily, adjusted to achieve a therapeutic level of 5-15 ng/mL, and then converted to oral form until discontinuation. In the Seattle cohort, tacrolimus was tapered off by day +180 if there was no significant GvHD; tacrolimus was tapered after day +180 in the Baltimore cohort. All patients received mycophenolate mofetil (MMF) until day 35 at a dose of 15 mg/kg PO three times daily with a maximum daily dose of 3 g. Patients received filgrastim 5 µg/kg/day by subcutaneous injection starting on day 4 and continuing until recovery of neutrophils to >1000/µL for three days.

With the exception of the incidence of extensive chronic GvHD discussed below, other major transplant outcomes did not differ significantly between the Seattle and Baltimore regimens. Unless otherwise specified, only outcomes data from the Seattle cohort of 55 patients (enrolled between 2002 and 2009) who received a single dose of post-HCT Cy will be reported here.

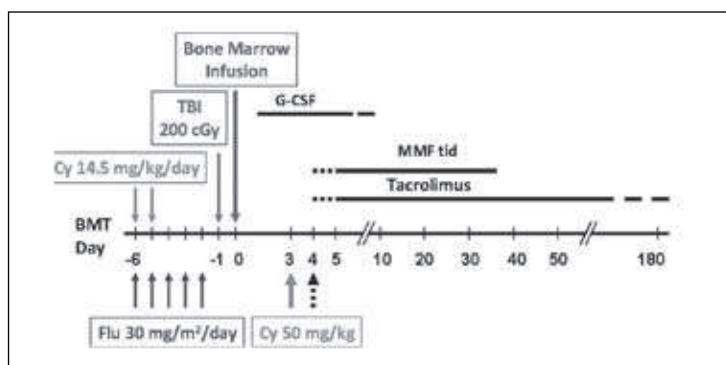


Figure 1. Nonmyeloablative conditioning for haploidentical HCT and postgrafting immunosuppression. Patients received Cy on day +3 (Seattle, solid arrow) or days +3, 4 (Baltimore, dotted arrow). Immunosuppression with tacrolimus or MMF was started on the day after completion of Cy post-HCT indicated by the dotted or solid lines. As described in the text, tacrolimus taper was center-dependent as indicated by the dashed lines.

Results

Patient and donor characteristics are shown in Table 1. The majority of patients (67%) carried the diagnosis of a lymphoid malignancy of which 23 of 37 were patients with Hodgkin's lymphoma who had relapsed after autologous HCT. The relationships of family donors were equally distributed between parents, siblings and children. The median number of HLA-mismatches in the HvG and GvH directions was 5 and 4, respectively.

As shown in Table 2, hematopoietic recovery after high-dose Cy was rapid. In general, primary graft rejection (defined as failure to achieve sustained donor hematopoietic chimerism >5%) was likely

Table 1. Patient and donor characteristics

Patients	
N	55
Median age (range)	40 (18-73)
Sex, M:F	34:21
Diagnosis	
Myeloid (33%)	18
CML	2
AML	16
Lymphoid (67%)	37
ALL	2
NHL	9
HL	23
MM	3
Donors	
Median age (range)	45 (19-66)
Relationship	
Parent	19 (35%)
Sibling	17 (31%)
Child	19 (35%)
Graft (mean cells/kg)	
CD34	5.6×10^6
CD3	4.6×10^7
Median HLA mismatches (range)	
HvG direction	5 (2-5)
GvH direction	4 (2-5)

if patients' T-cells or granulocytes in circulation were not completely donor-derived by day +28. Six of 49 (12%) evaluable patients had primary graft failure. Recovery of autologous hematopoiesis occurred in 5 of those 6 patients. The sixth patient died of bacterial pneumonia prior to autologous recovery.

Although designed as an outpatient procedure, most patients required at least one short hospitalization usually for fever as shown in Table 3. The number of invasive fungal infections was low as we reported previously⁹. There was a high rate of CMV reactivation but with pre-emptive anti-viral therapy no patients developed CMV pneumonitis.

Figure 2 shows the cumulative incidences of GvHD as reported previously⁹. There was a low incidence (9%) of grades III/IV acute GvHD. Almost all Grade II GvHD was mild-moderate affecting the skin or upper GI tract only. The additional dose of post-transplant Cy on day +4 appeared to reduce the incidence of extensive, chronic GvHD to 5-10%. The difference in rates of chronic GvHD has remained unchanged as the number of transplants using each regimen has in-

Table 2. Hematopoietic recovery/engraftment

Median time to hematopoietic recovery (range)	
ANC > 500 × 3 d	12 (10-44)
Platelets > 20,000 × 7 d	20 (0-44)
Failure to engraft, No./No. evaluable (%)	6/49 (12)
Median no. transfusions (range)	
RBC units	4 (0-25)
Platelet products	3 (0-50)
Donor CD3 Chimerism > 95%, No./No. evaluable (%)	
Day +28	41/43 (95)
Day +84	34/36 (94)

creased at each of our centers (currently >150 haplo-identical HCT in the Baltimore cohort). Consequently, the 2-day regimen of post-HCT Cy shown in Figure 1 was selected for a BMT CTN multi-center trial which has just completed accrual with results of the primary endpoint expected in late 2010.

Nonrelapse mortality (NRM) was 21% at day +200 (Figure 3). NRM was observed almost exclusively in patients with lymphoid diseases (11 of 12 patients). Causes of death were polymicrobial infections in 7 patients, GvHD in 2 patients, therapy-related MDS/AML in one lymphoma patient with prior autologous transplantation, diffuse alveolar hemorrhage in one patient, and uncertain etiology in one patient.

Also shown in Figure 3, there was a high rate of relapse occurring in 22/55 (40%) patients at a median of 111 d (range: 18-1070 d) post-HCT. With a median follow-up of 23 months, the actuarial overall (OS) and event-free survival (EFS) at 3 years post-HCT

Table 3. Hospitalizations/Infections

Admissions, No./Total patients (%)	
Median No. (range)	1 (0-5)
Median LOS, days (range)	4 (1-59)
% Fever or infection as reason for adm	63
Opportunistic infections	
Bacterial	
No. documented	62
Most frequent organisms (65% of total)	GPC (40%), C. diff (9%)
	Steno (9%), Pseudo (7%)
Invasive fungal (<i>Aspergillus</i>)	
Proven (days +5, 7, 89, 115)	4/55 (7%)
Probable (days +78, 86)	2/55 (4%)
Viral (CMV)	
Reactivation in high-risk patients (D ± R+)	27/34 (79%)
CMV pneumonitis	None

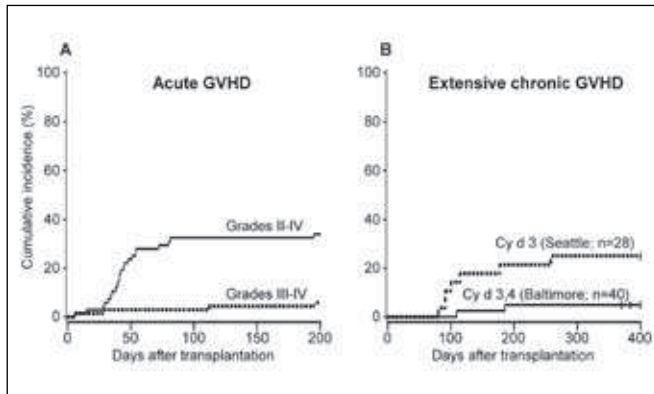


Figure 2. Cumulative incidence of acute and chronic GVHD. (A) Cumulative incidence of acute GVHD grades II-IV and III-IV. (B) Cumulative incidence of extensive chronic GVHD for patients who received one (Seattle) versus two (Baltimore) doses of post-transplant Cy³.

were 37% and 29%, respectively. OS and EFS of the subset of patients with HL who had relapsed following autologous transplantation was significantly better (61% and 41%, respectively; $p=0.04$) when compared to all other patients transplanted on study (Figure 4). We reported previously that survival of HL patients after haploidentical HCT was not worse and possibly better than after HCT from HLA-matched related or unrelated donors¹³.

Intensification of the pre-transplant conditioning regimen might provide more effective antitumor activity for patients with advanced hematologic malignancies. Radiolabeled antibodies which target surface antigens of hematopoietic cells have been shown to be effective agents for treating leukemias and lymphomas by targeting higher doses of radiation to affected tissues than can be achieved with total body irradiation^{14,15}. Accordingly, a Phase I/II dose-escalation study was initiated in Seattle in which an anti-CD45 antibody radiolabeled with ¹³¹I was added to the conditioning regimen of Figure 1 for very high-risk relapsed or refractory leukemia patients. A dosimetry dose was given at day -23 with gamma scans on days -22 to -20. The treatment dose was administered on day -14. To date, 7 patients with refractory leukemias have been treated including 2 patients with blast phase CML. The median doses of radiolabeled antibody to liver and bone marrow were 15 Gy and 9 Gy, respectively, thus rendering the conditioning regimen myeloablative. All patients engrafted with 100% donor-derived T-cells and granulocytes by day +28. Three patients are alive at a median follow-up of one year including the two patients with blast phase CML. Both of these patients also received maintenance therapy post-HCT with a tyrosine kinase inhibitor. One of the surviving CML patients with no prior history of acute or chronic GvHD relapsed in myeloid blast phase about one

year post-transplant. At the time of relapse, HLA-typing of the leukemia showed that it had undergone mutation to uniparental disomy of the HLA region presumably rendering the leukemia resistant to any GvL effect mediated by T-cells of the haploidentical donor, a provocative observation reported recently by other groups studying haploidentical HCT^{16,17}.

Discussion

We have shown that transplantation of bone marrow from haploidentical family members following nonmyeloablative conditioning and post-transplant cyclophosphamide, tacrolimus and MMF can be performed safely as evidenced by successful engraftment and low rates of severe acute and chronic GvHD or NRM. The rates of primary graft rejection (12%) and of severe, grades III/IV GvHD (9%) were similar to the rates of 11% and 7%, respectively, published for nonmyeloablative transplants using HLA-matched, unrelated donors¹¹. The rate of NRM at day +200 was similar to that of patients transplanted from matched donors^{10,11,18}. NRM occurred almost exclusively in patients with lymphomas, primarily due to serious infections. Many of these patients had extensive prior cytotoxic therapy for their recurrent diseases including autologous transplantation and had progressive disease at the time of transplantation, potential risk factors for post-HCT complications. Although increasing degrees of HLA-mismatch between donor and recipient have been associated with greater toxicity and inferior survival after allogeneic HCT, no such effect of HLA mismatching was observed using our approach to haploidentical HCT as we reported recently¹⁹.

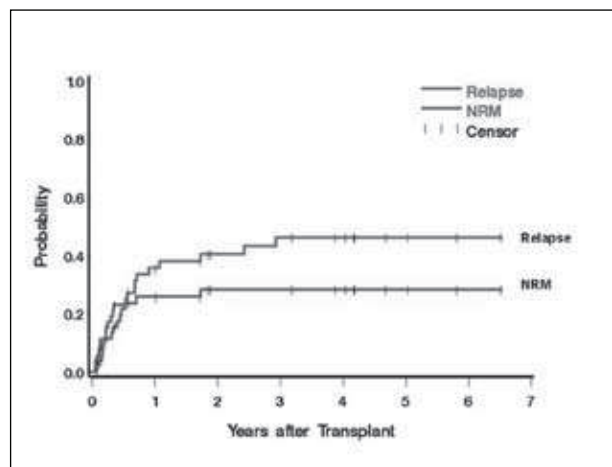


Figure 3. Nonrelapse mortality and relapse among nonmyeloablative haploidentical BMT recipients.

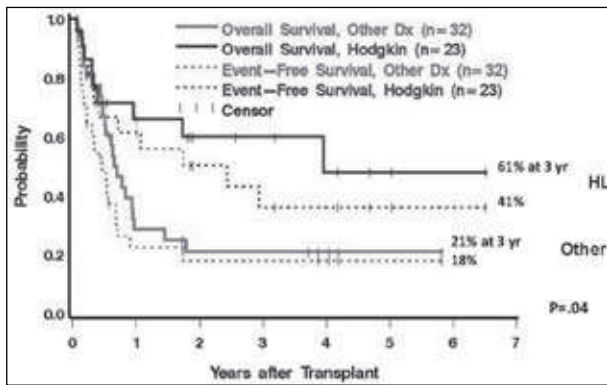


Figure 4. Overall and event-free survival after nonmyeloablative haploidentical HCT for patients with HL versus other patients with myeloid or lymphoid malignancies on study.

Relapse was the main cause of treatment failure in our studies. Although the number of patients transplanted was small, there is a suggestion that patients with lymphoid malignancies, especially patients with HL, may have better survival than patients with myeloid malignancies. Patients with myeloid or lymphoid malignancies who were long-term survivors were either patients with high-risk AML in first complete remission or lymphoma patients who had partial or complete responses to salvage chemotherapy, factors which should be considered in selecting patients for future studies. One possible explanation for the high rate of relapse we observed could be elimination of T-cells that contribute to a GvL effect by administration of high-dose Cy post-HCT. Future strategies to address this possibility could include infusions of alloreactive donor NK cells to augment the GvL effect or infusion of donor T-cells to treat relapse. Enhancement of the antitumor effect by intensifying the pre-HCT conditioning regimen is another strategy which could potentially reduce the incidences of graft failure and relapse if it can be achieved without increasing transplantation-related toxicity. Our preliminary study of myeloablative HCT using radiolabeled antibodies shows promise in this regard. Lastly, use of peripheral blood progenitor cells as the allograft source could potentially enhance the rate of engraftment and antitumor activity as shown for HCT using HLA-matched donors²⁰ and is currently under investigation.

Acknowledgements

This work was supported in part by grants CA15396, CA15704, CA18029, CA78902, HL036444 and HL088021 from the National Institutes of Health, Bethesda, MD. We thank our patients who agreed to participate in these studies and all physicians, mid-level providers, nurses and support staff involved in their care.

References

- Kanda Y, Chiba S, Hirai H et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from family members other than HLA-identical siblings over the last decade (1991-2000). *Blood* 2003;102: 1541-1547.
- Kernan NA, Flomenberg N, Dupont B & O'Reilly RJ. Graft rejection in recipients of T-cell-depleted HLA-nonidentical marrow transplants for leukemia. Identification of host-derived antidonor allocytotoxic T lymphocytes. *Transplantation* 1987;43: 842-847.
- Kernan NA, Collins NM, Juliano L et al. Clonable T lymphocytes in T cell-depleted bone marrow transplants correlate with development of graft-v-host disease. *Blood* 1986;68: 770-773.
- Dey BR, Spitzer TR. Current status of haploidentical stem cell transplantation (Review). *Br J Haematol* 2006;135: 423-437.
- Lehnert S, Rybka WB. Amplification of the graft-versus-host reaction by cyclophosphamide: dependence on timing of drug administration. *Bone Marrow Transplant* 1994;13: 473-477.
- Mayumi H, Umesue M & Nomoto K. Cyclophosphamide-induced immunological tolerance: an overview (Review). *Immunobiology* 1996;195: 129-139.
- Luznik L, Jalla S, Engstrom LW et al. Durable engraftment of major histocompatibility complex-incompatible cells after nonmyeloablative conditioning with fludarabine, low-dose total body irradiation, and posttransplantation cyclophosphamide. *Blood* 2001; 98: 3456-3464.
- O'Donnell PV, Luznik L, Jones RJ et al. Nonmyeloablative bone marrow transplantation from partially HLA-mismatched related donors using posttransplantation cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002;8: 377-386.
- Luznik L, O'Donnell PV, Symons HJ et al. HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, post-transplantation cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14: 641-650.
- McSweeney PA, Niederwieser D, Shizuru JA et al. Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects. *Blood* 2001;97: 3390-3400.
- Maris MB, Niederwieser D, Sandmaier BM et al. HLA-matched unrelated donor hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning for patients with hematologic malignancies. *Blood* 2003;102: 2021-2030.
- Nomoto K, Eto M, Yanaga K et al. Interference with cyclophosphamide-induced skin allograft tolerance by cyclosporin A. *J Immunol* 1992;149: 2668-2674.
- Burroughs LM, O'Donnell PV, Sandmaier BM et al. Comparison of outcomes of HLA-matched related, unrelated, or HLA-haploidentical related hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning for relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14: 1279-1287.
- Shenoi J, Gopal AK, Press OW & Pagel JM. Recent advances in novel radioimmunotherapeutic approaches for allogeneic hematopoietic cell transplantation (Review). *Curr Opin Oncol* 2010;22: 143-149.
- Pagel JM, Gooley TA, Rajendran J et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation after conditioning with 131I-anti-CD45 antibody plus fludarabine and low-dose total body irradiation for elderly patients with advanced acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome. *Blood* 2009;114: 5444-5453.
- Vago L, Perna SK, Zanussi M et al. Loss of mismatched HLA in leukemia after stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 2009;361: 478-488.
- Villalobos IB, Takahashi Y, Akatsuka Y et al. Relapse of leukemia with loss of mismatched HLA resulting from unipa-

- rental disomy after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2010;115: 3158-3161.
18. Sorror M, Storer B, Sandmaier BM et al. Hematopoietic cell transplantation-comorbidity index and Karnofsky performance status are independent predictors of morbidity and mortality after allogeneic nonmyeloablative hematopoietic cell transplantation. *Cancer* 2008;112: 1992-2001.
 19. Kasamon YL, Luznik L, Leffell MS et al. Nonmyeloablative HLA-haploidentical bone marrow transplantation with high-dose posttransplantation cyclophosphamide: effect of HLA disparity on outcome. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;16: 482-489.
 20. 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: 5074-5087.

TRASPLANTE ALOGÉNICO CON ACONDICIONAMIENTO DE INTENSIDAD REDUCIDA (AIR) EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON HEMOPATÍAS MALIGNAS

M.Á. DÍAZ, M. GONZÁLEZ VICENT

*Unidad de Trasplante Hematopoyético
y Terapia Celular. Hospital Infantil Universitario
Niño Jesús. Madrid*

Introducción

El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (TPH) es la única opción curativa para ciertas hemopatías malignas y no malignas en la edad pediátrica. Sin embargo, esta modalidad terapéutica está asociada a una significativa morbimortalidad a pesar de los avances producidos en los últimos años.

Más aún, el TPH está asociado a efectos secundarios a largo plazo que condicionan importantemente la calidad de vida de los pacientes pediátricos que sobreviven y alcanzan la edad adulta. Todo lo anterior justifica plenamente el uso de AIR para el trasplante alogénico.

Pacientes y métodos

Un total de 105 trasplantes alogénicos se realizaron en nuestra institución entre los años 2004 y 2010. La edad media fue de 8 años (1-18) y la mayoría estaban diagnosticados de leucemia aguda. Un total de 52 trasplantes se realizaron en 2.ª RC o fases más avanzadas. Las principales características de los pacientes y de los trasplantes se presentan en las Tablas 1 y 2.

Acondicionamiento

Mayoritariamente se utilizó el consistente en fludarabina 25 mg/m²/día × 5 días, Busulfan i.v. a dosis única diaria ajustada al peso (máximo 8 mg/kg) repartido en dos días y Tiotepa 5 mg/kg/día × 2 días.

Fuente de progenitores

La sangre periférica movilizada fue la única fuente de progenitores. Todos los inóculos fueron manipulados, bien con selección CD34+ o con depleción CD3CD19 (CliniMacs®).

Análisis estadístico

Los puntos de análisis fueron la tasa de injerto hematopoyético, toxicidad y mortalidad relacionada con el procedimiento.

El análisis multivariado de factores que afectan a la supervivencia fue realizado mediante regresión de Cox.

Resultados

El 93% de los pacientes injertaron con una mediana de días hasta injerto leucocitario y plaquetar de 13 (7-34) y 13 (7-70) respectivamente. La estancia mediana fue de 15 días, y el soporte transfusional fue de 2 días tanto para hematíes como para plaquetas.

En 18 casos se observó mucositis grado III-IV; toxicidad hepática fue detectada en 22 casos, sin ningún caso de SOS. 14 pacientes desarrollaron cistitis hemorrágica tardía, y hubo 6 casos de toxicidad neurológica, posiblemente relacionada con la fludarabina.

Enfermedad injerto contra huésped (EICH) aguda grado III-IV fue observada en 13 casos. En 21 casos se

Tabla 1. Características de los pacientes y trasplantes (n = 105)

Edad	8 años (1-18)
(M/F)	38/67
Peso	29 kg (7-76)
Diagnóstico:	
· ALL	58
· AML	30
· Otros	17
Fase de enfermedad:	
· Precoz	53
· Intermedia	32
· Avanzada	20
Seguimiento	28 meses (6 meses-6 años)

Tabla 2. Características de los pacientes y trasplantes (n = 105)

N.º de trasplantes (1 st /2 nd)	93/12
Donante (fam/no fam)	69/36
HLA disparidad:	
· Idéntico	49
· Dispar	29
· Haploidéntico	27
AIR	Flu/Bu/Thio
EICH profilaxis (CsA/Other)	27/70
G-CSF (sí/no)	35/7
Timoglobulina (sí/no)	8/97
CD34+ × 10 ⁶ /kg	6,67 (1-62,7)

diagnosticó EICH en forma crónica, 17 de ellos en su forma extensa.

La mortalidad a día +100 fue del $10 \pm 3\%$, siendo la edad la única variable significativa en el análisis multivariado (HR: 1,19 (1,09-1,37) $p < 0,001$).

Hubo 23 casos de recaída (KM $45 \pm 7\%$). La fase avanzada se asoció a mayor riesgo de recaída (HR: 4,34 (1,85-10,71) $p < 0,001$) y el EICH crónico se asoció a un menor riesgo de recaer (HR: 0,14 (0,03-0,61) $p < 0,009$).

Después de la recaída la principal causa de muerte fue la infección (17 casos), la EICH en 3 casos y otras causas en 2 casos.

La supervivencia libre de enfermedad (SLE) fue del $45 \pm 6\%$. En los pacientes con LLA en 1.^a RC fue del $62 \pm 11\%$ y del $68 \pm 11\%$ en pacientes con LMA en 1.^a RC. El sexo masculino y la fase avanzada al trasplante se asoció con una peor SLE (HR: 2,85 $p 0,025$ y 3,22 $p 0,001$) respectivamente, mientras que el EICH crónico se asoció a una mejor SLE ($p < 0,0001$).

Discusión

Aunque los datos publicados de uso de AIR en pacientes pediátricos son escasos, se puede afirmar que es útil, pero se asocia con una alta tasa de fallo de prendimiento en pacientes con hemopatías no malignas.

Sin embargo, en pacientes con hemopatías malignas, consigue altas tasas de injerto hematopoyético, como es el caso de nuestra serie.

El perfil de toxicidad de nuestro acondicionamiento es bajo, siendo la mucositis leve-moderada y la toxicidad hepática leve las principales toxicidades registra-

das. Esto se refleja en una baja probabilidad de muerte relacionada con el procedimiento. De hecho, la principal causa de muerte fue la infección reflejando probablemente el efecto altamente inmunosupresor del uso de fludarabina a dosis altas y el uso de inóculos manipulados para evitar la EICH aguda.

Uno de los grandes inconvenientes asociados al uso de AIR es la alta tasa de recaídas observadas en pacientes adultos.

Sin embargo, en nuestra serie la probabilidad de recaída puede considerarse normal, máxime teniendo en cuenta que la mitad de los pacientes se trasplantan en 2.^a remisión completa o superior. Además, la mayoría de las recaídas ocurren en estos pacientes, pero aún así la SLE de dichos pacientes está alrededor del 30%.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que el TPH con AIR en pacientes pediátricos presenta una alta tasa de injerto y baja morbimortalidad. Sin embargo, son problemas a resolver la alta tasa de infecciones virales y recaídas en aquellos pacientes trasplantados en fase avanzada de su enfermedad.

Bibliografía

- Gonzalez-Vicent M, Perez A, Abad L, Sevilla J, Ramirez M, Diaz MA. Graft manipulation and reduced-intensity conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from mismatched unrelated and mismatched/haploidentical related donors in pediatric leukemia patients. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2010 Apr;32(3):e85-90.
- Pulsipher MA, Boucher KM, Wall D, Frangoul H, Duval M, Goyal RK, Shaw PJ, Haight AE, Grimley M, Grupp SA, Kletzel M, Kadota R. Reduced-intensity allogeneic transplantation in pediatric patients ineligible for myeloablative therapy: results of the Pediatric Blood and Marrow Transplant Consortium Study ONC0313. *Blood.* 2009 Aug 13;114(7):1429-36. Epub 2009 Jun 15.
- Satwani P, Baldinger L, Freedman J, Jacobson JS, Guerra J, van de Ven C, Morris E, Garvin J, George D, Bradley MB, Bhatia M, Tallamy B, Schwartz J, Jin Z, Cairo MS. Incidence of Viral and fungal infections following busulfan-based reduced-intensity versus myeloablative conditioning in pediatric allogeneic stem cell transplantation recipients. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009 Dec;15(12):1587-95. Epub 2009 Sep 30.
- Satwani P, Cooper N, Rao K, Veys P, Amrolia P. Reduced intensity conditioning and allogeneic stem cell transplantation in childhood malignant and nonmalignant diseases. *Bone Marrow Transplant.* 2008 Jan;41(2):173-82. Epub 2007 Nov 26.
- Verneris MR, Eapen M, Duerst R, Carpenter PA, Burke MJ, Afanasyev BV, Cowan MJ, He W, Krance R, Li CK, Tan PL, Wagner JE, Davies SM. Reduced intensity conditioning regimens for allogeneic transplantation in children with acute lymphoblastic leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010 Mar 16. [Epub ahead of print]

Definición

Defining the Intensity of Conditioning Regimens: Working Definitions

Andrea Bacigalupo, M.D.,¹ Karen Ballen, M.D.,² Doug Rizzo, M.D.,³ Sergio Giralt, M.D.,⁴ Hillard Lazarus, M.D.,⁵ Vincent Ho, M.D.,⁶ Jane Apperley, M.D.,⁷ Shimon Slavin, M.D.,⁸ Marcelo Pasquini, M.D.,² Brenda M. Sandmaier, M.D.,⁹ John Barrett, M.D.,¹⁰ Didier Blaise, M.D.,¹¹ Robert Lowski, M.D.,¹² Mary Horowitz, M.D.²

• Biol Blood Marrow Transplant 2009

Racionalidad

High burden of late effects after haematopoietic stem cell transplantation in childhood: a single-centre study

D Bresters¹, JCM van Gilt¹, WJW Kellen¹, LM Ball¹, W Oostdijk², JG van der Bom³ and RM Egler⁴

¹Department of Pediatric Immunology, Human-Oncology, Bone Marrow Transplantation and Intensive Care, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands; ²Department of Pediatric Endocrinology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands; ³Department of Clinical Epidemiology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands

Logistic regression analyses. Among 162 survivors of HSCT seen in our late effects outpatient clinic, cumulative incidence of late effects was 93.2% after a median follow-up time of 7.2 years (range 2.0–21.0 years) after HSCT. The burden of late effects was mild, moderate, severe and disabling in 28, 41, 24 and 1% of survivors respectively. Risk factors for a severe or disabling burden of late effects were older age at HSCT (*P* for trend <0.001) and a conditioning regimen including irradiation OR 2.2, 95% CI 1.1–4.7, *P*=0.03). In conclusion, a high burden of late effects is found in childhood HSCT survivors after a median follow-up of only 7 years.

Bone Marrow Transplant 2010; 45: 79-85.

Objetivos del AIR

Prevenir rechazo del injerto
Plataforma del efecto injerto contra leucemia
Disminuir las complicaciones a corto y largo plazo

Historia del AIR

A pilot study of reduced intensity conditioning and allogeneic stem cell transplantation from unrelated cord blood and matched family donors in children and adolescent recipients

O Eki Turoz¹, P Satwani², L Harrison³, Y-K Cheung⁴, M Bridg Bradley⁵, D George⁶, EM Yantoshko⁷, J Garvin⁸, D Skovron⁹, O Bonmarat¹⁰, K Wolowick¹¹, C Winkelbauer¹², C van de Ven¹³ and MS Cairo¹⁴

¹Department of Pediatrics, Children's Hospital, New York-Presbyterian, Herbert Irving Comprehensive Cancer Center, Columbia University, New York, NY, USA; ²Department of Biostatistics, Children's Hospital, New York-Presbyterian, Herbert Irving Comprehensive Cancer Center, Columbia University, New York, NY, USA; ³Department of Pathology, Children's Hospital, New York-Presbyterian, Herbert Irving Comprehensive Cancer Center, Columbia University, New York, NY, USA; ⁴Department of Radiation Medicine, Children's Hospital, New York-Presbyterian, Herbert Irving Comprehensive Cancer Center, Columbia University, New York, NY, USA; ⁵Department of Pediatrics, Children's Hospital, New York-Presbyterian, Herbert Irving Comprehensive Cancer Center, Columbia University, New York, NY, USA; ⁶Department of Pediatrics, Children's Hospital, New York-Presbyterian, Herbert Irving Comprehensive Cancer Center, Columbia University, New York, NY, USA; ⁷Department of Pediatrics, Children's Hospital, New York-Presbyterian, Herbert Irving Comprehensive Cancer Center, Columbia University, New York, NY, USA; ⁸Department of Pediatrics, Children's Hospital, New York-Presbyterian, Herbert Irving Comprehensive Cancer Center, Columbia University, New York, NY, USA; ⁹Department of Pediatrics, Children's Hospital, New York-Presbyterian, Herbert Irving Comprehensive Cancer Center, Columbia University, New York, NY, USA; ¹⁰Department of Pediatrics, Children's Hospital, New York-Presbyterian, Herbert Irving Comprehensive Cancer Center, Columbia University, New York, NY, USA; ¹¹Department of Pediatrics, Children's Hospital, New York-Presbyterian, Herbert Irving Comprehensive Cancer Center, Columbia University, New York, NY, USA; ¹²Department of Pediatrics, Children's Hospital, New York-Presbyterian, Herbert Irving Comprehensive Cancer Center, Columbia University, New York, NY, USA; ¹³Department of Pediatrics, Children's Hospital, New York-Presbyterian, Herbert Irving Comprehensive Cancer Center, Columbia University, New York, NY, USA; ¹⁴Department of Pediatrics, Children's Hospital, New York-Presbyterian, Herbert Irving Comprehensive Cancer Center, Columbia University, New York, NY, USA

failure occurred in 5/21 (24%). In summary, RI AlloSCT in children is feasible and tolerable (≤25% GF) and results in ≥85% of recipients initially achieving ≥50% donor chimerism.

Historia del AIR

Reduced intensity allogeneic umbilical cord blood transplantation in children and adolescent recipients with malignant and non-malignant diseases

MB Bradley^{1,2}, P Satwani^{1,2}, L Baldinger³, E Morris⁴, C van de Ven⁵, G Del Toro⁶, J Garvin⁷, D George⁸, M Bhatta⁹, E Roman¹⁰, LA Baxter-Lowe¹¹, J Schwartz¹², E Qualter¹³, R Hawks¹⁴, K Wolowick¹⁵, S Foley¹⁶, O Militano¹⁷, J Leclerc¹⁸, Y-K Cheung¹⁹ and MS Cairo^{1,2,4,6,8}

Bone Marrow Transplant 2007; 40: 621-631.



Experiencia del Hospital Niño
Jesus:
2004-2010

Características (n=105)

Edad	8 años (1-18)
(M/F)	38 / 67
Peso	29 kg (7-76)
Diagnóstico:	
- ALL	58
- AML	30
- Otros	17
Fase de enfermedad:	
-Precoz	53
-Intermedia	32
- Avanzada	20
Seguimiento	28 months (6 mes-6 años)

Características Trasplante (n=105)

Nº de transplant (1º/ 2º)	93 / 12
Donante (Fam/No Fam)	69 / 36
HLA disparidad:	
- Idéntico	49
- Dispar	29
- Haploidéntico	27
AIR	Flu/Bu/Thio
GVHD profilaxis (CsA/Other)	27 / 70
G-CSF (sí/no)	35 / 7
Thymoglobulin (sí/no)	8 / 97
CD34+ x 10 ⁶ /kg	6.67 (1-62.7)

Injerto hematopoyético: 93%

Injerto Neutofilos	13 d (7-34)
Injerto Plat 20	13 d (7-70)
Injerto Plat 50	16 d (7-159)
Injerto Plat 100	25 d (7-365)

Soporte clínico

Trasfusión Hematíes	2 d (0-25)
Trasfusión Plat	2 d (0-50)
Estancia hospitalaria	15 d (9-85)

Toxicidad

Mucositis III-IV	18 casos
Hepatica leve-moderada	22 casos
Cistitis hemorrágica	14 casos
Neurológica	6 casos

EICH

Aguda total	27 casos
III-IV	13 casos
Crónica total	21 casos
Extenso	17 casos

MRT

Día + 100	10 ± 3%	
Global	25 ± 5%	
Analisis Multivariado:	HR	Valor p
-Edad	1.19 (1.09-1.37)	0.001

Recaída

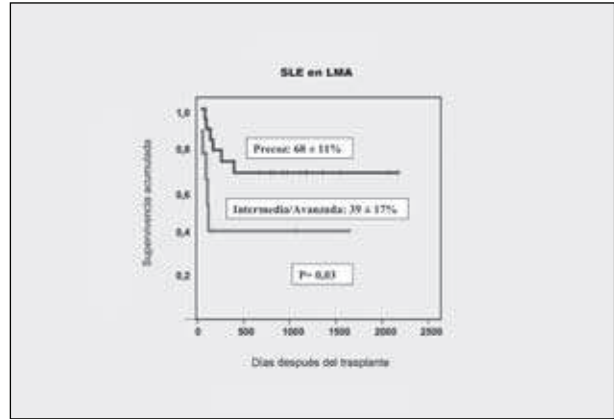
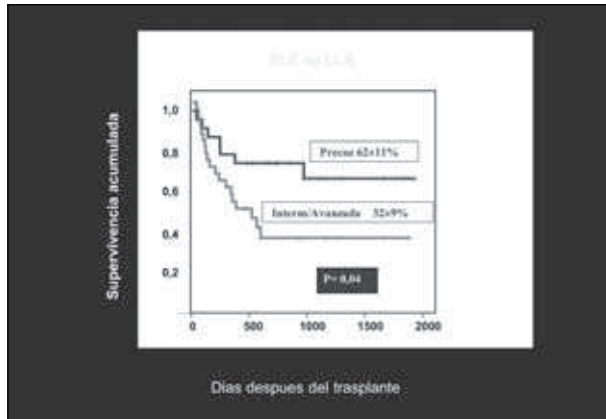
Probabilidad	45 ± 7%	
Analisis multivariado:	HR 95% IC	Valor P
- Fase Avanzada	4.34 (1.85-10.21)	0.001
- EICH crónico	0.14 (0.03-0.61)	0.009

Causas de muerte (n=45)

Recaída	23
Infección	17
EICH	3
Otras	2

SLE

Probabilidad	45 ± 8%	
Analisis multivariado:	HR 95% IC	Valor P
-Masculino	2.85 (1.14-7.13)	0.025
-Fase avanzada	3.22 (1.59-6.50)	0.001
-EICH crónico	0.05 (0.01-0.22)	0.0001



Conclusiones

- El uso de AIR en pacientes pediátricos se asocia a una baja posibilidad de fallo de injerto
- Perfil de toxicidad muy bajo
- MRT baja pero asociada a infección viral
- Alta probabilidad de recidiva en pacientes con fase avanzada

GESTIÓN DE CALIDAD Y ACREDITACIÓN DE LOS PROGRAMAS DE TRASPLANTE: RETOS Y REALIDADES

P. BALSALOBRE, C. MUÑOZ, J. ANGUIA, J. GAYOSO, J.L. DÍEZ-MARTÍN

Servicio de Hematología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid

Introducción

JACIE, acrónimo de Joint Accreditation Committee-ISCT (International Society for Cell Therapy) & EBMT (European Group for Blood and Marrow Transplantation), es el programa de acreditación de referencia para equipos de trasplante hematopoyético (TPH) en el entorno europeo. Este sistema de acreditación tiene como objetivo el reconocimiento explícito e internacional de los programas de trasplante, a nivel clínico y de laboratorio, con unas prácticas organizacionales internacionalmente homologables. Para ello los equipos tienen que demostrar el cumplimiento de una serie de estándares establecidos por las sociedades científicas implicadas, incluyendo la implantación de un sistema

de gestión de calidad que asegure la monitorización y mejora continua del programa en cuestión. En último término, este sistema de acreditación, hoy voluntario en nuestro país, pretende ser un incentivo para la promoción de una atención de alta calidad al paciente con TPH, sin menoscabo de que a corto-medio plazo, en el seno de la Alliance for the Harmonisation of Cellular Therapy Accreditation (AHCTA), sirva para acreditar el cumplimiento de los requerimientos mínimos para proveer/implantar inóculos celulares procedentes de terceros centros, nacionales o internacionales. En junio de 2010, 91 programas de TPH contaban con la acreditación JACIE (7 de los cuales eran españoles), y 26 se encontraban en proceso de reacreditación.

A nivel nacional, este programa de acreditación se ha articulado en torno al Comité Conjunto de Acreditación, en virtud del acuerdo que, con fecha 31 de octubre de 2006, se firmó entre JACIE, el Comité de Acreditación de Transfusión, Terapia Celular y Tisular (CAT), y la Organización Nacional de Trasplantes (ONT), con el visto bueno de la Comisión de Trasplantes del Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud.

Aunque en la mayoría de los países el programa de acreditación JACIE es en la actualidad algo optativo, algunos como Francia, Suiza, Holanda o Inglaterra están incorporando formalmente la acreditación JACIE como un requerimiento para la autorización, financiación o selección de programas de TPH.

En nuestro país, la autorización administrativa preceptiva para iniciar un programa de TPH es una competencia autonómica regulada por el Real Decreto 1301/2006, de 10 de noviembre, por el que se establecen las normas de calidad y seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos, y se aprueban las normas de coordinación y funcionamiento para su uso en humanos. La publicación de este RD supuso un salto cualitativo, respecto a la legislación anterior, en relación con el requerimiento de contar con un sistema de

gestión de calidad para la autorización de programas de trasplante de células y tejidos, al menos en lo que al subprograma de procesamiento, almacenamiento y distribución de células y tejidos se refiere.

Estándares de acreditación

Como se ha comentado anteriormente, el proceso de acreditación implica el reconocimiento formal del cumplimiento con una serie de estándares, lo cual requiere una evaluación de la documentación aportada por la unidad solicitante y una inspección local por parte de inspectores con cualificación y experiencia demostrada en el ámbito clínico y de laboratorio del trasplante hematopoyético, y con formación específica como inspectores JACIE/CAT. En la actualidad está vigente la primera edición de los Estándares para la Obtención, Procesamiento y Administración de Productos de Terapia Celular, editada en 2009 por el CCA. Estos estándares son el resultado de la armonización de los estándares de JACIE (4.^a edición, 2008) y de CAT (3.^a edición, 2007), en virtud de lo cual y del acuerdo que desembocó en la creación del CCA, la consecución de la acreditación CCA implica automáticamente la obtención de la emitida por CAT y JACIE.

A grandes rasgos, los estándares CCA están estructurados en 3 áreas, las correspondientes a los programas Clínico, de Obtención y de Procesamiento, almacenamiento y distribución de productos de terapia celular. Además, los estándares incorporan un apartado dedicado a terminología y definiciones operativas, así como una serie de apéndices y anexos. En cuanto al contenido de los estándares, las tres áreas comparten requerimientos relativos a la unidad, personal, gestión de calidad y normativa y procedimientos, los cuales se complementan con otros de índole más específica (selección y evaluación de donantes, investigación, gestión de datos y registros, etiquetado, almacenamiento, distribución y biovigilancia, entre otros).

Proceso de acreditación

La acreditación de los programas de TPH puede obtenerse globalmente o para cada uno de los subprogramas (Clínico, Obtención y Procesamiento, almacenamiento y distribución de productos de terapia celular). La acreditación de un subprograma clínico de forma independiente está condicionada a su vinculación funcional a subprogramas de Obtención y Procesamiento acreditados, los cuales pueden dar servicio a uno o varios subprogramas clínicos, acreditados o no. Asimismo, el alcance de la acreditación puede ser para procedimientos autólogos y/o alogénicos, para pacientes adultos y/o pediátricos y, en el caso del subprograma

de Obtención, para progenitores hematopoyéticos de médula ósea y/o sangre periférica.

A grandes rasgos, el proceso de acreditación incluye la solicitud de la misma y el pago de las tasas, el envío de la documentación pre-inspección (incluyendo una autoevaluación en relación con el cumplimiento de los estándares), la auditoría presencial, la elaboración del informe y la corrección de desviaciones y, finalmente, la resolución sobre la acreditación del programa solicitante.

La Secretaría Técnica del CCA, ubicada en la ONT, es la estructura administrativa habilitada para canalizar las solicitudes de acreditación por el CCA. Dichas solicitudes tienen que estar refrendadas por el director del centro de transfusión u hospital en el que se encuentra la unidad solicitante, la cual debe estar autorizada por el organismo autonómico competente para el desarrollo de la actividad cuya acreditación se solicita. Ratificado el cumplimiento por parte del centro solicitante de los requerimientos mínimos para la acreditación, el procedimiento de acreditación se pondrá en marcha y se notificará a la Coordinación Autonómica de Trasplantes que proceda. La auditoría por parte de los inspectores JACIE (para el subprograma clínico) y CAT (para los subprogramas de Obtención y Procesamiento), a los que se sumarán observadores de la ONT y la coordinación autonómica de trasplantes, se realizará en el plazo de 6 meses, previa aportación de la documentación requerida por el equipo auditor, y configuración de un programa preliminar de auditoría con al menos 15 días de antelación.

El resultado de la auditoría será comunicado de forma preliminar al centro y, de forma más detallada en relación con las desviaciones detectadas respecto a los estándares, a JACIE y CAT. Recogidas las aportaciones de ambos organismos, el informe definitivo de auditoría, incluyendo el dictamen y las eventuales deficiencias subsidiarias de subsanación, será remitido por el CCA al centro. Acreditada la resolución de las deficiencias detectadas, el dictamen definitivo que condicionará la emisión del certificado de acreditación, incluyendo el alcance y la validez de la misma, será emitido por el CCA.

Desde el año 2009, la acreditación es válida por un periodo de 4 años, si bien, transcurridos 2 años, los programas acreditados o reacreditados con posterioridad a dicha fecha serán sometidos a una auditoría interna centrada en el funcionamiento del sistema de calidad (formación continuada, reuniones del comité de calidad y revisión por la dirección, auditorías, revisión documental, evaluación de resultados, corrección de no conformidades etc.). Las deficiencias eventualmente encontradas en dicha auditoría deberán ser corregidas satisfactoriamente en un plazo razonable ya que, de lo contrario, el certificado de acreditación podría ser revocado.

Experiencia del Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM)

El Servicio de Hematología y Hemoterapia del HGUGM, en una clara apuesta por la calidad de su cartera de servicios, desde el año 2006 ha avanzado en la certificación según la norma ISO 9001 de sus laboratorios, la acreditación CAT del Banco de Sangre, y más recientemente en la acreditación CCA de su Programa de TPH.

La Unidad de TPH del HGUGM inició su actividad en julio de 1996. Actualmente cuenta con autorización para realizar trasplante autólogo y alogénico (familiar y no emparentado), de sangre periférica, médula ósea y sangre de cordón umbilical (SCU). Desde que el 7 de octubre de 1996 se hiciese el primer trasplante autólogo en nuestra unidad, progresivamente se han incorporado a la cartera de servicios de la misma nuevas modalidades de TPH: AloTPH de hermano HLA idéntico (con y sin manipulación inmuno-magnética del injerto), Mini-AloTPH, AloTPH de donante familiar no idéntico y AloTPH de donante no emparentado adulto y SCU, así como procedimientos terapéuticos de base inmunoterápica (infusión de linfocitos del donante e infusión de células mesenquimales, estas últimas en un contexto experimental). En la actualidad, en nuestra unidad se realizan 45-50 TPH/año, un 40-50% de los mismos alogénicos.

En octubre 2007, tras la contratación de una consultora externa y la designación de un puesto de Enfermería de apoyo vinculado a la Coordinación de TPH, iniciamos el proceso de acreditación CCA del programa de TPH, en sus áreas Clínica y de Obtención, Procesamiento y Almacenamiento (OPA) de productos de terapia celular. En primer lugar, hubo que proceder al rediseño del sistema de calidad del servicio, con el objeto de integrar los programas de certificación ISO de los laboratorios y de acreditación CAT del Banco de Sangre y CCA del programa de TPH. A partir de este momento, y más concretamente en relación con los requerimientos de la acreditación por el CCA, se procedió a:

1. Definir el alcance de la acreditación.
2. Difundir el programa entre todos los profesionales implicados.
3. Diseñar los procesos para cada tipo de trasplante (autólogo, alogénico e infusión de linfocitos del donante y otras células para terapia celular (Figura 1), así como su interrelación con el resto de procesos del sistema general de calidad.
4. Definir los indicadores de calidad a implantar.
5. Revisar el Manual de Calidad existente, ajustándolo al nuevo alcance.
6. Revisar los protocolos existentes, estandarizándolos y codificándolos de acuerdo con un formato normalizado, así como identificar y elaborar los documentos pendientes.
7. Identificar y definir los perfiles de puesto de trabajo: director del Programa de TPH, médico especia-

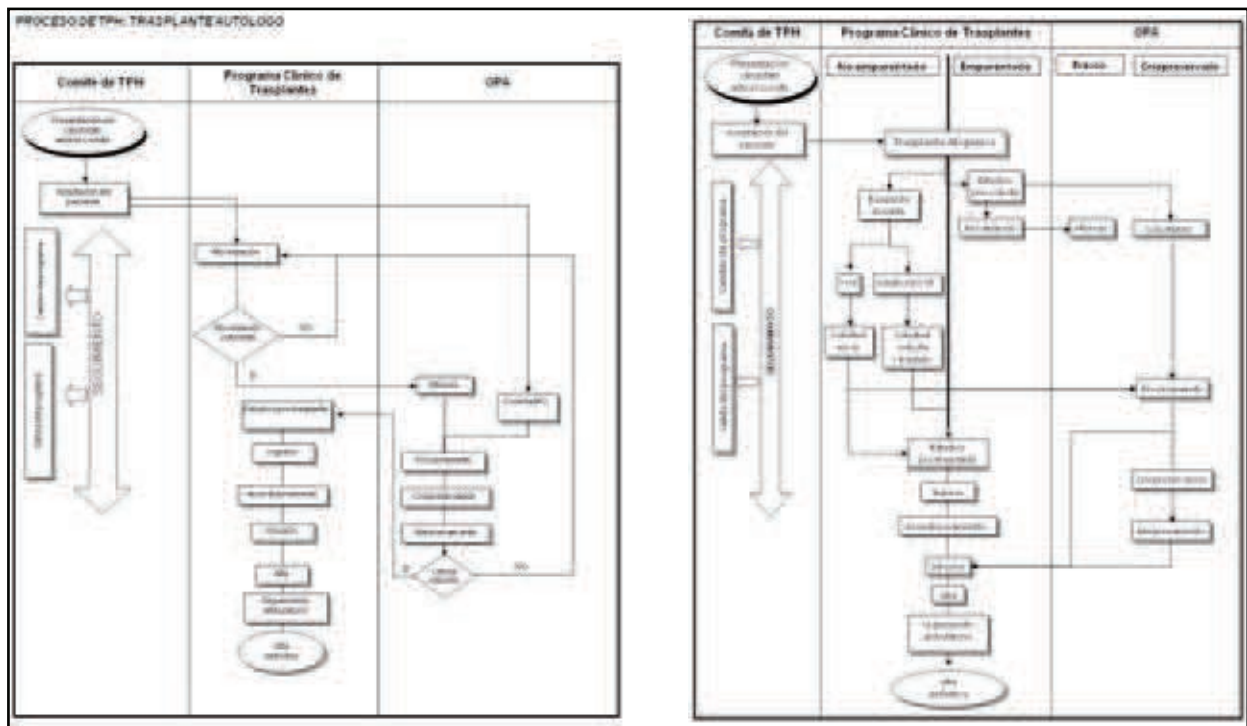


Figura 1. Procesos de trasplante.

lista en TPH, médico en formación, coordinador de TPH, jefe de Unidad de TPH, enfermera y auxiliar especialistas en TPH, identificando las responsabilidades operativas de cada uno de los mismos en su práctica habitual.

8. Elaborar un plan de formación continua para todos los profesionales implicados, tanto expertos como sin experiencia previa en el manejo de pacientes con TPH.

9. Redactar manuales de bienvenida para el personal de nueva incorporación.

10. Elaborar estudios de satisfacción de clientes, tanto en pacientes como en donantes y médicos proveedores de pacientes candidatos a TPH.

11. Identificar y evaluar a proveedores que dan apoyo al programa de TPH.

12. Definir el plan de mantenimiento y calibración/verificación de los equipos del Programa.

13. Implantar un *software* para la gestión documental relacionada con el sistema de calidad, incluyendo el registro de incidencias y su posterior análisis y abordaje preventivo y correctivo.

La auditoría externa, celebrada en marzo de 2010, identificó algunas no conformidades, entre las que destacaban la ausencia de una zona especialmente designada para proteger al paciente de la transmisión de agentes infecciosos en el área de consultas (estándar B.2.2); la falta de procedimientos estandarizados para el manejo de complicaciones post-TPH tales como el fracaso del injerto, la cistitis hemorrágica, etc. (estándar B.3.4.3.); la ausencia de un mecanismo de transmisión fehaciente de la información sobre la elegibilidad del donante a la Unidad de OPA (estándar B.6.7.6); la falta de evidencia sobre la revisión sistemática del tiempo de implante tras la infusión de células progenitoras por parte de la Unidad de OPA (estándar D.4.7.1); y la necesidad de informar de forma fehaciente a pacientes y donantes sobre la política de conservación y eliminación de los productos celulares (estándar D.9.2.1.1).

Discusión y conclusiones

La cultura de la calidad en el ámbito sanitario, tanto en el contexto de los laboratorios como en el contexto clínico más recientemente, tiene una implantación creciente. La homogeneización de la práctica, la evaluación y mejora continua, la validación de la formación y la cualificación profesional, la coordinación, el control de proveedores, la orientación al paciente, etc., son elementos todos que van a condicionar de forma crítica la forma de gestionar el TPH en un entorno cada vez más globalizado. Ello exige, no sólo

un cambio de cultura, sino también una gran inversión en recursos humanos, formativos y operativos, cuyo impacto en el resultado final tendrá que evaluarse formalmente en los años venideros. Algunas aproximaciones a los beneficios percibidos de este esfuerzo han apuntado hacia una mejora en los procedimientos, la coordinación, la motivación de los profesionales y la seguridad en los pacientes [Pamphilon D, Hematol Oncol Stem Cell Ther 2009]. Resultados preliminares sobre el impacto intra-centro del proceso de acreditación JACIE en términos de resultados post-AloTPH han sido recientemente comunicados por A. Gratwohl *et al.* De acuerdo con este análisis, los resultados en los centros acreditados mejoraron a lo largo del tiempo (periodo pre y post-acreditación) en torno a un 20% para la supervivencia global y la incidencia de recaída, y un 10% en relación con la mortalidad no relacionada con la recaída. Si estos resultados se confirman, es razonable pensar que la acreditación JACIE, CCA o similar terminará por configurarse como un criterio de obligado cumplimiento en la regulación legislativo-administrativa del ámbito del TPH.

Bibliografía

- Apperley J. Just another cost increasing exercise (JACIE)? Bone Marrow Transplant 2004 Nov;34(10):835-8.
- Ferrà C, Jiménez-Lorenzo MJ, Feliu E, Ribera JM. Analysis of the implementation of a Joint Accreditation Committee of the International Society for Cellular Therapy and European Group for Blood and Marrow Transplantation accreditation in a clinical program of hematopoietic progenitor cell transplantation. Med Clin 2010 [en prensa]
- Gratwohl A, Brand R, Niederwieser D, Baldomero H, Chabannon C *et al.* Impact of JACIE accreditation on outcome after haematopoietic stem cell transplantation: an EBMT megafile analysis. Bone Marrow Transplant 2010;45 (Issue S2): S1-S77
- Muñoz C, Balsalobre P, Gayoso J, Anguita J, Arellano A *et al.* A quality management programme to get JACIE accreditation in a haematopoietic transplant unit: a single centre experience led by nurses. Bone Marrow Transplant 2010;45 (Issue S2): S345-S380
- Pamphilon D, Apperley JF, Samson D, Slaper-Cortenbach I, McGrath E. JACIE Accreditation in 2008: Demonstrating Excellence in Stem Cell Transplantation. Hematol Oncol Stem Cell Ther 2009;2(2):311-9.
- Zahnd D, Leibundgut K, Zenhausem R *et al.* Implementation of the JACIE standards for a haematopoietic progenitor cell transplantation program: a cost-analysis. Bone Marrow Transplant 2004; 34: 847-853.
- Página web de JACIE: <http://www.jacie.org>
- Página web del Comité Conjunto de Acreditación: <http://www.ont.es/infesp/Paginas/ComiteConjuntodeAcreditacion.aspx>
- Estándares para la Obtención, Procesamiento y Administración de Productos de Terapia Celular. Comité Conjunto de Acreditación 1a edición. 2009.
- Manual de Acreditación y Evaluación. Obtención, Procesamiento y Administración de Productos de Terapia Celular. Comité Conjunto de Acreditación 1a edición. 2009.

Avances en la biología y tratamiento de la leucemia linfática crónica

COORDINADORES: J.A. GARCÍA MARCO. *Madrid*
A. SUÁREZ. *Las Palmas de Gran Canaria*

MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTENCIA AL TRATAMIENTO EN LA LLC

M.Á. PIRIS

Molecular Pathology Program.

Spanish National Cancer Research Centre (CNIO)

El conocimiento sobre la patogenia molecular de la leucemia linfocítica crónica (LLC)¹ es aún escaso y no ha sido trasladado al campo de la terapia dirigida.

No obstante, existe un razonable grado de evidencia sobre el papel esencial del receptor de células B en la supervivencia de las células neoplásicas²⁻⁵, su relación con la presencia de mutaciones somáticas de los genes IgVH, así como sobre la relevancia de las células no linfoides que componen el microambiente de los centros de proliferación⁶.

Algunas de las lagunas más llamativas en el conocimiento de la LLC son:

- Identificación de mecanismos de activación anómala del receptor de células B, o de señalización desde el mismo.
- Identificación del papel del estroma en la supervivencia de las células neoplásicas.
- Diferencias entre linfocitos de sangre periférica y linfocitos en el ambiente de la médula ósea o ganglio linfático.
- Ausencia de modelos que permitan estudios de farmacodinamia *in vivo*.

No obstante, existen áreas de progreso, cuyos resultados se expondrán durante la reunión.

Algunas de las dianas moleculares en las que existen datos estimulantes, que serán discutidos durante la reunión, son:

- PI3K.
- Moléculas antiapoptosis, como BCL2 y MCL1⁷.

- PIM⁸.
- SYK^{4,7,9}.
- Activación por Ca.

Bibliografía

1. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. Jun 15 2008;111(12):5446-5456.
2. Rodriguez A, Villuendas R, Yanez L, et al. Molecular heterogeneity in chronic lymphocytic leukemia is dependent on BCR signaling: clinical correlation. *Leukemia*. Sep 2007;21(9):1984-1991.
3. Herling M, Patel KA, Weit N, et al. High TCL1 levels are a marker of B-cell receptor pathway responsiveness and adverse outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. Nov 19 2009;114(21):4675-4686.
4. Quiroga MP, Balakrishnan K, Kurtova AV, et al. B-cell antigen receptor signaling enhances chronic lymphocytic leukemia cell migration and survival: specific targeting with a novel spleen tyrosine kinase inhibitor, R406. *Blood*. Jul 30 2009;114(5):1029-1037.
5. Ghia P, Chiorazzi N, Stamatopoulos K. Microenvironmental influences in chronic lymphocytic leukaemia: the role of antigen stimulation. *J Intern Med*. Dec 2008;264(6):549-562.
6. Herreros B, Rodriguez-Pinilla SM, Pajares R, et al. Proliferation centers in chronic lymphocytic leukemia: the niche where NF-kappaB activation takes place. *Leukemia*. Apr;24(4):872-876.
7. Baudot AD, Jeandel PY, Mouska X, et al. The tyrosine kinase Syk regulates the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells through PKCdelta and proteasome-dependent regulation of Mcl-1 expression. *Oncogene*. Sep 17 2009;28(37):3261-3273.
8. Chen LS, Redkar S, Bearss D, Wierda WG, Gandhi V. Pim kinase inhibitor, SGI-1776, induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. Nov 5 2009;114(19):4150-4157.
9. Buchner M, Baer C, Prinz G, et al. Spleen tyrosine kinase inhibition prevents chemokine- and integrin-mediated stromal protective effects in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. Mar 24.

Avances en la patogénesis, diagnóstico y tratamiento de los síndromes mielodisplásicos

COORDINADORES: C. DEL CAÑIZO. *Salamanca*
G.F. SANZ. *Valencia*

Resumen del simposio

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) son un conjunto heterogéneo de enfermedades clonales de la célula madre hematopoyética caracterizadas por citopenias, alteraciones morfológicas displásicas y elevado riesgo de transformación a leucemia mieloblástica aguda. Como en otras neoplasias mieloides, en los últimos años se han producido notables progresos en el conocimiento de su patogénesis y alteraciones moleculares. Por otro lado, la reciente disponibilidad de fármacos capaces de modificar su historia natural ha alterado de forma sustancial su esquema de tratamiento.

En este simposio, el Dr. José Cervera, responsable de la Unidad de Citogenética del Hospital Universitario La Fe de Valencia, revisa la contribución de las técnicas de análisis genómico al reconocimiento de las alteraciones moleculares que subyacen en su desarrollo. El Dr. Francesc Solé, jefe del Laboratorio de Citogenética Molecular del Hospital del Mar de Barcelona, nos presenta los datos recientes sobre el impacto pronóstico de las alteraciones cromosómicas en los SMD que han conducido a la propuesta conjunta de los grupos español y alemán de nueva clasificación de riesgo citogenético para estas enfermedades. Seguidamente, el Dr. Alberto Orfao, responsable del Laboratorio de Citometría de Flujo del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca, nos ofrece su experta y mesurada opinión sobre el papel actual y futuro de la citometría de flujo en el diagnóstico y evaluación pronóstica de los pacientes con SMD. Finalmente, el Dr. Richard M. Stone, director del Programa de Leucemia del Adulto del Dana Farber Cancer Institute and Brigham and Women's Hospital y profesor de la Harvard Medical School de Boston, nos presenta los resultados de las diferentes alternativas de tratamiento y su visión experta del algoritmo de tratamiento actual de los SMD.

Consideramos que este simposio, del más alto nivel posible, permitirá a los miembros de nuestra sociedad científica disponer de información actualizada de gran utilidad para afrontar el reto del diagnóstico y tratamiento adecuado de estos procesos hematológicos malignos.

CONTRIBUCIÓN DE LAS NUEVAS TÉCNICAS DE ANÁLISIS GENÉTICO AL CONOCIMIENTO DE LA PATOGÉNESIS DE LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS

J. CERVERA, E. SUCH, A. VALENCIA, M. IBÁÑEZ, I. LUNA, I. GÓMEZ, P. MONTESINOS, F. MOSCARDÓ, M.L. SENENT, G.F. SANZ, M.A. SANZ

Servicio de Hematología y Hemoterapia.
Hospital Universitario La Fe. Valencia

Introducción

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) son un grupo heterogéneo de trastornos clonales hematopoyéticos caracterizados por una hematopoyesis ineficaz, displasia en uno o varios linajes celulares y un riesgo elevado de transformación a leucemia mieloblástica aguda (LMA). La diversidad fenotípica de estas neoplasias se ha atribuido a diferentes patrones de alteración de las principales rutas de señalización celular como consecuencia de la acumulación de alteraciones moleculares, tanto genéticas como epigenéticas. En los últimos años se ha producido un avance notable en el conocimiento sobre la contribución de algunos de estos mecanismos moleculares a la patogénesis de los SMD. En buena medida, ello se ha debido a un desarrollo sin precedentes de las técnicas de análisis genético tales como la secuenciación de alto rendimiento, el estudio de perfiles de expresión génica mediante *microarrays*, el cariotipado molecular mediante *arrays* de SNP (*single-nucleotide polymorphisms*) o HGC (hibridación genómica comparada) o el estudio de alteraciones epigenéticas por diversas metodologías, entre otras.

En esta ponencia se revisan brevemente los recientes hallazgos en la patogénesis de los SMD y el papel que las nuevas técnicas de análisis genético han desempeñado en su estudio.

Anemia refractaria con sideroblastos en anillo (ARSA)

Un caso particular que merece especial atención es la ARSA, un SMD que se caracteriza por la acumulación de un exceso de hierro en las mitocondrias de los eritroblastos y cuya patogenia permanece en buena medida inexplicada. Así, se sabe que la formación de sideroblastos en anillo puede tener lugar en diversas situaciones no neoplásicas, tales como la intoxicación por plomo o el tratamiento con isoniazida. En este último caso, el fármaco es capaz de inhibir la enzima

ALA (*delta-aminolevulinic acid dehydratase*), bloqueando la formación de hemoglobina. Además, algunos trastornos hereditarios también se asocian con la formación de sideroblastos en anillo. El más común de ellos es la *anemia sideroblástica ligada a X*, causada por una mutación en el gen de la ALA sintetasa específica eritroide (*ALAS2*)¹. Por su parte, en la *anemia sideroblástica congénita autosómica recesiva* se ha descrito recientemente una mutación en el gen *SLC25A38* en el 17% de los casos². El gen *SLC25A38* codifica una proteína de la familia de los transportadores mitocondriales específicos eritroides, importante en la biosíntesis del grupo heme. El silenciamiento de este gen es capaz de producir anemia en modelos animales de peces zebrafish.

Recientemente Boultonwood y cols. han realizado una contribución importante al conocimiento de los mecanismos moleculares de la ARSA tomando como modelo otro raro trastorno hereditario denominado *anemia sideroblástica con ataxia ligada al cromosoma X*³. Este síndrome se caracteriza por una mutación que inactiva parcialmente la función del gen *ABCB7*, un gen esencial para la hematopoyesis al ser responsable del transporte del hierro desde la mitocondria al citoplasma de la célula. Mediante estudios de secuenciación y expresión en células CD34+ y eritroblastos en cultivo, este grupo ha demostrado que la expresión del gen *ABCB7* está significativamente disminuida en los pacientes con ARSA frente al resto de SMD y los individuos normales. Además, la expresión de *ABCB7* guarda una relación inversa con el porcentaje de sideroblastos en médula ósea. Estos resultados establecen por primera vez una relación patogénica entre las formas hereditarias y adquiridas de las anemias sideroblásticas y sugieren que el gen *ABCB7* podría jugar un papel fundamental en la patogenia de las ARSA. Sin embargo, no se han encontrado mutaciones ni hipermetilación aberrante de *ABCB7* en pacientes con ARSA adquirida, lo que sugiere que otros mecanismos están implicados en el silenciamiento de este gen.

Finalmente, el empleo de *microarrays* de expresión en células CD34+ de pacientes con ARSA muestra un patrón de expresión génica específico y que, junto con la sobreexpresión de genes relacionados con el interferón gamma, se caracteriza por una sobreexpresión de genes relacionados con el metabolismo mitocondrial y, en particular, con aquellos relacionados con la síntesis del grupo heme (p. ej.: *ALAS2*)⁴. Asimismo, un estudio reciente por el mismo grupo demuestra que los eritroblastos de las ARSA sometidos a cultivo muestran una marcada desregulación de rutas celulares implicadas en la apoptosis, la reparación del ADN, la función mitocondrial y la ruta JAK/STAT. Entre los genes más infraexpresados destacan el propio *ABCB7*, el gen de integridad mitocondrial *MFN2*, *STAT5B*, *HSPA5*, *FANCC* y el regulador negativo de la apoptosis *MAP3K7*⁵.

SMD con deleción aislada de 5q

El hallazgo aislado de una deleción intersticial del brazo largo del cromosoma 5 se asocia con un síndrome clínico característico descrito hace más de 35 años, el síndrome 5q⁻⁶. La actual clasificación de la OMS de las neoplasias hematológicas denomina a esta entidad *SMD con deleción aislada de 5q⁷*, y se caracteriza por un predominio femenino (2:1), anemia macrocítica con un recuento de plaquetas normal o elevado, una cifra de blastos en médula ósea inferior al 5%, megacariocitos hipolobulados y una supervivencia prolongada con baja tasa de transformación leucémica.

La deleción en el síndrome 5q⁻ es típicamente intersticial, aunque el tamaño de la región delecionada es variable entre los pacientes. Desde el punto de vista molecular, dos regiones comúnmente delecionadas (RCD) han sido identificadas en las bandas 5q31 y 5q32-q33. Muchos pacientes con deleción aislada de 5q muestran pérdida de ambas regiones de forma simultánea, por lo que es difícil dilucidar el papel exacto que ambas juegan en la patogenia de la enfermedad. Sin embargo, el segmento más centromérico en 5q31 parece guardar más relación con la patogenia de los SMD y LMA *de novo* así como de aquéllos secundarios a terapia (SMD-t/LAM-t)⁸. Estudios *in vitro* y en modelos murinos han encontrado indicios de que al menos dos genes de esta región (*EGR1* y *CTNNA1*) podrían estar relacionados con un mayor riesgo de transformación leucémica^{9,10}.

Por el contrario, la región más telomérica parece contener un gen supresor de tumores relacionado con el síndrome 5q⁻¹¹. En los últimos años y mediante el empleo de métodos de mapeo cromosómico se ha conseguido delimitar esta RCD hasta un tamaño de aproximadamente 1,5 megabases, conteniendo en torno a 40 genes conocidos. Algunos de ellos tienen características propias de genes supresores tumorales. Sin embargo, la secuenciación de todos estos genes no ha mostrado evidencias de deleciones de ambos alelos o mutaciones puntuales en el alelo restante que motivaran una inactivación homocigota de ninguno de ellos. En 2008, Ebert y cols. demostraron mediante el empleo de ARNs de interferencia, para bloquear la expresión de todos y cada uno de los 40 genes implicados en esta RCD, que la pérdida parcial de función (haploinsuficiencia) del gen *RPS14*, requerido para la maduración de la subunidad ribosómica 40S, es capaz de reproducir el defecto en la eritropoyesis característico del síndrome 5q⁻ y que la reexpresión forzada de este gen es asimismo capaz de revertir dicho fenotipo en células progenitoras hematopoyéticas procedentes de individuos sanos¹². Además, las células con haploinsuficiencia de *RPS14* muestran un bloqueo en el procesamiento del ARN prerribosómico análogo al defecto ribosómico funcional observado en la anemia de Dia-

mond-Blackfan, estableciendo por primera vez una posible relación entre el síndrome 5q⁻ y un síndrome de fallo medular congénito. Estos resultados sugieren que la haploinsuficiencia del gen *RPS14* tiene un papel patogénico en el síndrome 5q⁻ ocasionando un defecto en la maduración ribosómica.

En este sentido, un hito muy importante en la elucidación de la patogenia molecular del síndrome 5q⁻ ha sido la reciente generación de un primer modelo murino de este trastorno por Barlow y cols. mediante el empleo de técnicas refinadas de ingeniería cromosómica¹³. Ello ha permitido comprobar que la deleción artificial de un segmento cromosómico que contiene al gen *RPS14* es capaz de producir *in vivo* un fenotipo anémico similar al del síndrome 5q⁻¹⁴. Además, estos ratones tienen un incremento en la apoptosis medular y sobreexpresión del gen supresor de tumores p53. El cruce de estos ratones deficientes en *RPS14* con otros con la función p53 anulada es capaz de revertir el fenotipo anormal, sugiriendo que la apoptosis o la inhibición del crecimiento mediadas por p53 son determinantes para la anemia inducida por la haploinsuficiencia de *RPS14* en el síndrome 5q⁻. Sin embargo, aunque es probable que la haploinsuficiencia de *RPS14* tenga un papel causal en el defecto de la maduración eritroide, no explica el fenotipo plaquetar o la ventaja proliferativa del clon alterado en el síndrome 5q⁻.

Muy recientemente, Starczynowski y cols. mediante secuenciación masiva paralela de librerías de pequeños RNAs en líneas celulares han conseguido identificar la presencia de 13 micro-RNAs en la RCD de 5q¹⁴. A continuación, un análisis mediante RT-PCR cuantitativa permitió identificar que dos de ellos, miR-145 y miR-146a, estaban significativamente infraexpresados en pacientes con deleciones de 5q con respecto a otros SMD y controles normales. Además, el bloqueo de miR-145 y miR-146a en modelos murinos era capaz de reproducir algunas de las características fenotípicas del síndrome 5q como la hipolobulación de los megacariocitos y la trombocitosis en sangre periférica. Finalmente, identificaron dos genes relacionados con la inmunidad innata, TIRAP (miR-145) y TRAF6 (miR-146a), como dianas de estos miRNAs. Estos genes interactúan entre sí, dando lugar a una activación final de la ruta NF-κB. En el caso de TRAF6, una proporción significativa de ratones trasplantados con médula ósea con hiperexpresión de este gen experimentaban una progresión a fallo medular o LMA.

En definitiva, parece que la deleción intersticial de genes en 5q ocasiona diversas alteraciones genéticas que cooperan en la génesis del fenotipo característico del síndrome 5q⁻. El defecto eritroide es probablemente debido a la alteración de *RPS14*, mientras que la deficiencia de miR-145 y miR-146a parece relacionarse más con las alteraciones del fenotipo plaquetar

y podría contribuir a la expansión clonal. Es posible que la haploinsuficiencia de otros genes comúnmente deletados en el cromosoma 5, como por ejemplo *APC*¹⁵, puedan también contribuir a la patogenia de estos trastornos. En este sentido, la lenalidomida ha emergido en los últimos años como un tratamiento con una elevada efectividad en los pacientes con síndrome 5q- en términos de independencia transfusional y respuestas citogenéticas¹⁶. Pellagatti y cols. han demostrado mediante estudios de expresión génica que el tratamiento *in vitro* con lenalidomida incrementa significativamente la expresión del gen *SPARC*, localizado también en la RCD en 5q31-q32. *SPARC* es un gen supresor de tumores que participa en la inhibición del crecimiento, la adhesión celular y la angiogénesis. Puesto que éstos son algunos de los mecanismos de acción que se han sugerido para lenalidomida y dado que este gen se localiza también en la RCD del síndrome 5q-, se ha sugerido que *SPARC* podría jugar un papel en la respuesta a lenalidomida así como en la patogenia del síndrome 5q-¹⁷.

Estudio de mutaciones en pacientes con SMD

En los últimos dos años nuevas mutaciones se han descrito en pacientes con SMD y trastornos mixtos mielodisplásicos/mieloproliferativos (SMD/SMP). En buena medida, ello se ha debido al notable progreso producido en el empleo e interpretación de los datos proporcionados por *microarrays* de HGC y de SNPs. Ambas técnicas constituyen potentes herramientas de análisis masivo que permiten identificar deleciones y ampliaciones crípticas al estudio citogenético convencional. En particular, los *arrays* de SNPs pueden ser empleados como herramientas de genotipado y estudios de asociación. Sin embargo, es su elevada resolución, aproximadamente de un marcador por cada 100 pb del genoma, lo que ha permitido su empleo como una herramienta de "cariotipado molecular". Además, a diferencia de los *arrays* de HGC, permiten detectar regiones con pérdida de heterocigosidad sin variación en el número de copias (CN-LOH), también conocidas como regiones de disomía uniparental (UPD). Este fenómeno consiste en la duplicación de material materno o paterno de un cromosoma o región cromosómica con la consiguiente pérdida del otro alelo. Las UPD pueden tener un carácter tanto constitucional como adquirido. Las alteraciones constitucionales se asocian con errores en la meiosis y, aunque pueden asociarse con diversos trastornos del desarrollo, también se observan de forma natural en sujetos sanos. Por el contrario, las UPD adquiridas pueden deberse tanto a recombinaciones mitóticas como a un intento de la célula por compensar una pérdida de material cromosómico. Estas alteraciones se han relacionado con la

patogenia de diversas neoplasias. Como se expone a continuación, diversos estudios recientes demuestran el importante papel que las UPD parecen jugar en el caso de los SMD.

Mutaciones de TET2

En 2009, diferentes grupos describieron mutaciones en el gen *TET2* en diferentes neoplasias hematológicas. A través de la combinación de diferentes técnicas, incluyendo citogenética convencional, hibridación genómica comparada (HCG) y el empleo de *arrays* de SNPs, Delhommeau y cols.¹⁸ localizaron en la región del cromosoma 4q24 el gen *TET2* a partir de pacientes con neoplasias mieloproliferativas que presentaban deleciones o CN-LOH en dicha región cromosómica. El análisis de la copia del gen restante reveló la presencia de diferentes mutaciones somáticas con posible carácter inactivante. La consiguiente pérdida de funcionalidad en ambas copias del gen sugiere que *TET2* presenta un papel como gen supresor de tumores implicado en el control del balance entre la supervivencia, crecimiento y diferenciación en la hematopoyesis, de manera que la presencia de dichas mutaciones inactivantes podría favorecer la proliferación tumoral. Este tipo de mutaciones también se encontraron en pacientes con LMA, SMD, SMP, LMA secundarias y leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) con la región 4q24 aparentemente intacta en el cariotipo convencional¹⁸⁻²⁰. Este fenómeno sugiere que las alteraciones de *TET2* podrían presentar un papel clave en la regulación de la proliferación mieloide y que podrían ser un evento genético común a diversas neoplasias de estirpe mieloide. Además, parecen ser un evento genético temprano y necesario para que alteraciones genéticas adicionales contribuyan a la aparición de un determinado fenotipo tumoral.

TET2 pertenece a la familia de genes *TET* (*ten-eleven translocation*) formada por 3 miembros (*TET1*, *TET2* y *TET3*) con un tamaño de 150 kb que comprende 11 exones. Codifica una proteína que contienen dos regiones altamente conservadas y cuya función se desconoce en buena medida. *TET2* no se había relacionado previamente con cánceres humanos, pero *TET1* se ha visto implicado en un reordenamiento con el gen *MLL* (*mixed-lineaged leukemia*) en la translocación cromosómica t(10;11)(p12;q23), en la que siempre aparece conservada la región C-terminal, por lo que se cree que este grupo de proteínas tienen una función importante para la transformación celular.

La frecuencia de las mutaciones de *TET2* mediante secuenciación directa de los 11 exones se encuentra en el 14-26% de los SMD, el 22-40% de las LMMC, el 12-50% de las LMA secundarias y el 8-12% de los SMP. Además, no parecen correlacionarse con muta-

ciones de *FLT3*, *JAK2*, *NPM1*, *CEBPA* o *MLL*. La escasez de estudios hasta el momento hace que tanto la frecuencia como su influencia pronóstica resulten aún controvertidos¹⁸⁻²².

Mutaciones de C-CBL

En varios estudios realizados en pacientes con SMD y/o SMP se ha observado que una de las regiones con mayor incidencia de UPD es 11q, principalmente en LMMC (48%) y SMD/SMP inclasificables (38%), siendo su frecuencia mucho menor en pacientes con SMD. A raíz de estos trabajos se ha profundizado en el análisis de esta región y se han descrito distintas mutaciones que afectan al gen *C-CBL*, localizado en 11q23.3 en este mismo subgrupo de pacientes y que podría ser un proceso anterior a la UPD²³.

El gen *C-CBL* forma parte de la familia de CBL. Está compuesto por 16 exones que codifican 906 aminoácidos en un único transcrito. Se encuentra localizado en 11q23.3 y codifica una ubiquitina ligasa E3 que juega un papel regulador en la señalización de las tirosinas cinasas. Por una parte, favorece su activación, al provocar la unión del activador al dominio de unión en N-terminal y, por otra, sirve de adaptador al reclutar componentes reguladores de las señales de transducción como SHP2 y P13K.

Se han encontrado hasta 12 mutaciones localizadas en el exón 8, 11 mutaciones en el exón 9, y 4 en la región intrónica²⁴. Muchas de las variaciones que se han descrito son sustituciones *missense* (78%) en el dominio RING o en el dominio de unión que impiden la actividad ubiquitina ligasa de CBL, por lo que las células adquieren una mayor capacidad proliferativa al sobreexpresarse *FLT3*²⁵. Otras mutaciones producen alteraciones en el *splicing* (19%) y la formación de nuevos codones de parada (3%). Estas mutaciones podrían explicar la desregulación de las rutas de proliferación que se observan en los pacientes de SMD/SMP. Diferentes análisis demuestran que las mutaciones en *C-CBL* son adquiridas y que raramente se ven relacionadas con otras mutaciones conocidas. En cuanto a su repercusión clínica, parece que los pacientes con mutaciones de *C-CBL* muestran una tendencia a una supervivencia global y una supervivencia libre de progresión más corta que los que carecen de estas mutaciones.

Mutaciones de ASXL1

Recientemente se han descrito mutaciones del gen *ASXL1* (*additional sex combs 1*) en el 11% de los pacientes con SMD, el 43% de LMMC y el 25% de LMA²⁶. Sin embargo, los datos preliminares disponibles sugieren que las mutaciones de *ASXL1* son un evento raro

en los SMD con bajo porcentaje de blastos²⁷. *ASXL1* está localizado en la banda cromosómica 20q11, una región afectada comúnmente en diversas neoplasias de estirpe mielóide, y pertenece a una familia de tres genes que codifican unas proteínas pobremente caracterizadas y que se sabe que participan en la regulación del remodelado de la cromatina. Algunos estudios sugieren que *ASXL1* podría tener una función como gen supresor de tumores al afectar la autorrenovación o diferenciación de los progenitores hematopoyéticos. Las mutaciones identificadas, localizadas en el exón 12 del gen, son en su mayoría mutaciones que alteran el marco de lectura, causadas por delección o duplicación de un nucleótido, y ocasionan una proteína truncada en su extremo C-terminal.

Mutaciones de RUNX1

La identificación de mutaciones en la línea germinal del factor de transcripción *AML1*, también denominado *RUNX1*, en pacientes con desorden plaquetario familiar con predisposición a leucemia reveló inicialmente el rol de este gen en la megacariocitopoyesis²⁸.

El gen *RUNX1* se encuentra en la banda 21q22 con un tamaño de 260 kb y está formado por 12 exones. Existen 3 isoformas del gen *RUNX1*, siendo la más frecuente la isoforma *RUNX1b*, que codifica una proteína de 453 aminoácidos formada por dos dominios altamente conservados. Por un lado, el dominio Runt en la región N-terminal, codificado por los exones 3-5 encargado de mediar la unión al ADN y de la heterodimerización con la subunidad CBF β , y el dominio TAD en la región C-terminal, codificado por los exones 6-8, que activa la transcripción de genes esenciales en la diferenciación y proliferación de la hematopoyesis normal²⁹.

Alteraciones en *RUNX1* se encuentran en distintos subgrupos de leucemias. Citogenéticamente, *RUNX1* se fusiona con otros genes como resultado de translocaciones cromosómicas específicas: t(12;21) en leucemia linfoblástica aguda de estirpe B; t(8;21) en LMA de subtipo FAB M2; y la menos frecuente t(3;21) en SMD-t y en la transformación blástica de la LMC. Por otro lado, *RUNX1* presenta una alta incidencia de mutaciones puntuales somáticas heterocigotas repartidas por los dominios N-terminal y C-terminal en pacientes con SMD *de novo* (2-12%), especialmente en AREB, AREB-t, LMMC y SMD-t/LMA-t (15-45%)^{30,31}, principalmente en aquéllos con anomalías en el cromosoma 7 (-7/7q-), donde la frecuencia de mutaciones aumenta a un 77%³¹. En las LMA *de novo* la incidencia es relativamente baja (< 5%), excepto en las LMA-M0 (12-33%). En cuanto a su implicación pronóstica, parece que los pacientes con mutaciones de *RUNX1* presentan un pronóstico peor en términos de supervivencia global que aquellos que no tienen mu-

taciones^{30,31}. Sin embargo su carácter pronóstico independiente no ha sido establecido de forma inequívoca. Así, un reciente estudio muestra que los pacientes con SMD/LMA y mutaciones puntuales de *RUNX1* también presentan más frecuentemente mutaciones de los genes *FLT3*, *N-RAS*, *PTPN11* y *NF1* y, consecuentemente, activación de rutas tirosina cinasa dependiente de *RAS*³².

Conclusiones

En los últimos años se ha producido un avance notable en el conocimiento sobre la patogenia de los SMD. En buena medida, ello se ha debido a un desarrollo sin precedentes de las técnicas de análisis genético tales como la secuenciación de alto rendimiento, la ingeniería genética, el estudio de perfiles de expresión génica mediante *microarrays*, el cariotipado molecular mediante *arrays* de SNPs, etc.

Entre los hallazgos más recientes en la patogenia de las ARSA destaca el probable papel patogénico de la infraexpresión del gen *ABCB7*. En el síndrome 5q- el defecto eritroide es probablemente debido a la haploinsuficiencia de *RPS14*, mediada por p53, mientras que la deficiencia de los microRNA miR-145 y miR-146a parece relacionarse con las alteraciones del fenotipo plaquetar y podría contribuir a la expansión clonal. Otros genes como *APC* o *SPARC* podrían también estar implicados en la patogenia de las deleciones del cromosoma 5. Finalmente la identificación de nuevas alteraciones recurrentes de elevada frecuencia, como las de los genes *TET2* o *ASXL1*, permitirá en los próximos años explorar su potencial papel diagnóstico, pronóstico o terapéutico. Finalmente, otras mutaciones como las de los genes *RUNX1* en SMD-t/LMA-t o de *C-CBL* en SMD/SMP contribuirán al refinamiento en el conocimiento de la patogenia y la clasificación molecular de estas neoplasias.

Bibliografía

1. Camaschella C. Hereditary sideroblastic anemias: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Semin Hematol* 2009;46:371-7.
2. Guernsey DL, Jiang H, Campagna DR, et al. Mutations in mitochondrial carrier family gene *SLC25A38* cause nonsyndromic autosomal recessive congenital sideroblastic anemia. *Nat Genet* 2009;41:651-3.
3. Boulwood J, Pellagatti A, Nikpour M, et al. The role of the iron transporter *ABCB7* in refractory anemia with ring sideroblasts. *PLoS ONE* 2008 Apr 9;3(4):e1970.
4. Pellagatti A, Cazzola M, Giagounidis A, et al. Gene expression profiles of CD34+ cells in myelodysplastic syndromes: involvement of interferon-stimulated genes and correlation to FAB subtype and karyotype. *Blood* 2006;108:337-45.
5. Nikpour M, Pellagatti A, Liu A, et al. Gene expression profiling of erythroblasts from refractory anaemia with ring sideroblasts (RARS) and effects of G-CSF. *Br J Haematol* 2010 Apr 12. [Epub ahead of print]
6. Van den BH, Michaux L. 5q-, twenty-five years later: a synopsis. *Cancer Genet Cytogenet* 1997;94:1-7.
7. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, IARC Press, Lyon, 2008.
8. Boulwood J, Fidler C, Strickson AJ, et al. Narrowing and genomic annotation of the commonly deleted region of the 5q-syndrome. *Blood* 2002;15;99(12):4638-41.
9. Liu TX, Becker MW, Jelinek J, et al. Chromosome 5q deletion and epigenetic suppression of the gene encoding a-catenin (*CTNNA1*) in myeloid cell transformation. *Nature Med* 2007;13: 78-83.
10. Joslin JM, Fernald AA, Tennant TR, et al. Haploinsufficiency of *EGR1*, a candidate gene in the del(5q), leads to the development of myeloid disorders. *Blood* 2007;110:719-26.
11. Boulwood J, Fidler C, Strickson AJ et al. Transcription mapping of the 5q- syndrome critical region: cloning of two novel genes and sequencing, expression, and mapping of a further six novel cDNAs. *Genomics* 2000;66:26-34.
12. Ebert BL, Pretz J, Bosco J, et al. Identification of *RPS14* as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature* 2008;17;451(7176):335-9.
13. Barlow JL, Drynan LF, Hewett DR et al. A p53-dependent mechanism underlies macrocytic anemia in a mouse model of human 5q- syndrome. *Nature Medicine* 2009;16;1:59-66.
14. Starczynowski DT, Kuchenbauer F, Argiropoulos B et al. Identification of miR-145 and miR-146a as mediators of the 5q-syndrome phenotype. *Nature Medicine* 2009;16;1:49-58.
15. Wang J, Fernald AA, Anastasi J et al. Haploinsufficiency of *Apc* leads to ineffective hematopoiesis. *Blood* 2010 Apr 29;115(17):3481-8.
16. List A, Dewald G, Bennett J, et al. Myelodysplastic Syndrome-003 Study Investigators. Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *N Engl J Med* 2006 Oct 5;355(14):1456-65.
17. Pellagatti A, Jädersten M, Forsblom AM, et al. Lenalidomide inhibits the malignant clone and up-regulates the *SPARC* gene mapping to the commonly deleted region in 5q- syndrome patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jul 3;104(27):11406-11. Epub 2007 Jun 18.
18. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, et al. Mutation in *TET2* in myeloid cancers. *N Engl J Med* 2009, 28;360(22):2289-301.
19. Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C, et al. Genetic characterization of *TET1*, *TET2*, and *TET3* alterations in myeloid malignancies. *Blood* 2009 May 6.
20. Jankowska AM, Szpurka H, Tiu RV, et al. Loss of heterozygosity 4q24 and *TET2* mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2009 Jun 18;113(25):6403-10.
21. Mohamedali AM, Smith AE, Gaken J, et al. Novel *TET2* Mutations Associated With UPD4q24 in Myelodysplastic Syndrome. *J Clin Oncol* 2009 Jun 15.
22. Langemeijer SM, Kuiper RP, Berends M, et al. Acquired mutations in *TET2* are common in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet* 2009;41(7):838-42.
23. Dunbar AJ, Gondek LP, L. O'Keefe CL, et al. 250K Single Nucleotide Polymorphism Array Karyotyping Identifies Acquired Uniparental Disomy and Homozygous Mutations, Including Novel Missense Substitutions of c-Cbl, in Myeloid Malignancies. *Cancer Res* 2008;68 (24):10349-57.
24. Grand FH, Hidalgo-Curtis CE, Ernst T, et al. Frequent *CBL* mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2009;113:6182-92.
25. Reindl C, Quentmeier H, Petropoulos K, et al. *CBL* Exon 8/9 Mutants Activate the *FLT3* Pathway and Cluster in

- CoreBinding Factor/1 1q Deletion Acute Myeloid Leukemia/Myelodysplastic Syndrome Subtypes. *Clin Cancer Res* 2009;15(7):2238.
26. Gelsi-Boyer V, Trouplin T, Adelaide J, et al. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia, *British Journal of Haematology* 2009;145:788-800.
 27. Boulwood J, Perry J, Pellagatti A, et al. Frequent mutation of the polycomb-associated gene ASXL1 in the myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2010;24(5):1062-5. Epub 2010 Feb 25.
 28. Song WJ, Sullivan MG, Legare RD, et al. Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet* 1999;23(2):166-75.
 29. Michaud J, Scott HS, Escher R. AML1 interconnected pathways of leukemogenesis. *Cancer Invest* 2003;21(1):105-36.
 30. Harada H, Harada Y, Niimi H, et al. High incidence of somatic mutations in the AML1/RUNX1 gene in myelodysplastic syndrome and low blast percentage myeloid leukemia with myelodysplasia. *Blood* 2004 Mar 15;103(6):2316-24.
 31. Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J. Mutations of AML1 are common in therapy-related myelodysplasia following therapy with alkylating agents and are significantly associated with deletion or loss of chromosome arm 7q and with subsequent leukemic transformation. *Blood* 2004;104(5):1474-81.
 32. Niimi H, Harada H, Harada Y, et al. Hyperactivation of the RAS signaling pathway in myelodysplastic syndrome with AML1/RUNX1 point mutations. *Leukemia* 2006; 20:635-44.

NUEVA CLASIFICACIÓN PRONÓSTICA DE LAS ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS PARA LOS SMD

F. SOLÉ

*Laboratori de Citogenètica Molecular.
Servei de Patologia. 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 FAB¹: 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 abso-

luto 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 (WHO) ha propuesto una nueva clasificación, en la que establece las siguientes entidades: anemia refractaria con y sin sideroblastos en anillo, citopenia refractaria con mielodisplasia multilineal, anemia refractaria con exceso de blastos y el síndrome 5q⁻².

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 presentadas³⁻⁶. 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 deleción, 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)⁶, 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

Tabla 1. Alteraciones más frecuentes en los pacientes con SMD de novo

Alteraciones
Alteraciones más frecuentes:
5q- (q13q33)
7q- o -7
+8
i(17)(q10)
del(20)(q11q13)
-Y
Otras alteraciones:
t(1;3)(p36;q21)
t(1;7)(p11;p11)
1q+
t(2;11)(p11;q23)
inv(3)(q21q26), t(3;3)(q21;q26)
del(9)(q13q22)
+11
12p-
+13
13q-
-18/18q-
-20
+21

blastos, AREB y AREB-t (61% y 70%, respectivamente) 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- en pacientes con AREB; la implicación del cromosoma 7 en forma de monosomía o delección 7q- en pacientes con AREB y AREB-t; y la trisomía 8, delección 12p- 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 supervivencia⁵.

A nivel molecular es de destacar la localización del gen EVI1 en la banda 3q26.

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 media de edad de 65 años, con una larga supervivencia, y que a nivel citológico cursa con una hipolobulación megacariocítica, número normal o elevado de plaquetas, anemia macrocítica e hipoplasia de la serie roja en médula ósea⁷. 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, 3 AREB-t, y en combinación con otras alteraciones cromosómicas en 1 ARSA, 3 AREB, y 1 LMMC⁶. Los pacientes con la delección 5q- como única anomalía presentan las características propias del llamado síndrome 5q-⁷. 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 favorable⁸.

Otras alteraciones distintas de la delección 5q y que implican al cromosoma 5 son t(5;12) implicando el gen TEL, t(5;7) implicando el gen HIP1 y t(3;5) implicando el gen MLF⁹.

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 LANL¹⁰. 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^{3-6,10}, la trisomía 8 ha sido la alteración cromosómica numérica más observada en nuestra experiencia⁶. 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 citogenéticas¹¹. En nuestra serie⁶ la delección del cromosoma 12, a pesar de 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 localizado el oncogén c-K-RAS, 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 pacientes⁶. En tres 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 hепato o esplenomegalia, médula ósea hiper celular, 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)^{6,12}.

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 delección de 17p. En estos casos, es frecuente que esta delección se presente en forma de isocromosoma 17q, y que a nivel molecular se observe la mutación de P53⁹.

Valor pronóstico del estudio citogenético y nueva propuesta

En la serie del GCECGH⁶, se observó 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 y cols.¹³ señalando, al igual que Coiffier y cols.¹⁴, la importancia de la proporción del número de blastos, dato corroborado posteriormente por Sanz y cols.⁸. 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 Galton¹⁵ insistieron 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 y cols.¹⁶ destacan que, independientemente del subtipo morfológico (variedades

Tabla 2. Propuesta de actualizar el IPSS en relación con el valor pronóstico de las alteraciones citogenéticas

Propuesta 2009	Propuesta 2010 (GCECGH, Grupo Alemán-Austriaco, IPSS y MDS Cytogenetic Working Group)
Buen pronóstico (> 50 meses)	Muy buen pronóstico (> 60,8 meses)
5q-, 5q- +1, 11q-, 12p-, 20q-, +21, -Y	del(11q), -Y
Intermedio 1 (50-30 meses)	Buen pronóstico (48,5 meses)
2 alt., +1/+1q inv(3q), t(3q), t(7q), +8, +19, -21	5q-, 5q- +1, der(1;7), 12p-, 20q-, +21
Intermedio 2 (30-15 meses)	Intermedio (25 meses)
Cariotipo con 3 alteraciones citogenéticas, -7/7q-	2 alt., -7/7q-, +8, i(17)(q10) +19, -21, clones independientes
Mal pronóstico (< 15 meses)	Mal pronóstico (15 meses)
Cariotipo con > 3 alteraciones citogenéticas	der(3)(q21/q26), cariotipo con 3 alteraciones citogenéticas, alteraciones dobles con -7/7q-
	Muy mal pronóstico (5,7 meses)
	Cariotipo con > 3 alteraciones citogenéticas

des con exceso de blastos), la detección de un cariotipo complejo se relaciona con un mal pronóstico. Esta opinión fue confirmada por Toyama y cols.⁴ en una serie de 401 SMD, serie 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 y cols.³, 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 experiencia⁶ y en la referida en la literatura^{3-5,17} 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 citogenético¹⁷. El IPSS separa tres grupos de pronóstico respecto el cariotipo: buen pronóstico: cariotipo normal, pérdida del cromosoma Y y delección 5q- y delección 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 y cols.¹⁸ y Haase y cols.¹⁹, 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 delección del(11q), del(12p) y el mal pronóstico de los cariotipos con más de 3 alteraciones citogenéticas. En la Tabla 2 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 3 se detallan los resultados de las principales series de SMD.

En la Tabla 4 se indican las normas a tener en cuenta para contar el número de alteraciones citogenéticas en un paciente con SMD. Esta normativa es importante

Tabla 3. Principales series con valor pronóstico del resultado citogenético

<i>Greenberg et al., 1997</i>
N = 816 SMD de novo
· Alteraciones citogenéticas: 47%
· Buen pronóstico: normal, 5q-, -Y, 20q- (todas como única anomalía)
· Intermedio: resto de alteraciones
· Mal pronóstico: cariotipo complejo (3 o más alteraciones) y anomalías del cromosoma 7
<i>Solé et al., 2005</i>
N = 968 SMD de novo
· Alteraciones citogenéticas: 47%
· Buen pronóstico: normal, 5q-, -Y, 11q-, 12p-, 20q-
· Intermedio: r3q21-q26, +8, +9, t11q
· Desconocido: otras alteraciones únicas o dobles
· Mal pronóstico: cariotipo complejo, -7/7q-, i(17q)
<i>Bernasconi et al., 2007</i>
N = 491 pacientes
· Buen pronóstico: normal, 5q-, -Y, 11q-, 12p-
· Intermedio: r3q21-q26, del(7)(q31q35), 20q-
· Mal pronóstico: cariotipo complejo, +8
<i>Haase et al., 2007</i>
N = 2.124 SMD de novo
· Buen pronóstico: normal, 5q-, -Y, +1/+1q, t(1q), t(7q), 12p, cr. 15, t(17q), -21/+21, -x
· Intermedio: -7/7q-, 11q-, cr. 19
· Mal pronóstico: cariotipo complejo, t(5q)
<i>Podzykova et al., 2008</i>
N = 1.029 pacientes
· Buen pronóstico: normal, 5q-, -Y, 11q-, 12p-
· Intermedio: 3q, +8
· Mal pronóstico: cariotipo complejo, +11, i(17q)

Tabla 4. 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 (mar)
· Cromosoma en anillo (r)
· Doble diminutos (dmms) o regiones de tinción homogénea (HSR)

seguirla, 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.

Conclusión

La aplicación rutinaria del estudio citogenético de los SMD es importante, ya que aporta información complementaria a la de la citología, y permite el estable-

Tabla 5. Protocolo de estudio citogenético de los SMD

<i>Obligatorio</i>
· Estudio citogenético convencional (<i>gold standard</i>)
· En los casos con ausencia de divisiones o menos de 10 metafases analizadas, aplicar:
– FISH con las sondas 5q, 7q, centromérica del 8 y 20q o considerar aplicar CGH/SNP array
· Aplicar FISH para el seguimiento de la enfermedad mínima residual
· Aplicar FISH con sonda 5q- en casos en que no se detecte 5q- que cumplan los siguientes requisitos:
– Sospecha de síndrome 5q-
– Ausencia de mitosis
– Cariotipo alterado con implicación del cromosoma 5 pero sin evidencia de 5q- (por ejemplo, monosomía 5)
– Cariotipo complejo (≥ 3 alteraciones citogenéticas)
<i>Opcional</i>
· Cariotipo complejo: aplicar m-FISH o SKY
<i>Recomendable</i>
· Conservación de muestras biológicas en el banco de tumores/tejidos

cimiento 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 (Tabla 5).

Por otro lado, el seguir conociendo nuevas alteraciones citogenéticas permitirá establecer nuevas entidades citológicas con unas características clínicas bien definidas.

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* 51: 189 199, 1985.
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Konrad Muller-Hermelink H, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD: World health organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the clinical advisory committee-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 17: 3835-3849, 1999.
- Morel P, Hebbbar M, Lai JL, Duhamel A, Preudhomme C, Wattel E, Bauters F, Fenaux P: 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* 7: 1315-1323, 1993.
- Toyama K, Ohyashiki K, Yoshida Y, Abe T, Asano S, Hirai H, Hirashima K, Hotta T, Kuramoto A, Kuriya Sh, Miyazaki T, Kakishita E, Mizoguchi H, Okada M, Shirakawa Sh, Takaku F, Tomonaga M, Uchino H, Yasunaga K, Nomura T: Clinical implications of chromosomal abnormalities in 401 patients with myelodysplastic syndromes: a multicentric study in Japan. *Leukemia* 7: 499-508, 1993.
- Fenaux P, Morel P, Luc Lai J: Cytogenetics of myelodysplastic syndromes. *Sem Hematol* 33: 127-138, 1996.
- Solé F, B. Espinet, G. F. Sanz, J. Cervera, M. J. Calasanz, E. Luño, F. Prieto, I. Granada, J. Ma Hernández, J. C. Cigudosa, J. L. Diez, E. Bureo, M. L. Marqués, E. Arranz, R. Ríos, J. A. Martínez Climent, T. Vallespí, L. Florensa, S. Woessner. "Incidence, characterization and prognostic significance of chromosomal abnormalities in 640 patients with primary myelodysplastic syndromes". *British Journal of Haematology* 108:346-356, 2000.
- Van Den Berghe H, Vermaelen K, Mecucci C, Barbierei D, Tricot G: The 5q anomaly. *Cancer Genet Cytogenet* 17: 189 255, 1985.
- Sanz GF, Sanz MA, Vallespí T, Cañizo MC, Torradabella M, García S, Irrigüible D, San Miguel JF: 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* 74: 395-408, 1989.
- Fenaux P: Chromosome and molecular abnormalities in myelodysplastic syndromes. *Int J Hematol* 73: 429-437, 2001.
- Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia 1982: Correlation of morphology and karyotype. *Cancer Genet Cytogenet* 11: 249 360, 1984.
- Streubel B, Sauerland C, Heil G, Freund M, Bartels H, Lengfelder E, Wandt H, Ludwig WD, Nowotny H, Baldus M, Grothaus-Pinke B, Buchner T, Fonatsch C. 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* 100:521-533, 1998.
- Becher R, Carbonell F, Bartram CR: Isochromosome 17q in Ph⁻ negative leukemia: a clinical, cytogenetic, and molecular study. *Blood* 75: 1679 1683, 1990.
 - 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* 28: 13 20, 1988.
 - Coiffier B, Adeleine P, Viala J J, Bryon P A, Fiere D, Gentilhomme O, Vuvan H.: Dysmyelopoietic syndromes. A search of prognostic factors in 193 patients. *Cancer* 52: 83 90, 1983.
 - Muftu GJ, Galton DAG: Myelodysplastic syndromes: natural history and features of prognostic importance. *Clin Haematol* 15: 953, 1986.
 - 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* 68: 189 194, 1988.
 - Greenberg P, Cox C, Le Beau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz MA, Vallespí T, Hamblin T, Oscier D, Ohyashiki K, Toyama K, Aul C, Mufti G, Bennett JM. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 89: 2079-2088, 1997.
 - Solé F, Luño E, Sanzo C, Espinet B, Sanz GF, Cervera J, Calasanz MJ, Cigudosa JC, Millà F, Ribera JM, Bureo E, Martín ML, Arranz E, Florensa L (2005): "Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes". *Haematologica* 90 (9):1168-1178, 2005.
 - Haase D, Germing U, Schanz J, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Hildebrandt B, Kundgen A, Lübbert M, Kunzmann R, Giagounidis AA, Aul C, Trümper L, Krieger O, Stauder R, Müller TH, Wimazal F, Valent P, Fonatsch C, Steidl C. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood*. 110(13):4385-95, 2007.

IMPACTO DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN EL DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DE LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS

A. ORFAO¹, S. MATARRAZ¹, A. LÓPEZ¹, S. BARRENA¹, C. FERNÁNDEZ¹, J. FLORES¹, A. RASILLO¹, J.M.^a SAYAGUÉS¹, M.^aL. SÁNCHEZ¹, P. BÁRCENA¹, J.M.^a HERNÁNDEZ-RIVAS², C. SALVADOR³, N. FERNÁNDEZ-MOSTEIRÍN³, M. GIRALT³, L. PERDIGUER⁴, P. LARANJEIRA⁵, A. PAIVA⁵

¹ Departamento de Medicina. Centro de Investigación del Cáncer y Servicio de Citometría. Universidad de Salamanca. ² Servicio de Hematología. Hospital Clínico Universitario de Salamanca. ³ Servicio de Hematología. Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza. ⁴ Servicio de Hematología. Hospital de Alcañiz (Teruel). ⁵ Unidade de Citometria. Centro de Histocompatibilidade do Centro-Coimbra. Coimbra (Portugal)

Introducción

De forma similar a lo que ocurre con otras neoplasias mieloides como las leucemias mieloblásticas agudas (LMA), entre los SMD se incluye un grupo muy heterogéneo de pacientes que probablemente sufren múltiples enfermedades biológica y clínicamente diferentes¹. A ello apuntan la gran variedad de alteraciones morfológicas², genéticas y moleculares detectadas³, el comportamiento clínico dispar y difícil de predecir con precisión y las múltiples complicaciones derivadas fundamentalmente de las citopenias periféricas, su grado de severidad y de la tasa variable de transformación a leucemia aguda junto a una supervivencia variable, entre otros parámetros⁴. Por todo ello, en la actualidad el diagnóstico de los SMD sigue suponiendo en muchos casos un reto y requiere de múltiples criterios (información) derivados de la anamnesis y los antecedentes del paciente, la exploración física y los datos de laboratorio –incluidos de forma especial los obtenidos con los estudios morfológicos, histológicos y citogenéticos–, junto a una batería de test dirigidos a excluir la existencia de otros procesos^{4,5}. Por todo ello, hoy día sigue siendo necesario disponer de criterios adicionales que puedan facilitar el diagnóstico de los SMD y la identificación de nuevos subgrupos de pacientes con características clínicas y biológicas bien definidas, que permitan establecer indicaciones terapéuticas más adecuadas, dirigidas a mejorar el pronóstico de los mismos. De entre otras aproximaciones metodológicas, los estudios multiparamétricos por citometría de flujo de diferentes compartimentos de células hematopoyéticas surgen en la última década como una opción muy prometedora⁵⁻¹⁵.

A continuación, revisaremos la información disponible acerca de las indicaciones médicas y los resultados de los estudios inmunofenotípicos por citometría de flujo multiparamétrica realizados en SMD, para centrarnos posteriormente en comentar la utilidad clínica de dichos estudios y aquellos factores que han influido en limitar su aplicación en los SMD; en la última parte buscamos proporcionar una perspectiva de los avances técnicos y estudios requeridos para ampliar en el futuro la utilidad y aplicabilidad de los estudios inmunofenotípicos en los SMD.

Indicaciones médicas del inmunofenotipado en SMD

De acuerdo con los criterios actuales de la Organización Mundial de la Salud¹⁶, los estudios inmunofenotípicos tienen un papel limitado en el diagnóstico y caracterización de los SMD, a diferencia de lo que ocurre en otras hemopatías malignas⁶. Así, ante la sospecha clínica de SMD, la información derivada de los aná-

lisis citomorfológicos de la sangre periférica (SP) y de la médula ósea (MO), junto con los datos derivados de los estudios histopatológicos y citogenéticos, conforman la información sobre la que hoy asientan los criterios diagnósticos de la enfermedad^{1,16}. En algunos pacientes se requiere además de un periodo de observación para poder confirmar dicha sospecha diagnóstica, no siendo fácil a veces en adultos de edad avanzada el diagnóstico diferencial entre SMD y otros procesos reactivos^{8,12,17}. Según la OMS, aunque su utilidad futura es prometedora, el uso de los estudios inmunofenotípicos se restringiría en la actualidad a casos con elevada sospecha de SMD, que, pese a no cumplir de forma estricta los criterios diagnósticos convencionales, muestran alteraciones inmunofenotípicas múltiples, altamente sugerentes de la enfermedad¹⁶.

Casi en paralelo, yendo más allá de las recomendaciones de la OMS, el grupo de SMD de la Red Europea de Leucemias (ELN, “European LeukemiaNet”) ha reconocido la necesidad de establecer un consenso, entre otros aspectos, sobre las posibles indicaciones médicas de los estudios inmunofenotípicos por citometría de flujo en SMD⁵. Como resultado de una reunión celebrada en Amsterdam (Holanda) en el año 2008, este grupo concluye que la utilidad clínica de los estudios inmunofenotípicos se centraría preferentemente en: 1) el diagnóstico de pacientes con citopenias refractarias de significado indeterminado (ICUS); 2) el diagnóstico diferencial entre las ICUS y los SMD de bajo riesgo que presentan cariotipo normal en ausencia de necesidades transfusionales; 3) el diagnóstico de SMD con displasia uni vs. multilineal; 4) el diagnóstico diferencial entre algunos subtipos de SMD y LMA (p. ej.: leucemia mielomonocítica crónica vs. LMA con diferenciación monocítica); 5) la evaluación pronóstica de subgrupos bien definidos de SMD, como los SMD de alto riesgo o el síndrome 5q–, y 6) la identificación de otros procesos malignos capaces de causar citopenias, diferentes de los SMD (Tabla 1).

Información derivada de los estudios inmunofenotípicos de los SMD

En la última década se ha multiplicado el número de trabajos en los que se investiga la presencia de diferentes alteraciones fenotípicas y su posible utilidad clínica en los SMD^{5,8,10-12,15,18}. Así, los estudios más relevantes publicados en la bibliografía acerca del inmunofenotipo de los SMD se han centrado principalmente en el análisis de: 1) las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) CD34+¹⁵; 2) las células mieloides en maduración¹⁸; 3) la serie monocítica⁸ y; 4) en menor medida, los precursores eritroides (Tabla 2)¹⁹; 5) esporádicamente se han referido también estudios en la línea megacariocítica²⁰. Han recibido menor atención otras lí-

Tabla 1. Utilidad clínica de los estudios inmunofenotípicos en SMD según el grupo ELN (European Leukemia Net)

Diagnóstico de ICUS
Diagnóstico diferencial ICUS versus SMD de bajo riesgo (p. ej.: pacientes con cariotipo normal, sin dependencia de transfusiones)
Diagnóstico diferencial de SMD uni versus multilineal
Diagnóstico diferencial entre LMMC versus LMA con diferenciación monocítica
Evaluación pronóstica de los SMD de alto riesgo y síndrome 5q-
Diagnóstico de procesos que cursan con citopenia diferentes de los SMD

ICUS: citopenia refractaria de significado incierto; LMA: leucemia mieloblástica aguda; LMMC: leucemia mielomonocítica crónica; SMD: síndromes mielodisplásicos.

neas celulares hematopoyéticas menos representadas como el granulocito basófilo y eosinófilo^{21,22}, los mastocitos o las células dendríticas^{15,23-25}.

En conjunto, en estos trabajos se describen una multitud de alteraciones recurrentes distintas (Tablas 2 y 3) variables en tipo, número y especificidad. Las anomalías descritas reflejan una distribución alterada de las distintas líneas celulares y sus compartimentos madurativos, asociada con frecuencia a la presencia de aberraciones fenotípicas en uno o más de los compartimentos celulares referidos anteriormente. A diferencia de las neoplasias linfoides, en las que las anomalías fenotípicas se asocian de forma evidente con las alteraciones genéticas subyacentes²⁶, en los SMD éstas probablemente reflejan, además, la tormenta de citocinas y el impacto del micromedio ambiente medular sobre la hematopoyesis, en su intento por estimular la producción de células maduras imprescindibles para la supervivencia del individuo (p. ej.: los hematíes, las plaquetas y los granulocitos neutrófilos)¹⁵. Probablemente por eso, algunas de las alteraciones descritas no son específicas de los SMD, y se observan también en otro tipo de situaciones, como la respuesta a estrés medular (p. ej.: tras la administración de G-CSF, GM-CSF u otros factores de crecimiento), citopenias carenciales, citopenias tóxicas y otros procesos reactivos^{8,12,17,27}. De entre estas alteraciones, merece destacar, por su relevancia y frecuencia: 1) el incremento absoluto y relativo del número total de células CD34+ así como de progenitores CD34+ inmaduros y/o comprometidos a línea mielóide (mieloblastos); 2) el descenso del número de precursores linfoides B CD34+/CD10+; 3) la hipogranulación de células mieloides; 4) los asincronismos en la expresión de antígenos de células de línea de granulocito neutrófilo, monocito y/o eritroide en maduración; 5) la ausencia/disminución de reactividad para marcadores mieloides como CD13 y CD33, y; 6) expresión aberrante de antígenos asociados a línea linfóide en precursores granulomonocíticos (Tabla 2)⁵. Entre las demás anomalías frecuentemen-

te descritas entre los precursores CD34+ se incluyen: 1) expresión anormal de CD11b y CD15; 2) negatividad para CD13, CD33 y/o HLA-DR; 3) expresión aberrante de antígenos linfoides como CD5, CD7, CD19 y/o CD56; 4) sobreexpresión de CD34 y, 5) pérdida de expresión de CD45, CD38 y CD34, junto a 6) distribución alterada de los precursores CD34+ comprometidos a las diferentes líneas mieloides (Tabla 2). Ante esta situación, para la puesta en marcha de los estudios inmunofenotípicos se recomienda definir: 1) las poblaciones celulares de interés; 2) los marcadores y combinaciones de marcadores a analizar; 3) las alteraciones fenotípicas que se investigarán (p. ej.: cambios numéricos en la distribución de las diferentes poblaciones celulares, anomalías en intensidad de fluorescencia asociada a un marcador o expresión asincrónica de varios antígenos asociados a maduración), y 4) el sistema de puntuación de dichas alteraciones que permita evaluar en su conjunto el grado de severidad de las anomalías detectadas (Tablas 2 y 3).

Utilidad clínica del inmunofenotipado en SMD

Pese a lo referido anteriormente en el apartado sobre indicaciones médicas, hoy se reconoce que, debido a la gran heterogeneidad de este grupo de enfermedades, seguramente no existan alteraciones fenotípicas individuales que permitan identificar por sí solas, y de forma específica y sensible, la hematopoyesis asociada a los SMD⁵. Por el contrario, el análisis sistemático de una amplia batería de combinaciones de marcadores dirigidos a la identificación de las distintas líneas celulares de MO, sus estadios madurativos y posibles aberraciones fenotípicas podría definir patrones fenotípicos complejos, pero específicos de SMD, en la práctica totalidad de los casos^{15,18}. Además, el número de alteraciones fenotípicas, su grado de especificidad y desviación respecto a los patrones normales, así como la línea o líneas celulares afectadas, están estrechamente relacionados con los subgrupos diagnósticos y pronósticos de SMD establecidos por el IPSS (del inglés *International Prognostic Scoring System*)⁸⁻¹⁰ y/o el WPSS (del inglés *WHO Prognostic Scoring System*)²⁸, la dependencia transfusional, el tiempo de progresión/transformación a LMA y la supervivencia de los pacientes, incluidos aquellos que han recibido un trasplante de progenitores hematopoyéticos^{8,11,12}. De acuerdo con ello, en los últimos años se han propuesto varios sistemas de puntuación fenotípica (Tabla 3) que muestran una gran eficacia diagnóstica y utilidad pronóstica^{8,10,15,29,30}. En ellos se consideran simultáneamente distintas anomalías con diferente peso relativo según el tipo, número y grado de severidad de las mismas, y las líneas hematopoyéticas afectadas. En términos generales, el número de anomalías que se consideran relevantes en estos

Tabla 2. Compartimentos celulares diana de los estudios de citometría de flujo en SMD y más frecuentemente encontrados

Compartimento celular	Alteración fenotípica
Progenitores mieloides CD34+	
	Incremento del número de células CD34+
	Aumento de expresión de CD11b ^a y/o CD15
	Ausencia de expresión de CD13, CD33, y/o HLA-DR
	Expresión de antígenos asociados a línea linfóide (p. ej.: CD5, CD7, CD19, o CD56)
	Sub o sobreexpresión de CD34
	Subexpresión de CD38
Progenitores B CD34+	
	Descenso del número de precursores CD34+/CD10+
Precursores de granulocito neutrófilo en maduración	
	Hipogranularidad/Descenso de SSC
	Patrones de expresión de antígenos mieloides alterados (p. ej.: para CD11b/CD13/CD16)
	Asincronismos madurativos
	Ausencia de expresión de CD13 y/o CD33
	Expresión aberrante de CD34
	Expresión de antígenos asociados a línea linfóide
	Subexpresión de CD45
Precursores de línea monocítica	
	Alteración del patrón de expresión de HLA-DR, CD11b, CD13, CD14, CD33
	Ausencia de expresión de CD13, CD14, CD16 y/o CD33
	Expresión de CD34
	Expresión de antígenos asociados a línea linfóide ^b
Precursores eritroides	
	Expresión anormalmente elevada de CD45 y/o CD117
	Expresión aberrante de CD34
	Expresión anormalmente baja de CD71, CD36 y/o CD235a

SSC: dispersión lateral de luz.

^a Los precursores de granulocito basófilo pueden mostrar reactividad simultánea para CD34 y CD11b.

^b excepto CD4.

sistemas de puntuación es muy amplio y el tipo de alteraciones sólo es parcialmente superponible entre los diferentes estudios.

En la práctica, sin embargo, la utilidad clínica de los estudios inmunofenotípicos se ve limitada por la gran complejidad y heterogeneidad de los patrones fenotípicos existentes en la enfermedad y en aquellos procesos con los que ha de establecerse con frecuencia un diagnóstico diferencial.

Factores que limitan la aplicación clínica del inmunofenotipado en SMD

Desde hace más de dos décadas se vienen aplicando las técnicas inmunofenotípicas al estudio de los SMD. Inicialmente, los resultados de estos estudios han te-

nido escaso impacto. Únicamente en los últimos 5-10 años, con la introducción de los análisis multiparamétricos mediante citometría de flujo, el inmunofenotipado ha adquirido una mayor difusión y aceptación en el estudio de los SMD. Desde el punto de vista práctico, el análisis citométrico de múltiples parámetros fenotípicos permite abordar de forma más eficiente el estudio de los rasgos fenotípicos madurativos de diferentes compartimentos de células hematopoyéticas y establecer criterios que permiten definir la existencia de desviaciones y alteraciones en los patrones de expresión proteica, característicos de los SMD^{10,15,18,27}. Ante esta situación, a simple vista resulta inesperado que dicha información no se haya trasladado rápidamente a la rutina del diagnóstico hematológico. Esta aparente discrepancia resulta aún más manifiesta si tenemos en cuenta dos factores: 1) por un lado, la

Tabla 3. Alteraciones inmunofenotípicas de los precursores CD34+ de médula ósea y su asociación a hemopatía clonal y síndromes mielodisplásicos (SMD)

Variable inmunofenotípica	Grado de especificidad	
	Proceso clonal	SMD
% de precursores inmaduros	Alto	Intermedio
CD13 (IMF)	Alto	Alto
CD117 (IMF)	Intermedio	Intermedio
% células CD7+	Alto	Intermedio
% de precursores de granulocito neutrófilo	Alto	Intermedio
CD13 (IMF)	Alto	Alto
CD33 (IMF)	Bajo	Bajo
CD117 (IMF)	Intermedio	Intermedio
% células CD15+	Alto	Alto
% células CD64+	Alto	Alto
% células CD65+	Alto	Alto
% de precursores eritroides	Alto	Alto
% células CD36+	Alto	Intermedio
% células CD71+	Alto	Intermedio
% de precursores linfoides B	Bajo/Intermedio	Bajo/Intermedio
% de precursores monocíticos	ND	ND
TdT (IMF)	Alto	Alto
CD79a (IMF)	Intermedio	Alto
% de precursores de CDp	Intermedio	Alto

CDp: células dendríticas plasmocitoides; IMF: intensidad media de fluorescencia; ND: no determinado; SMD: síndromes mielodisplásicos.

utilidad creciente del inmunofenotipo en el diagnóstico, clasificación, evaluación del grado de extensión y monitorización de las leucemias agudas, los síndromes linfoproliferativos crónicos y, más recientemente, las gammopatías monoclonales³¹ y; 2) por otra parte, el número creciente de trabajos publicados en los últimos años, en los que se demuestra la utilidad de los estudios inmunofenotípicos por citometría de flujo en el diagnóstico y evaluación pronóstica de pacientes con SMD^{10,18}.

En términos generales podríamos decir que los motivos y razones que limitan la aplicación de los estudios inmunofenotípicos por citometría de flujo al campo de los SMD son múltiples. De ellos merece destacarse: 1) la necesidad de estudiar simultáneamente varias poblaciones celulares habitualmente heterogéneas en cuanto a sus características madurativas ya que los SMD puede afectar a una o múltiples líneas de células hematopoyéticas y, dentro de cada una de ellas, a distintos compartimentos madurativos; 2) la gran variedad de las alteraciones fenotípicas detectadas, incluso dentro de cada uno de los compartimentos celulares antes referidos, incrementa aún más si cabe el número de marcadores a analizar; 3) la existencia de información parcial e in-

completa sobre los perfiles fenotípicos de diferentes compartimentos madurativos de médula ósea normal y reactiva, sobre todo en procesos y enfermedades en los que dichos patrones madurativos puedan verse alterados respecto a la diferenciación normal; 4) las limitaciones técnicas que dificultan en muchos laboratorios el empleo de marcajes de más de cuatro fluorescencias, o la elaboración de paneles de > 4 colores en los que existan reactivos comerciales de elevada calidad, con una flexibilidad que permita la elaboración de paneles optimizados y no limitados y ajustados a los reactivos comercialmente disponibles y; 5) la ausencia de estudios multicéntricos sobre series amplias de pacientes con SMD, donde se evalúe la utilidad diagnóstica y pronóstica de la información inmunofenotípica respecto a otros parámetros de reconocida utilidad clínica. Todo ello, asociado a la falta de estandarización metodológica, lleva asociado un coste y complejidad crecientes por el elevado número de reactivos requeridos, la necesidad de personal altamente cualificado, el tiempo re-

querido para el análisis de la información fenotípica obtenida y su interpretación, así como la falta de criterios que faciliten su estandarización a nivel multicéntrico. A modo de ejemplo, los estudios fenotípicos en una neoplasia linfóide suelen centrar su objetivo en la identificación de una (o a lo sumo dos) poblaciones de células tumorales, bloqueadas en su maduración, requiriendo para su identificación y caracterización la evaluación de los patrones de expresión de en torno a un máximo de 20-30 marcadores. En contraposición, ante la sospecha de un SMD han de evaluarse diferentes compartimentos madurativos de al menos cuatro grupos de precursores medulares: los precursores CD34+ y las células CD34- comprometidas a línea de granulocito neutrófilo, monocito y a la serie eritroide (Tabla 2). Esto requiere, además, de baterías más amplias de marcadores y de un conocimiento detallado y profundo de los patrones fenotípicos característicos de la MO normal (en diferentes grupos de edad), y de su desviación en un número creciente de situaciones con las que podría llegar a plantearse un diagnóstico diferencial, que van desde los síndromes mieloproliferativos y las LMA a las citopenias carenciales, inducidas por tóxicos y asociadas a infecciones, entre otros.

Tabla 4. Sistemas de puntuación fenotípica propuestos para el diagnóstico y evaluación pronóstica de los SMD

Referencia	Criterios de puntuación	
	Valor diagnóstico	Valor pronóstico
Stetler-Stevenson <i>et al.</i> , Blood 2001	N.º de alteraciones (> 2)	
Wells <i>et al.</i> , Blood 2003		N.º y tipo de aberraciones
Arroyo <i>et al.</i> , Hematol Jour 2004		N.º de alteraciones (> 2)
Lorand-Metze <i>et al.</i> , Leuk Res 2007		N.º de alteraciones (correlación con WPSS)
Font <i>et al.</i> , Leuk Res 2007	N.º alteraciones (subtipos OMS)	
Van de Loosdrecht, Blood 2008	N. alteraciones	
Scott <i>et al.</i> , Blood 2008	N.º y tipo alteraciones (tras Alo-Tx)	
Matarráz <i>et al.</i> , Leukemia 2008	N.º y severidad de alteraciones	N.º y severidad de alteraciones

Alo-Tx: trasplante alogénico; WPSS: Índice Pronóstico Internacional basado en los criterios de la Organización Mundial de la Salud.

Perspectivas futuras

Ante esta situación, cabe preguntarse: ¿algún día el inmunofenotipo llegará a aplicarse de forma rutinaria, simplificada y reproducible en la caracterización diagnóstica, la subclasificación y/o la evaluación pronóstica de los SMD? Para poder dar respuesta a esta pregunta hacen falta iniciativas encaminadas a abordar tres aspectos diferentes: 1) innovación metodológica; 2) estandarización de procedimientos, y 3) demostración fehaciente de su utilidad clínica añadida sobre las herramientas disponibles en la actualidad.

Para abordar tales aspectos, han surgido diferentes iniciativas que persiguen facilitar la aplicación de este tipo de estudios en la rutina diagnóstica. De ellas merecen destacarse dos. Por un lado, la del grupo de SMD de la Red Europea de Leucemias (ELN, "European LeukemiaNet"), que intenta poner orden en los procedimientos existentes, de acuerdo con las necesidades más urgentes⁵. Además de establecer las indicaciones médicas actuales (y también previsiblemente futuras) de la citometría aplicada al estudio de los SMD, la ELN hace una revisión retrospectiva de los procedimientos técnicos y de aquellos marcadores e información fenotípica, que en la bibliografía existente hasta ese momento y en la experiencia de los miembros del grupo serían los más adecuados e informativos, respectivamente^{5,32}. En paralelo, el grupo EuroFlow trabaja desde hace cuatro años en el diseño y evaluación de nuevos paneles de anticuerpos y de nuevas herramientas informáticas, que una vez combinados pueden llegar a transformar el análisis y la interpretación de los resultados de los estudios inmunofenotípicos por citometría de flujo de los SMD, en un proceso objetivo que pueda aplicarse de forma estandarizada para ese fin (www.euroflow.org)^{33,34}.

La tercera iniciativa ha de estar centrada en la investigación y demostración de la utilidad clínica de las

nuevas propuestas metodológicas desarrolladas. Este reto, de actualidad candente, requiere de series muy amplias de pacientes, en los que además se disponga de información clínica, biológica, genética y evolutiva completa y de calidad y sólo podrá alcanzarse en el seno de estudios multicéntricos, en especial si están apoyados por grupos cooperativos consolidados, como el grupo español de SMD.

Bibliografía

1. Valent P, Horny HP, Bennett JM, et al. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leuk Res.* 2007;31:727-736.
2. Mufti GJ, Bennett JM, Goasguen J, et al. Diagnosis and classification of myelodysplastic syndrome: International Working Group on Morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) consensus proposals for the definition and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts. *Haematologica.* 2008;93:1712-1717.
3. Pellagatti A, Cazzola M, Giagounidis A, et al. Deregulated gene expression pathways in myelodysplastic syndrome hematopoietic stem cells. *Leukemia.* 2010;24:756-764.
4. Jadersten M, Hellstrom-Lindberg E. Myelodysplastic syndromes: biology and treatment. *J Intern Med.* 2009;265:307-328.
5. van de Loosdrecht AA, Alhan C, Bene MC, et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from the first European LeukemiaNet working conference on flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Haematologica.* 2009;94:1124-1134.
6. Orfao A, Ortuno F, de Santiago M, Lopez A, San Miguel J. Immunophenotyping of acute leukemias and myelodysplastic syndromes. *Cytometry A.* 2004;58:62-71.
7. Ogata K, Nakamura K, Yokose N, et al. Clinical significance of phenotypic features of blasts in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood.* 2002;100:3887-3896.
8. Wells DA, Benesch M, Loken MR, et al. Myeloid and monocytic dyspoiesis as determined by flow cytometric scoring in myelodysplastic syndrome correlates with the IPSS and with outcome after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2003;102:394-403.

9. Benesch M, Deeg HJ, Wells D, Loken M. Flow cytometry for diagnosis and assessment of prognosis in patients with myelodysplastic syndromes. *Hematology*. 2004;9:171-177.
10. Ogata K, Kishikawa Y, Satoh C, Tamura H, Dan K, Hayashi A. Diagnostic application of flow cytometric characteristics of CD34+ cells in low-grade myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2006;108:1037-1044.
11. Scott BL, Wells DA, Loken MR, Myerson D, Leisenring WM, Deeg HJ. Validation of a flow cytometric scoring system as a prognostic indicator for posttransplantation outcome in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2008;112:2681-2686.
12. van de Loosdrecht AA, Westers TM, Westra AH, Drager AM, van der Velden VH, Ossenkoppele GJ. Identification of distinct prognostic subgroups in low- and intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes by flow cytometry. *Blood*. 2008;111:1067-1077.
13. Fuchigami K, Mori H, Matsuo T, et al. Absolute number of circulating CD34+ cells is abnormally low in refractory anemias and extremely high in RAEB and RAEB-t; novel pathologic features of myelodysplastic syndromes identified by highly sensitive flow cytometry. *Leuk Res*. 2000;24:163-174.
14. Del Canizo MC, Fernandez ME, Lopez A, et al. Immunophenotypic analysis of myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2003;88:402-407.
15. Matarraz S, Lopez A, Barrena S, et al. The immunophenotype of different immature, myeloid and B-cell lineage-committed CD34+ hematopoietic cells allows discrimination between normal/reactive and myelodysplastic syndrome precursors. *Leukemia*. 2008;22:1175-1183.
16. Brunning RO, Germing U, LeBeau M, Porwit A, Baumann I. Myelodysplastic syndromes/neoplasms. WHO Classification of Tumours and Hematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC 2008.
17. Stachurski D, Smith BR, Pozdnyakova O, et al. Flow cytometric analysis of myelomonocytic cells by a pattern recognition approach is sensitive and specific in diagnosing myelodysplastic syndrome and related marrow diseases: emphasis on a global evaluation and recognition of diagnostic pitfalls. *Leuk Res*. 2008;32:215-224.
18. Matarraz S, Lopez A, Barrena S, et al. Bone marrow cells from myelodysplastic syndromes show altered immunophenotypic profiles that may contribute to the diagnosis and prognostic stratification of the disease: a pilot study on A series of 56 patients. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010;78:154-168.
19. Della Porta MG, Malcovati L, Invernizzi R, et al. Flow cytometry evaluation of erythroid dysplasia in patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia*. 2006;20:549-555.
20. Thiele J, Quitmann H, Wagner S, Fischer R. Dysmegakaryopoiesis in myelodysplastic syndromes (MDS): an immunomorphometric study of bone marrow trephine biopsy specimens. *J Clin Pathol*. 1991;44:300-305.
21. Fureder W, Schemthaler GH, Ghannadan M, et al. Quantitative, phenotypic, and functional evaluation of basophils in myelodysplastic syndromes. *Eur J Clin Invest*. 2001;31:894-901.
22. Wimazal F, Baumgartner C, Sonneck K, et al. Mixed-lineage eosinophil/basophil crisis in MDS: a rare form of progression. *Eur J Clin Invest*. 2008;38:447-455.
23. Horny HP, Greschniok A, Jordan JH, Menke DM, Valent P. Chymase expressing bone marrow mast cells in mastocytosis and myelodysplastic syndromes: an immunohistochemical and morphometric study. *J Clin Pathol*. 2003;56:103-106.
24. Sperr WR, Stehberger B, Wimazal F, et al. Serum tryptase measurements in patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma*. 2002;43:1097-1105.
25. Ma L, Ceuppens J, Kasran A, Delforge M, Boogaerts M, Vandenberghe P. Immature and mature monocyte-derived dendritic cells in myelodysplastic syndromes of subtypes refractory anemia or refractory anemia with ringed sideroblasts display an altered cytokine profile. *Leuk Res*. 2007;31:1373-1382.
26. Owaidah TM, Rawas FI, Al Khayatt MF, Elkum NB. Expression of CD66c and CD25 in acute lymphoblastic leukemia as a predictor of the presence of BCR/ABL rearrangement. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. 2008;1:34-37.
27. Moon HW, Huh JW, Lee M, Hong KS, Chung WS. Immunophenotypic features of granulocytes, monocytes, and blasts in myelodysplastic syndromes. *Korean J Lab Med*;30:97-104.
28. Lorand-Metze I, Ribeiro E, Lima CS, Batista LS, Metze K. Detection of hematopoietic maturation abnormalities by flow cytometry in myelodysplastic syndromes and its utility for the differential diagnosis with non-clonal disorders. *Leuk Res*. 2007;31:147-155.
29. Malcovati L, Della Porta MG, Lunghi M, et al. Flow cytometry evaluation of erythroid and myeloid dysplasia in patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia*. 2005;19:776-783.
30. Cherian S, Moore J, Bantly A, et al. Peripheral blood MDS score: a new flow cytometric tool for the diagnosis of myelodysplastic syndromes. *Cytometry B Clin Cytom*. 2005;64:9-17.
31. Paiva B, Vidriales MB, Perez JJ, et al. Multiparameter flow cytometry quantification of bone marrow plasma cells at diagnosis provides more prognostic information than morphological assessment in myeloma patients. *Haematologica*. 2009;94:1599-1602.
32. Loken MR, van de Loosdrecht A, Ogata K, Orfao A, Wells DA. Flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from a working conference. *Leuk Res*. 2008;32:5-17.
33. Pedreira CE, Costa ES, Almeida J, et al. A probabilistic approach for the evaluation of minimal residual disease by multiparameter flow cytometry in leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Cytometry A*. 2008;73A:1141-1150.
34. Pedreira CE, Costa ES, Barrena S, et al. Generation of flow cytometry data files with a potentially infinite number of dimensions. *Cytometry A*. 2008;73:834-846.

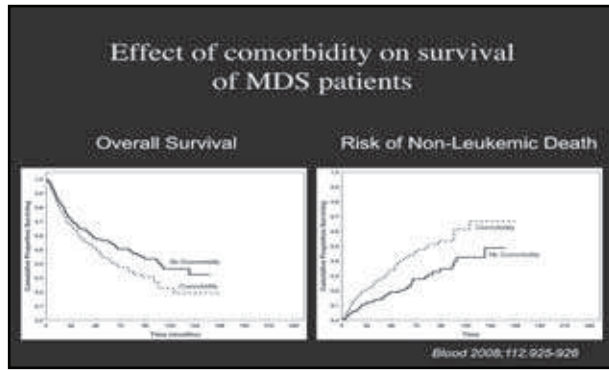
CÓMO TRATAR AL PACIENTE CON SMD

R. STONE

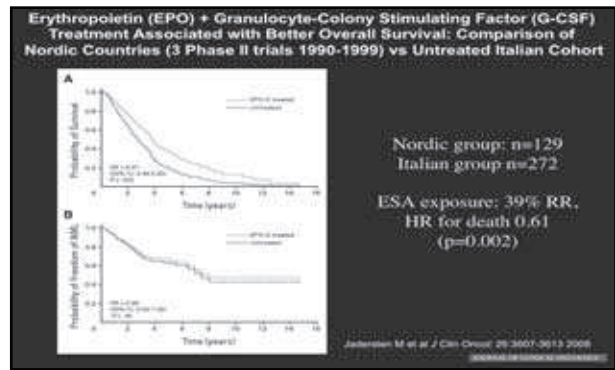
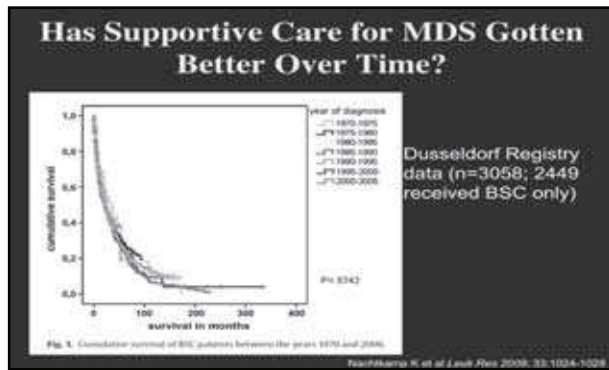
Adult Leukemia Program. Dana-Farber Cancer Institute and Brigham and Women's Hospital. Harvard Medical School Boston (MA, EE UU)

Myelodysplastic Syndromes: Therapeutic Approach

- Use limited pathophysiological understanding to guide rx
 - Imatinib in rare CMML cases w PDGFRb activation (e.g. t(5;12))
 - ? Role of 'new' mutations: c-cbl, TET2, ASXL1 and SNP-defined abnormal karyotype
- Disease heterogeneity dictates choice
 - Higher risk: consider alloSCT
 - DNAMT1 (5-aza, decitabine) instead or first
 - 5q-: lenalidomide
 - Selected lower risk: immunosuppression



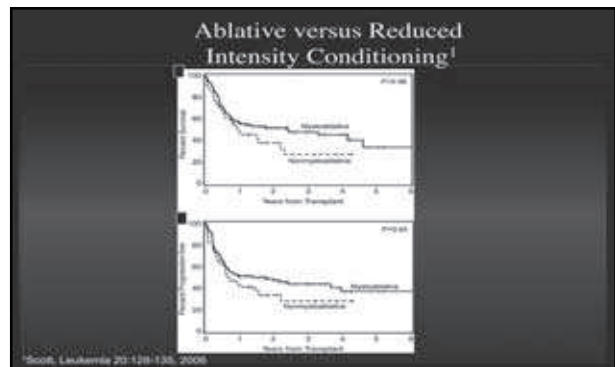
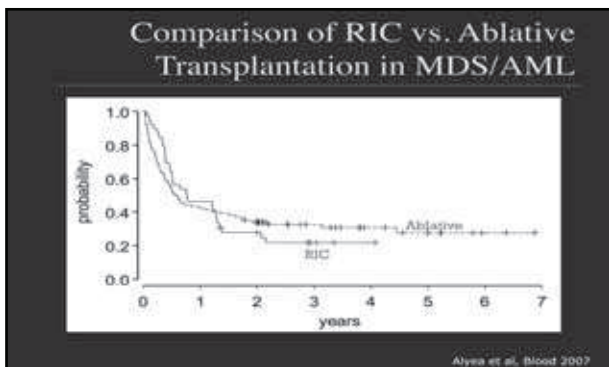
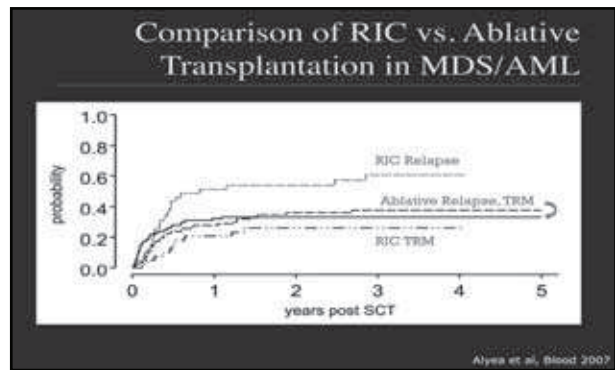
- ### Myelodysplastic Syndromes: Some Controversies
- Who/when to RIC 'v' full allo?
 - How should we treat non 5q- lower risk MDS: immunosuppression, HGFs, lenalidomide or azacitidine?
 - How long to we treat with hypomethylating agents and when should we combine them with other agents?
 - To chelate or not to chelate?

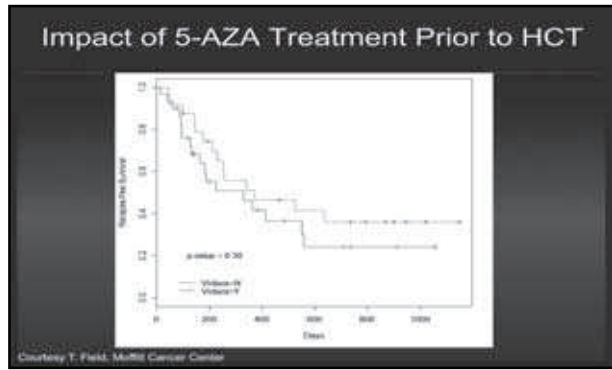
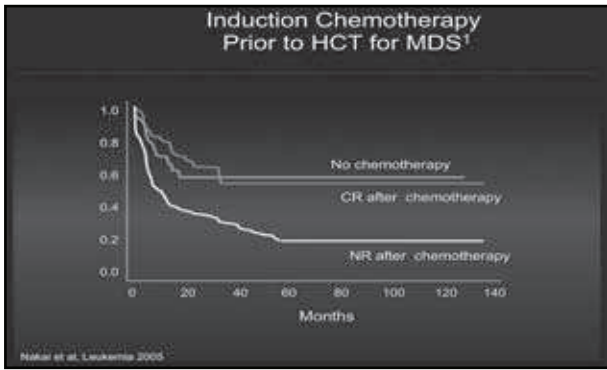


AlloTX in MDS: Approximation of Life Expectancy (Years)

	Immediate Transplant	Transplant in 2 Years	Transplant at Progression
Low	6.51	6.86	7.21
Int-1	4.61	4.74	5.16
Int-2	4.93	3.21	2.84
High	3.20	2.75	2.75

From: Cutler C, et al. Blood 2004





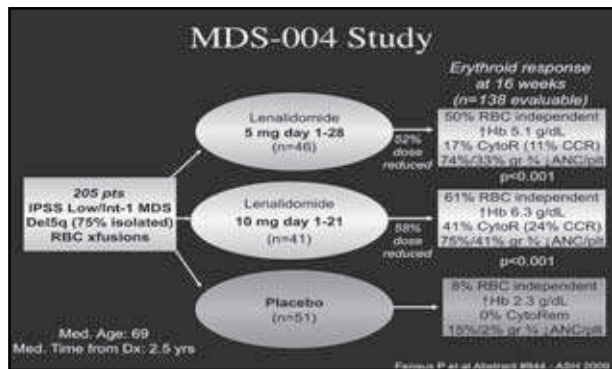
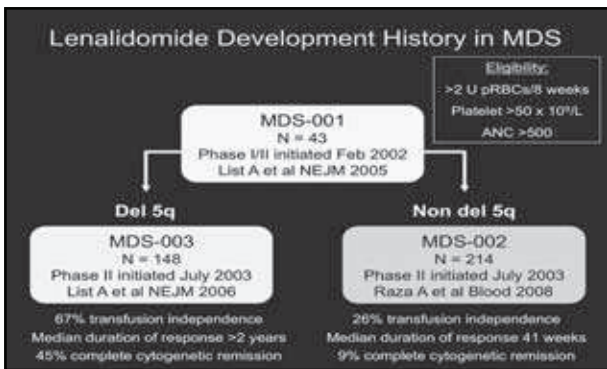
Immunosuppression in MDS

- Theory that the pathophysiology of cytopenias in non-excess blast subtypes of MDS may be due to T-cell mediated suppression, as in aplastic anemia
- Immunosuppression in indolent subtypes of MDS, particularly hypoplastic refractory anemia with normal chromosomes
 - Cyclosporin A: 50% response rate (Czech)
 - Antithymocyte globulin: 50% RBC and/or platelet response (NCI, n=60)
 - Best chance: younger pts and lower platelet counts, HLADR15
- Identification of candidates is challenging

Phase II: Alemtuzumab in IPSS Int-1/Int-2 MDS With High PPR For Immunosuppressive Therapy

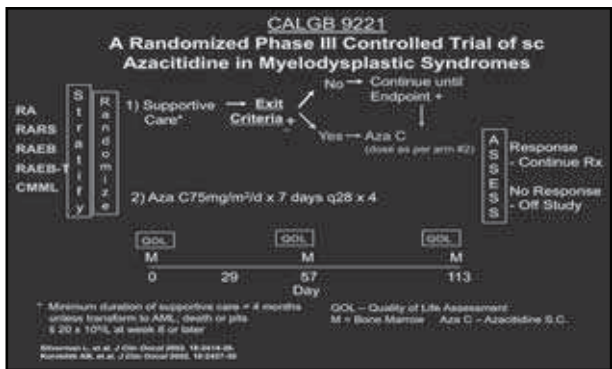
- Eligible patients: MDS, high PPR using 2003 method
- Pts younger (median age 53) and more with hypocellular MDS (45%) than typical
- Alemtuzumab (anti-CD52) 10 mg IV for 10 consecutive days
- Pts given TMP/SMX and valganciclovir prophylaxis
- 15/16 (93%) Int-1 and 2/5 (40%) Int-2 MDS had some response
- 5/7 pts with abnormal karyotype had cytogenetic normalization
- 4/22 transiently positive for EBV

Blomd EM et al Abstract #110 - ASH 2009



Differentiation Therapy in MDS

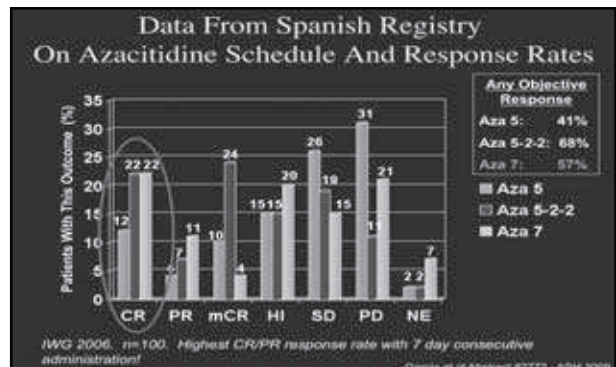
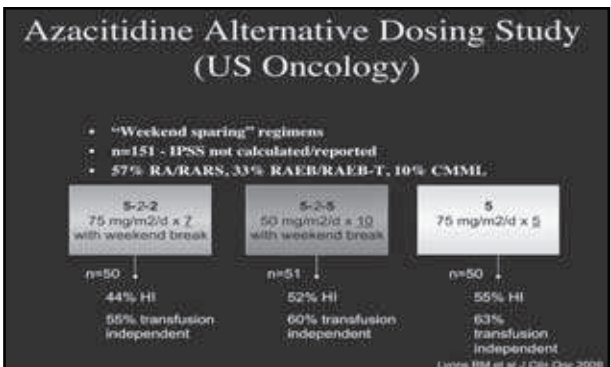
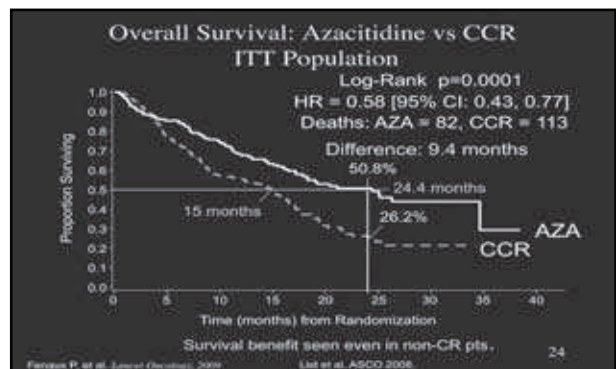
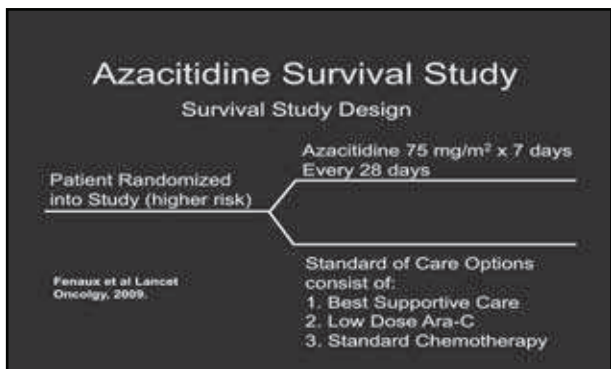
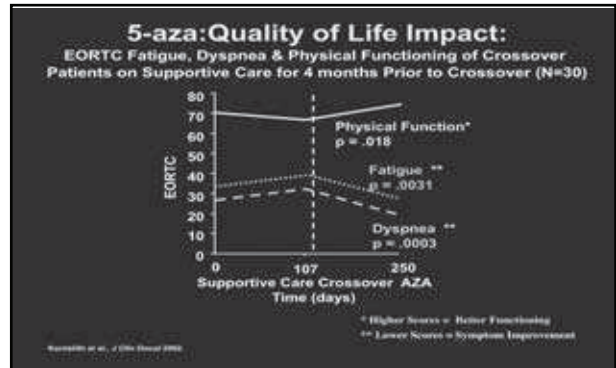
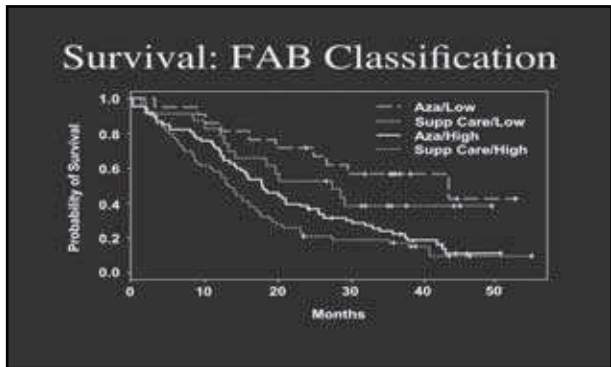
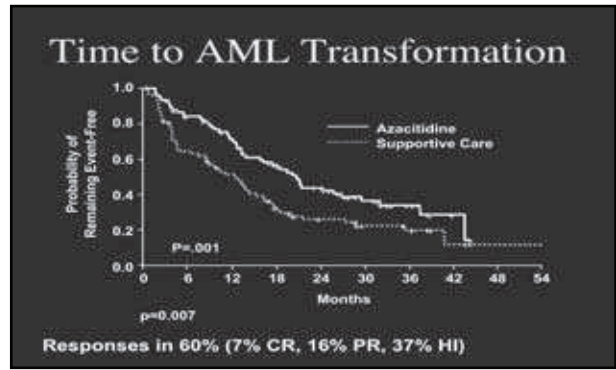
- Overcome Block in Failure to produce mature cells
 - Low dose ara-C: responses in 10-20%, rarely used now
 - ATRA: lack of benefit in randomized trial
 - Promote transcription of differentiation-associated genes
 - histone deacetylase inhibitors (e.g., phenylbutyrate, depsipeptide) in development
 - DNA hypomethylating agents (5-azacytidine and decitabine)
 - The most active available category of agents in MDS (5-aza FDA approved 5-04)



ANALYSIS OF RESPONSE

	SC 92	Aza C 99	Crossover 49
CR	0 (0%)	7 (7%)*	5 (10%)
PR	0 (0%)	15 (16%)**	2 (4%)
Impr	5 (5%)	38 (37%)**	
16 (36%)			
Total	5 (5%)	60 (60%)**	
23 (47%)	P-value	* < 0.01	** < 0.001

Silverman et al., JCO, May 15 2002, 2429-2440



Phase I of Oral Azacitidine

- Traditional dose escalation starting with 120 mg/day PO x 7 days of a 28 day cycle
 - First cycle was SC 75 mg/m²/day x 7 days
- **DLT:** 600 mg/day (grade 3 diarrhea)
- **MTD:** 480 mg/day
- Mean bioavailability 13% (range 5-35%)
- Among patients getting at least 6 cycles (n=14): 29% CR, 43% stable disease

Genita-Mansoni G et al Abstract #117 / ASH 2009

DECITABINE in MDS

- 66 pts with MDS rec'd decitabine 15mg/m² over 4 h IV q8 h x 3d every 6 weeks (Wijermans, JCO, 2000)
 - In RAEB: 7/26 CRs, RAEB-T 4 CR, 1 PR/22
 - overall 51% heme improvement
- Randomized trial of decitabine (IV q 8h x 9 doses) 'v' obs: Saba ASH 04 lead to FDA approval early May 2006
 - Prolonged t to AML/death in high risk only
 - RR similar to 5-aza (17% PR/CR; 30% ORR)
- New schedule: 20 mg/m²/d IV x5d q 28d is popular based on Phase IIB trial w. 35% CR/PR (Kantarjian et al, Blood, 2007)

3-Arm Dosing Study Data Responses By Treatment Arm

Schedule	No. CR/Total (%)
20 mg/m ² IV x 5 days	25/64 (39)*
20 mg/m ² SQ x 5 days	3/14 (21)
10 mg/m ² IV x 10 days	4/17 (24)

*Statistically significant compared to the two other treatment groups

Wijermans R et al Blood 2007;109:1121-1127

Phase III Low-Dose Decitabine (q 8h dosing) vs Supportive Care in MDS: Results

- EORTC 06011
 - Median age: 70 years
 - IPSS in 2-high-risk MDS: 35% 3/9%
 - Poor cytogenetics: 40%
 - Previous treatment: 20%
- Superior responses and PFS with decitabine vs supportive care; no improvement in OS or time to AML or death

Response, mos	Decit (n = 119)	BSC (n = 114)	P Value
Median OS	10.1	8.5	.38
Median PFS	6.6	3.0	.004
Median time to AML or death	8.8	6.1	.24

Wijermans R et al. ASH 2008. Abstract 226

Chelation in MDS?

- Ferritin levels and transfusion burden correlate with poor outcome
- It is possible to lower iron burden with an oral agent; deferasirox
- While consensus statements recommend chelation, at least in chronically transfused lower risk pts, there are no studies which prospectively document a clinical benefit

Overall Survival After Transplantation:*

Based on pre-transplant serum ferritin

* in MDS patients

Amaral P et al. Blood. 2007;109(10):4596-99

US03 Prospective Phase II Chelation Study: Two Year Data

42% (n=35) of the n=83 discontinued during year 2

- 9.6% (n=8) due to abnormal lab values (creatinine in 6 of 8 pts) – 30% of pts with normal baseline Cr had 2 values >ULN
- 9.6% (n=8) due to AEs (mostly GI)
- 13.2% (n=11) due to death (not drug related)
- 9.6% (n=8) due to disease progression

Liaw A et al Abstract 3829 ASH 2009

Matched-Pair Analysis of Transfused Patients With MDS and Ferritin >500 ng/mL Receiving Iron Chelation Therapy or Not: Düsseldorf Registry

- Type of chelation therapy received:
 - Deferoxamine only (n = 53)
 - Deferiprone followed by deferoxamine (n = 3)
 - Deferasirox only (n = 47)
 - Deferoxamine followed by deferasirox (n = 14)
- Serum ferritin levels:
 - Mean 1954 ng/mL in chelated group, 945 ng/mL in non-chelated

	Chelation (n = 93)	No Chelation (n = 93)	P Value
Median OS	75 months	40 months	.002
Risk of AML			.73
At 2 years	10%	12%	NR
At 5 years	19%	18%	NR

Fox et al. ASH 2009; abstract 1747

Developmental Therapeutics in MDS

- FLT3 inhibitors in excess blasts subtypes w mutation
- TPO agonists
- Anti-TNF in low risk MDS
- Farnesyl transferase inhibitors
- Histone deacetylase inhibitors alone and in combination with DNAMTi
- DNAMTi plus lenalidomide
- Lenalidomide plus bortezomib
- Glutathione S-transferase binders

Azacitidine ± Romiplostim in MDS: Randomized Phase II Study

*Azacitidine, 75 mg/m²/day on Days 1-7 of 28-day cycle
Kantarjian H, et al. ASH 2008. Abstract 224.

Azacitidine ± Romiplostim in MDS

- Addition of romiplostim to azacitidine in MDS patients increased platelet levels, decreased need for platelet therapy, and decreased bleeding

Azacitidine Cycle	Median Platelet Counts, x 10 ⁹ cells/L					
	Placebo (n = 13)		Romiplostim			
	Pre Cycle	Nadir	500 µg/wk (n = 13)		750 µg/wk (n = 14)	
			Pre Cycle	Nadir	Pre Cycle	Nadir
1	25	14	40	33	37	32
2	48	16	121	63	115	53
3	54	33	73	43	222	116
4	88	40	60	50	315	91

Experience with HDAC Inhibitors in Leukemia

Drug	MS-275	Depisapeptide	Vorinostat	MGCD-0103	LBH589	VPA
Phase	I	I	I	I	I	II
N	39	10	41	29	29	75
Tox.	Neuro	Constitutional	GI	GI	Cardiac	Neuro
ORR	0	0	17%	10%	0	24%

Quin. Blood 2007;109:2781-2790; Byrd. Blood 2005;105:909-907; Garcia-Manero. Blood, 2009; Garcia-Manero, submitted; Ossa. CCR 2006;12:4929-30; Koehnigen. Ann. Hematol 2007;86(5):614-68.

Summary of Combination Epigenetic Studies

Study	AZA+ PB	DAC+ VPA	AZA+ VPA	DAC+ VPA	AZA+ MGCD 0103
Phase	I	I/II	I/II	I	I/II
N	36	54	53	25	52
Tox.	Neuro	Neuro	Neuro	Neuro	GI
ORR	30%	22%	42%	44%	36%

Quin. Cancer Res 2006;85:6361-8; Garcia-Manero. Blood 2006;108:3271-8; Soriano. Blood 2007;110:2302-6; Blum. JCO 2007;25:3884; Garcia-Manero. ASH 2007; poster 444.

5-azacitidine+lenalidomide

- ▶ Phase 1 study higher risk untreated MDS
- ▶ Doses: 5-azacitidine 75 mg/m² 5 to 10 days and lenalidomide 5 mg PO QD 14 to 21 days
- ▶ Median age 68 years (52-78)
- ▶ No drug related toxicity: DLT/MTD
- ▶ Responses:
 - CR 7 (41%)
 - PR 1 (6%)
 - HI 3 (18%)
 - marrow CR 1 (6%)

ORR 12 (71%)

Conclusion: safe combination. Need confirmation other studies; higher doses of LEN?

Sakamuri. JCO, 2010

Are we making a difference in MDS? Concluding thoughts

- Of course lenalidomide in 5q- MDS and DNA hypomethylating agents are advances and probably do lead to better QOL and longer survival in the aggregate, BUT WE NEED TO:
 - Define molecular pathophysiology
 - Identify who will respond and who won't before exposure to dangerous drugs
 - Figure out how to combine active agents with each other
 - Agree on valid surrogate endpoints
 - Do more phase III trials and/or decide on utility of Bayesian randomization in drug acceptance process

MDS: General Algorithm

Stone. Blood, 2009

Presente y futuro en el tratamiento del mieloma múltiple

COORDINADOR: J.J. LAHUERTA. *Madrid*

Resumen del simposio

En el mieloma múltiple (MM), considerando la no tan lejana época de la quimioterapia convencional, en la que la máxima aspiración terapéutica consistía en estabilizar la progresión y aliviar el dolor, la perspectiva actual es muy diferente. En los noventa, la quimioterapia a altas dosis con soporte autólogo supuso un avance indiscutible, que, aunque aplicable sólo a una minoría de casos con MM, permitió obtener respuestas antitumorales de mayor calidad y prolongar la vida de muchos pacientes. En los pacientes susceptibles de trasplante, el MM pasó de ser una enfermedad incurable con largas supervivencias del 10-15%, atribuibles sólo al carácter indolente de una minoría de casos con MM, a ser “prácticamente” incurable, con medianas de supervivencia de entre 5 y 8 años, y un 30-40% de curaciones “operativas” en los pacientes más jóvenes. Sin solución de continuidad, en la década 2000-2010, la disponibilidad de talidomida primero, bortezomib después y, por último, lenalidomida revolucionó el tratamiento del MM. Los resultados del gran esfuerzo de investigación clínica desarrollada tanto desde la industria farmacéutica como desde potentes grupos cooperativos son ya evidentes, aunque el efecto final requerirá tiempos de observación más prolongados.

Aunque es cierto que el trasplante y los nuevos fármacos han incrementado la eficacia de los tratamientos de primera línea y permiten disponer de recursos de rescate por fin eficaces, también lo es que, individualmente, el efecto antitumoral, tanto de los viejos como de los nuevos fármacos e incluso de la quimioterapia a alta dosis soportada con trasplante autólogo, es limitado, por lo que son necesarios esquemas de tratamiento combinado y la utilización de estrategias de tratamiento secuencial en las que cada etapa aporta un efecto antitumoral adicional sobre la anterior, o prolonga la duración de la respuesta obtenida previamente. Aunque el desarrollo clínico de los agentes terapéuticos actuales aún no ha terminado, es posible ya intuir los límites de su eficacia. No sería sorprendente alcanzar la frontera de un 80% de RC en pacientes jóvenes y del 50% en los no candidatos a trasplante, con mejores perspectivas también para los nada infrecuentes pacientes “frágiles” con MM.

Ahora, irrumpe una “nueva” generación de nuevos fármacos aún en fases tempranas de investigación clínica, cuya primera consecuencia será recuperar las posibilidades de rescate en pacientes con MM cuyas opciones estarán agotadas, quizás por la utilización simultánea de todos los recursos disponibles en primera línea. De forma paralela, la introducción de nuevas técnicas de análisis citométrico y molecular están permitiendo avances significativos en el conocimiento biológico del MM, en la búsqueda del dintel de respuesta relacionado con la curación y en el desarrollo de tratamientos adaptados al riesgo, a la sensibilidad terapéutica individual o a dianas genéticas predeterminadas. La ponencia del Dr. Rafael Fonseca estudia la descripción del impacto pronóstico en el MM de algunas de las anomalías genéticas más útiles desde el punto de vista asistencial, analiza las posibilidades de nuevas técnicas de análisis genético cuya incorporación traslacional es previsible a medio plazo y describe los datos clínicos disponibles que pueden orientar el tratamiento adaptado al riesgo genético.

En este escenario de cambios constantes, sin embargo, la interpretación de los resultados clínicos es extraordinariamente complicada y dificulta la adquisición de criterios sólidos como soporte de decisiones terapéuticas para cada momento clínico de la enfermedad. La intervención del Dr. Joan Bladé en este simposio aborda este objetivo, actualizando los fundamentos y las líneas de tratamiento para pacientes con MM de nuevo diagnóstico con opciones de trasplante autólogo, valorando también la mejor utilización del trasplante alogénico y los criterios para el manejo de los pacientes mayores, valorando las adaptaciones necesarias para casos de elevada fragilidad biológica por razones de edad o comorbilidad.

Desde la perspectiva de los tratamientos de rescate en el MM, la intervención del Dr. Jesús San Miguel examina las posibilidades de una nueva generación de fármacos con mecanismos de acción muy diferentes cuyo desarrollo es consecuencia de los importantes avances del conocimiento biológico del MM, algunos de los cuales ya han sido introducidos en fases tempranas de investigación clínica en pacientes con MM recaídos o refractarios.

CÓMO TRATAR EL MIELOMA MÚLTIPLE EN LA ENCRUCIJADA TERAPÉUTICA ACTUAL

J. BLADÉ, L. ROSIÑOL, M.^aT. CIBEIRA, C. FERNÁNDEZ DE LARREA

*Instituto de Enfermedades Oncohematológicas.
Departamento de Hematología. IDIBAPS.
Hospital Clínic. Barcelona*

Introducción

El mieloma múltiple (MM) se caracteriza por la proliferación neoplásica de una clona de células plasmáticas que produce una inmunoglobulina monoclonal. La proliferación plasmocelular da lugar a afección esquelética con lesiones osteolíticas y/u osteoporosis, hipercalcemia, anemia, insuficiencia renal, infecciones bacterianas y/o plasmocitomas extramedulares^{1,2}. El pico de máxima incidencia se sitúa entre los 60 y los 70 años. El 15% y 2% de los pacientes tienen menos de 50 y 40 años, respectivamente³. Se ha referido que todos los casos de MM están precedidos por una gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI)^{4,6}. Sin embargo, tanto la causa de la GMSI como de los mecanismos involucrados en su progresión a MM aún se desconocen⁵. La mediana de supervivencia de los pacientes mayores de 65 años tratados con quimioterapia convencional se sitúa entre 2 y 3 años, mientras que la mediana de supervivencia de los pacientes más jóvenes se sitúa entre 5 y 6 años. Sin embargo, existe una considerable variabilidad en la supervivencia que viene condicionada por los llamados factores pronósticos. Los principales factores pronósticos en el MM son la beta2-microglobulina sérica, las alteraciones citogenéticas, la presencia de afección extramedular y el grado de respuesta al tratamiento⁸. En esta revisión se consideran las mejores opciones terapéuticas, tanto para los pacientes candidatos a trasplante de progenitores hematopoyéticos como para los no elegibles para tal procedimiento terapéutico.

Tratamiento en pacientes candidatos a trasplante de progenitores hematopoyéticos

La administración de dosis elevadas de quimioterapia seguida de rescate con progenitores hematopoyéticos de sangre periférica –trasplante autólogo o TASPE– constituye un elemento esencial en el tratamiento de los pacientes menores de 65 años con MM⁹. Sin embargo, si el procedimiento beneficia a la mayoría de pacientes o sólo a determinados subgrupos no está establecido. Cabe destacar que la consecución de la re-

misión completa (RC) es el hecho que determina la supervivencia libre de progresión y la supervivencia a largo plazo¹⁰⁻¹². Así, en la serie de los autores, la mediana de supervivencia libre de progresión (SLP) de los pacientes que alcanzaron RC fue de 6 años frente a un año y medio para los que sólo alcanzaron una RP. De otro lado, las medianas de supervivencia de los pacientes en RC y RP pos-trasplante fueron de 10 y 4 años, respectivamente¹³. Cabe señalar que la sensibilidad al tratamiento de inducción, medida por la cuantía del componente M en el momento del trasplante, constituye el factor que mejor predice la RC pos-trasplante^{10,11}. Cuando se utilizan regímenes de inducción convencionales, las tasas de RC pre y postrasplante se sitúan entre el 5 y el 10% y alrededor de 35%, respectivamente⁹, y la tasa de pacientes en RC continuada más allá de los 10 años postrasplante es de alrededor del 10%⁹. La disponibilidad de nuevos fármacos con nuevos mecanismos de acción, como la talidomida, el bortezomib y la lenalidomida, nos proporciona la posibilidad de alcanzar mayor disminución tumoral pre-trasplante y, en consecuencia, mayor número de RC postrasplante.

Con la asociación de talidomida/dexametasona (TD) la tasa de remisiones completas pretrasplante es inferior al 10% y dicha combinación resulta subóptima en pacientes con citogenética de mal pronóstico y/o con afección extramedular^{14,15}. La administración de bortezomib/dexametasona da lugar a una tasa de RC del 12 y 33% pre y postrasplante, respectivamente^{16,17}. Aunque la asociación de bortezomib y dexametasona se ha mostrado muy eficaz en pacientes con citogenética de mal pronóstico, las tasas globales de RC no son superiores a las obtenidos con quimioterapia convencional y no se dispone aún de resultados a largo plazo⁹. Con los llamados regímenes “triples” como PAD (bortezomib/adriamicina/dexametasona) o VTD (bortezomib/talidomida/dexametasona) se han referido resultados muy prometedores con una tasa de RC pre y postrasplante del 19 al 31% y del 43 al 52%, respectivamente¹⁶⁻¹⁸. De otro lado, con el tratamiento más intensivo utilizado en la llamada “Total Therapy III”, utilizando un tratamiento de inducción con VTD-PACE, doble trasplante autólogo en tándem, consolidación con VTD y mantenimiento con talidomida/dexametasona, la tasa de RC a los 2 años del inicio del tratamiento es del 56% con una fracción de pacientes en RC continuada y prolongada (*operational cures*) para los pacientes de buen pronóstico del 55%¹⁹. Los resultados anteriores se resumen en la Tabla 1.

Respecto al doble trasplante autólogo, en dos estudios se ha referido que prolonga la supervivencia en los pacientes que no llegan a alcanzar al menos una muy buena respuesta parcial con el primero^{20,21}.

La consolidación de la respuesta postrasplante con nuevos fármacos puede constituir otro paso adelante.

Tabla 1. Respuesta a las diferentes combinaciones de nuevos fármacos ("dobletes", "tripletes" y "Total Therapy") pre y post-TASPE

Régimen	Pre-TASPE	Post-TASPE
Tal/Dex	6%	23-34%
Vel/Dex	12%	33%
PAD-1	24%	43%
VTD	21-30%	43-52%
Total Therapy-III	–	56% a los 2 años

De hecho, estudios preliminares muestran que la consolidación con talidomida, lenalidomida o bortezomib incrementa la tasa de RC⁹. En este sentido, se ha demostrado recientemente que la consolidación con 4 ciclos de VTD puede dar lugar a remisiones moleculares de larga duración²². En cinco estudios, el mantenimiento con talidomida ha prolongado la SLP, si bien la supervivencia tras la recaída ha sido inferior en dos de ellos⁹. El papel de la lenalidomida y del bortezomib como tratamiento de mantenimiento se está investigando en estudios prospectivos⁹. Los resultados preliminares del tratamiento de mantenimiento postrasplante con lenalidomida son muy prometedores²³.

Si se toman en consideración los datos anteriores, el tratamiento del MM en pacientes candidatos a TASPE debería incluir: 1) un régimen de inducción con tres fármacos como VTD; 2) autotrasplante; 3) consolidación con VTD o VRD, y 4) mantenimiento con nuevos fármacos, en el contexto de estudios de enfermedad mínima residual, al objeto establecer hasta cuándo es necesario administrar tratamiento de mantenimiento²⁴ (Figura 1).

El trasplante alogénico con acondicionamiento mioablativo conlleva una mortalidad relacionada con el procedimiento de entre el 30 y el 50%. Por esta razón, el trasplante alogénico con acondicionamiento convencional sólo se efectúa en pacientes muy jóvenes (< 50 años) con factores de muy mal pronóstico

como puede ser el tener una leucemia de células plasmáticas primaria o la delección 17p en el estudio citogenético⁹. Con el trasplante alogénico con acondicionamiento de intensidad reducida (Alo-TIR) la mortalidad relacionada con el trasplante se sitúa entre el 15 y el 20%. Los acondicionamientos más utilizados son fludarabina/melfalán-140 o fludarabina junto a dosis bajas de irradiación corporal total (2 Gys). La tasa de RC es del 40-50%, y la incidencia de enfermedad de

injerto contra el huésped aguda y crónica, del 30 y el 50%, respectivamente⁹. Los factores que condicionan el éxito del Alo-TIR son la masa tumoral en el momento del trasplante y el desarrollo de una enfermedad de injerto contra el huésped crónica. En dos estudios, que incluyen 100 pacientes cada uno, el trasplante en tándem (autólogo seguido de Alo-TIR) produjo una tasa de RC de alrededor del 55% y un *plateau* de supervivencia libre de progresión, más allá de los 6 años de efectuado el trasplante, del 25%^{25,26} (Tabla 2). Las situaciones en que el Alo-TIR puede ser más beneficioso serían: pacientes que no han alcanzado la remisión completa tras un autotrasplante y pacientes en recaída sensible^{9,27}. Con todo, el trasplante alogénico en el MM se debe considerar un tratamiento experimental.

Tratamiento de los pacientes no candidatos a trasplante de progenitores hematopoyéticos

En pacientes en los que por edad o por comorbilidad no se plantea la práctica de un autotrasplante, el tratamiento clásico ha consistido en melfalán/prednisona (MP) o en regímenes basados en dexametasona. Sin embargo, los resultados han sido subóptimos con una tasa de RC inferior al 5% y una mediana de supervivencia de menos de 3 años²⁸. En los últimos años,

los llamados nuevos fármacos, talidomida, bortezomib y lenalidomida, con mecanismos de acción distintos a la quimioterapia convencional, están dando lugar a resultados muy esperanzadores. Así, con la asociación de MP con talidomida (MPT) se alcanza una tasa de respuestas de hasta el 15%, y en los 5 estudios aleatorizados en los que se ha comparado MPT frente a MP la SLP ha sido más prolongada con MPT en todos ellos y la supervivencia global en 3²⁹⁻³³. En pacientes mayores de 75 años, la dosis de ta-

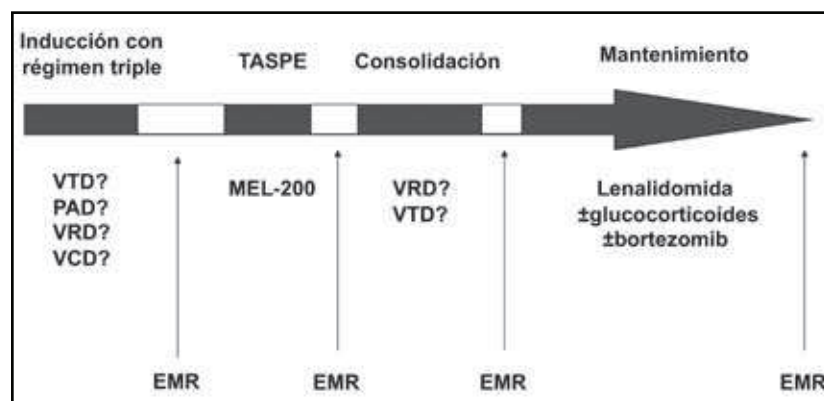


Figura 1. Tratamiento actual del MM en paciente candidato a autotrasplante.

Tabla 2. Autotrasplante seguido de Ato-TIR

Autor	N.º pacs.	Seguimiento mediano (años)	EICHa (II-IV)/ EICHe (%)	RC (%)	SLE (m)	SG (5 años)
Rotta <i>et al.</i> , 2009	102	6,6	42/74	57	36	NA
Bruno <i>et al.</i> , 2009	100	5	38/74	53	37	NA

lidomida del MPT debería ser de 100 mg/día en lugar de los 200 utilizados en pacientes más jóvenes (mejora la tolerancia, al tiempo que mantiene una considerable eficacia³¹). En un amplio estudio internacional se compara MP con MPR (MP más lenalidomida) sin tratamiento de mantenimiento frente a MPR-R (MPR seguido de mantenimiento con lenalidomida). Los resultados preliminares de este estudio muestran que la tasa de respuestas es superior con MPR que con MP, y que la SLP es más prolongada con MPR-R³⁴. Sin embargo, la SLP con MP y con MPR fue similar en los dos brazos. MP también se ha comparado con MPV (MP más bortezomib)³⁵. La tasa global de respuestas (71% vs. 36%), RC (30% vs. 4%), la SLP (mediana, 24 vs. 16 meses) y la supervivencia global (82% vs. 69% a los 2 años de seguimiento) fueron todas favorables a MPV. También resulta de interés que en este estudio el tratamiento con MPV fue superior al MP en todos los subgrupos pronósticos³⁵.

Ludwig *et al.*³⁵ compararon MP frente a talidomida/dexametasona. Aunque el tratamiento con TD dio lugar a una mayor tasa de respuestas (68% vs. 50%), dicho tratamiento fue más tóxico, lo que dio lugar a una menor supervivencia (mediana, 41 vs. 49 meses). De otro lado, la asociación de TD es un régimen terapéutico subóptimo para los pacientes con citogenética de mal pronóstico y/o afección extramedular^{14,15,37}. La asociación de lenalidomida y una dosis semanal de dexametasona de 40 mg da lugar a una tasa de respuestas del 70%, incluyendo un 14% de RC³⁸. De hecho, la administración de lenalidomida con dosis bajas de dexametasona produjo menor toxicidad y mejor supervivencia, al menos a corto plazo, que la lenalidomida asociada a dosis elevadas de dexametasona³⁸.

De los resultados de los estudios anteriormente citados se desprende que la asociación de un régimen clásico, en particular MP o dexametasona, con uno de los nuevos agentes (talidomida, lenalidomida o bortezomib) debe constituir el tratamiento de elección en los pacientes con MM no elegibles para autotrasplante. Es probable que las combinaciones con MP sean superiores a las combinaciones con dexametasona. Al objeto de contestar esta pregunta, existe un amplio estudio internacional en el que se pretenden incluir 1.600 pacientes y en el que se compara la eficacia de lenalidomida/dexametasona vs. lenalidomida/dexametasona seguido de mantenimiento con lenalidomida vs. MPT. Fuera del contexto de un ensayo clínico la elección del tratamiento inicial en un paciente con MM no candidato a autotrasplante debería depender de la edad del paciente, del estado general y de las características de la enfermedad³⁹. Para los pacientes con enfermedad agresiva (afección esquelética extensa, afección extramedular o citogenética de mal pronóstico) un régimen basado en bortezomib, como MPV, debería constituir el tratamiento de elección. Para los pacientes que no tienen una enfermedad agresiva (más acumulativa que proliferativa con un gran componente monoclonal, notable infiltración medular por células plasmáticas, anemia, infecciones bacterianas de repetición) la asociación MPT podría constituir el tratamiento idóneo. En pacientes de edad muy avanzada y/o frágiles, MPT con una dosis de talidomida de 100 mg/día, en lugar de los 200 mg habituales del MPT clásico, sería el tratamiento de elección. La asociación de bortezomib/dexametasona es la más adecuada si existe insuficiencia renal (actúa con rapidez, no es mielosupresora y no precisa ajuste de dosis). En los pacientes con neuropatía periférica el tratamiento debería basarse en lenalidomida/dexametasona (evitar el bortezomib y la talidomida). Finalmente, si existen problemas logísticos que dificulten las visitas muy frecuentes al hospital, se deberá abogar por un régimen oral como MPT a lenalidomida/dexametasona³⁹ (Tabla 3).

Tabla 3. Tratamiento del MM en pacientes no candidatos a trasplante

Enfermedad "agresiva"	MPV
Enfermedad "no agresiva"	MPT
Citogenética de alto riesgo	MPV
Insuficiencia renal	Bortezomib/dexametasona
Historia de neuropatía previa	Combinaciones con lenalidomida
Muy ancianos/frágiles	MPT (talidomida 100 mg/d)
Problemas logísticos	MPT, lenalidomida/dexametasona

Bibliografía

- Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc* 2003; 78: 21-23.
- International Myeloma Working Group. Criteria for classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders. *Br J Haematol* 2003; 121: 749-757.
- 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; 93: 345-351.
- Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance consistently precedes

- multiple myeloma: a prospective study. *Blood* 2009; 113: 5412-5417.
5. Weis BM, Abadie J, Verma P, et al. A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood* 2009; 113: 5418-5442.
 6. Bladé J, Rosiñol L, Cibeira MT. Are all myelomas preceded by MGUS? *Blood* 2009; 113:5370-5371.
 7. Bladé J, Rosiñol L, Cibeira MT, Fernández de Larrea C. Pathogenesis and progression of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Leukemia* 2008; 22: 1651-1657.
 8. Bladé J, Rosiñol L, Cibeira MT. Prognostic factors for multiple myeloma in the era of novel agents. *Ann Oncol* 2008; 19 (Suppl. 7) vii117-vii120.
 9. Bladé J, Rosiñol L, Cibeira MT, Rovira M, Carreras E. Hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma beyond 2010. *Blood* 2010; 115:3655-3663.
 10. Alexanian R, Weber D, Giralt S, et al. Impact of complete remission with intensive therapy in patients with responsive multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27: 1037-1043.
 11. Nadal E, Giné E, Bladé J, et al. High-dose therapy/autologous stem cell transplantation in patients with chemosensitive myeloma: predictors of complete remission. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33: 61-64.
 12. Lahuerta JJ, Mateos MV, Martínez-López J, et al. Influence of pre- and post-transplantation responses on outcome of patients with multiple myeloma: sequential improvement of response and achievement of complete response are associated with longer survival. *J Clin Oncol* 2008; 26: 5775-5782.
 13. Rovira M, Rosiñol L, Fernández-Aviles F, et al. Is there a curative potential of autologous stem cell transplantation in multiple myeloma? Long-term results from a single institution series. *Bone Marrow transplant* 2009; 43 (Suppl. 1): S 147.
 14. Cavo M, Tachetti P, Patriarca F, et al. A phase III study of double autotransplantation incorporating bortezomib/thalidomide/dexamethasone (VTD) or thalidomide/dexamethasone (TD) for multiple myeloma: superior clinical outcome with VTD compared with TD. *Blood* 2009; 114: 148 (Abstract 351).
 15. Rosiñol L, Cibeira MT, Martínez J, et al. Thalidomide/dexamethasone (TD) vs. bortezomib/thalidomide/dexamethasone vs. VBMCP/VBAD/Velcade as induction regimens prior autologous stem cell transplantation in multiple myeloma. Results of a phase III PETHEMA/GEM trial. *Blood* 2009; 114: 59 (Abstract 130).
 16. Harousseau JL, Attal M, Leleu X, et al. Bortezomib plus dexamethasone as induction treatment prior to autologous stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Haematologica* 2006; 91: 1498-1505.
 17. Rosiñol L, Oriol A, Mateos MV, et al. A phase II trial of alternating bortezomib and dexamethasone as induction regimen prior to autologous stem cell transplantation in younger patients with multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2007; 25: 4452-4458.
 18. Popat R, Oakervee HE, Hallam S, et al. Bortezomib, doxorubicin and dexamethasone (PAD) front-line treatment of multiple myeloma: updated results after long-term follow-up. *Br J Haematol* 2008; 141: 512-516.
 19. Barlogie B, Anassie E, van Rhee F, et al. Incorporating bortezomib into upfront treatment for multiple myeloma: early results of total therapy 3. *Br J Haematol* 2007; 138: 176-185.
 20. Attal M, Harousseau JL, Facon T, et al. Single versus double autologous stem cell transplant for multiple myeloma. *N Engl J Med* 2003; 349: 2495-2502.
 21. Cavo M, Tosi P, Zamagni E, et al. Prospective, randomized study of single compared with double autologous transplantation for multiple myeloma: Bologna 96 clinical study. *J Clin Oncol* 2007; 25: 2434-2441.
 22. Ladetto M, Pagliano G, Ferrero S, et al. Major tumor shrinking and persistent molecular remission after consolidation with bortezomib, thalidomide, and dexamethasone in patients with autografted myeloma. *J Clin Oncol* 2010; March 22 (Epub ahead of print).
 23. Attal M, Cristini C, Marit G, et al. Lenalidomide maintenance alter transplantation for myeloma. *J Clin Oncol* 2010; 28: 7s (abstr 8010).
 24. Bladé J, Rosiñol L. Refining "total therapy" for myeloma. *Blood* 2010; 115:4152-4153.
 25. Bruno B, Rotta M, Patriarca F, et al. Nonmyeloablative allografting for newly diagnosed multiple myeloma: the experience of the Gruppo Italiano Trapianti di Midollo. *Blood* 2009; 113: 3375-3382.
 26. Rotta M, Storer BE, Sahebi F, et al. Long-term outcome of patients with multiple myeloma after autologous hematopoietic cell transplantation and nonmyeloablative allografting. *Blood* 2009; 113: 3383-3391.
 27. Rosiñol L, Pérez-Simón JA, Sureda A, et al. A prospective PETHEMA study of tandem autologous transplantation versus autograft followed by reduced-intensity conditioning allogeneic transplantation in newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* 2008; 112: 3591-3593.
 28. Bladé J, Rosiñol L. Advances in therapy of multiple myeloma. *Current Op Oncol* 2008; 20: 697-704.
 29. 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: 1209-1218.
 30. Palumbo A, Bringhen S, Liberatti AM, et al. Oral melphalan, prednisone, and thalidomide in elderly patients with multiple myeloma: updated results of a randomized controlled trial. *Blood* 2008; 112: 3107-3114.
 31. Hulin C, Facon T, Rodon P, et al. Comparison of melphalan-prednisone-thalidomide (MP-T) 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; 27:3664-3670.
 32. Waage A, Gimsing P, Fayers P et al. Melphalan and prednisone plus thalidomide or placebo in elderly patients with multiple myeloma. *Blood* 2010; May 6, (Epub ahead of print).
 33. Wiejermans P, Schaafsma M, Termoshuizen F, et al. Phase III study of the value of thalidomide added to melphalan plus prednisone in elderly patients with newly diagnosed multiple myeloma. The HOVON 49 study. *J Clin Oncol* 2010; June 1 (Epub ahead of print).
 34. Palumbo A, Dimopoulos MA, Delforge M, et al. A phase 3 study to determine the efficacy and safety of lenalidomide combined with melphalan and prednisone in patients > 65 years with newly diagnosed multiple myeloma. *Haematologica* 2010/s2: 234-235 (Abstract 566).
 35. 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: 906-917.
 36. Ludwig H, Hajek R, Tóthová E, et al. Thalidomide-dexamethasone compared with melphalan-prednisolone in elderly patients with multiple myeloma. *Blood* 2009; 113: 3435-3441.
 37. Rosiñol L, Cibeira MT, Bladé J, et al. Extramedullary multiple myeloma scapes the effect of thalidomide. *Haematologica* 2004; 89: 832-836.
 38. Rajkumar SV, Yacobus S, Callander NS, et al. Lenalidomide plus high-dose dexamethasone versus lenalidomide low-dose dexamethasone as initial therapy for newly diagnosed multiple myeloma: an open-label randomized clinical trial. *Lancet Oncol* 2010; 11: 29-37.
 39. Bladé J, Rosiñol L. Changing paradigms in the treatment of multiple myeloma. *Haematologica* 2009; 94: 163-166.

MIELOMA MÚLTIPLE Y SU ESTRATIFICACIÓN DE ACUERDO CON FACTORES DE RIESGO

R. FONSECA

Mayo Clinic, Arizona (EE UU)

Introducción

El mieloma múltiple es una neoplasia de las células plasmáticas que se caracteriza por la presencia de un número aumentado de estas células en la médula ósea, acompañado por la producción de proteínas monoclonales¹. El mieloma es una de las neoplasias hematológicas más comunes y sólo segundo a los linfomas de tipo no Hodgkin.

En los últimos años hemos visto un aumento muy grande en nuestro entendimiento de la patofisiología de la enfermedad². Estos estudios han demostrado cuáles son los pasos necesarios para la generación de una de estas primeras células plasmáticas para establecer un clon de tipo gammapatía monoclonal de significado no determinado (MGUS)³. Estos mismos estudios también nos han mostrado la serie de eventos que son necesarios para favorecer la progresión de la enfermedad de los estadios benignos a la enfermedad maligna³. Si bien estos estudios aún son incompletos, ellos han demostrado que una serie de eventos similares son responsables de la progresión y patogénesis en la mayoría de los casos. Esto ha generado una diversidad en las variantes posibles del mieloma que se convierten en variantes asociadas a distintos cuadros clínicos de presentación, y sobre todo a distintos pronósticos². En este comunicado revisamos algunos de los marcadores usados para determinar el pronóstico en los pacientes con mieloma múltiple.

Marcadores iniciales

En un principio la gran mayoría de los marcadores usados en la clínica eran de carácter no genético⁴. Éstos se basaban en el uso de marcadores de la masa tumoral tal como la β 2-microglobulina y marcadores de la actividad mitótica de la enfermedad^{5,6}. Estos marcadores fungieron un papel importante en la clasificación del la enfermedad pero carecen de importancia pronóstica suficiente para poder ser usados en el caso de un paciente individual (es decir, son adecuados para el grupo pero no para el individuo). Estos marcadores incluían una β 2-microglobulina elevada, albúmina baja, mieloma de tipo IgA o lambda, muchas lesiones óseas y falla de la función renal⁵⁻⁷.

Un avance mayor en la habilidad de pronosticar a pacientes con mieloma fue la introducción de la citogenética como factor pronóstico para la enfermedad. Inicialmente Dewald y colegas en la Clínica Mayo identificaron que cualquier anomalía genética se asociaba a menor sobrevida⁸. Los investigadores de la Universidad de Arkansas identificaron anomalías del cromosoma 13 como factores pronósticos importantes⁹⁻¹¹. En forma subsecuente Smadja y colegas identificaron la hipodiploidía como un factor pronóstico negativo¹¹. Sin embargo, todos estos estudios son altamente limitados por la dificultad de obtener metafases con anomalías en el mieloma^{12,13}. En la gran mayoría de los casos las metafases son normales, y en consecuencia sabemos si provienen de las células mieloides medulares. Esto es claro ya que estudios subsecuentes han demostrado que todos los mielomas tienen anomalías genéticas en las células plasmáticas.

FISH de interfase

Hoy en día es bien sabido que varios marcadores de tipo FISH tienen gran habilidad pronóstica para pacientes con mieloma múltiple^{14,15}. Muchos de estos marcadores fueron desarrollados en series de pacientes tratados con terapias que contenían melfalán y con trasplante autólogo de células tallo (TMO)^{14,16,17}. En particular se vio que aquellos pacientes con translocaciones de tipo t(4;14) y t(14;16) tiene un mal pronóstico, con una posibilidad alta de recaída en el año, que sigue a un TMO o terapia convencional^{14,17-19}. Aunado a estas dos translocaciones, delección del cromosoma 17 en la región p13 también ha sido reconocido como un factor pronóstico adverso importante^{14,17,20,21}.

El valor pronóstico de estas translocaciones en el contexto de los tratamientos actuales sigue siendo debatido. A pesar de que algunos estudios inicialmente sugieren que agentes como el bortezomib²²⁻²⁴ o la lenalidomida^{25,26} disminuyen o eliminan el efecto pronóstico esto es sólo una hipótesis ya que los grupos de pacientes estudiados son pequeños y con seguimiento relativamente corto. Al parecer, el marcador de delección 17p13 se mantiene como identificador de mal pronóstico y es independiente de cualquier tratamiento administrado.

Vale la pena recalcar que la delección del cromosoma 13 por FISH no tiene el mismo valor pronóstico que cuando esta delección se detecta por metafases^{27,28}. Los estudios que han usado sondas de FISH para detectar las delecciones del 13 han sido positivos pero el efecto pronóstico no es tan potente como cuando estas delecciones son detectadas en cariotipos. También es importante recalcar que la presencia de los factores genéticos adversos en casos de MGUS o mieloma tipo indolente no es criterio suficiente para iniciar la terapia del paciente.

Microarreglos de tipo RNA

El uso de los microarreglos de RNA ha ayudado a identificar un grupo de pacientes con un muy mal pronóstico. Para poder hacer estudios con microarreglos es imprescindible seleccionar las células plasmáticas de la médula ósea para hacer la extracción del material RNA²⁹⁻³². Los investigadores de la Universidad de Arkansas desarrollaron un índice que identifica a un 15% de pacientes que tiene un pronóstico muy malo³². Para lograr estos estudios y definir este índice pronóstico usaron un perfil (llamado en inglés "firma") que se compone de los valores absolutos de 70 genes, y se puede simplificar en 17. También han sido desarrollados otros índices pronósticos que pueden determinar el pronóstico de los pacientes³³. Algo muy interesante con el uso de los microarreglos es que también se pueden establecer categorías de la enfermedad y habilitar así la clasificación moderna de la misma.

Otras tecnologías

Otras tecnologías han sido aplicadas en la clínica para establecer el pronóstico en pacientes con mieloma múltiple. El caso más claro es el del grupo de los franceses, que usaron los microarreglos de tipo DNA para poder establecer el pronóstico de los pacientes³⁴. En este caso se identificaron cambios recurrentes de los cromosomas 1, 12 y 15 como factores importantes para establecer un pronóstico. El atractivo de esta técnica es que estos resultados se pueden convertir de forma sencilla a sondas de tipo FISH³⁴.

Aplicaciones en la clínica

Lo más importante de todos estos estudios es convertirlos en herramientas de ayuda en la clínica³⁵. Para eso se tienen que convertir en pruebas sencillas que tengan posibilidad de ser utilizadas tanto en hospitales pequeños como en aquéllos de referencia. Es posible que una vía alternativa sea la creación de más laboratorios de referencia en los que se hagan los análisis necesarios. Es posible también que al paso del tiempo algunas de estas pruebas se puedan convertir en inmunohistoquímica o citometría de flujo para su análisis³⁶.

Aún no está definido cómo incorporar estos marcadores en casos de pacientes con terapias nuevas. Los marcadores descubiertos y subsecuentemente validados en pacientes tratados con melfalán y con TMO no han sido validados en su totalidad en pacientes tratados en forma moderna^{14,17}. Tanto en el caso del bortezomib como con la lenalidomida algunos reportes sugieren que los valores pronósticos de estos marcadores no aplican^{22,24-26}. Vale la pena destacar que la mayoría

de estos reportes se han hecho en series de pacientes pequeños y con seguimiento corto^{22,24-26}. Algunos estudios recientes sugieren que si bien estos agentes nuevos ayudan a todos los pacientes con mieloma, la estratificación pronóstica por genética aún prevalece.

Conclusiones

El futuro es brillante en que cada vez se entienden más los cambios asociados con la patogénesis y el pronóstico de la enfermedad. Sin embargo, aún queda mucho por aprender. Los marcadores actuales, aun los mejores, son incapaces de determinar en su totalidad la variabilidad pronóstica del paciente. Es posible que una lección inicial sea aceptar el hecho de que las características intrínsecas de la enfermedad sólo confieren cierto porcentaje del curso de una enfermedad y que factores del huésped, tratamiento y estocásticos son importantes, e imponderables. En el futuro el tratamiento inicial va a ser dictaminado por la composición genética del mieloma individual, pero aun así otras variables serán de importancia.

Bibliografía

1. Rajkumar SV, Kyle RA. Multiple myeloma: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc.* 2005;80(10):1371-82.
2. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, Shaughnessy J, Gutierrez N, Stewart AK, et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia.* 2009;23(12):2210-21.
3. Bergsagel PL, Kuehl WM. Critical roles for immunoglobulin translocations and cyclin D dysregulation in multiple myeloma. *Immunological Reviews.* 2003;194:96-104.
4. Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer* 1975;36(3):842-54.
5. Greipp P, Lust J, O'Fallon W, Katzmann J, Witzig T, Kyle R. Plasma cell labeling index and beta 2-microglobulin predict survival independent of thymidine kinase and C-reactive protein in multiple myeloma. *Blood.* 1993;81(12):3382-7.
6. Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Blade J, et al. International staging system for multiple myeloma. *Journal of Clinical Oncology.* 2005;23(15):3412-20.
7. Bataille R, Durie BG, Grenier J, Sany J. Prognostic factors and staging in multiple myeloma: a reappraisal. *J-Clin-Oncol.* 1986;4(1):80-7.
8. Dewald GW, Kyle RA, Hicks GA, Greipp PR. The Clinical Significance of Cytogenetic Studies in 100 Patients With Multiple Myeloma, Plasma Cell Leukemia, or Amyloidosis. *Blood.* 1985;66(2):380-90.
9. Tricot G, Barlogie B, Jagannath S, Bracy D, Matter S, Vesole DH, et al. Poor-Prognosis In Multiple-Myeloma Is Associated Only With Partial Or Complete Deletions Of Chromosome-13 Or Abnormalities Involving 11q And Not With Other Karyotype Abnormalities. *Blood* 1995;86(11):4250-6.
10. Tricot G, Sawyer JR, Jagannath S, Desikan KR, Siegel D, Naucke S, et al. Unique role of cytogenetics in the prognosis of patients with myeloma receiving high-dose therapy and autotransplants. *J Clin Oncol.* 1997;15(7):2659-66.

11. Smadja NV, Bastard C, Brigaudeau C, Leroux D, Fruchart C. Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood*. 2001;98(7):2229-38.
12. Sawyer JR, Waldron JA, Jagannath S, Barlogie B. Cytogenetic findings in 200 patients with multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet*. 1995;82(1):41-9.
13. Debes-Marun C, Dewald G, Bryant S, Picken E, Santana-Dávila S, González-Paz N, et al. Chromosome abnormalities clustering and its implications for pathogenesis and prognosis in myeloma. *Leukemia*. 2003;17(2):427-36.
14. Fonseca R, Blood E, Rue M, Harrington D, Oken MM, Kyle RA, et al. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood*. 2003;101(11):4569-75.
15. Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, Bastard C, Bergsagel PL, Chesi M, et al. Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. *Cancer Res*. 2004;64(4):1546-58.
16. Avet-Loiseau H, Facon T, Grosbois B, Magrangeas F, Rapp MJ, Harousseau JL, et al. Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation. *Blood*. 2002;99(6):2185-91.
17. Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, Charbonnel C, Garban F, Hulin C, et al. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myelome. *Blood*. 2007;109(8):3489-95.
18. Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Greipp PR, Litzow MR, Henderson KJ, et al. Clinical implications of t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16.3;q32), and -17p13 in myeloma patients treated with high-dose therapy. *Blood*. 2005;106(8):2837-40.
19. Zhan F, Huang Y, Colla S, Stewart JP, Hanamura I, Gupta S, et al. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood*. 2006;108(6):2020-8.
20. Drach J, Ackermann J, Fritz E, Kromer E, Schuster R, Gisslinger H, et al. Presence of a p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy. *Blood*. 1998;92(3):802-9.
21. Drach J, Ackerman J, Kaufmann H, Konigsberg R, Huber H. Deletions of the p53 gene in multiple myeloma [letter]. *British Journal of Haematology*. 2000;108(4):886.
22. Jagannath S, Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, Irwin D, Stadtmauer EA, et al. Bortezomib appears to overcome the poor prognosis conferred by chromosome 13 deletion in phase 2 and 3 trials. *Leukemia*. 2007;21(1):151-7.
23. Mulligan G, Mitsiades C, Bryant B, Zhan F, Chng WJ, Roels S, et al. Gene expression profiling and correlation with outcome in clinical trials of the proteasome inhibitor bortezomib. *Blood*. 2007;109(8):3177-88.
24. San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK, Dimopoulos MA, Shpilberg O, Kropff M, et al. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2008;359(9):906-17.
25. Reece D, Song KW, Fu T, Roland B, Chang H, Horsman DE, et al. Influence of cytogenetics in patients with relapsed or refractory multiple myeloma treated with lenalidomide plus dexamethasone: adverse effect of deletion 17p13. *Blood*. 2009;114(3):522-5.
26. Kapoor P, Kumar S, Fonseca R, Lacy MQ, Witzig TE, Hayman SR, et al. Impact of risk stratification on outcome among patients with multiple myeloma receiving initial therapy with lenalidomide and dexamethasone. *Blood*. 2009;114(3):518-21.
27. Fonseca R, Oken MM, Harrington D, Bailey RJ, Van Wier SA, Henderson KJ, et al. Deletions of chromosome 13 in multiple myeloma identified by interphase FISH usually denote large deletions of the q arm or monosomy. *Leukemia*. 2001;15(6):981-6.
28. Fonseca R, Harrington D, Oken MM, Dewald GW, Bailey RJ, Van Wier SA, et al. Biological and prognostic significance of interphase fluorescence in situ hybridization detection of chromosome 13 abnormalities (delta13) in multiple myeloma: an eastern cooperative oncology group study. *Cancer Res*. 2002;62(3):715-20.
29. Zhan F, Hardin J, Kordsmeier B, Bumm K, Zheng M, Tian E, et al. Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells. *Blood*. 2002;99(5):1745-57.
30. Shaughnessy J, Zhan F, Hardin J, et al, editors. High Density Microarrays in the Molecular Classification of Multiple Myeloma. Proceedings of the VIII International Myeloma Workshop; 2001; Banff, Alberta, Canada.
31. Shaughnessy JD, Jr. Global gene expression profiling in the study of multiple myeloma. [Review] [94 refs]. *International Journal of Hematology*. 2003;77(3):213-25.
32. Shaughnessy JD, Jr., Zhan F, Burington BE, Huang Y, Colla S, Hanamura I, et al. A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1. *Blood*. 2007;109(6):2276-84.
33. Chng WJ, Braggio E, Mulligan G, Bryant B, Remstein E, Valdez R, et al. The centrosome index is a powerful prognostic marker in myeloma and identifies a cohort of patients that might benefit from aurora kinase inhibition. *Blood*. 2008;111(3):1603-9.
34. Avet-Loiseau H, Li C, Magrangeas F, Gouraud W, Charbonnel C, Harousseau JL, et al. Prognostic significance of copy-number alterations in multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2009;27(27):4585-90.
35. Stewart AK, Bergsagel PL, Greipp PR, Dispenzieri A, Gertz MA, Hayman SR, et al. A practical guide to defining high-risk myeloma for clinical trials, patient counseling and choice of therapy. *Leukemia*. 2007;21(3):529-34.
36. Keats JJ, Fonseca R, Chesi M, Schop R, Baker A, Chng WJ, et al. Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell*. 2007;12(2):131-44.

PERSPECTIVAS DEL MIELOMA MÚLTIPLE ANTE LA SEGUNDA GENERACIÓN DE NUEVOS FÁRMACOS

E.M. OCIO, M.^aV. MATEOS,
J.F. SAN MIGUEL

Servicio de Hematología. Hospital Universitario de Salamanca. Centro de Investigación del Cáncer (CIC) IBMCC/CSIC. Universidad de Salamanca

La supervivencia de los pacientes con mieloma múltiple se ha visto incrementada considerablemente en la última década, debido, en gran medida, a la utilización de tratamientos de rescate basados en nuevos fármacos como talidomida, bortezomib o lenalidomida. En este sentido, el grupo de la Clínica Mayo observó que la supervivencia desde el momento de la recaída de los pacientes que han progresado después del año 2000 es doce meses superior en comparación con los que han recaído antes de esta fecha (mediana de supervivencia de 23,9 vs. 11,8 meses)¹. Sin embargo, la duración de la respuesta a los sucesivos tra-

tamientos de rescate sigue siendo cada vez más corta que la duración de las respuestas previas. Por lo tanto, los objetivos actuales destinados a mejorar la supervivencia de los pacientes con mieloma en recaída serían los siguientes:

- Optimizar la eficacia de los tres fármacos mencionados anteriormente a través de las combinaciones más adecuadas,
- Determinar las secuencias óptimas de tratamiento, y
- Promover la investigación clínica activa de nuevos agentes experimentales².

En el contexto de la recaída probablemente estamos pasando de un extremo a otro, en el sentido de que antes del año 2000 no había fármacos nuevos para este grupo de pacientes y, sin embargo, en estos últimos años hemos asistido a la publicación de un gran número de esquemas de tratamiento para ellos. Estas nuevas opciones terapéuticas se basan normalmente en los resultados de pequeños estudios piloto con escaso seguimiento: de hecho, el campo de los tratamientos de rescate se ha convertido en una “torre de Babel” en la que muchos médicos reclaman guías de tratamiento bien estandarizadas y tratamientos más uniformes.

En los pacientes refractarios o en recaída, la pregunta más relevante probablemente sea si se deben usar todos los fármacos activos al mismo tiempo o si, por el contrario, estos compuestos se deben utilizar de una forma secuencial. Por otra parte, también es necesario definir si la combinación de un inhibidor del proteasoma y un inmunomodulador^{3,4} es superior a la combinación de cualquiera de estos dos fármacos con un agente alquilante o antraciclinas con corticosteroides. De hecho, se han obtenido resultados similares con combinaciones tales como bortezomib-ciclofosfamida-prednisona⁵ o lenalidomida-adriamicina-dexametasona⁶, lo que podría ser considerado como un punto a favor del uso secuencial de bortezomib y lenalidomida en vez de simultáneo.

Partiendo de estas premisas, nos deberíamos preguntar si estamos ya en posición de poder proponer directrices de tratamiento para los pacientes de mieloma refractarios o en recaída. La recomendación más importante es que la elección de uno u otro tratamiento debería sustentarse en un juicio clínico cuidadoso sobre los tres siguientes factores:

- Los fármacos usados en terapias previas y su eficacia.
- El tipo de recaída.
- Las características del paciente.

Para tomar la decisión de qué fármacos o combinaciones de los mismos resultarían más eficaces en un determinado paciente es necesario elaborar una lista de las combinaciones de los fármacos usados previamente (agentes alquilantes, IMiD o bortezomib)

con el grado y duración de las respuestas obtenidas. Con esta información se podrá decidir sobre la posibilidad de volver a tratar con el mismo fármaco o con una combinación basada en los agentes sensibles previos y evitar los fármacos que han mostrado poca o ninguna eficacia y que sólo contribuirán a incrementar la toxicidad. El tipo de recaída es también importante, puesto que si es agresiva se podrían preferir las combinaciones de varios fármacos con el objetivo de conseguir un rápido control de la enfermedad. Por último, es importante hacer un análisis de las características del paciente, incluyendo la presencia de comorbilidades (diabetes, insuficiencia cardiaca), la calidad de vida, función renal, reserva de médula ósea y las toxicidades previas (neuropatía periférica, trombosis venosa profunda, etc.) y tener en cuenta factores sociales tales como la distancia al hospital y la capacidad del paciente para llevar a cabo el tratamiento en casa. Además, a la hora de decidir las opciones de tratamiento en la recaída, es importante considerar la edad del paciente y la esperanza de vida, puesto que saber esto servirá/ayudará a tomar decisiones “rentables”, lo cual tiene una gran importancia en la situación actual de recesión económica.

Teniendo todo esto en cuenta, surgen las siguientes posibles directrices:

En los **pacientes jóvenes** en recaída temprana después del trasplante autólogo (< 1 año), la meta debería ser superar la resistencia farmacológica y, por lo tanto, nosotros apoyaríamos la combinación de todos los fármacos potencialmente eficaces tales como Re-Vel-Cy-Dex (bortezomib-lenalidomida-dexametasona-ciclofosfamida) o V-DTPACE (bortezomib-dexametasona -talidomida-cisplatino-adriamicina-ciclofosfamida-etopósido). Si se logra una remisión completa o muy buena repuesta parcial, el paciente podría proceder a un trasplante alogénico con un régimen de acondicionamiento de intensidad reducida (RIC-Allo). Una alternativa al RIC-Allo sería el consolidar la respuesta con terapia de mantenimiento. Si la recaída tiene lugar después de 3-4 años del primer ASCT, otra posibilidad atractiva sería la reinducción con el tratamiento inicial u otra combinación con un agente nuevo seguido de un segundo ASCT. En las situaciones intermedias, cuando la recaída tiene lugar 2 o 3 años después del ASCT, favoreceríamos el rescate con agentes nuevos pero usados de una forma secuencial en vez de simultáneamente: una primera línea de tratamiento (diferente a la usada en la inducción), cambiando a una segunda y subsecuentes líneas solamente cuando tenga lugar la progresión de la enfermedad. En estos últimos casos, si el paciente tiene menos de 55 años, la posibilidad de RIC-Allo podría también ser discutida después de la segunda recaída.

En los **pacientes “ancianos”**, se debería tener en cuenta fundamentalmente la calidad de vida y el cos-

te. En la primera recaída, la primera opción sería usar un esquema diferente al usado para la inducción, a no ser que la primera remisión fuese lo suficientemente larga como para reconsiderar volver a tratar con el mismo esquema. En la segunda o sucesivas recaídas, generalmente después de haber sido tratado con bortezomib y al menos con un inmunomodulador, se debería recomendar un ensayo clínico con agentes experimentales. Si el paciente no es candidato a terapia activa, se podría considerar el tratamiento paliativo con ciclofosfamida oral (50 mg días alternos) y prednisona (30 mg al día).

Llegados a este punto, merece la pena hacer un comentario sobre los agentes experimentales. El progreso de la supervivencia en mieloma observado en la última década solamente ha sido posible gracias al compromiso activo entre los pacientes y los doctores que participaron en ensayos clínicos previos. Estos estudios mostraron una significativa ventaja en la supervivencia en aquellos pacientes tratados con fármacos tales como bortezomib o lenalidomida, y estos resultados condujeron finalmente a la aprobación de su uso en otros pacientes. En la actualidad, algunos fármacos, como los inhibidores de histona deacetilasa, de AKT, nuevos inmunomoduladores e inhibidores de proteasomas, están abriéndose camino entre los fármacos del mieloma múltiple pero solamente el compromiso continuo con la investigación clínica los llevará a estar disponibles para todos los pacientes y finalmente convertir esta enfermedad, hoy en día todavía incurable, en una enfermedad crónica o curable.

En este sentido, los avances en el conocimiento de la biología del MM están contribuyendo de forma importante al diseño de estos nuevos fármacos dirigidos frente a proteínas celulares o vías de señalización implicadas en la patogenia de esta enfermedad⁷⁻⁹. En la segunda parte de esta revisión se analizan los principales fármacos experimentales que se están analizando en estudios preclínicos y clínicos. La Tabla 1 recoge los principales resultados clínicos de estos fármacos utilizados en monoterapia o en combinación con otros agentes antimieloma.

Agentes que actúan bloqueando el ciclo celular

Varios estudios de expresión génica de células plasmáticas procedentes de pacientes con mieloma han demostrado la existencia de una sobreexpresión generalizada de diferentes ciclinas¹⁰. Por lo tanto, el uso de agentes destinados a inhibir estas proteínas que favorecen la progresión en el ciclo celular podría tener un papel en el control de esta enfermedad. En este campo se están evaluando tres tipos de moléculas: in-

hibidores de CDK (*cyclin dependent kinases*), inhibidores de ciclinas e inhibidores de aurora cinasas, que son unas proteínas necesarias para el correcto funcionamiento de la mitosis. Aunque los resultados preclínicos han sido prometedores con todos estos fármacos, aún no existen datos clínicos concluyentes con ninguno de ellos.

Agentes que actúan en la epigenética

La epigenética, como un mecanismo de regulación de la expresión génica, está adquiriendo una relevancia cada vez más importante en la patogenia del cáncer. Dos son los mecanismos fundamentales involucrados en la epigenética: la acetilación de histonas y la metilación de islas CPG. Frente a ambos se han desarrollado fármacos que los modulan con una finalidad antitumoral.

Inhibidores de histona deacetilasas (HDAC)

Las HDAC son enzimas que eliminan los grupos acetilos de numerosas proteínas. Por una parte, actúan sobre histonas, proteínas sobre las que está enrollado el ADN y que, al deacetilarse, inducen un empaquetamiento del ADN que impide que éste sea accesible a los factores de transcripción. Esto resulta en la infraexpresión de proteínas, como los genes supresores tumorales. Por otra parte, las HDAC también pueden actuar sobre proteínas no histonas, como Hsp90, p53, tubulina y otras, induciendo un fenotipo celular pro-oncogénico. De hecho, se ha demostrado la sobre-expresión de estas proteínas en numerosos tumores, entre ellos el mieloma múltiple. La inhibición de las HDAC mediante fármacos específicos podría revertir estos mecanismos proliferativos y antiapoptóticos^{11,12}. Varios ensayos clínicos con inhibidores de HDAC solos y en combinación con otros agentes se han llevado a cabo o están activos en la actualidad. En todos ellos la actividad de estos fármacos en monoterapia es bastante escasa: SAHA se ha evaluado en 10 pacientes con mieloma con una única RM; de forma similar, ITF2357, administrado a 15 pacientes, indujo una RP, y panobinostat (LBH589) únicamente indujo una RP en los 38 pacientes tratados. Sin embargo, basado en experimentos preclínicos, se está analizando la actividad de diferentes combinaciones de estos fármacos. Tanto romidepsina, como vorinostat o panobinostat se están evaluando en combinación con bortezomib en pacientes en recaída, induciendo respuestas en torno a un 40-70% de los pacientes. Es importante destacar que con estas combinaciones se obtuvieron buenos resultados en pacientes previamente

Tabla 1. Resumen de los resultados clínicos más recientes de nuevos fármacos solos y en combinación con tratamientos convencionales en pacientes con mieloma múltiple

Referencia	Régimen	N	Respuestas
<i>Agentes que actúan sobre la epigenética</i>			
Galli M (ASH 2007)	ITF2357 (inhibidor HDAC)	15	7% PR
Richardson PG (ASH 2007)	Vorinostat (inhibidor HDAC)	10	10% MR
Weber DM (IMW 2009)	Vorinostat + Bortezomib	34	26% PR, 21% MR, 53% SD
Weber DM (IMW 2009)	Vorinostat + Bortezomib	21	10% VGPR, 33% PR, 48% SD
Siegel D (ASH 2009)	Vorinostat + lenalidomida + dexametasona	28	7% CR, 39% PR, 18% MR, 21% SD
Wolf (ASH 2008)	Panobinostat (inhibidor HDAC)	38	6% MR
San Miguel JF (ASH 2009)	Panobinostat + bortezomib	29	14% CR, 34% PR, 14% PR
Spencer A (IMW 2009)	Panobinostat + lenalidomida + dex	13	15% CR, 31% VGPR, 15% PR, 8% MR
Niesvizky (ASH 2005)	Romidepsina (inhibidor HDAC)	12	92% SD
Harrison (ASH 2008)	Romidepsina + bortezomib + Dex	25	22% CR, 22% VGPR, 22% PR
<i>Inhibidores de la respuesta a proteínas mal plegadas</i>			
Richardson PG (ASH 2005)	Tanespimicina (inhibidor de Hsp90)	22	10% PR, 5% MR, 30% SD
Richardson PG (ASH 2006)	Tanespimicina + bortezomib	63	5% CR, 9% nCR, 22% PR
Jagannath S (ASH 2007)	Carfilzomib (inhibidor del proteasoma)	6	17% PR, 34% MR
Jagannath S (ASH 2009)	Carfilzomib	39	13% PR, 13% MR, 41% SD
Wang (ASH 2009)	Carfilzomib	87	Bort naive: 2% CR, 44% PR, 15% MR, 22% SD Bort tratados: 3% CR, 15% PR, 12% MR, 39% SD
Siegel (ASH 2009)			
Niesvizky (ASH 2009)	Carfilzomib + lenalidomida + dex	26	21% CR/nCR, 17% VGPR, 21% PR, 13% MR, 21% SD
Richardson (ASH 2009)	NPI-0052 (inhibidor del proteasoma)		58% SD
<i>Agentes que actúan sobre receptores de superficie</i>			
<i>Inhibidores de receptores tirosina-cinasa</i>			
Dispenzieri A (Leuk Lymphoma 2006)	Imatinib (inhibidor de c-kit/PDGFR)	23	No respuestas
Wildes TM (ASH 2007)	Dasatinib (inhibidor de c-kit/PDGFR)	13	30% SD
Arnulf B (ASH 2007)	AB1010 (inhibidor de FGFR3 TK) +/- Dex	19	No respuestas a AB1010 sólo Dex añadida → 21% (1nCR, 1PR, 2MR)
Prince HM (Blood 2009)	Pazopanib (inhibidor de VEGF-R)	21	No respuestas
Raschko M (ASH 2007)	Bevacizumab (inhibidor de VEGF-R) + lenalidomida + Dex	10	70% PR
Moreau P (ASH 2007)	AVE-1642 (inhibidor de IGF-1R)	14	7% MR
Lacy M (ASH 2007)	CP-751,871 (inhibidor de IGF-1 R) +/- Dex +/- Rapamicina	47	No respuestas en monoterapia 4% CR, 8% PR en combinación
<i>Anticuerpos monoclonales frente a antígenos de superficie</i>			
van Zaanen HC (Br J Haematol 1998)	cMab (anticuerpo monoclonal quimérico Anti-IL6)	12	No respuestas
Rossi (ASH 2008)	CNTO 328 (anticuerpo monoclonal Anti-IL6) + bortezomib	21	14% CR, 10% VGPR, 33% PR
Chanan-Khan AA (ASH 2009)	BB-10901 (Anti-CD56)	18	17% MR
Zonder J (ASH 2008)	HuLuc63 (Anti-CS1)	23	26% SD
Jakubobiak A (ASH 2009)	HuLuc63 (Anti-CS1) + bortezomib	16	6% CR, 19% nCR, 19% PR, 31% MR, 19% SD
Lonial S (ASH 2009)	HuLuc63 (Anti-CS1) + lenalidomida + dex	13	15% VGPR, 77% PR, 8% SD
Hussein MA (Haematologica 2010)	SGN-40 (Anti-CD40)	44	20% SD
Agura (ASH 2009)	SGN-40 (Anti-CD40) + lenalidomida +/- dex	33	3% CR, 36% PR, 12% MR, 30% SD

Tabla 1. Resumen de los resultados clínicos más recientes de nuevos fármacos solos y en combinación con tratamientos convencionales en pacientes con mieloma múltiple (cont.)

Moléculas que interfieren con vías de señalización			
Alsina M (Blood 2004)	Tipifarnib (inhibidor de farnesil transferasa)	43	64% SD
Siegel DS (ASH 2006)	SCIO-469 (inhibidor de MAPK) +/- bortezomib	62	24% SD con SCIO-469 en monoterapia Bz asociado →26% PR, 6% MR, 9% SD
Richardson PG (ASH 2007)	Perifosina (inhibidor de PI3K/AKT) +/- dex	48	24% SD con perifosina Dex asociado →13% PR, 25% MR, 47% SD
Richardson PG (IMW 2009)	Perifosina + bortezomib +/- dexametasona	86	3% CR, 19% PR, 16% MR
Jakubowiak A (IMW 2009)	Perifosina + lenalidomida + dexametasona	30	7% nCR, 10% VGPR, 33% PR, 20% MR
Ghobrial I (ASH 2009)	Temsirolimus (inhibidor de mTOR) + bortezomib	19	5% CR, 16% VGPR, 26% PR, 26% MR, 10% SD
Hofmeister (ASH 2009)	Temsirolimus + bortezomib	21	5% CR, 5% PR, 14% MR
Guenther (ASH 2009)	Everolimus (inhibidor de mTOR)	7	14% PR, 57% SD
Raje (ASH 2009)	Everolimus + lenalidomida	15	13% PR, 33% MR, 7% SD
Otros agentes			
Schey SA (J Clin Oncol 2004)	Pomalidomida	24	17% CR, 37% PR, 13% MR
Richardson PG (ASH 2009)	Pomalidomida	21	5% CR, 10% PR, 24% MR, 43% SD
Streetly (ASH 2009)	Pomalidomida	44	14% CR, 39% PR, 9% MR, 30% SD
Lacy MQ (ASH 2008)	Pomalidomida + dexametasona	60	2% CR, 23% VGPR, 33% PR, 5% MR, 18% SD
Knop (Haematológica 2005)	Bendamustina	31	6% CR, 23% PR, 23% MR
Pönisch (BJH 2008)	Bendamustina + talidomida + prednisona	28	14% CR, 18% VGPR, 50% PR
Hrusowsky (ASH 2007)	Bendamustina + bortezomib + dex	40	25% VGPR, 47% PR
Pönisch (Lugano 2008)	Bendamustina + bortezomib + prednisona	46	15% nCR, 14% VGPR, 46% PR
Lentzsch (ASH 2009)	Bendamustina + lenalidomida + dex	11	11% VGPR, 56% PR, 22% SD
Van de Donk NW (Leukemia 2004)	Oblimersen (G3139) + VAD	10	40% PR, 30% MR
Badros AZ (J Clin Oncol 2005)	Oblimersen (G3139) + talidomida + dexametasona	33	6% CR, 12% nCR, 36% PR, 18% MR
Mateos MV (Clin Cancer Res 2010)	Plitidepsin (aplidin) +/- dex	51	6% PR, 8% MR, 2% SD
Bahlis NJ (Clin Cancer Res 2002)	ATO (tríoideo arsénico) + ácido ascórbico	6	33% PR, 67% SD
Berenson JR (Clin Cancer Res 2007)	ATO + bortezomib + ácido ascórbico	22	9% PR, 18% MR
Berenson JR (Br J Haematol 2006)	ATO + melfalán + ácido ascórbico	65	3% CR, 23% PR, 21% MR

ASH: American Society of Haematology meeting; CR: remisión completa; IMW: International Myeloma Workshop; MR: respuesta menor; nCR: casi remisión completa; PR: respuesta parcial; SD: enfermedad estable; VGPR: muy buena respuesta parcial.

expuestos o incluso refractarios a bortezomib. Otra combinación atractiva es la de estos inhibidores de HDAC con lenalidomida y dexametasona. En este sentido, vorinostat y panobinostat también se han testado en esta combinación con un porcentaje de respuestas en torno a un 50% en ambos casos con varias RC.

Agentes hipometilantes

5-azacitidina ha demostrado también actividad *in vitro* frente a células mielomatosas, y su eficacia clínica está siendo testada actualmente en un ensayo en fase II. La combinación de agentes hipometilantes con

inhibidores de HDAC debe ser evaluada con el fin de determinar si la actuación simultánea sobre dos vías epigenéticas puede resultar en sinergia antitumoral.

Inhibidores de la respuesta a proteínas mal plegadas

Las proteínas presentes en las células precisan, tras su síntesis, de un correcto plegamiento por un doble motivo: por una parte, la conformación espacial de las diferentes proteínas es esencial para ejercer su función. Por otra parte, las proteínas mal plegadas son tóxicas para la célula, por lo que deben ser rápidamente eliminadas de la misma. La respuesta a

proteínas mal plegadas es un mecanismo fisiológico de supervivencia celular que es responsable del correcto plegamiento de las proteínas celulares, de la detección de proteínas mal plegadas y de la coordinación de su eliminación. Toda célula precisa de un correcto funcionamiento de estos mecanismos con el fin de mantener su homeostasis. Esta actividad es más necesaria en el caso de las células neoplásicas debido a su elevado metabolismo y su elevada síntesis de proteínas. Un caso especial dentro de las células neoplásicas es el de las células plasmáticas del mieloma múltiple, ya que éstas producen y secretan una enorme cantidad de inmunoglobulinas. El mecanismo que tienen las células para plegar las proteínas recién sintetizadas es el sistema de chaperonas, cuyo principal representante es la familia de las Hsp (*heat shock proteins*). Si este sistema falla o no es suficiente, las proteínas deben ser eliminadas mediante dos mecanismos celulares: el proteasoma y el agresoma.

Esta respuesta a proteínas mal plegadas es, como ya se ha mencionado, especialmente importante en el caso del mieloma múltiple por la gran cantidad de proteínas que sintetizan las células plasmáticas; por lo tanto, el bloqueo de cualquiera de estos sistemas resultará en la acumulación de inmunoglobulinas y de otras proteínas tóxicas en el citoplasma y subsiguientemente en la muerte celular. Además, es lógico pensar que la utilización de varios fármacos con el fin de interrumpir simultáneamente dos o más de estos sistemas inducirá un efecto citotóxico sinérgico en la célula plasmática tumoral. A continuación se repasan los principales grupos de fármacos que actúan sobre estos mecanismos:

Inhibidores de las Hsp (heat shock protein)

Las Hsp son las responsables del correcto plegamiento de las proteínas en una conformación funcional. Estas proteínas están presentes en todas las células del organismo y son necesarias para mantener su homeostasis. En el caso de los tumores se ha encontrado una importante sobreexpresión de esta familia de proteínas; de hecho, las Hsp27, Hsp70 y Hsp90 se encuentran muy elevadas en los pacientes con mieloma múltiple. Estudios *in vitro* han demostrado una clara actividad antimieloma de los inhibidores de Hsp y un efecto sinérgico con bortezomib¹³. Tras un ensayo de fase I que confirmó la actividad de tanespimicina, un inhibidor de Hsp90, como agente único en pacientes con mieloma, se activó un ensayo en que tanespimicina fue combinado con bortezomib en pacientes con mieloma en recaída. Sesenta y tres pacientes fueron incluidos obteniéndose 5% RC, 9% nRC, y 22% RP.

Nuevos inhibidores del proteasoma

Como ya se ha mencionado, la aparición del inhibidor de proteasomas bortezomib junto con los agentes inmunomoduladores han cambiado el curso clínico de los pacientes con mieloma. Esto ha llevado a la investigación de otros inhibidores de proteasomas con el objetivo de aumentar la potencia, mejorar la biodisponibilidad y el perfil de toxicidad y facilitar la vía de administración. NPI-0052 es un nuevo inhibidor, disponible por vía oral, que ha mostrado una importante actividad *in vitro*¹⁴ y que está actualmente siendo evaluado en estudios en fase I con más de la mitad de pacientes mostrando estabilización de su enfermedad. Es interesante resaltar que mientras que bortezomib inhibe preferentemente la actividad *caspase-like* del proteasoma, NPI-0052 inhibe las tres actividades catalíticas: "Trypsin-, Chymotrypsin- and Caspase-like". RP-171 (Carfilzomib) es otro nuevo inhibidor de proteasomas con una potente actividad antimieloma. La inhibición inducida por este fármaco es irreversible y muy específica, ya que únicamente afecta a la actividad *chymotrypsin-like*¹⁵. Dos ensayos clínicos de fase II están en marcha con este compuesto en monoterapia en pacientes con mieloma múltiple en recaída. En ambos casos, los resultados parecen muy prometedores con gran actividad incluso en pacientes que habían recibido previamente e incluso habían sido refractarios al otro inhibidor de proteasomas, bortezomib. Además, a diferencia del bortezomib, este fármaco no produce neuropatía periférica, lo que le hace especialmente atractivo en la clínica. Hay que tener en cuenta que, mientras la mayoría de los otros agentes incluidos en esta revisión precisan ser combinados con otros fármacos para mostrar actividad antimieloma, este inhibidor de proteasomas es claramente eficaz como agente único. Además, un estudio recientemente reportado está analizando la actividad de la combinación de carfilzomib con lenalidomida y con dexametasona.

Inhibidores de la formación del agresoma

El agresoma es el segundo sistema, tras el proteasoma, de eliminación de proteínas tóxicas para la célula. Esta organela no existe en condiciones normales, pero en una situación en que el proteasoma no es suficiente para eliminar todas las proteínas, se induce la formación del agresoma a través de la HDAC-6 (histona deacetilasa-6). La inhibición simultánea de los dos sistemas de eliminación de proteínas tóxicas, el proteasoma y el agresoma, resulta en un sinérgico incremento en la citotoxicidad en líneas celulares y en células de pacientes con mieloma¹⁶; sin embargo, aún no se han reportado datos clínicos con esta combinación.

Agentes que actúan sobre receptores de superficie

Activadores directos de la vía extrínseca de la apoptosis

Uno de los elementos que se ha asociado con el desarrollo de tumores es la inhibición de los mecanismos proapoptóticos que mantienen la homeostasis en las células normales¹⁷. Esto ha hecho que una de las estrategias utilizadas para intentar acabar con las células tumorales haya sido la activación directa de las vías apoptóticas. Con este fin la activación de dos miembros de la super-familia de los receptores de TNF se ha propuesto recientemente como potenciales dianas antimieloma; uno de ellos es el receptor llamado FAS (CD95), y el segundo son los receptores de TRAIL (*TNF related-apoptosis-inducing ligand*). Varios estudios han demostrado actividad *in vitro* de agonistas de TRAIL/Apo2L frente al MM, tanto en líneas celulares como en células frescas aisladas de pacientes¹⁸. Además, también se ha investigado la actividad de una molécula activadora de Fas denominada Mega-FAS (APO010) frente a células de MM¹⁹. Así, el uso clínico de estos fármacos solos o en combinación con otros agentes resulta atractivo y, de hecho, un ensayo está explorando la eficacia de mapatumumab (anticuerpo monoclonal humano frente a TRAIL-R1) en combinación con bortezomib en pacientes con mieloma múltiple refractario o en recaída.

Inhibidores de receptores tirosina-cinasa

Los receptores tirosina cinasa son una familia de receptores que se caracterizan, como su nombre indica, por inducir la fosforilación de sus sustratos en residuos tirosina. Se han descrito más de 20 clases diferentes de estos receptores y tienen una importancia fundamental en el desarrollo embrionario de los diferentes tejidos y también en los procesos normales de diferenciación y de homeostasis celular. Además, recientemente se ha descubierto que su activación juega un papel importante en la patogénesis y el desarrollo de numerosos tumores, encontrándose sobreexpresados en muchos de ellos. El paradigma de esta situación es la translocación t(9;22) presente en la leucemia mieloide crónica que induce la activación constitutiva de la tirosina-cinasa abl, que está directamente relacionada con la aparición de esta enfermedad. Otras veces, se producen translocaciones que provocan la sobreexpresión de estas proteínas con o sin su activación constitutiva.

Por lo tanto, una línea lógica de investigación en el terreno de la búsqueda de nuevos fármacos antitumorales ha sido el diseño de nuevos compuestos en-

camados a bloquear los efectos proliferativos y antiapoptóticos de las tirosina-cinasas. A continuación se describen algunos de los más importantes receptores y sus inhibidores:

Imatinib mesilato (STI-571) y dasatinib (BMS-354825)

La base para la utilización de estos inhibidores de c-kit/PDGFR reside en el hecho de que aproximadamente un tercio de los pacientes con mieloma expresan c-kit en la superficie de las células plasmáticas²⁰. Nuestro grupo ha demostrado que imatinib mesilato (STI571) es capaz de bloquear el ciclo celular en las células de pacientes con mieloma y además potencia el efecto *in vitro* de otros agentes anti-mieloma habitualmente utilizados en la clínica. Sin embargo, en un ensayo clínico en fase II que se ha llevado a cabo no se consiguió ninguna respuesta. Respecto al dasatinib, los estudios *in vitro* que se han realizado en nuestro laboratorio han mostrado que este inhibidor de tirosina-cinasas potencia de forma importante la actividad de bortezomib o lenalidomida, siendo especialmente sinérgica la combinación con dexametasona. En lo que se refiere a la clínica, este fármaco utilizado como agente único indujo estabilizaciones de la enfermedad en 4 de los 13 pacientes con mieloma refractario o en recaída en los que se utilizó. En la actualidad existen dos ensayos clínicos en los que la combinación de dasatinib con bortezomib o bien con lenalidomida + dexametasona se están utilizando en pacientes con mieloma en recaída o refractarios.

Inhibidores de FGFR3

La translocación t(4;14) induce la sobreexpresión del receptor tirosina-cinasa FGFR3 y confiere un pronóstico adverso. Estudios recientes utilizando diferentes moléculas como el inhibidor PD173074, o el inhibidor de receptores tirosina-cinasa de clase III, IV y V, CHIR-258/TKI 258, han demostrado la capacidad de estos fármacos para inhibir la autofosforilación de FGFR3 en células con dicha translocación, resultando en parada de ciclo celular y apoptosis. Hasta la fecha un inhibidor de FGFR3 (AB1010) se ha utilizado en 11 pacientes con mieloma y t(4;14). Todos los pacientes progresaron con el inhibidor en monoterapia, pero cuando se asoció dexametasona, tres pacientes respondieron: uno alcanzó nRC, otro RP y dos RM.

VEGF y VEGFR como dianas terapéuticas

VEGF (*vascular endothelial growth factor*) es otra diana interesante, no sólo por su relevancia en la angiogénesis sino también por su capacidad de activar señales de proliferación, supervivencia y migración en

las células de mieloma a través de las vías de MEK/MAPK y de PI3K/AKT²¹. En la actualidad hay disponibles varios inhibidores tirosina-cinasa que actúan sobre los tres receptores de VEGF y han demostrado actividad *in vitro*. Desafortunadamente, las expectativas levantadas por estos experimentos *in vitro* no han sido confirmadas en los estudios clínicos y, de hecho, el inhibidor de VEGF pazopanib no ha mostrado eficacia en un ensayo clínico en fase II. Sin embargo, es posible que estos agentes puedan ser útiles cuando se utilicen en combinación con otros fármacos. Así, un anticuerpo monoclonal humanizado frente a VEGF (Bevacizumab, Avastin) está siendo explorado en combinación con lenalidomida y dexametasona en 17 pacientes con un 70% de RP.

Inhibidores del receptor de IGF-I

IGF-I (*insulin-like growth factor-I*) es una de las citocinas más importantes en la patogenia del mieloma. Estimula la proliferación de las células mielomatosas y protege de la apoptosis inducida por dexametasona o por TRAIL, entre otros efectos²². Diferentes anticuerpos monoclonales que bloquean la unión del ligando con su receptor están siendo investigados en el tratamiento del mieloma múltiple. Dos grupos han reportado recientemente la actividad clínica de dos de estos anticuerpos en pacientes con mieloma: AVE-1642 se utilizó como agente único en 14 pacientes; únicamente uno de ellos consiguió una RM. CP-751,871 se administró a 47 pacientes, permitiéndose la adición de dexametasona o de rapamicina en caso de enfermedad estable (SD) o de progresión de la enfermedad (PD); 4% de los pacientes alcanzaron RC, y 8% RP. Una alternativa a los anticuerpos monoclonales es la utilización de inhibidores específicos del receptor tirosina-cinasa IGF-IR. Nuestro grupo ha demostrado que NVP-AEW541 bloquea la progresión en el ciclo celular e induce apoptosis en líneas celulares de mieloma múltiple y en células frescas aisladas de pacientes con mieloma; además, potencia el efecto de varios agentes antimieloma, siendo la combinación de esta molécula con dexametasona y bortezomib especialmente atractiva²³.

Anticuerpos monoclonales dirigidos frente a antígenos de superficie de las células plasmáticas

- El receptor de la interleucina 6 (IL6-R) es uno de los receptores más importantes presentes en la superficie de la célula plasmática⁸. La interacción con su ligando natural, IL-6, promueve la proliferación de las células plasmáticas, antiapoptosis y resistencia a fármacos a través de la activación de diferentes vías, como las de PI3K/AKT o Ras/Raf/MAPK entre

otras. Los resultados clínicos con anticuerpos monoclonales que bloquean esta interacción utilizados en monoterapia han sido bastante pobres. Sin embargo, hay datos preliminares de la combinación del anticuerpo monoclonal CNTO 328 con bortezomib en 21 pacientes que muestran un 57% de RP o mejores con un 14% de RC.

- CD56 (NCAM) es una molécula de adhesión involucrada en el anclaje de las células plasmáticas mielomatosas al estroma medular, y su ausencia en las células plasmáticas de la médula ósea de los pacientes con mieloma se ha asociado con su diseminación extramedular y con una tendencia a una menor supervivencia²⁰. Este hecho ha propiciado la investigación de nuevos anticuerpos monoclonales frente a este receptor. En este sentido, la eficacia antitumoral del anticuerpo monoclonal Hu N901-DM1 (anti CD56) se ha analizado en 18 pacientes refractarios, con tres de ellos alcanzando una RM.

- CS1 es una glicoproteína de membrana que mediante estudios de expresión génica se observó estar muy altamente expresada en las células plasmáticas mielomatosas, en linfocitos CD8 y en células NK. Además, estudios posteriores demostraron su relevancia en la adhesión de las células plasmáticas al estroma medular. Esta elevada expresión en células tumorales mielomatosas lo convierte en una interesante diana terapéutica, por lo que se ha generado un anticuerpo monoclonal humanizado (HuLuc 63) frente a CS1 con interesante actividad preclínica frente al mieloma múltiple. Respecto a los resultados clínicos, como agente único, obtuvo un 26% de estabilizaciones de la enfermedad en 23 pacientes refractarios. Su eficacia en combinación con otros agentes ha sido muy importante. En concreto, cuando este anticuerpo se combinó con bortezomib, el 75% de los pacientes obtuvieron una RM o mejor y en el 19% se estabilizó la enfermedad. Sin embargo, la combinación con lenalidomida parece especialmente atractiva por un mecanismo de acción singular en el que el agente inmunomodulador “prepara” las células mononucleadas de sangre periférica y posteriormente elotuzumab induce ADCC. Esta combinación ha producido un 92% de RP o mejores en 13 pacientes con baja toxicidad.

- CD40 está expresado en células con alta actividad proliferativa y en todas las células presentadoras de antígenos. En líneas celulares de mieloma, un anticuerpo monoclonal anti-CD40 (SGN-40) es capaz de inducir apoptosis mediante señalización directa, mediante citotoxicidad dependiente de anticuerpos y mediante fagocitosis celular dependiente de anticuerpos²⁴. En un ensayo en fase I con este anticuerpo como agente único, en que se incluyeron 32 pacientes con mieloma, se observaron disminuciones transitorias de la paraproteína y algunas estabilizaciones

de la enfermedad. Basándose en estos resultados, se han activado sendos estudios de SGN-40 en combinación con bortezomib y con lenalidomida y dexametasona en pacientes con mieloma múltiple refractario o en recaída. Del segundo de ellos ya tenemos datos de respuestas preliminares que demuestran eficacia incluso en pacientes tratados previamente con lenalidomida.

Moléculas que interfieren con vías de señalización

Inhibidores de farnesil-transferasa

Las mutaciones en N- y K-RAS son relativamente frecuentes en los pacientes con mieloma múltiple avanzado y se asocian con un mal pronóstico²⁵. La activación de la vía de RAS requiere de la localización de RAS en la membrana celular. Para ello, esta proteína precisa de una modificación lipídica que es mediada por dos enzimas: la farnesil-transferasa y la geranyl-geranyl-transferasa. En consecuencia, la inhibición de la farnesilación de RAS impedirá la localización de RAS en la membrana y la actividad oncogénica de esta proteína. Por lo tanto, el uso de estos agentes parece atractivo, especialmente en aquellos pacientes con mutaciones activadoras de RAS. Los resultados de un ensayo en fase II con el inhibidor de la farnesil transferasa, tipifarnib (Zarnestra) muestran únicamente estabilizaciones de la enfermedad en un 64% de los pacientes. Su combinación con otros agentes como bortezomib presenta sinergia *in vitro*, pero aún no se han reportado resultados clínicos.

Inhibidores de las MAPK

Las MAPK son proteínas implicadas en importantes vías que controlan la proliferación celular y la apoptosis. Una de las vías cuya inhibición se ha explorado en mieloma es la vía de p38. El uso de inhibidores de p38 MAPK (por ejemplo, SCIOS-469) resulta en la inhibición de la proliferación de las células plasmáticas, una disminución en la secreción de IL-6 y de VEGF, dos citocinas importantes en la patogenia del mieloma, como se ha descrito previamente y, lo que es más interesante, induce un importante efecto sinérgico al combinarlo con bortezomib. Un ensayo clínico en fase II de SCIOS-469 que se llevó a cabo en pacientes con mieloma en recaída mostró un 24% de SD cuando se utilizó en monoterapia y 26% de RP, 6% de RM y 9% de SD cuando se combinó con bortezomib. Otro fármaco que actúa sobre las proteínas de estas vías es el inhibidor de MEK, AZD 6244. Este agente presenta una interesante eficacia citotóxica *in vitro* frente a célu-

las tumorales de mieloma y, además, mejora la enfermedad ósea del mieloma en modelos preclínicos.

Inhibidores de PI3K/AKT

La vía de Akt es una de las vías más importantes en la patogenia del mieloma²⁶ y su activación confiere ventaja proliferativa a las células plasmáticas tumorales y un fenotipo de resistencia a diferentes fármacos, como por ejemplo la dexametasona. Esta vía de señalización es activada por citocinas y otras señales procedentes del estroma de la médula ósea, por lo que su bloqueo mediante inhibidores específicos puede resultar en una atractiva actividad anti-mieloma en el contexto del microambiente medular. La perifosina es un alquil-fosfolípido oral que inhibe Akt respetando PI3K, e induce una potente citotoxicidad *in vitro* e *in vivo* en células mielomatosas humanas y es sinérgico con otros fármacos como dexametasona, doxorubicina, melfalán o bortezomib²⁷. Estos datos han proporcionado la base para los diferentes ensayos clínicos que están en marcha con este agente en pacientes con mieloma múltiple refractario. Así, perifosina sola ha mostrado un 24% de SD, y en combinación con dexametasona indujo un 81% de respuestas: 13% RP, 25% RM, y 47% SD. Además, un ensayo clínico está evaluando la combinación de perifosina con bortezomib con o sin dexametasona en pacientes en recaída y que habían estado previamente expuestos a bortezomib. En esta población de pacientes refractarios, la combinación es capaz de conseguir respuestas en más de un tercio de los pacientes. El último ensayo que se está llevando a cabo con este fármaco es en combinación con lenalidomida y con dexametasona. De este estudio en fase I se han reportado los resultados de los primeros 30 pacientes con resultados muy prometedores (70% de respuestas).

Inhibidores de mTOR (mammalian target of rapamycin)

mTOR se es una de las moléculas integrantes de la vía de PI3K/AKT y media la fosforilación de proteínas responsables de la regulación de la síntesis y la expresión de muchas otras proteínas, incluyendo ciclinas-D y c-myc. Basándose en resultados *in vitro*²⁸, varios inhibidores de mTOR como los análogos de rapamicina CCI-779 (temsirolimus) o RAD001 (everolimus) se encuentran en investigación clínica en pacientes con mieloma múltiple. El primero se ha combinado con bortezomib en un ensayo en fase II que ha incluido 19 pacientes obteniendo un 47% de respuestas incluyendo varias RC. Ambos fármacos se están combinando también con lenalidomida en dos fases I con buenos resultados preliminares.

Grupo misceláneo

Nuevos IMiD (pomalidomida)

Los buenos resultados de lenalidomida en combinación con dexametasona o con otros agentes clásicos o en investigación han estimulado el desarrollo de otros análogos de la talidomida que podrían tener una eficacia similar. Uno de estos fármacos es pomalidomida, que en un estudio en fase I llevado a cabo hace unos años demostró clara eficacia en monoterapia en pacientes con mieloma múltiple refractario. Recientemente se ha publicado un estudio en fase II de pomalidomida en combinación con dexametasona. En los 60 pacientes incluidos en el estudio, 63% alcanzaron RM o mejor, y 25% SD. Además, una tercera parte de los 13 pacientes que habían sido previamente refractarios a lenalidomida respondieron a la combinación de pomalidomida con dexametasona.

Bendamustina

La bendamustina es un fármaco con una estructura química peculiar que le confiere características intermedias entre un agente alquilante y un análogo de las purinas. Se trata de una molécula antigua que se está recuperando en la actualidad para el tratamiento de los pacientes con MM y, de hecho, varios estudios han analizado la actividad de este fármaco en pacientes con MM en recaída o refractarios. Como agente único se ha probado en pacientes que habían recaído tras un autotrasplante previo, es decir, que habían recibido dosis altas de melfalán (otro agente alquilante) con un buen porcentaje de respuestas. Posteriormente se ha utilizado en diferentes combinaciones como talidomida y prednisona, bortezomib y esteroides o lenalidomida y dexametasona con un tasa de respuestas de entre un 65 y un 85%.

Bcl-2 antisense

Oblimersen (G3139) es un oligodeoxinucleótido *antisense* que conduce a una disminución selectiva de los niveles de mRNA y proteicos de Bcl-2²⁹. Debido a la alta expresión de esta proteína en el mieloma, su actividad en combinación con otros agentes está siendo explorada en esta enfermedad. En estos estudios, cuando oblimersen se asoció con VAD, esta combinación fue capaz de vencer la resistencia a este esquema quimioterápico, y su combinación con talidomida y dexametasona indujo una tasa de respuestas del 72%, con 6% RC, 12% nRC, 36% RP y 18% RM.

Plitidepsina (Aplidina) y Zalypsis

Aplidina es un agente antitumoral derivado del tunicado marino *Aplidium albicans*. A pesar de que su diana aún no ha sido definida, se ha demostrado la implicación de las vías de JNK y de p38 en la potente actividad antimieloma de este compuesto. Además, presenta sinergia *in vitro* con varios agentes anti-mieloma. Los resultados con aplidina (sola o en combinación con dexametasona en caso de respuesta subóptima) en 41 pacientes con mieloma intensamente tratados mostraron 8% RP, 15% RM y 27% SD. Un ensayo clínico de este compuesto en combinación con bortezomib se ha activado recientemente.

Zalypsis es otro compuesto derivado de un organismo marino que ha demostrado clara eficacia en estudios preclínicos a concentraciones picomolares³⁰. Su mecanismo de acción parece basado en la generación de daño al DNA. Estos estudios preclínicos han promovido el desarrollo de un ensayo clínico en fase I/II que está testando la actividad de este fármaco en monoterapia en pacientes con MM refractario o en recaída.

Trióxido arsénico (ATO)

La base científica para la utilización de ATO en pacientes con mieloma múltiple reside en sus efectos multifactoriales sobre líneas celulares y células frescas aisladas de pacientes con mieloma. Un estudio en fase II llevado a cabo en pacientes con mieloma múltiple en recaída mostró RM y estabilizaciones de la enfermedad. Dado que el glutatión se ha propugnado como un inhibidor de la muerte inducida por ATO, y que el ácido ascórbico es capaz de disminuir las concentraciones intracelulares de esta molécula, la combinación de ATO con ácido ascórbico resulta interesante, así como con dexametasona, ya que ambos fármacos utilizan diferentes vías proapoptóticas. En este sentido, hay varios ensayos clínicos en que se han combinado ATO y ácido ascórbico con melfalán o incluso con bortezomib, mostrando tasas de respuestas de entre el 27% y el 48%; sin embargo, la mayoría de estas respuestas fueron menores, y la investigación de este agente ha sido prácticamente abandonada.

Conclusión

En los últimos años hemos asistido a la aprobación de tres fármacos que han cambiado el pronóstico de los pacientes con MM en recaída. La elección del mejor tratamiento para estos pacientes debe basarse en el análisis de varias características del paciente (comorbilidades), de la enfermedad (tipo de recaída, duración de la respuesta previa) y de los tratamientos previos

recibidos. Además, actualmente se está realizando un gran esfuerzo para tratar de descubrir nuevas dianas terapéuticas y nuevos fármacos basándose en un conocimiento cada vez más profundo de la patogenia del mieloma múltiple. Los experimentos *in vitro* realizados en líneas celulares y en células frescas obtenidas de pacientes con mieloma múltiple, así como los datos derivados de los modelos animales, sustentan claramente su traslación clínica. Sin embargo, es necesario un esfuerzo conjunto de médicos y pacientes para incluir a estos últimos en ensayos clínicos, de forma que las expectativas levantadas por muchos de estos fármacos puedan ser demostradas en estos estudios con agentes en monoterapia o en combinación con otros fármacos antimieloma.

Bibliografía

- Kumar SK, Rajkumar SV, Dispenzieri A, et al. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood*. 2008;111:2516-2520.
- San-Miguel J, Harousseau JL, Joshua D, Anderson KC. Individualizing treatment of patients with myeloma in the era of novel agents. *J Clin Oncol*. 2008;26:2761-2766.
- Richardson PG, Weller E, Jagannath S, et al. Multicenter, phase I, dose-escalation trial of lenalidomide plus bortezomib for relapsed and relapsed/refractory multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2009;27:5713-5719.
- Richardson P, Jagannath S, Jakubowiak A, et al. Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone in Patients with Relapsed or Relapsed/Refractory Multiple Myeloma (MM): Encouraging Response Rates and Tolerability with Correlation of Outcome and Adverse Cytogenetics in a Phase II Study. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2008;112:1742.
- Reece DE, Rodriguez GP, Chen C, et al. Phase I-II trial of bortezomib plus oral cyclophosphamide and prednisone in relapsed and refractory multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2008;26:4777-4783.
- Knop S, Gerecke C, Liebisch P, et al. The Efficacy and Toxicity of the RAD Regimen (Revlimid(R), Adriamycin(R), Dexamethasone) in Relapsed and Refractory Multiple Myeloma - A Phase I/II Trial of "Deutsche Studiengruppe Multiples Myelom". *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2007;110:2716.
- Ocio EM, Mateos MV, Maiso P, Pandiella A, San-Miguel JF. New drugs in multiple myeloma: mechanisms of action and phase I/II clinical findings. *Lancet Oncol*. 2008;9:1157-1165.
- Hideshima T, Mitsiades C, Tonon G, Richardson PG, Anderson KC. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nat-RevCancer*. 2007;7:585-598.
- San Miguel JF, Gutierrez N, Garcia-Sanz R, Pandiella A. Thalidomide and new drugs for the treatment of multiple myeloma. *HematolJ*. 2003;4:201-207.
- Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F, Sawyer J, Barlogie B, Shaughnessy J, Jr. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood*. 2005;106:296-303.
- Catley L, Weisberg E, Kiziltepe T, et al. Aggresome induction by proteasome inhibitor bortezomib and alpha-tubulin hyperacetylation by tubulin deacetylase (TDAC) inhibitor LBH589 are synergistic in myeloma cells. *Blood*. 2006;108:3441-3449.
- Maiso P, Carvajal-Vergara X, Ocio EM, et al. The histone deacetylase inhibitor LBH589 is a potent antimyeloma agent that overcomes drug resistance. *Cancer Res*. 2006;66:5781-5789.
- Davenport EL, Moore HE, Dunlop AS, et al. Heat shock protein inhibition is associated with activation of the unfolded protein response pathway in myeloma plasma cells. *Blood*. 2007;110:2641-2649.
- Chauhan D, Catley L, Li G, et al. A novel orally active proteasome inhibitor induces apoptosis in multiple myeloma cells with mechanisms distinct from Bortezomib. *Cancer Cell*. 2005;8:407-419.
- Demo SD, Kirk CJ, Aujay MA, et al. Antitumor activity of PR-171, a novel irreversible inhibitor of the proteasome. *Cancer Res*. 2007;67:6383-6391.
- Hideshima T, Bradner JE, Wong J, et al. Small-molecule inhibition of proteasome and aggresome function induces synergistic antitumor activity in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:8567-8572.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100:57-70.
- Mitsiades CS, Treon SP, Mitsiades N, et al. TRAIL/Apo2L ligand selectively induces apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood*. 2001;98:795-804.
- Ocio EM, Maiso P, Garayoa M, Dupuis M, Pandiella A, Miguel JFS. The Activation of Fas Receptor by APO010, a Recombinant Form of Fas Ligand, Induces In Vitro and In Vivo Antimyeloma Activity. *Blood*. 2007;110:453a-Abstract 1515.
- Mateo G, Montalban MA, Vidriales MB, et al. Prognostic value of immunophenotyping in multiple myeloma: a study by the PETHEMA/GEM cooperative study groups on patients uniformly treated with high-dose therapy. *J Clin Oncol*. 2008;26:2737-2744.
- Podar K, Anderson KC. The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: therapeutic implications. *Blood*. 2005;105:1383-1395.
- Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, et al. Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies, and solid tumors. *Cancer Cell*. 2004;5:221-230.
- Maiso P, Ocio EM, Garayoa M, et al. The insulin-like growth factor-I receptor inhibitor NVP-AEW541 provokes cell cycle arrest and apoptosis in multiple myeloma cells. *BrJ Haematol*. 2008;141:470-482.
- Tai YT, Li X, Tong X, et al. Human anti-CD40 antagonist antibody triggers significant antitumor activity against human multiple myeloma. *Cancer Res*. 2005;65:5898-5906.
- Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, et al. Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. *Cancer Res*. 2004;64:1546-1558.
- Tu Y, Gardner A, Lichtenstein A. The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT kinase pathway in multiple myeloma plasma cells: roles in cytokine-dependent survival and proliferative responses. *Cancer Res*. 2000;60:6763-6770.
- Hideshima T, Catley L, Yasui H, et al. Perifosine, an oral bioactive novel alkylphospholipid, inhibits Akt and induces in vitro and in vivo cytotoxicity in human multiple myeloma cells. *Blood*. 2006;107:4053-4062.
- Raje N, Kumar S, Hideshima T, et al. Combination of the mTOR inhibitor rapamycin and CC-5013 has synergistic activity in multiple myeloma. *Blood*. 2004;104:4188-4193.
- Klasa RJ, Gillum AM, Klem RE, Frankel SR. Oblimersen Bcl-2 antisense: facilitating apoptosis in anticancer treatment. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*. 2002;12:193-213.
- Ocio EM, Maiso P, Chen X, et al. Zalypsis: a novel marine-derived compound with potent antimyeloma activity that reveals high sensitivity of malignant plasma cells to DNA double-strand breaks. *Blood*. 2009;113:3781-3791.

Trombosis e hipercoagulabilidad

COORDINADORES: L. GARCÍA FRADE. *Valladolid*
J.R. GONZÁLEZ. *Salamanca*

NUEVOS FACTORES GENÉTICOS IMPLICADOS EN EL RIESGO DE TROMBOFILIA

J.M. SORIA¹, A. CÁRDENAS¹, J.C. SOUTO²

¹ Unitat de Genòmica de Malalties Complexes.

Institut de Recerca. ² Servei d'Hematologia.

Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona

Introducción

La localización e identificación de componentes genéticos implicados en patologías humanas, o en fenotipos directa o indirectamente asociados a las mismas, es un objetivo fundamental de la genética y constituye una de las prioridades esenciales para el futuro inmediato del sector biomédico. Desde hace varias décadas hemos asistido, por un lado, al desarrollo teórico de múltiples estrategias estadísticas con esta finalidad, como el análisis de ligamiento y los estudios de asociación, y, por otra parte, a la mejora significativa de técnicas de laboratorio como las de secuenciación y genotipación, todos ellos avances que han supuesto progresos sustanciales en la búsqueda de genes responsables de enfermedades. De este modo, la deseable posibilidad de una medicina preventiva y personalizada basada en la genética podría ser una realidad al alcance de nuestra mano. El conocimiento de la base fisiopatológica y los factores genéticos implicados en la enfermedad tromboembólica se ha beneficiado de estos avances, cambiando el concepto que se tenía de esta patología.

El presente artículo pretende hacer una revisión de los conocimientos genéticos actuales sobre el riesgo de padecer enfermedad tromboembólica y sobre la complejidad del problema que supone abordar este campo en su globalidad. Como consecuencia se propone empezar a integrar perfiles de riesgo, más que factores de riesgo, para trasladar esta información al ámbito clínico.

Bases genéticas de la trombofilia

En 1965 se reconoció que la trombosis podía ser una enfermedad heredable, cuando Egeberg describió una familia con trombofilia asociada con una deficiencia en antitrombina. Desde entonces, el concepto de trombofilia ha evolucionado considerablemente. Dado que las deficiencias de antitrombina (AT), de proteína C (PC) y de proteína S (PS), y la disfibrinogenemia (Lane *et al.*, 1996) seguían un patrón de herencia autosómico dominante, se pensó que la trombofilia familiar era causada por un defecto génico dominante con una reducida penetrancia, que explicaría la variable expresividad

clínica de la enfermedad. Esta idea de la trombofilia familiar como una enfermedad monogénica (con un modelo de herencia mendeliana simple) quedó en entredicho a través del estudio sistemático de la deficiencia de PC (Miletich *et al.*, 1993). Como resultado de estas observaciones se hipotetizó que la trombofilia familiar seguía un modelo poligénico de herencia, donde la cosegregación de uno o más factores genéticos adicionales incrementaría el riesgo trombótico (Miletich *et al.*, 1993). Esta hipótesis se confirmó después de la identificación de las mutaciones factor V Leiden (FVL) (Bertina *et al.*, 1994) y G20210A del gen de la protrombina (Poort *et al.*, 1996) como factores de riesgo trombótico adicional en las familias portadoras de deficiencias en PC, PS o AT (Koeleman *et al.*, 1994; Zöller *et al.*, 1995).

En nuestros días la trombofilia hereditaria se considera una enfermedad multifactorial (interacción de factores genéticos y ambientales) y compleja, donde la suma de múltiples genes (cada uno de ellos con un efecto variable con el ambiente) determinará en cada individuo el grado de susceptibilidad a la trombosis (Rosendaal *et al.*, 1999; Bovill *et al.*, 1999).

¿Dónde estamos? Nuevos factores de riesgo trombótico

En la última década se han invertido grandes esfuerzos en el estudio de la enfermedad trombótica y, aunque hemos avanzado en los conocimientos sobre la base molecular de esta patología, aún queda mucho camino por recorrer, más si se tiene en cuenta que el 60% de la predisposición a la trombosis es atribuible a factores genéticos (Souto *et al.*, 2000).

Actualmente, además de las deficiencias en inhibidores de coagulación y las mutaciones FVL y G20210A en el gen de la protrombina anteriormente mencionadas, disponemos de importantes evidencias científicas de la implicación de otros factores genéticos en el riesgo de trombosis.

Uno de estos factores es el grupo sanguíneo ABO. Su asociación con el riesgo tromboembólico se conoce desde finales de los años sesenta, en que los portadores del grupo sanguíneo no-O presentan un riesgo entre 2 y 4 veces superior de padecer eventos trombóticos. Estos sujetos también tienen niveles más altos de factor von Willebrand y factor VIII y, posiblemente, éste sea el mecanismo fisiopatológico por el cual el grupo sanguíneo ABO está relacionado con el riesgo trombótico. En los últimos 5 años, se ha dado un paso más en el conocimiento del grupo sanguíneo como factor de riesgo cardiovascular con la demostración de que es el genotipo A1 el que presenta más riesgo de trombosis (Tirado I *et al.*, 2005; Morelli VM *et al.*, 2005). Además, también se ha reportado que los por-

tadores de genotipos no-O y factor V Leiden (FVL) tienen 23 veces más riesgo (CI95 9,1-59,3) de trombosis que los portadores de genotipos para el grupo sanguíneo O sin FVL (Morelli VM *et al.*, 2005). Estos resultados avalan la implicación del grupo sanguíneo ABO en el riesgo tromboembólico y su papel sinérgico con otros factores genéticos de riesgo.

Otro factor genético implicado en el riesgo de trombosis, inicialmente controvertido, es la mutación C46T en el gen del F12. Su implicación en la enfermedad tromboembólica fue reportada en un estudio familiar con una estrategia combinada de análisis de ligamiento genético y asociación (Soria JM *et al.*, 2002). Estudios posteriores de asociación caso-control han confirmado que la mutación C46T del F12 es un factor de riesgo de padecer trombosis venosa (Tirado I *et al.*, 2004) o arterial (Santamaria A *et al.*, 2004a; Santamaria *et al.*, 2004b; Roldan V *et al.*, 2005). Concretamente, los portadores homocigotos del alelo T presentan 5 veces más riesgo de eventos tromboembólicos que los no portadores. En la misma dirección, se ha reportado un estudio (Cochery-Nouvellon E *et al.*, 2007) en que se demuestra la implicación de este polimorfismo con factor de riesgo trombotico durante el primer embarazo en un seguimiento de 32.463 mujeres previamente asintomáticas. En este trabajo se demuestra que las portadoras del alelo T en homocigosis tienen 6 veces más riesgo de padecer un evento trombotico que las no portadoras. Recientemente, en el primer *genome-wide association study* (GWAS) publicado con la enfermedad tromboembólica (Tregouet *et al.*, 2009) identifican el locus del gen del F12 asociado al riesgo de trombosis.

También se han identificado en estudios caso-control, a partir de una estrategia de genes candidatos, varias mutaciones poco frecuentes en la población general, pero que confieren un riesgo alto de desarrollar eventos tromboticos. Estas mutaciones son la R67X en el gen de la SERPINA10 (inhibidor de la proteína Z) y la mutación A384S en el gen de la SERPINC1 (anti-trombina). Los portadores de la mutación R76X tienen un riesgo 3,3 veces superior de padecer un evento trombotico que los no portadores (Corral J *et al.*, 2006); y los portadores de la A384S tienen un riesgo 10 veces superior de padecer un evento trombotico que los no portadores (Corral J *et al.*, 2007). Fenotípicamente, la A384S causa una deficiencia en AT muy peculiar, ya que presenta niveles antigénicos normales, actividad anti-FXa normal, pero una actividad anti-IIa reducida en presencia de heparina (Mushunje A *et al.*, 2003). Según estas características el efecto de la mutación A384S sobre la proteína AT no puede detectarse con los métodos plasmáticos rutinarios utilizados en los laboratorios clínicos. Además, es importante destacar la relevancia clínica de la identificación de los pacientes portadores de esta mutación para una correcta admi-

nistración del tratamiento anticoagulante, ya que, debido al defecto que esta mutación causa en la proteína AT, las heparinas no fraccionadas pueden ser ineficientes como tratamiento anticoagulante en los portadores de esta mutación. Por tanto, por todo lo anteriormente expuesto, la detección a nivel genético de esta alteración es imprescindible y supone un avance significativo en su diagnóstico, cuya prevalencia en donantes sanos en población caucásica es de 1/630 (Tait RC *et al.*, 1994).

Otras mutaciones poco frecuentes en la población general son la R306T (FV Cambridge) y la R306G (FV Hong Kong) en el gen del F5, asociadas al fenotipo resistencia a la proteína C activada (APCR). Teniendo en cuenta que entre el 10 y el 20% de los casos de APCR no son portadores de la mutación FVL, debería estudiarse la presencia de estas mutaciones en estos pacientes.

Por último, otra alteración genética con importantes evidencias científicas de su implicación en el riesgo de trombosis es la mutación V34L en el gen del F13. La estabilización de las moléculas de fibrina por el FXIII activado es un proceso esencial para la formación del coágulo. Este proceso tiene un mecanismo de retroalimentación positiva donde la fibrina activa al FXIII. Esta activación es más rápida cuando el aminoácido 34 del FXIII es una Leu que cuando es una Val (Ariens RA *et al.*, 2000). Como consecuencia, esta alteración cambia la conformación de la fibrina que polimeriza formando una malla más delgada en el coágulo, con poros más pequeños y alterando las características de permeabilidad del coágulo (Ariens RA *et al.*, 2000). En este caso el alelo de riesgo sería el más prevalente, ya que la mutación tendría un efecto "protector" (Franco RF *et al.*, 1999; Catto AJ *et al.*, 1999). Al no existir ningún test plasmático que detecte el efecto funcional de la variante Leu34 sobre la formación del coágulo, la detección a nivel genético de esta alteración puede suponer un dato relevante en la cualificación del riesgo individual de enfermedad tromboembólica.

Otros factores genéticos asociados a riesgo trombotico están bajo estudio (Tabla 1), la mayoría de ellos identificados a través de la estrategia de análisis de genes candidatos o análisis de ligamiento genético con rasgos cuantitativos. Sin embargo, el campo de la trombofilia se está transformando con la irrupción de los *genome-wide association studies* (conocidos por las siglas GWAS). Este tipo de estudios permiten el análisis de asociación de cientos de miles (incluso un millón) de *single nucleotide polymorphisms* (SNP) distribuidos a lo largo del genoma con un fenotipo en un gran número de individuos.

El primer estudio de asociación a gran escala con el riesgo de trombosis comprendía el análisis de 19.682 SNP en 3.155 pacientes con trombosis y 5.087 controles (Bezemer *et al.*, 2008). Este estudio reveló la impli-

Tabla 1. De variantes genéticas potencialmente relacionadas con el riesgo de tromboembolismo venoso o con fenotipos intermediarios

Proteína	Var. genética	Gen	Fenotipo	Tipo de estudio	N	OR	Referencia
Anexina V		ANXA5					
	Haplotipo M2		TVP	Caso-control	613	1.9 (1.24-2.76)	Grandone et al. Thromb Haemost 2010;103:1102-03
Antitrombina		SERPINC1					
	C/T		TVP	Caso-control	8242	1.29 (1.10-1.49)	Bezemer et al. JAMA 2008;299:1306-14
Apolipoproteína A4		APOA4					
	Gln360His		TVP	Caso-control	2374	0.34 (0.18-0.65)	Zee et al. Circulation 2006;113:2193-200
Acuaporina 2		AQP2					
	SNP19 C/G		TVP	Caso-control	948	1.50 (0.80-2.60)	Nossent et al. Haematologica 2008;93:959-60
	SNP19 G/C		TVP	Caso-control	948	2.30 (0.60-9.20)	Nossent et al. Haematologica 2008;93:959-60
	SNP20 C/A		TVP	Caso-control	948	1.30 (0.90-1.90)	Nossent et al. Haematologica 2008;93:959-60
	SNP20 A/A		TVP	Caso-control	948	1.90 (0.90-4.10)	Nossent et al. Haematologica 2008;93:959-60
Receptor β2-adrenérgico		ADBR2					
	Gln27Glu		TVP	Caso-control	2374	1.40 (1.09-1.79)	Zee et al. Circulation 2006;113:2193,2200
	Gln27Glu		TVP	Caso-control	948	No sig.	Nossent et al. JTH 2005;3:405-07
	Gln27Glu		TVP	Caso-control	14210	1.34 (0.94-1.90)	Folsom et al. Thromb Haemost 2008;99:240
	Gln27Glu		TVP	Caso-control	164	No sig.	O'Donnell et al. Br J Haematol 2003;123:139-41
Citocromo CYP4V2		CYP4V2					
	C/A		TVP	Caso-control	8242	1.24 (1.11-1.37)	Bezemer et al. JAMA 2008;299:1306-14
			Factor XI	Caso-control	4051	Sig.	Bezemer et al. JAMA 2008;299:1306-14
Receptor endotelial prot C		EPCR					
	4678 G/C		Proteína Ca	Controles sanos	401	P=0,006	Medina et al. Thromb Haemost 2004; 91:905-11
	4678 G/C		TVP	Caso-control	806	0.61 (0.39-0.90)	Medina et al. Thromb Haemost 2004; 91:905-11
	4678 G/C		TVP+ FVL	Estudio en familias	276	0.31 (0.16-0.83)	Medina et al. Thromb Haemost 2005;94:389-94
	4678 G/C homocig C/C		TVP	Caso-control	228	0.47 (0.22-0.99)	Pecheniuk et al. Thromb Haemost 2008;99:453-55
	6936 A/G		TVP	Caso-control	676	1.80 (1.20-2.60)	Saposnik et al. Blood 2004;103:1311-18
	6936 A/G		sEPCR plasma	Controles sanos	100	P< 0.0001	Saposnik et al. Blood 2004;103:1311-18
	6936 A/G		sEPCR plasma	Controles sanos	469	P sig.	Uitte de Willig et al. JTH 2004;2:1305-10
	6147 G/A (haplotipo H4)		TVP	Caso-control	948	1.40 (1.00-2.20)	Uitte de Willig et al. JTH 2004;2:1305-10
	6936 A/G		TVP	Caso-control	5370	2.50 (1.20-5.40)	Galanaut et al. JTH 2010;8:707-13

Tabla 1. De variantes genéticas potencialmente relacionadas con el riesgo de tromboembolismo venoso o con fenotipos intermedios (cont.)

Proteína	Var. genética	Gen	Fenotipo	Tipo de estudio	N	OR	Referencia
Selectina	-E	SELE					
	Leu554Phe		TVP	Caso-control	2374	0.39 (0.22-0.71)	Zee et al. Circulation 2006;113:2193-2200
	Ser128Arg/Arg		TVP recurrente	Casos con TV	585	4.10 (1.50-11.4)	Jilma et al. Arch Inter Med 2006;166:1655-59
Factor II		F2					
	19911 A/G		TVP+PT20210	Caso-control	408	aum. de 3.3 a 5.3	Pérez-Ceballos et al. Br J Haematol 2002;118:610-4
	19911 A/G		Factor II	Caso-control	1588	P = 0.05	Martinelli et al. JTH 2006;4:2582-6
	19911 A/G		TVP	Caso-control	1588	1.50 (1.00-2.20)	Martinelli et al. JTH 2006;4:2582-6
	19911 A/G		TVP+FVL	Caso-control	1588	2.10 (1.30-3.40)	Martinelli et al. JTH 2006;4:2582-6
	19911 A/G homocig G/G		TVP	Caso-control	9144	1.43 (1.27-1.61)	Chinhamitr et al. JTH 2006;4:2587-92
19911 A/G homocig G/G		Factor II	Controles sanos	2816	Sig.	Chinhamitr et al. JTH 2006;4:2587-92	
Factor V		F5					
	T915S		TVP mujeres	Caso-control	2029	2.01 (1.12-3.63)	Smith et al. JAMA 2007;297:489-98
	K858R		TVP mujeres	Caso-control	2029	0.74 (0.60-0.90)	Smith et al. JAMA 2007;297:489-98
	K858R		TVP mujeres	Caso-control	6719	0.73 (0.58-0.92)	Smith et al. J Thromb Haemost 2009;7:1743-6
	3578 C/G		TVP mujeres	Caso-control	2029	1.20 (1.01-1.42)	Smith et al. JAMA 2007;297:489-98
	Haplótipo HR2		TVP	Metaanálisis	10406	1.15 (0.98-1.36)	Castaman et al. Haemat 2003;88:1182-9
Haplótipo HR2		TVP mujeres	Caso-control	2029	No sig.	Smith et al. JAMA 2007;297:489-98	
Proteasa activadora Factor VII		FSAP					
	1601 G/A		TVP	Caso-control	942	No sig.	Van Minkelen Blood 2005;105:4898-9
	1601 G/A		TVP	Caso-control	426	3.5 (1.2-10.0)	Hoppe et al. Blood 2005;105:1549-51
	1601 G/A		TVP mujeres	Caso-control	2029	No sig.	Smith et al. JAMA 2007;297:489-98
	1601 G/A		TVP	Cohorte	170	No sig.	Sidelmann et al. Thromb Res 2008;122:848-53
	1601 G/A		TVP recurrente	Cohorte con TVP	854	No sig.	Gulesserian et al. Thromb Haemost 2006;95:65-7
Factor VIII		F8					
	3951 C/G		TVP varones	Caso-control	343	0.40 (0.20-0.80)	Nossent et al. Thromb Haemost 2006;95:942-8
	3951 C/G		FVIII	Caso-control	343	Sig.	Nossent et al. Thromb Haemost 2006;95:942-8
	3951 C/G		FVIII mujeres	Caso-control	295	Sig.	Scanavini et al. Thromb Haemost 2005;93:453-6
	3951 C/G		TVP mujeres	Caso-control	295	No sig.	Scanavini et al. Thromb Haemost 2005;93:453-6
3951 C/G		TVP mujeres	Caso-control	2029	No sig.	Smith et al. JAMA 2007;297:489-98	
Factor IX		F9					
	12806 T/A		TVP mujeres	Caso-control	2029	1.49 (1.08-2.05)	Smith et al. JAMA 2007;297:489-98
Factor X		F10					
	8946 C/G		TVP mujeres	Caso-control	2029	0.80 (0.68-0.96)	Smith et al. JAMA 2007;297:489-98

Tabla 1. De variantes genéticas potencialmente relacionadas con el riesgo de tromboembolismo venoso o con fenotipos intermedios (cont.)

Proteína	Var. genética	Gen	Fenotipo	Tipo de estudio	N	OR	Referencia
Factor XI	12806 C/A	F11	TVP mujeres	Caso-control	2029	0.83 (0.70-0.99)	Smith et al. JAMA 2007;297:489-98
	22771 C/T		TVP mujeres	Caso-control	2029	1.31 (1.10-1.55)	Smith et al. JAMA 2007;297:489-98
	rs3756008 (A/T)		TV	Caso-control	4051	1.27 (1.16-1.38)	Bezemer et al. JAMA 2008;299:1306-14
	rs3756008 (A/T)		Factor XI	Caso-control	4051	Sig.	Bezemer et al. JAMA 2008;299:1306-14
	rs2036914 (T/C)		TVP	Caso-control	4051	1.30 (1.19-1.42)	Bezemer et al. JAMA 2008;299:1306-14
	rs2036914 (T/C)		Factor XI	Caso-control	4051	Sig.	Bezemer et al. JAMA 2008;299:1306-14
	rs4253418 (A/G)		TVP	Caso-control	4051	1.39 (1.11-1.74)	Bezemer et al. JAMA 2008;299:1306-14
	rs4253418 (A/G)		Factor XI	Caso-control	4051	Sig.	Bezemer et al. JAMA 2008;299:1306-14
Factor XIII B		F13B					
	8259 A/G His95Arg		TVP	Caso-control	943	1.50 (1.10-2.00)	Komanasin et al. JTH 2005;3:2487-96
Fibrinógeno α		FGA					
	251 G/A		TVP mujeres	Caso-control	2029	1.25 (1.05-1.29)	Smith et al. JAMA 2007;297:489-98
	215 G/A		TVP mujeres	Caso-control	6719	1.27 (1.10-1.47)	Smith et al. J Thromb Haemost 2009;7:1743-6
	Thr312Ala (Thr/Ala)		TVP	Caso-control	1520	1.27 (1.01-1.60)	Rasmussen-Torvik et al. Thromb Res 2007;121:1-7
	Thr312Ala (Ala/Ala)		TVP	Caso-control	1520	1.49 (1.00-2.22)	Rasmussen-Torvik et al. Thromb Res 2007;121:1-7
	Thr312Ala (Ala/Ala)		TEP	Caso-control	348	2.71 (1.23-6.01)	Carter et al. Blood 2000;96:1177-79
	Thr312Ala (Thr/Ala)		TVP mujeres	Caso-control	2029	1.24 (1.3-1.50)	Smith et al. JAMA 2007;297:489-98
	Thr312Ala (Thr/Ala)		TVP mujeres	Caso-control	6719	1.66 (1.25-2.04)	Smith et al. J Thromb Haemost 2009;7:1743-6
Fibrinógeno β		FGB					
	1643 C/T		TVP mujeres	Caso-control	2029	1.31 (1.08-1.60)	Smith et al. JAMA 2007;297:489-98
	1643 C/T		TVP mujeres	Caso-control	6719	1.30 (1.09-1.55)	Smith et al. J Thromb Haemost 2009;7:1743-6
Fibrinógeno γ		FGG					
	129 A/T (T/T)		TVP	Caso-control	948	2.40 (1.50-3.90)	Uitte de Willige et al. Blood 2005;106:4167-83
	129 A/T (A/T)		TVP mujeres	Caso-control	2029	1.23 (1.02-1.49)	Smith et al. JAMA 2007;297:489-98
	129 A/T (T/T)		TVP mujeres	Caso-control	2029	1.64 (1.04-2.58)	Smith et al. JAMA 2007;297:489-98
	129 A/T		TVP mujeres	Caso-control	6719	1.42 (1.21-1.68)	Smith et al. J Thromb Haemost 2009;7:1743-6
Glicoproteína VI		GP6					
	rs1613662 (G/A)		TVP	Caso-control	8242	1.15 (1.01-1.30)	Bezemer et al. JAMA 2008;299:1306-14
Heme oxigenasa 1		HMOX1					
	rs3074372 GT (alelo largo >33)		TVP recurrente	Cohorte	860	2.00 (1.30-3.30)	Mustafa et al. J Vasc Surg 2008;47:566-70
Antagonista receptor IL-1		IL1RN					
	13888 T/G (G/G)		TVP	Caso-control	948	3.9 (1.6-9.7)	Van Minkelen et al. ATVB 2007;27:1486-91

Tabla 1. De variantes genéticas potencialmente relacionadas con el riesgo de tromboembolismo venoso o con fenotipos intermediarios (cont.)

Proteína	Var. genética	Gen	Fenotipo	Tipo de estudio	N	OR	Referencia
Receptor de IL-4	lle50val	ILR4	TVP	Caso control	2374	0.66 (0.52-0.84)	Zee et al. Circulation 2006;113:2193-2200
IL-10		IL10					
	IL-10G STR (G10)		TVP	Caso-control	174	2.83 (1.11-7.24)	Cochery-Nou. et al. Thromb Haemost. 2006;96:24-
	IL-10G STR (G13)		TVP	Caso-control	174	3.33 (1.53-7.23)	Cochery-Nou. et al. Thromb Haemost. 2006;96:24-8
Lipoproteína lipasa		LPL					
	Asn291Ser		TVP	Caso-control	2374	3.09 (1.56-6.09)	Zee et al. Circulation 2006;113:2193-2200
Prot. Rel con el receptor de la lipoproteína (proteína 1)		LRP1					
	663 C/T		TVP	Caso-control	350	3.30 (1.30-8.50)	Vormittag et al. J Thromb Haemost 2007;5:479-502
	663 C/T		Factor VIII	Caso-control	350	Sig.	Vormittag et al. J Thromb Haemost. 2007;5:479-502
PAI-1		SERPINE1					
	664 A/G		TVP mujeres	Caso-control	2029	1.19 (1.01-1.41)	Smith et al. JAMA 2007;297:489-98
	5878 A/G		TVP mujeres	Caso-control	2029	1.26 (1.03-1.55)	Smith et al. JAMA 2007;297:489-98
	Haplótipo 3		TVP mujeres	Caso-control	2029	1.38 (1.08-1.77)	Smith et al. JAMA 2007;297:489-98
	4G/5G		TVP	Caso-control	616	1.10 (0.70-1.70)	Ridker et al. Circulation 1997;95:59-62
	rs2227631 (en DL con 4G/5G)		TVP	Caso-control	302	1.50 (0.81-2.77)	Stegnar et al. Thromb Haemost 1998;79:975-9
Glutatión peroxidasa plasmática		GPX3					
	Haplótipo 2 (CCTCCTC)		TVP cerebral	Caso-control	146	10.7 (2.70-42.4)	Voetsch et al. Stroke 2008;39:303-07
Precalicerina		KLKB1					
	rs3087505 (T/C)		TVP	Caso-control	4051	1.27 (1.09-1.47)	Bezemer et al. JAMA 2008;299:1306-14
	rs3087505 (T/C)		Factor XI	Caso-control	4051	Sig.	Bezemer et al. JAMA 2008;299:1306-14
Proteína C		PROC					
	-1654 C/T; -1641 A/G; -1476 A/T		TVP	Caso-control LETS	948	1.60 (1.00-2.50)	Spek et al. ATVB 1995;15:214-18
	CC/GG/TT vs (TT/AA/AA)		PC en plasma	LETS,		68 p< 0.001	Spek et al. ATVB 1995;15:214-18
	CC/GG/TT vs (TT/AA/AA)		TVP	Caso-control	636	1.39 (1.04-1.87)	Alach et al. ATVB 1999;19:1573-6
	CC/GG vs TT/AA		PC en plasma	Controles sanos	394	p< 0.05	Alach et al. ATVB 1999;19:1573-6
	CC/GG vs TT/AA		TVP	Caso-control	9148	1.27 (1.09-1.48)	Pomp et al. Thromb. Haemost. 2009;101:62-7
	2405 C/T; 2418 A/G		P C en plasma	Caso-control	9148	No sig.	Pomp et al. Thromb. Haemost. 2009;101:62-7
	CC/GG vs TT/AA		TVP mujeres	Caso-control	2029	1.33 (1.12-1.57)	Smith et al. JAMA 2007;297:489-98
	CC/GG vs TT/AA		TVP mujeres	Caso-control	2029	1.37 (1.15-1.64)	Smith et al. JAMA 2007;297:489-98
	2583 A/T		TVP mujeres	Caso-control	2029	0.82 (0.69-0.98)	Smith et al. JAMA 2007;297:489-98
	11310 G/T		TVP mujeres	Caso-control	2029	0.78 (0.65-0.93)	Smith et al. JAMA 2007;297:489-98
	4515 C/T		TVP mujeres	Caso-control	2029		
	4919 G/A		TVP mujeres	Caso-control	2029		

Tabla 1. De variantes genéticas potencialmente relacionadas con el riesgo de tromboembolismo venoso o con fenotipos intermediarios (cont.)

Proteína	Var. genética	Gen	Fenotipo	Tipo de estudio	N	OR	Referencia
Proteína S		PROS1					
	Haplotipo		TVP mujeres	Caso-control	2029	1.85 (1.12-3.05)	Smith et al. JAMA 2007;297:489-98
Proteína Z		PROZ					
	79 G/A -13 A/G		TVP cerebral TVP cerebral	Caso-control Caso-control	154 154	2.57 (1.23-5.34) 2.04 (0.79-5.28)	Le Cam-Duchez et al. J Neurol 2008;255:1521-25 Le Cam-Duchez et al. J Neurol 2008;255:1521-25
TAFI		CPB2					
	36326 T/C -438 G/A -438 G/A		TVP mujeres TVP TVP mujeres	Caso-control Casos TVP vs TEP Caso-control	2029 214 2029	0.52 (0.30-0.88) 0.10 (0.02-1.10) No sig.	Smith et al. JAMA 2007;297:489-98 Zidane et al. Thromb Haemost 2003;90:439-45 Smith et al. JAMA 2007;297:489-98
Trombomodulina		THBD					
	-33 G/A 5110 A/G 5110 A/G		TVP TVP mujeres TVP	Caso-control Caso-control Caso-control	599 2029 460	Sig. 1.24 (1.04-1.47) 0.80 (0.83-1.22)	Le Flem et al. ATVB 1999;19:1098-104 Smith et al. JAMA 2007;297:489-98 Heit et al. JTH 2005;3:710-7
Factor tisular		F3					
	1208 D→I 1208 D→I 1208 D→I		TVP F. tisular plasm TVP mujeres TVP mujeres	Caso-control Caso-control Caso-control Caso-control	1459 56 2029 2029	0.72 para 1208 D Sig. No Sig. 2.55 (1.17-5.57)	Amaud ATVB 2000;20:892-8 Amaud ATVB 2000;20:892-8 Smith et al. JAMA 2007;297:489-98 Smith et al. JAMA 2007;297:489-98
Inhibidor del la vía del factor tisular		TFPI					
	1502 G/A Haplotipo 3 536 C/T 536 C/T 536 C/T -33 T/C -33 T/C		TVP mujeres TVP mujeres TVP TVP TVP mujeres TVP TVP mujeres	Caso-control Caso-control Donantes de sangre Pacientes Caso-control Caso-control Caso-control	2029 2029 308 211 2019 1156 2029	1.25 (1.05-1.48) 0.73 (0.59-0.90) 9.30 (1.80-48.6) No Sig. No Sig. 0.60 (0.30-0.90) No Sig.	Smith et al. JAMA 2007;297:489-98 Smith et al. JAMA 2007;297:489-98 Kleesiek et al. Thromb Haemost 1999;82:1-5 Evans et al. Thromb Haemost 2000;83:511 536 C/T Smith et al. JAMA 2007;297:489-98 Ameziane et al. Thromb Haemost 2002;88:195-9 Smith et al. JAMA 2007;297:489-98
Factor necrosis tumoral, miembro 4		TNFSF4					
	-921 C/T		TVP mujeres	Caso-control	2431	1.86 (1.17-2.92)	Mälarstig et al. Clin Chem 2008;54:833-40

DL: desequilibrio de ligamiento; N: número de individuos; OR: odds ratio; Sig.: significativo; TVP: trombosis venosa profunda; TEP: tromboembolismo pulmonar.

cación de tres *loci* (CYP4V2/KLKB1/F11 cluster, GP6 y SERPINC1) en el riesgo de trombosis. La asociación de CYP4V2 y GP6 con la trombosis ha sido posteriormente confirmada en un metaanálisis de tres estudios independientes (Morange *et al.*, 2010).

El primer GWAS propiamente dicho en el ámbito de la trombosis se ha reportado recientemente (Tregouet *et al.*, 2009). Este estudio analizó 291.872 SNP en 419 pacientes con trombosis y 1.228 controles sanos. Sin embargo, sólo dos factores genéticos ya conocidos alcanzaron el nivel de significación estadística para este tipo de análisis, concretamente el FVL y el ABO.

El proyecto GAIT (Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia) también ha aportado los resultados de un GWAS con rasgos cuantitativos relacionados con trombosis. Hemos identificado un gen implicado en la determinación de los niveles de homocisteína (Malarstij *et al.*, 2009) en la familias GAIT y hemos confirmado esta asociación en población europea. Además, utilizando una estrategia combinada de ligamiento genético y asociación, hemos identificado un nuevo factor genético de riesgo trombótico en el cluster de los genes del C4BP (Buil *et al.*, 2010). Este estudio ha puesto de manifiesto la existencia de un nuevo mecanismo implicado en la trombosis con la participación de la cadena alfa del C4BP, independiente de la proteína S (un importante inhibidor de la coagulación).

Más recientemente, con una estrategia de GWAS y replicación de las señales más significativas en otra cohorte, se ha reportado la implicación del *locus HIVEP1* en el cromosoma 6, como factor de riesgo trombótico (Morange *et al.*, 2010). Como en el caso anterior, este resultado también apunta hacia un nuevo mecanismo de acción en la fisiopatología de la trombosis.

Sin embargo, las variantes funcionales de estos *loci* y el mecanismo concreto por el cual las proteínas que codifican estos genes están implicadas en el riesgo de trombosis están por descubrir.

En busca de la “heredabilidad perdida”

El uso de GWAS ha permitido el descubrimiento de más de 200 *loci* que se asocian a enfermedades complejas y rasgos de interés biomédico (McCarthy *et al.*, 2008). Usualmente, estos *loci* implican genes no identificados o previamente no relacionados con el fenotipo, contribuyendo así a un mayor conocimiento de su biología. A pesar del éxito, las variantes encontradas mediante GWAS confieren un riesgo relativamente pequeño y explican sólo una pequeña parte de la heredabilidad del rasgo (Altshuler *et al.*, 2008).

¿Dónde se encuentra la parte de heredabilidad que falta? Varias explicaciones pueden esgrimirse a la hora de buscar esta “materia oscura” (en alusión a que sabemos que existe, detectamos sus efectos, pero no pode-

mos “verla”). Inicialmente, pensaríamos en las limitaciones de la estrategia de GWAS y de su análisis. Los GWAS, como en los estudios de asociación tradicionales, no identifican la variante causal, sino una variante situada en las proximidades o en desequilibrio de ligamiento (LD) con la causal. En muchos *loci*, lo que se identifica es una pequeña región (de 10 a 100 kb) en la que se encontraría el gen causal y mutaciones, que tendrá que ser estudiada mediante *fine-mapping* y re-secuenciación. Muy posiblemente, las variantes realmente asociadas al fenotipo explican una parte más alta de la heredabilidad del mismo y aportarán una estimación mejor del riesgo de padecer las enfermedades a las que están asociadas.

A esta limitación hay que añadir que los sets comerciales utilizados para los GWAS cubren los SNP más comunes, pero su potencia se ve muy reducida (o es prácticamente nula) a la hora de detectar variantes raras de baja frecuencia. De hecho, ni siquiera están diseñados para capturar toda la variabilidad de SNP comunes, incluso en las regiones funcionales de los genes. Disponer de las variantes raras asociadas al fenotipo también explicaría una parte más alta de la heredabilidad del mismo y aportará una estimación mejor del riesgo a padecer las enfermedades relacionadas.

Estas limitaciones explican en gran medida por qué las variantes genéticas identificadas con los GWAS aportan poca información sobre el riesgo de padecer la enfermedad bajo estudio. En otras palabras, explican una parte muy baja de la heredabilidad de estas patologías. Por consiguiente, es necesario mejorar el diseño y, especialmente, el análisis de los GWAS para conseguir información más precisa.

Sin embargo, también tendríamos que pensar que la “heredabilidad perdida” puede ser explicada por diferentes fuentes de variabilidad, no sólo los SNP comunes o raros. En este sentido, ya existen estudios que incorporan las *copy number variations* (CNV) en el contexto de GWAS para analizar la base genética de la susceptibilidad a enfermedades complejas.

Aparte de estas fuentes de variabilidad genética, existe una creciente corriente científica que aboga por explorar otras alternativas hasta ahora difícilmente abordables. Entre ellas están procesos epigenéticos, como la metilación del ADN, o profundizar en la interacción gen/gen y gen/ambiente.

¿Hacia dónde vamos? De factores de riesgo a perfiles de riesgo

Pese a las limitaciones de los GWAS, este intenso trabajo está aportando información muy valiosa. Por un lado, empezamos a conocer mejor y en más profundidad las vías metabólicas y rutas biológicas implicadas en procesos patológicos. Por otro lado, la información

de los GWAS nos ayuda a entender que un polimorfismo genético por sí mismo no tendrá un gran efecto sobre el riesgo real de padecer la enfermedad. Será la suma de factores genéticos y sus interacciones con otros factores genéticos y ambientales los que proporcionarán la información necesaria para estratificar los individuos según su riesgo, lo que se conoce como perfiles de riesgo. Sólo integrando esta información (perfiles de riesgo) podremos trasladar la genómica al paciente. Es en este contexto donde se establece un interesante y amplio campo de estudio para un futuro inmediato en el área de las enfermedades complejas. Precisamente, teniendo en cuenta la información de la que ya disponemos, es en el campo de la trombofilia donde los perfiles de riesgo están aportando información muy valiosa para la toma de decisiones terapéuticas (Segal JD *et al.*, 2009; Eichinger S *et al.*, 2010). Estos primeros perfiles sólo contemplan variables clínicas y fenotípicas. Pero los primeros intentos de establecer perfiles de riesgo incluyendo información genética han sido bastantes alentadores (van Hylckama Vlieg *et al.*, 2008). A medida que vayamos conociendo más factores de riesgo, estas estimaciones mejorarán sustancialmente.

Conclusiones

Los rápidos avances en las estrategias y metodologías genómicas están aportando información muy valiosa para profundizar en la predisposición genética a la trombosis. La identificación de factores genéticos implicados en esta patología mejorará la estrategia preventiva y terapéutica en los pacientes de cara a situaciones de riesgo y episodios tromboembólicos futuros, y la identificación de familiares afectos, la mayoría de ellos asintomáticos, que de otra forma no se beneficiarían de esta prevención. Para que esta mejora sea efectiva, se nos plantean dos grandes retos: por un lado, integrar la información de la que ya disponemos y, por otro, la identificación de nuevos factores de riesgo.

Para integrar la información de la que ya disponemos es imprescindible el desarrollo de herramientas eficaces para su detección y uso a gran escala, permitiendo a los laboratorios clínicos acceder a test genéticos a un coste similar al de la mayoría de los marcadores clásicos. Es de destacar que tanto la traslación de los avances genómicos a la práctica clínica (*from bench to bedside*) como la interpretación de los resultados genéticos del diagnóstico de la enfermedad constituyen un gran reto, que requerirá del esfuerzo colaborativo y la integración del conocimiento de especialistas clínicos y genetistas. El camino es irreversible. Del conocimiento de la individualidad genética se han de derivar avances hacia un manejo individualizado

de los cuidados de la salud. La medicina preventiva y personalizada basada en la genética es una realidad al alcance de nuestra mano.

Por otro lado, el rápido desarrollo de nuevas herramientas moleculares ofrece prometedoras posibilidades que facilitarán la identificación de nuevos factores de riesgo tromboembólico, que nos aportarán la visión global que necesitamos para entender las bases moleculares de esta patología.

Bibliografía

- Aiach M, Nicaud V, Alhenc-Gelas M, Gandrille S, Arnaud E, Amiral J, Guize L, Fiessinger JN, Emmerich J. Complex association of protein C gene promoter polymorphism with circulating protein C levels and thrombotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(6):1573-6; 1996.
- Altshuler D. et al. Genetic Mapping in Human Disease. *Science* 322:881-888; 2008.
- Ameziane N, Seguin C, Borgel D, Fumeron F, Moatti D, Alhenc-Gelas M, Grandchamp B, Aiach M, Emmerich J, de Prost D. The -33T->C polymorphism in intron 7 of the TFPI gene influences the risk of venous thromboembolism, independently of the factor V Leiden and prothrombin mutations. *Thromb Haemost* 88(2):195-9; 2002.
- Ariens RA, Philippou H, Nagaswami C, Weisel JW, Lane DA, Grant PJ. The factor XIII V34L polymorphism accelerates thrombin activation of factor XIII and affects cross-linked fibrin structure. *Blood*. 96:988-95; 2000.
- Arnaud E, Barbalat V, Nicaud V, Cambien F, Evans A, Morrison C, Arveiler D, Luc G, Ruidavets JB, Emmerich J, Fiessinger JN, Aiach M. Polymorphisms in the 5' regulatory region of the tissue factor gene and the risk of myocardial infarction and venous thromboembolism: the ECTIM and PATHROS studies. *Etude Cas-Témoins de l'Infarctus du Myocarde. Paris Thrombosis case-control Study. Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(3):892-8; 2000.
- Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 369,64-67; 1994.
- Bezemer ID, Bare LA, Doggen CJ, Arellano AR, Tong C, Rowland CM, Catanese J, Young BA, Reitsma PH, Devlin JJ, Rosendaal FR. Gene variants associated with deep vein thrombosis. *JAMA* 299:1306-14; 2008.
- Bovill EG, Hasstedt SJ, Leppert MF, Long GL. Hereditary thrombophilia as a model for multigenic disease. *Thromb Haemost* 82:662-666; 1999.
- Buil A, Tréguët DA, Souto JC, Saut N, Germain M, Rotival M, Tired L, Cambien F, Lathrop M, Zeller T, Alessi MC, Rodriguez de Cordoba S, Münzel T, Wild P, Fontcuberta J, Gagnon F, Emmerich J, Almasry L, Blankenberg S, Soria JM, Morange PE. C4BPB/C4BPA is a new susceptibility locus for venous thrombosis with unknown protein S independent mechanism: results from genome-wide association and gene expression analyses followed by case-control studies. *Blood*. 2010 (in press).
- Carter AM, Catto AJ, Kohler HP, Ariens RA, Stickland MH, Grant PJ. alpha-fibrinogen Thr312Ala polymorphism and venous thromboembolism. *Blood* 96(3):1177-9; 2000.
- Castaman G, Faioni EM, Tosetto A, Bernardi F. The factor V HR2 haplotype and the risk of venous thrombosis: a meta-analysis. *Haematologica* 88(10):1182-9; 2003.
- Catto AJ, Kohler HP, Coore J, Mansfield MW, Stickland MH, Grant PJ (1999). Association of a common polymorphism in

- the factor XIII gene with venous thrombosis. *Blood* 93:906-8; 1999.
- Chinthamittr Y, Vos HL, Rosendaal FR, Doggen CJ. The association of prothrombin A19911G polymorphism with plasma prothrombin activity and venous thrombosis: results of the MEGA study, a large population-based case-control study. *J Thromb Haemost* 4(12):2587-92; 2006.
- Cochery-Nouvellon E, Mercier E, Lissalde-Lavigne G, Daurès JP, Quéré I, Dauzat M, Marès P, Gris JC. Homozygosity for the C46T polymorphism of the F12 gene is a risk factor for venous thrombosis during the first pregnancy. *J Thromb Haemost*. 5(4):700-7; 2007.
- Cochery-Nouvellon E, Vitry F, Cornillet-Lefebvre P, Hezard N, Gillot L, Nguyen P Interleukin-10 promoter polymorphism and venous thrombosis: a case-control study. *Thromb Haemost* 96(1):24-8; 2006.
- Corral J, González-Conejero R, Soria JM, González-Porras JR, Pérez-Ceballos E, Lecumberri R, Roldán V, Souto JC, Miñano A, Hernández-Espinosa D, Alberca I, Fontcuberta J, Vicente V. A Nonsense Polymorphism in the Protein Z-dependent Protease Inhibitor Increases the Risk for Venous Thrombosis. *Blood* 108:177-183; 2006.
- Corral J, Hernández-Espinosa D, Soria JM, González-Conejero R, Ordoñez A, González-Porras JR, Pérez-Ceballos E, Lecumberri R, Sanchez I, Roldán V, Mateo J, Miñano A, González M, Alberca I, Fontcuberta J, Vicente V. Antithrombin Cambridge II (Ala384Ser): an underestimated but strong and frequent genetic risk factor for venous thrombosis. *Blood* 15;109:4258-63; 2007.
- Egeberg O. Inherited antithrombin III deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorr* 13:516-530; 1967.
- Eichinger S, Heinze G, Jandek LM, Kyrle PA, Risk Assessment of Recurrence in Patients With Unprovoked Deep Vein Thrombosis or Pulmonary Embolism The Vienna Prediction Model. *Circulation* 121:1630-1636; 2010.
- Evans GD, Langdown J, Brown K, Baglin TP. The C536T transition in the tissue factor pathway inhibitor gene is not a common cause of venous thromboembolic disease in the UK population. *Thromb Haemost* 83(3):511; 2000.
- Folsom AR, Peacock JM, Boerwinkle E, Cushman M. Beta2-adrenergic receptor polymorphism and venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 99(1):240; 2008.
- Franco RF, Reitsma PH, Lourenco D, Maffei FH, Morelli V, Tavella MH, Araujo AG, Piccinato CE, Zago MA. Factor XIII Val34Leu is a genetic factor involved in the etiology of venous thrombosis. *Thromb Haemost*. 81:676-9; 1999.
- Galanaud JP, Cochery-Nouvellon E, Alonso S, Chauleur C, Mercier E, Lissalde-Lavigne G, Fabbro-Peray P, Reny JL, Mares P, Dauzat M, Quere I, Gris JC. Paternal endothelial protein C receptor 219Gly variant as a mild and limited risk factor for deep vein thrombosis during pregnancy. *J Thromb Haemost* 8(4):707-13; 2010.
- Grandone E, Tiscia G, Colaizzo D, Vergura P, Pisanelli D, Margaglione M. The haplotype M2 within the ANXA5 gene is independently associated with the occurrence of deep venous thrombosis. *Thromb Haemost* 103:1102-3; 2010.
- Gulesserian T, Hron G, Endler G, Eichinger S, Wagner O, Kyrle PA. Marburg I polymorphism of factor VII-activating protease and risk of recurrent venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 95(1):65-7; 2009.
- Heit JA, Petterson TM, Owen WG, Burke JP, DE Andrade M, Melton LJ 3rd. Thrombomodulin gene polymorphisms or haplotypes as potential risk factors for venous thromboembolism: a population-based case-control study. *J Thromb Haemost* 3(4):710-7; 2005.
- Hoppe B, Tolou F, Radtke H, Kiesewetter H, Dörner T, Salama A. Marburg I polymorphism of factor VII-activating protease is associated with idiopathic venous thromboembolism. *Blood* 105(4):1549-51; 2005.
- Jilma B, Kovar FM, Hron G, Endler G, Marsik CL, Eichinger S, Kyrle PA. Homozygosity in the single nucleotide polymorphism Ser128Arg in the E-selectin gene associated with recurrent venous thromboembolism. *Arch Intern Med* 166(15):1655-9; 2006.
- Kleesiek K, Schmidt M, Götting C, Schwenz B, Lange S, Müller-Berghaus G, Brinkmann T, Prohaska W. The 536C->T transition in the human tissue factor pathway inhibitor (TFPI) gene is statistically associated with a higher risk for venous thrombosis. *Thromb Haemost* 82(1):1-5; 1999.
- Koeleman BPC, Reitsma PH, Allaart CF, Bertina RM. Activated protein C resistance as an additional risk factor for thrombosis in protein C deficient families. *Blood* 84:1031-1035; 1994.
- Komanasin N, Catto AJ, Futers TS, van Hylckama Vlieg A, Rosendaal FR, Ariëns RA. A novel polymorphism in the factor XIII B-subunit (His95Arg): relationship to subunit dissociation and venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 3(11):2487-96; 2005.
- Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM, Bochkov NP, Boulyjenkov V, Chandy M, Dahlback B, Ginter EK, Miletich JP, Rosendaal FR, Seligsohn U. Inherited Thrombophilia: Part 1. *Thromb Haemost* 76:651-662; 1996.
- Le Cam-Duchez V, Bagan-Triquet A, Barbay V, Mihout B, Borg JY. The G79A polymorphism of protein Z gene is an independent risk factor for cerebral venous thrombosis. *J Neurol* 255(10):1521-5; 2008.
- Le Flem L, Picard V, Emmerich J, Gandrille S, Fiessinger JN, Aiach M, Alhenc-Gelas M. Mutations in promoter region of thrombomodulin and venous thromboembolic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(4):1098-104; 1999.
- Mälärstig A, Buil A, Souto JC, Clarke R, Blanco-Vaca F, Fontcuberta J, Peden J, Andersen M, Silveira A, Barlera S, Seedorf U, Watkins H, Almasly L, Hamsten A, Soria JM. Identification of ZNF366 and PTPRD as Novel Determinants of Plasma Homocysteine in a Family-based Genome-wide Association Study. *Blood* 114: 1417-22, 2009.
- Mälärstig A, Eriksson P, Rose L, Diehl KA, Hamsten A, Ridker PM, Zee RY. Genetic variants of tumor necrosis factor superfamily, member 4 (TNFSF4), and risk of incident atherothrombosis and venous thromboembolism. *Clin Chem* 54(5):833-40; 2008.
- Martinelli I, Battaglioli T, Tosetto A, Legnani C, Sottile L, Ghiotto R, Mannucci PM. Prothrombin A19911G polymorphism and the risk of venous thromboembolism. *J Thromb Haemost* 4(12):2582-6; 2006.
- McCarthy M. Genome Wide Association studies: past, present and future. *Human Molecular Genetics* 17:R100-R101; 2008.
- Medina P, Navarro S, Estellés A, Vayá A, Bertina RM, España F. Influence of the 4600A/G and 4678G/C polymorphisms in the endothelial protein C receptor (EPCR) gene on the risk of venous thromboembolism in carriers of factor V Leiden. *Thromb Haemost* 94(2):389-94; 2005.
- Medina P, Navarro S, Estellés A, Vayá A, Woodhams B, Mira Y, Villa P, Migaud-Fressart M, Ferrando F, Aznar J, Bertina RM, España F. Contribution of polymorphisms in the endothelial protein C receptor gene to soluble endothelial protein C receptor and circulating activated protein C levels, and thrombotic risk. *Thromb Haemost* 91(5):905-11; 2004.
- Miletich JP, Prescott SM, White R, Majerus PW, Bovill EG. Inherited predisposition to thrombosis. *Cell* 72:477-480; 1993.
- Morange PE, Bezemer I, Saut N, Bare L, Burgos G, Brocheton J, Durand H, Biron-Andreani C, Schved JE, Pernod G, Galan P, Drouet L, Zelenika D, Germain M, Nicaud V, Heath S, Ninio E, Delluc A, Münzel T, Zeller T, Brand-Herrmann SM, Alessi MC, Tired L, Lathrop M, Cambien F, Blankenberg S, Emmerich J, Trégouët DA, Rosendaal FR. A follow-up study of a genome-wide association scan identifies a susceptibility locus for venous thrombosis on chromosome 6p24.1. *Am J Hum Genet* 86:592-5; 2010.

- Morelli VM, De Visser MC, Vos HL, Bertina RM, Rosendaal FR. ABO blood group genotypes and the risk of venous thrombosis: effect of factor V Leiden. *J Thromb Haemost*. 3(1):183-5; 2005.
- Mushunje A, Zhou A, Carrell RW, Huntington JA. Heparin-induced substrate behaviour of antithrombin Cambridge II. *Blood* 102:4028-34; 2003.
- Mustafa S, Weltermann A, Fritsche R, Marsik C, Wagner O, Kyrle PA, Eichinger S. Genetic variation in heme oxygenase 1 (HMOX1) and the risk of recurrent venous thromboembolism. *J Vasc Surg* 47(3):566-70; 2008.
- Nossent AY, Dai L, Rosendaal FR, Vos HL, Eikenboom JC. Beta 2 adrenergic receptor polymorphisms: association with factor VIII and von Willebrand factor levels and the risk of venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 3(2):405-7; 2005.
- Nossent AY, Eikenboom JC, Vos HL, Bakker E, Tanis BC, Doggen CJ, Bertina RM, Rosendaal FR. Haplotypes encoding the factor VIII 1241 Glu variation, factor VIII levels and the risk of venous thrombosis. *Thromb Haemost* 95(6):942-8; 2006.
- Nossent AY, Vos HL, Rosendaal FR, Bertina RM, Eikenboom JC. Aquaporin 2 gene variations, risk of venous thrombosis and plasma levels of von Willebrand factor and factor VIII. *Haematologica* 93(6):959-60; 2008.
- O'Donnell J, Manning RA, Laffan MA. Beta-adrenergic receptor polymorphisms in patients with elevated factor VIII levels with venous thrombosis. *Br J Haematol* 123(1):139-41; 2003.
- Pecheniuk NM, Elias DJ, Xu X, Griffin JH. Failure to validate association of gene polymorphisms in EPCR, PAR-1, FSAP and protein S Tokushima with venous thromboembolism among Californians of European ancestry. *Thromb Haemost* 99(2):453-5; 2008.
- Pérez-Ceballos E, Corral J, Alberca I, Vayá A, Llamas P, Montes R, González-Conejero R, Vicente V. Prothrombin A19911G and G20210A polymorphisms' role in thrombosis. *Br J Haematol* 118(2):610-4; 2002.
- Pomp ER, Doggen CJ, Vos HL, Reitsma PH, Rosendaal FR. Polymorphisms in the protein C gene as risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost* 101(1):62-7; 2009.
- Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase venous thrombosis. *Blood* 88:3698-703; 1996.
- Rasmussen-Torvik LJ, Cushman M, Tsai MY, Zhang Y, Heckbert SR, Rosamond WD, Folsom AR. The association of alpha-fibrinogen Thr312Ala polymorphism and venous thromboembolism in the LITE study. *Thromb Res* 121(1):1-7; 2007.
- Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Stampfer MJ, Miletich JP. Arterial and venous thrombosis is not associated with the 4G/5G polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor gene in a large cohort of US men. *Circulation* 95(1):59-62; 1997.
- Roldan V, Gonzalez-Conejero R, Marin F, Pineda J, Vicente V, Corral J. Five prothrombotic polymorphisms and the prevalence of premature myocardial infarction. *Haematologica* 90:421-3; 2005.
- Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet* 353:1167-1173; 1999.
- Santamaría A, Martínez-Rubio A, Mateo J, Tirado I, Soria JM, Fontcuberta J. Homozygosity of the T allele of the 46 C\rightarrowT polymorphism in the F12 gene is a risk factor for acute coronary artery disease in the Spanish population. *Haematologica* 89:878-879; 2004.
- Santamaría A, Mateo J, Tirado I, Oliver A, Belvis R, Martí-Fàbrega J, Felices R, Soria JM, Souto JC, Fontcuberta J. Homozygosity of the T allele of the 46 C\rightarrowT polymorphism in the F12 gene is a risk factor for ischemic stroke in the Spanish population. *Stroke* 35:1795-1799; 2004.
- Saposnik B, Reny JL, Gaussem P, Emmerich J, Aiach M, Gandrille S. A haplotype of the EPCR gene is associated with increased plasma levels of sEPCR and is a candidate risk factor for thrombosis. *Blood* 103(4):1311-8; 2004.
- Scanavini D, Legnani C, Lunghi B, Mingozzi F, Palareti G, Bernardi F. The factor VIII D1241E polymorphism is associated with decreased factor VIII activity and not with activated protein C resistance levels. *Thromb Haemost* 93(3):453-6; 2005.
- Segal JD, Brotman DJ, Necochea AJ, et al. Predictive Value of Factor V Leiden and Prothrombin G20210A in Adults With Venous Thromboembolism and in Family Members of Those With a Mutation: A Systematic Review. *JAMA* 301(23):2472-2485; 2009.
- 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* 122(6):848-53; 2008.
- Smith NL, Hindorff LA, Heckbert SR, Lemaitre RN, Marcianti KD, Rice K, Lumley T, Bis JC, Wiggins KL, Rosendaal FR, Psaty BM. Association of genetic variations with nonfatal venous thrombosis in postmenopausal women. *JAMA* 297(5):489-98; 2007.
- Smith NL, Wiggins KL, Reiner AP, Lange LA, Cushman M, Heckbert SR, Lumley T, Rice KM, Folsom AR, Psaty BM. Replication of findings on the association of genetic variation in 24 hemostasis genes and risk of incident venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 7(10):1743-6; 2009.
- Soria JM, Almasy L, Souto JC, Bacq D, Buil A, Faure A, Martínez-Marchán E, Mateo J, Borell M, Stone WH, Lathrop M, Fontcuberta J, Blangero J. A quantitative trait locus in human factor XII gene jointly influences plasma factor XII levels and susceptibility to thrombotic disease. *Am J Hum Genet* 70:567-574; 2002.
- Souto JC, Almasy L, Borrell M, Blanco-Vaca F, Mateo J, Soria JM, Coll I, Felices R, Stone W, Fontcuberta J, Blangero J. Genetic susceptibility to thrombosis and its relationship to physiological risk factors: the GAIT Study. *Am J Hum Genet* 67:1452-1459; 2000.
- Spek CA, Koster T, Rosendaal FR, Bertina RM, Reitsma PH. Genotypic variation in the promoter region of the protein C gene is associated with plasma protein C levels and thrombotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15(2):214-8; 1995.
- Stegnar M, Uhrin P, Peternel P, Mavri A, Salobir-Pajnic B, Stare J, Binder BR. The 4G/5G sequence polymorphism in the promoter of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene: relationship to plasma PAI-1 level in venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 79(5):975-9; 1998.
- Tait RC, Walker ID, Perry DJ, et al. Prevalence of antithrombin deficiency in the healthy population. *Br J Haematol* 87:106-12; 1999.
- Tirado I, Mateo J, Soria JM, Oliver A, Martínez-Sánchez E, Vallvé C, Borrell M, Urrutia T, Fontcuberta J. The ABO blood group genotype and factor VIII levels as independent risk factors for venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 93:468-74; 2005.
- Tirado I, Soria JM, Mateo J, Oliver A, Souto JC, Santamaría A, Felices R, Borrell M, Fontcuberta J (2004). Association after linkage analysis indicates that homozygosity for the 46C\rightarrowT polymorphism in the F12 gene is a genetic risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost* 91:899-904; 2004.
- Trégouët DA, Heath S, Saut N, Biron-Andreani C, Schved JF, Pernod G, Galan P, Drouet L, Zelenika D, Juhan-Vague I, Alessi MC, Tiret L, Lathrop M, Emmerich J, Morange PE. Common susceptibility alleles are unlikely to contribute as strongly as the FV and ABO loci to VTE risk: results from a GWAS approach. *Blood* 113:5298-303; 2009.
- Uitte de Willige S, de Visser MC, Houwing-Duistermaat JJ, Rosendaal FR, Vos HL, Bertina RM. Genetic variation in the fibrinogen gamma gene increases the risk for deep venous thrombosis by reducing plasma fibrinogen gamma' levels. *Blood* 106(13):4176-83; 2005.

- Uitte de Willige S, Van Marion V, Rosendaal FR, Vos HL, de Visser MC, Bertina RM. Haplotypes of the EPCR gene, plasma sEPCR levels and the risk of deep venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2(8):1305-10; 2004.
- van Hylckama Vlieg A, Baglin CA, Bare LA, Rosendaal FR, Baglin TP. Proof of principle of potential clinical utility of multiple SNP analysis for prediction of recurrent venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 6:751-4; 2008.
- van Minkelen R, de Visser MC, Houwing-Duistermaat JJ, Vos HL, Bertina RM, Rosendaal FR. Haplotypes of IL1B, IL1RN, IL1R1, and IL1R2 and the risk of venous thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(6):1486-91; 2007.
- van Minkelen R, de Visser MC, Vos HL, Bertina RM, Rosendaal FR. The Marburg I polymorphism of factor VII-activating protease is not associated with venous thrombosis. *Blood* 105(12):4898; author reply 4899; 2005.
- Voetsch B, Jin RC, Bierl C, Deus-Silva L, Camargo EC, Annichino-Bizacchi JM, Handy DE, Loscalzo J. Role of promoter polymorphisms in the plasma glutathione peroxidase (GPx-3) gene as a risk factor for cerebral venous thrombosis. *Stroke* 39(2):303-7; 2008.
- Vormittag R, Bencur P, Ay C, Tengler T, Vukovich T, Quehenberger P, Mannhalter C, Pabinger I. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 polymorphism 663 C > T affects clotting factor VIII activity and increases the risk of venous thromboembolism. *J Thromb Haemost* 5(3):497-502; 2007.
- Zee RY, Cook NR, Cheng S, Erlich HA, Lindpaintner K, Ridker PM. Polymorphism in the beta2-adrenergic receptor and lipoprotein lipase genes as risk determinants for idiopathic venous thromboembolism: a multilocus, population-based, prospective genetic analysis. *Circulation* 113(18):2193-200; 2009.
- Zidane M, de Visser MC, ten Wolde M, Vos HL, de Monyé W, Bertina RM, Huisman MV. Frequency of the TAFI -438 G/A and factor XIII A Val34Leu polymorphisms in patients with objectively proven pulmonary embolism. *Thromb Haemost* 90(3):439-45; 2003.
- Zöller B, Berntsdotter A, García de Frutos P, Dahlbäck B. Resistance to activated protein C as an additional genetic risk factor in hereditary deficiency of protein S. *Blood* 85: 3518-23; 1995.

clínicos^{3,4}. A la inversa, la prevalencia de cáncer oculto en los pacientes que presentan una trombosis idiopática puede ser de hasta un 5-10%⁵.

Diversos tipos de neoplasias se han asociado a un incremento del riesgo de trombosis, pero en algunas de ellas, como los adenocarcinomas del tracto gastrointestinal o del ovario, los tumores cerebrales, o algunas neoplasias hematológicas, el riesgo es especialmente elevado^{5,6}. Además, en los pacientes con cáncer usualmente coexisten varios factores que predisponen al desarrollo de trombosis, tales como la cirugía, la inmovilización, el empleo de catéteres venosos centrales, la quimioterapia, y el uso de eritropoyetina recombinante, tratamientos hormonales o fármacos antiangiogénicos⁵.

A pesar de la estrecha asociación entre neoplasia y trombosis, las bases celulares y moleculares de la misma no son bien conocidas. Los pacientes con cáncer presentan con frecuencia alteraciones en los parámetros de coagulación, indicativos de hipercoagulabilidad, pero dichas alteraciones no suelen correlacionarse con el desarrollo de trombosis y por lo tanto suelen ser de poca utilidad clínica en la predicción del riesgo individual de trombosis⁷.

El papel del factor tisular (FT) en las trombosis asociadas a cáncer ha suscitado un interés especial, puesto que esta glicoproteína de transmembrana es el principal iniciador de la coagulación *in vivo*⁸. Las células tumorales de algunos tipos de neoplasias, como las de páncreas o los gliomas, pueden expresar niveles altos de FT, lo que se correlaciona con la incidencia de trombosis. Adicionalmente, se ha demostrado la relación entre el FT circulante, no unido a células y la activación de la coagulación en el cáncer⁹. Los avances en el conocimiento de la hemostasia que se han producido en los últimos años indican que una buena parte del FT circulante está ligado a micropartículas (MP). Por ello, se ha supuesto que las MP portadoras de FT se acumulan en el trombo en formación a través de la interacción entre la P-selectina de las plaquetas activadas en el trombo y su receptor, la PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*) de las MP, proporcionando una alta concentración de FT en el lugar del daño vascular y facilitando la propagación del trombo¹⁰.

MICROPARTÍCULAS EN LA TROMBOSIS ASOCIADA A CÁNCER

M.^aD. TÀSSIES¹, C. FONT², J. MONTEAGUDO¹, P. GASCÓN², J.C. REVERTER¹

¹ Servicio de Hemoterapia y Hemostasia;

² Servicio de Oncología Médica.

Hospital Clínic. IDIBAPS. Barcelona

Cáncer y trombosis

La asociación entre cáncer y trombosis fue referida ya en 1865 por Armand Trousseau¹. Desde entonces en multitud de estudios se ha evidenciado que la enfermedad tromboembólica es una de las principales complicaciones del cáncer, constituyendo la segunda causa de muerte en estos pacientes². Entre un 5% y un 15% de los pacientes con cáncer desarrollan complicaciones trombóticas, tal como se ha demostrado en estudios

MP: origen y funciones

Las MP son fragmentos de membrana de tamaño entre 0,1 y 1 micra de diámetro liberadas desde la membrana citoplasmática tras la activación celular o durante la apoptosis¹¹. Las MP se originan básicamente por vesiculación de la membrana citoplasmática por un mecanismo complejo que conlleva cambios en el citoesqueleto y la modificación de la asimetría normal de los fosfolípidos de la membrana. La activación celular o la apoptosis inducen un incremento del calcio

intracelular que afecta a las enzimas responsables del mantenimiento de la estructura del citoesqueleto y de la membrana celular y que facilita la generación de MP. La activación de enzimas como la flopassa o la escramblasa y la inactivación de otras como la flipasa dará lugar a la exposición en la cara externa de la membrana de las MP de fosfolípidos aniónicos, fundamentalmente fosfatidilserina, que usualmente están en la cara citoplasmática de la membrana celular¹².

Las MP pueden originarse a partir de una amplia variedad de células normales, tales como plaquetas, leucocitos, monocitos, eritrocitos y células endoteliales, así como a partir de células neoplásicas, y están implicadas en numerosos procesos fisiológicos y patológicos^{13,14}. Las MP transportan proteínas procedentes de las membranas de las células de origen, que incluyen receptores funcionales como el FT, al mismo tiempo que pueden contener proteínas intracelulares, segundos mensajeros y material genético¹³.

Las MP, una vez liberadas, interaccionan mediante su unión a receptores celulares específicos. Tras esta interacción inicial, su membrana puede fusionarse con la membrana citoplasmática de la célula diana. Estudios recientes apoyan la participación de las MP en distintos procesos biológicos tales como la transferencia horizontal de proteínas y RNA entre células adyacentes y la inducción de señalización celular, resultando en modificaciones fenotípicas rápidas en las células diana¹⁵. Se ha demostrado el papel de las MP como mediadores en enfermedades inflamatorias, cardiovasculares y diabetes, así como en la progresión tumoral, facilitando la diseminación y las metástasis¹⁵. Además, las MP que contienen FT y moléculas de adhesión como la P-selectina y su ligando, la PSGL-1, tienen un importante papel en la iniciación de la coagulación y en la formación del trombo¹⁶.

MP en el cáncer: relación con las trombosis

Los pacientes con cáncer presentan un número aumentado de MP circulantes¹⁷⁻¹⁹. El mecanismo por el que se generan estas MP no es bien conocido. En estudios experimentales con modelos murinos, se ha demostrado que algunos eventos oncogénicos como la activación de K-ras o la inactivación del gen supresor de tumores p53 modulan la generación de MP y la expresión de FT²⁰. El origen celular de las MP portadoras de FT en pacientes con cáncer no está claramente establecido, ya que éstas pueden originarse tanto a partir de la célula tumoral como de las células normales (endotelio, monocitos, plaquetas), en las que la expresión de FT puede ser inducida por citocinas y otros mediadores que están aumentados en el cáncer. Es conocido que las MP tienen además la habilidad de fusionarse con células y probablemente con otras MP de distinto ori-

gen celular, como confirma el hallazgo de MP que expresan simultáneamente proteínas específicas de distintas líneas celulares²¹. Por ese motivo, no se sabe con seguridad si las MP que expresan antígenos específicos de las células tumorales derivan exclusivamente de dichas células y, en la actualidad, la contribución relativa de las células tumorales o las del huésped en el *pool* de MP portadoras de FT es difícil de establecer⁸.

La relación entre la generación de MP y la actividad procoagulante asociada al cáncer se evidenció a partir de experimentos realizados a principio de la década de los ochenta en líneas celulares tumorales²². En estudios recientes se ha demostrado un incremento de MP portadoras de FT en el plasma de pacientes con neoplasias en estadios avanzados¹⁷⁻¹⁹. En el 68% de los pacientes con cáncer de páncreas y aproximadamente en el 50% de aquellos con carcinoma de ovario, mama o colon se han hallado niveles elevados de MP comparados con individuos sin cáncer¹⁷. En pacientes con carcinoma de colon los niveles de MP portadoras de FT es dos veces superior al de los controles sanos, y se correlacionan con los niveles de dímero-D¹⁹. Las MP circulantes se han relacionado con el riesgo de trombosis en estos pacientes. Así, los pacientes con cáncer metastásico de páncreas o de mama que presentan trombosis tienen MP circulantes que son capaces de generar trombina por la presencia de FT activo en su membrana¹⁸. En una serie que incluyó 51 pacientes con cáncer de diversos orígenes con trombosis y 49 pacientes con cáncer sin trombosis se halló una actividad procoagulante asociada a MP significativamente mayor en los pacientes que habían presentado trombosis²³. En modelos experimentales en ratones también se ha confirmado que las células tumorales son capaces de generar MP con actividad procoagulante dependiente del FT²⁴.

La forma en que estas MP portadoras de FT contribuyen al desarrollo de trombosis en el cáncer ha sido investigada recientemente. Thomas y colaboradores²⁵ han evidenciado, en líneas celulares de adenocarcinoma pancreático, que las células tumorales son capaces de producir MP que expresan FT a la vez que PSGL-1. *In vivo*, en modelos murinos de cáncer, estas MP circulan por el torrente sanguíneo y se acumulan en el lugar de la lesión vascular de una manera dependiente de su unión a P-selectina, ya que la adición de un anticuerpo contra P-selectina inhibe el proceso²⁵. En este modelo experimental, las MP procedentes de las células tumorales, pero no las propias células tumorales, fueron capaces de acelerar la formación del trombo, hallazgo que es consistente con observaciones previas en MP no tumorales procedentes de monocitos¹⁰. Se ha sugerido que, a diferencia de las células originarias, las MP podrían interactuar a través de los fosfolípidos aniónicos de su membrana, o bien que la concentración de receptores es mayor en las MP, favoreciendo todo ello la concentración de MP en el trombo en formación. En

este sentido, se ha demostrado que la actividad FT por unidad de superficie es 100 veces mayor en las MP que en la célula de origen. Por lo tanto, las MP portadoras de FT y PSGL-1 tienen un papel importante en la formación del trombo en el cáncer²⁵.

La activación de la coagulación y el aumento de número de MP en pacientes con cáncer no son sólo atribuibles al FT transportado por las MP, sino también a la alta densidad de fosfolípidos aniónicos en su superficie, especialmente de fosfatidilserina. La fosfatidilserina favorece el proceso de coagulación al facilitar el ensamblaje y la activación de los complejos tenasa y protrombinasa. Adicionalmente, la fosfatidilserina accesible en la superficie de la MP es un importante cofactor para la actividad del FT proporcionando la indispensable superficie cargada negativamente para promover la generación de trombina²⁶.

El valor predictivo de las MP para el riesgo trombótico en pacientes con cáncer se ha analizado en algunos estudios. En una serie retrospectiva de 60 pacientes con cáncer sin trombosis se halló una incidencia de TVP de 38% al año en aquéllos con niveles altos de MP comparado con el 0% en los pacientes con niveles bajos¹⁷. En una serie pequeña prospectiva de pacientes con cáncer de páncreas, los niveles elevados de MP se asociaron con el desarrollo de trombosis²⁷.

La quimioterapia es un factor de riesgo independiente para los eventos trombóticos. Se han propuesto diversos mecanismos por el que ésta puede contribuir al estado de hipercoagulabilidad en los pacientes con cáncer. En los últimos años el papel de las MP portadoras de FT ha suscitado interés. La quimioterapia origina daño endotelial y activación plaquetaria que puede dar lugar a la generación de MP portadoras de FT, como se ha evidenciado en estudios *in vitro*^{4,15}. Sin embargo, se desconoce si la diferente quimioterapia utilizada en los distintos tipos de tumores influye de manera diferencial en la expresión de FT, la liberación de MP y el riesgo de trombosis *in vivo*. Existen muy pocos estudios clínicos que evalúen el valor predictivo de las MP portadoras de FT en la hipercoagulabilidad inducida por quimioterapia. En algunas series de pacientes tratados con cisplatino se ha hallado incluso una disminución del número de MP en las primeras horas tras la quimioterapia, sin cambios en los marcadores plasmáticos de hipercoagulabilidad⁴, con un aumento de las mismas en las infusiones posteriores del fármaco. En la actualidad no existe suficiente evidencia que avale un papel específico de las MP en la hipercoagulabilidad asociada a quimioterapia.

Recientemente se han puesto en marcha ensayos clínicos para evaluar el beneficio de la profilaxis primaria en pacientes con neoplasias de colon, pulmón o páncreas en estadios avanzados y niveles altos de MP portadoras de FT²⁸.

Otras funciones de las MP en el cáncer

La expresión de FT por parte de células tumorales así como la liberación por parte de éstas de MP portadoras de FT al torrente sanguíneo parecen tener un papel no sólo en la hipercoagulabilidad asociada al cáncer, sino también en la angiogénesis y en la progresión de la neoplasia²⁹. En algunos estudios los niveles de MP portadoras de FT que expresaban además una proteína mucinosa tumoral se asociaron con una menor supervivencia en pacientes con adenocarcinomas en estadios avanzados¹⁹. Así, recientemente se han acumulado evidencias sobre el papel de las MP en la supervivencia de las células neoplásicas, su invasividad y las metástasis. Una parte de estas funciones estaría mediada por el FT, que es capaz de promover el crecimiento tumoral, la angiogénesis y la extensión tumoral a distancia.

Algunas de las funciones que se han atribuido a las MP son la modulación de la respuesta inmune contra el tumor, por ejemplo, mediante la exposición de FasL (CD95L) en su superficie que puede inducir apoptosis de los linfocitos T citotóxicos, y ofrecer un mecanismo de escape inmunológico a las células tumorales. Las MP se han relacionado también con la resistencia a quimioterapia, al extraer el fármaco del interior celular. Las células tumorales pueden liberar MP conteniendo caspasa-3 y hacerse así resistentes a la apoptosis mediada por dicha enzima.

El crecimiento tumoral depende de la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los capilares preexistentes. Las MP pueden contener factores promotores de la angiogénesis, tales como el VEGF. Las MP de origen plaquetario, endotelial o tumoral expresan moléculas de adhesión y transportan factores de crecimiento y metaloproteinasas, todos ellos esenciales para la angiogénesis. Las MP procedentes de células tumorales están enriquecidas en metaloproteinasas y otras enzimas proteolíticas que intervienen en la digestión de la matriz extracelular necesaria para la progresión tumoral¹³. Por último, las MP pueden tener una función en la transformación tumoral, ya que ésta requiere de la acumulación de una serie de cambios genéticos. Se ha demostrado que las MP participan en la transferencia horizontal de oncogenes entre células de glioblastoma favoreciendo la transformación fenotípica de las células receptoras del oncogén³⁰.

Conclusiones

El cáncer se asocia a un estado de hipercoagulabilidad que conlleva un incremento del riesgo de trombosis. Las MP derivadas de las propias células tumorales o de las células normales pueden contribuir a este estado

protrombótico. La actividad procoagulante de las MP es debida básicamente al FT expresado en su superficie y también a los fosfolípidos aniónicos de sus membranas que soportan los procesos de la coagulación. Las MP se concentran en el trombo en formación mediante uniones ligando-receptor específicas y aportan FT y fosfolípidos, favoreciendo así la progresión del trombo. El valor predictivo para el riesgo de trombosis del incremento del número o actividad procoagulante de las MP circulantes está siendo objeto de estudio en la actualidad. Por otra parte, las MP podrían ser una interesante diana terapéutica en las trombosis asociadas a neoplasias si se confirma su importancia en ensayos prospectivos adecuadamente diseñados.

A parte de su función procoagulante, las MP tienen en el cáncer otras funciones relacionadas con la angiogénesis, el crecimiento tumoral y la diseminación metastásica.

Por último, el avance en el conocimiento de la biología y de las funciones de las MP puede ofrecer mejoras importantes en el diagnóstico y pronóstico, así como nuevas dianas terapéuticas no sólo en el cáncer, sino también en otras enfermedades en las que la generación de MP puede tener un papel relevante.

Agradecimientos

Trabajo financiado en parte por: FIS 05/0204 y FIS 07/0387.

Bibliografía

1. Trousseau A. Phlegmasie alba dolens. Clinique Medicale de l'Hôtel Dieu de Paris. JB Balliere et Fils 1865; 654-715.
2. Lee AYY, Levine MN. Venous thromboembolism and cancer: Risks and outcomes. Circulation 2003; 107: 17-21.
3. Otten HM, Mathijssen J, ten Cate H, Soesan M, Inghels M, Richel DJ, et al. Symptomatic venous thromboembolism in cancer patients treated with chemotherapy: an underestimated phenomenon. Arch Intern Med 2004; 164:190-4.
4. Lechner D, Weltermann A. Chemotherapy-induced thrombosis: a role for microparticles and tissue factor? Sem Thromb Hemost 2008; 34: 199-203.
5. Noble S, Pasi J. Epidemiology and pathophysiology of cancer-associated thrombosis. Br J cancer 2010; 102: s2-s9.
6. Zwicker JI, Furie BC, Furie B. Cancer associated thrombosis. Crit Rev Oncol Hematol 2007; 62: 126-36.
7. Prandoni P, Falanga A, Piccioli P. Cancer and venous thromboembolism. Lancet Oncol 2005; 6: 401-10.
8. Kasthuri RS, Taubman MB, Mackman N. Role of tissue factor in cancer. J Clin Oncol 2009; 27: 4834-8.
9. Kakkar AK, DeRuvo N, Chinswangwatanakul V, Tebbutt S, Williamson RCN. Extrinsic-pathway coagulation activity in cancer with high factor VIIa and tissue factor. Lancet 1995; 346: 1004-5.
10. Falati S, Liu Q, Gross P, Merrill-Skologoff G, Chou J, Vandendries E et al. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand-1 and platelet P-selectin. J Exp Med 2003; 197:1585-98.
11. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. Blood Rev 2007; 21:157-71.
12. Nieuwland R, Sturk A. Why do cells release vesicles? Thromb Res 2010; 125: s49-s51.
13. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. Trends Cell Biol 2009;19:43-51.
14. Enjeti AK, Lincz LF, Seldon M. Microparticles in health and disease. Semin Thromb Hemost 2008; 34: 683-92.
15. Aharon A, Brenner B. Microparticles, thrombosis and cancer. Best Pract Res Clin Haematol 2009; 22:61-9.
16. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. N Engl J Med 2008; 359: 938-49.
17. Zwicker JI, Liebman HA, Neuberg D, Lacroix R, Bauer KA, Furie BC et al. Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. Clin Cancer Res 2009; 15:6830-40.
18. Tesselaar ME, Romijn FP, van der Linden IK, Prins FA, Bertina RM, Osanto S. Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? J Thromb Haemost 2007; 5:520-7.
19. Hron G, Kollars M, Weber H, Sagaster V, Quehenberger P, Eichinger S, et al. Tissue factor positive microparticles: cellular origin and association with coagulation activation in patients with colorectal cancer. Thromb Haemost 2007; 97:119-23.
20. Yu JL, May L, Lhotak V, Shahrzad S, Shirasawa S, Weitz JI et al. Oncogenic events regulate tissue factor expression in colorectal cancer cells: implications for tumor progression and angiogenesis Blood. 2005;105:1734-41.
21. Nieuwland R. Cellular origin of microparticles exposing tissue factor in cancer: a mixed double? J Thromb Haemost 2008; 6:1514-6.
22. Dvorak HF, Van DeWater L, Bitzer AM, Dvorak AM, Anderson D, Harvey VS, et al. Procoagulant activity associated with plasma membrane vesicles shed by cultured tumor cells. Cancer Res 1983; 43: 4434-42.
23. Tesselaar ME, Romijn FP, van der Linden IK, Bertina RM, Osanto S. Microparticle-associated tissue factor activity in cancer patients with and without thrombosis. J Thromb Haemost 2009; 7:1421-3.
24. Davila M, Amirkhosravi A, Coll E, Desai H, Robles L, Colon J et al. Tissue factor-bearing microparticles derived from tumor cells: impact on coagulation activation. J Thromb Haemost 2008; 6: 1517-24.
25. Thomas GM, Panicot-Dubois L, Lacroix R, Dignat-George F, Lombardo D, Dubois C. Cancer cell-derived microparticles bearing P-selectin glycoprotein ligand 1 accelerate thrombus formation in vivo. J Exp Med 2009; 206: 1913-27.
26. Castellana D, Toti F, Freyssinet JM. Membrane microvesicles: macromessengers in cancer disease and progression. Thromb Res 2010; 125: s84-s88.
27. Khorana AA, Francis CW, Menzies KE, Wang JG, Hyrien O, Hathcock J, et al. Plasma tissue factor may be predictive of venous thromboembolism in pancreatic cancer. J Thromb Haemost 2008; 6: 1983-5.
28. Zwicker JI. Predictive value of tissue factor bearing microparticles in cancer associated thrombosis. Thromb Res 2010; 125: s89-s91.
29. Castellana D, Kunzelmann C, Freyssinet JM. Pathophysiologic significance of procoagulant microvesicles in cancer disease and progression. Hämostaseologie 2009; 29:51-57.
30. Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A et al. Inter-cellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. Nat Cell Biol 2008; 10:619-24.

TROMBOSIS VENOSA CEREBRAL Y TROMBOFILIA

Á. GARCÍA AVELLO, J. CESAR

Sección de Hemostasia. Servicio de Hematología.
Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid

Introducción

La trombosis de senos venosos cerebrales es una enfermedad relativamente rara y representa alrededor del 2% de todas las trombosis venosas. Recientemente han sido publicadas dos amplias revisiones de este tema^{1,2}. Su frecuencia es más elevada en mujeres que en hombres, en parte debido a causas estrictamente femeninas³. Su diagnóstico fue muy difícil hasta el advenimiento del TAC, y probablemente muchos casos quedaron sin diagnosticar en el pasado. En la actualidad con la angiorresonancia el diagnóstico no representa un problema⁴. Clínicamente se puede confundir con jaqueca, ictus o hemorragia cerebral. Es muy importante la identificación temprana de casos graves para proceder a la terapéutica trombolítica⁵ o incluso craniectomía en casos desesperados, afortunadamente de una frecuencia escasa. Los datos propios que vamos a facilitar a continuación están extraídos de la experiencia del Laboratorio de Hipercoagulabilidad del Servicio de Hematología del Hospital Universitario Ramón y Cajal a lo largo de los últimos 11 años.

En el momento de escribir este trabajo tenemos registrados 2.068 casos de trombosis en territorio venoso, de los cuales 54 son trombosis de senos cerebrales, lo que representa un 2,6% sobre el total.

Factores de riesgo

Las circunstancias asociadas a esta trombosis han sido definidas anteriormente y son: trombofilia hereditaria, anticoagulante lúpico, terapia estrogénica (anticonceptivos, terapia hormonal sustitutiva, etc.), causas obstétricas (embarazo, parto, puerperio), trauma local o más raramente trauma general, cirugía, tanto neurocirugía como cirugía general, cáncer y procesos inflamatorios o infecciosos de todo tipo⁶.

En nuestra estadística, si comparamos los factores de riesgo de todas la trombosis venosas con las de la trombosis de senos venosos cerebrales, observamos que el riesgo relativo es mayor con la terapia estrogénica (RR = 1,8) y ligeramente mayor en las trombosis idiopáticas (RR = 1,2). El resto de factores de riesgo que son causas concretas de trombosis (cáncer, trauma, inmovilización y cirugía) tienen una importancia

menor en las trombosis venosas cerebrales que en la trombosis venosa en general. Esto nos indica que las causas de trombosis "generales" tienen más importancia en la trombosis venosa cerebral que en el resto de las trombosis venosas.

Fisiopatología

La cadena de eventos que sigue a una trombosis de senos cerebrales es la siguiente: la trombosis de uno o varios senos venosos cerebrales origina un aumento de la presión intracapilar cerebral, que favorece el paso de líquido al compartimento extravascular, con el consiguiente edema de los tejidos cerebrales y un aumento de la presión en el líquido cefalorraquídeo. El edema de los tejidos cerebrales puede producir un déficit de función en los más graves con afectaciones neurológicas concretas. El aumento de presión intravascular puede romper la integridad de la pared y dar lugar a una hemorragia intracerebral que produce aún mayor daño y eventualmente una lesión crónica e irreversible que origina con cierta frecuencia crisis comiciales.

Clínica

La sintomatología ha sido evaluada en varias publicaciones, pero es Wasay *et al.*⁶ el que mayor número de casos presenta, y define de mayor a menor la incidencia de cada síntoma. Así, se observaba cefalea en el 76% de los casos (producida sin duda por el edema cerebral), debilidad generalizada en el 56% de los casos, un déficit focal en el 36% (producido por el edema y/o por la hemorragia cerebral), náuseas y vómitos en el 35% de los casos (hipertensión intracraneal), dificultad para la marcha en el 30%, somnolencia en el 28%, visión borrosa en el 22% (edema de papila por hipertensión intracraneal), crisis comiciales en el 23% (lesión cerebral aguda y después crónica), desvanecimiento en el 21% y alteración del comportamiento en el 18%. Asimismo destacaba una exploración neurológica anormal en el 62% de los casos y un estado mental anormal en un 50%; la hemiparesia se observó en un 39%, papiledema en un 32%, confusión en un 30%, y coma en un 20%; disartria en el 20%, parálisis de pares craneales en un 18%, *pseudotumor cerebri* en un 16%, ataxia en un 14% y afasia en un 5% de los casos.

Diagnóstico

El diagnóstico clínico se puede sospechar con relativa facilidad, pero el diagnóstico cierto es radiológico. En

un principio el TAC puede diagnosticar o fundamentar una sospecha con cierta garantía, pero es la resonancia magnética y sobre todo la angiografía que hace el diagnóstico de una manera definitiva⁴. En la angiografía se observan el seno o senos trombados. También se puede ver engrosamiento de la pared y estenosis y asimetrías de los senos que podrían indicar trombosis antiguas con drenajes venosos aberrantes. Después de una hemorragia cerebral se puede observar hiperintensidad focal por hemosiderina y ventrículos "rasgados". En el momento agudo se suele ver edema cerebral, e hipodensidad focal con infartos hemorrágicos o no hemorrágicos.

Trombofilia genética

No existen muchas publicaciones con datos de trombosis venosa cerebral y trombofilia pero revisaremos las disponibles añadiendo a continuación nuestra propia experiencia.

En 1996 Deschiens⁷ publica 40 casos con 30 mujeres (75%) y 10 hombres (25%), con un 15% de trombofilia: 4 con factor V Leiden (FVL), 3 con anticuerpos anticardiolipina positivos, un caso con déficit de proteína C (PC), y otro con déficit de proteína S (PS) (nótese que hasta 1997 no se descubrió el gen de la protrombina 20210A (PT 20210A).

Biousse en 1998⁸ describe 35 casos, con 23 mujeres (65%) y 12 hombres, observando un 5,7% de portadores de la protrombina 20210-A, siendo ésta la primera publicación que relaciona la protrombina 20210A con la trombosis venosa cerebral.

Eikelboom en 1999⁹ describe el primer homocigoto de PT 20210A en trombosis venosa cerebral y describe activación de la coagulación (fragmento 1+2 de la protrombina, y complejo trombina-antitrombina elevados en los homocigotos y menos elevados en los heterocigotos).

Amberger en 2004¹⁰ describe 56 casos, con un 25% de trombofilia (sobre todo FVL) pero sin determinar la presencia del gen de la PT 20210A.

Mazzoleni en 2005¹¹ describe el caso de un niño con leucemia aguda linfoblástica y trombosis cerebral en el proceso de inducción con metotrexato intratecal y metilprednisolona en el que se diagnosticó PT 20210 A.

Gadella en 2005¹² presenta 26 casos, 21 mujeres (80%), con PT 20210 en el 23% de ellas y un 8% de FVL.

González-Hernández en 2007¹³ presenta 18 casos, con trombofilia en el 27% de ellos y tratamiento con estrógenos/progestágenos en 4 de las mujeres.

Romero en 2007¹⁴ describe 15 casos: diagnostican FVL en el 26% y PT 20210A en un 13% de ellos.

De Stefano en 2007¹⁵ presenta 45 casos, 5% de ellos

con mutación de la V617F JAK2 cinasa, lo que nos indica la importancia de la presencia de los síndromes mieloproliferativos en la etiología de este tipo de trombosis venosa.

Otrock en 2008¹⁶ presenta 16 casos cuya edad de aparición de la trombosis fue de 22 años, diagnosticando al 31% de FVL, pero sin determinar la presencia del gen de la PT 20210A.

Finalmente Wysolinska¹⁷ describe en 2008 163 casos de los cuales presentan PT 20210-A un 11%, FVL un 10% y anticuerpos anticardiolipina un 17%.

Experiencia propia

En cuanto a nuestra experiencia, sobre el total del grupo de trombosis de senos cerebrales (54 casos) tenemos 16 casos de trombofilia genética (27,7%), lo que representa la tasa de trombofilia genética más alta de todos los diagnósticos en nuestras manos. Este dato está también muy alejado de la incidencia de trombofilia en el ictus (5,4%, 447 casos), y esta última es muy similar a la del grupo control (5,2%, 532 casos), lo que indica una vez más que el ictus arterial no está relacionado con la trombofilia genética que conocemos y por tanto estas determinaciones asociadas a la trombofilia no se deben realizar en el ictus arterial.

Al respecto de la ingesta de anovulatorios asociados a la trombosis de senos venosos, debemos decir que la incidencia es la más alta de todos los diagnósticos de trombosis venosa (34%).

En cuanto a la trombofilia, la distribución de los distintos defectos es muy diferente en la población de la trombosis venosa en general y de la trombosis venosa cerebral. En la trombosis venosa en general, el 60% corresponde al FVL y el 27% a la PT 20210A, siendo el resto de los diagnósticos déficits de AT-III, proteína C y proteína S; sin embargo, en la trombosis venosa cerebral, el factor V Leiden representa un 29% de los casos y la protrombina 20210-A un 71% del total. No se han observado déficits de AT-III, proteína C o proteína S.

La distribución por sexos en la trombosis venosa en general es de un estricto 50% para cada uno, mientras que, en la trombosis venosa cerebral, las mujeres representan el 63% del total y los hombres el 37%. Si atendemos a la trombofilia hereditaria, en la trombosis venosa en general, la proporción de trombofilia en mujeres y hombres es exactamente la misma (9% para cada sexo); sin embargo, en la trombosis venosa cerebral la proporción de mujeres (23%) es más del doble que en los hombres, que presentan una proporción similar a la trombosis venosa en general (9%). Si consideramos de nuevo los déficits concretos en hombres y muje-

res, observamos que la desproporción de las mujeres se debe casi en su totalidad a la incidencia muy aumentada de protrombina 20210A en las mismas (19%).

Si expresamos estas diferencias en términos de riesgo relativo, observamos que para la trombosis venosa cerebral respecto a la trombosis venosa en general el riesgo relativo de ser mujer y portadora de 20210-A es de RR = 6,3, y de la ingesta de anovulatorios es de RR = 1,8. Para los hombres el riesgo relativo respecto a la PT 20210-A es de 1,3.

Si consideramos la incidencia de la protrombina 20210-A en diversas circunstancias clínicas, observamos que es del 2% en 276 controles, del 1,9% en 105 ictus arteriales (n.s.), del 8% en 2.068 casos de trombosis venosa en general ($p < 0,01$) y del 23% en 46 casos de trombosis de senos venosos cerebrales ($p < 0,001$).

La frecuencia de recidiva en la trombosis de senos cerebrales es de las más bajas (7%). Esto puede ser debido a que a estos pacientes no se les retira tan fácilmente la anticoagulación crónica como a los otros, ya que se considera de mucha mayor gravedad que el resto de las trombosis venosas y el mantenimiento de la anticoagulación oral evita la recidiva de la trombosis.

Tratamiento

El tratamiento de la trombosis venosa cerebral ha sido revisado en algunas guías¹⁸ y comienza con heparina no fraccionada en infusión continua controlada con el tiempo de tromboplastina parcial activado para obtener un valor de entre 1,5 y 2,5 veces el control.

Ocasionalmente se puede hacer trombolisis cuando se observa coma de comienzo, deterioro del estado general o no mejoría de los síntomas. Cuando la hipertensión intracraneal pone en peligro la vida, está indicada una derivación del LCR o en casos desesperados craneotomía. Pasada la fase aguda está indicada anticoagulación crónica con anticoagulantes orales al menos durante 6 meses. Frecuentemente se precisan fármacos anticongulantes para controlar las crisis que se pueden producir originadas en las zonas cerebrales lesionadas.

Conclusiones

La trombosis venosa cerebral está asociada más al sexo femenino que al masculino, debido sobre todo a su fuerte asociación con la presencia de la protrombina 20210-A y en menor medida al tratamiento con estrógenos/progestágenos.

Bibliografía

1. Bousser MG, Ferro JM, Cerebral venous thrombosis: an update. *Lancet Neurol* 2007; 6:162-70.
2. Stam J. Current concepts: thrombosis of the cerebral veins and sinuses. *N Engl J Med* 2005; 352:1791-8.
3. Coutinho JM, Ferro JM, Canhão P, Barrinagarrementeria F, Cantu C, Bousser MG, Stam J. Cerebral venous and sinus thrombosis in women. *Stroke* 2009; 40:2356-61.
4. Selim M, Fink J, Linfante I, Kumar S, Schlaug G, Caplan LR. Diagnosis of cerebral venous thrombosis with eco-planar T2*SW-weighted magnetic resonance imaging. *Arch Neurol* 2002; 59:1021-6.
5. Ciccone A, Cannão P, Falcao F, Ferro JM, Sterzi R. Thrombolysis for cerebral vein and dural sinus thrombosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2004; (1): CD003693.
6. Wasay M, Bakshi R, Bobustuc G, Kojan S, Sheikh Z, Dai a, et al. Cerebral Venous Thrombosis: Analysis of a Multicenter Cohort from the United States. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2008; 17:49-54.
7. Deschiens MA, Conard J, Horellou MH, Ameri A, Preter M, Chedru F, Samama MM, Bousser MG. Coagulation studies, factor V Leiden, and anticardiolipin antibodies in 40 cases of cerebral venous thrombosis. *Stroke* 1996; 27:1719-20.
8. Biousse V, Conard J, Brouzes C, Horellou MH, Ameri A, Bousser MG. Frequency of the 20210 G-A mutation in the 3' untranslated region of the prothrombin gene in 35 cases of cerebral venous thrombosis. *Stroke* 1998; 29:1398-400.
9. Eikelboom JW, Ivey L, Baker RL. Familial thrombophilia and the prothrombin 20210A mutation: association with increased thrombin generation and unusual thrombosis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1999; 10:1-5.
10. Amberger N, Masuhr F, Valdeuza JM, Vetter B, Weith M. A negative personal and family history for venous thrombotic events is not sufficient to exclude thrombophilia in patients with cerebral venous thrombosis. *Eur J Neurol* 2004; 11:555-8.
11. Mazzoleni S, Putti MC, Simioni P, Sainati OL, Tormene D, Manara R, Carli M. Early cerebral sinovenous thrombosis in a child with acute lymphoblastic leukemia carrying the prothrombin G20210A variant: a case report and review of the literature. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2005; 16:43-9.
12. Gadelha T, Andre C, Jucá AA, Nucci M. Prothrombin 20210-A and oral contraceptive use as risk factors for cerebral venous thrombosis. *Cerebrovasc Dis.* 2005; 19:49-52.
13. Gonzalez-Hernandez A, Fabre-PI O, Lopez-Fernandez JC, Araña-Toledo V, Lopez-Veloso C, Suarez-Muñoz J, *Rev Neurol* 2007; 45:661-4.
14. Romero A, Marco P, Verdú J, Sanchez S, Castaño, V. Thrombophilia Genética y trombosis venosa cerebral. *Med Clin* 2007; 128:656-6.
15. De Stefano V, Fiorini A, Rossi E, Za T, Farina G, Chiusolo P, Sica S, Leone G. Incidence of the JAK2 V617F mutation among patients with splenic or cerebral venous thrombosis and without overt chronic myeloproliferative disorders. *J Thromb Haemost* 5:708-14.
16. Otrock ZK, Taher AT, Shamsedden WA, Mahfouz RA. Thrombophilic risk factors among 16 Lebanese patients with cerebral venous and sinus thrombosis. *J Thromb Thrombolysis* 2008; 1:41-3.
17. Wysokinska EM, Wysokinski WE, Brown RD, Karnicki K, Gork-Beiska I, Grill D, et al. Thrombophilia differences in cerebral venous sinus and lower extremity deep venous thrombosis. *Neurology* 2008; 70:627-33.
18. Einhäupl K, Bousser MG, de de Bruijn SF, Ferrp JM, Martinelli I, Masuhr F et al. EFNS guideline on the treatment of cerebral venous and sinus thrombosis. *Eur J Neurol* 2006; 13:553-9.

OPTIMAL DURATION OF ANTICOAGULANT THERAPY IN THROMBOPHILIC PATIENTS WITH VENOUS THROMBOEMBOLISM

A. SQUIZZATO¹, W. AGENO¹, D. IMBERTI²

¹ *Research Center on Thromboembolic Disorders and Antithrombotic Therapies. Department of Clinical Medicine. University of Insubria. Varese, Italy*

² *Department of Internal Medicine. Arcispedale S. Anna. Ferrara, Italy*

Introduction

Anticoagulation is the main therapy for venous thromboembolism (VTE). The evidence for the need for anticoagulation in patients with VTE is based on studies performed more than 40 years ago¹. Patients with VTE should be treated with parenteral drugs as soon as the diagnosis is confirmed by objective testing. Moreover, as soon as possible, most patients are also started on oral anticoagulant treatment with vitamin K antagonists for the long-term treatment of VTE². Long-term therapy has two goals: to complete the treatment of the acute episode of DVT and to prevent new episodes of venous thromboembolism (VTE), including recurrent DVT and pulmonary embolism (PE) that are not directly related to the acute event². Oral anticoagulant therapy alone is continued until its benefits (reduction of recurrent VTE) no longer clearly outweigh its risks (increase in bleeding). The risk of recurrence after stopping therapy is largely determined by two factors: whether the acute episode of VTE has been effectively treated; and the patient intrinsic risk of having a new episode of VTE². Therefore, guidelines suggest to treat VTE for at least 3 months if transient risk factors are identified and to consider long-term treatment for patients with unprovoked VTE and no risk factors for bleeding, in whom good quality anticoagulant monitoring is achievable². When the risk to benefit ratio remains uncertain, patient preference to continue or to stop treatment is also taken into account². Testing for thrombophilia, and consequently, presence or absence of an inherited or acquired predisposition to VTE, has been advocated as relevant to adjust therapeutic measures for treatment of a VTE, such as duration or intensity of treatment.

Thrombophilia

The term thrombophilia was first mentioned by Egeberg in 1965, when he described a Norwegian fam-

ily with a high tendency to thrombosis due to a deficiency in the natural anticoagulant antithrombin^{3,4}. Subsequently, in the 1980s, deficiencies of the other natural anticoagulants, protein C and protein S, were found to increase the risk of VTE^{5,6}. Many mutations have been described in the coding genes for antithrombin, protein C and protein S and, in fact, heterozygous mutations already cause a deficiency of the affected protein. Deficiencies of natural anticoagulants (antithrombin, protein C and protein S) are rather uncommon, with a prevalence of <1% in the general population and a prevalence of at most 5% among patients with thrombosis⁷⁻⁹. During the last two decades, newer and more prevalent thrombophilic defects have been discovered, such as the factor V Leiden mutation which causes activated protein C resistance and the prothrombin G20210A mutation¹⁰⁻¹¹. Elevated levels of factor VIII have shown to be a risk factor for thrombosis¹². Mild hyperhomocysteinaemia is also a risk factor for VTE, but its clinical relevance seems small, especially since lowering the homocysteine level did not show a reduction in recurrence of VTE¹³. The only established acquired thrombophilic disorder is the primary antiphospholipid syndrome (APS). APS is a clinical diagnosis, based on at least one episode of arterial or venous thrombosis or recurrent miscarriage, combined with the persistent presence of anti-phospholipid antibodies. The well established, clinically most relevant antibodies are: lupus anticoagulant, anti-cardiolipin antibodies and anti- β 2-glycoprotein-1 antibodies¹⁴.

Evidence to guide duration of anticoagulant therapy based on thrombophilia

Thrombophilia has shown to increase the risk of a first VTE, but it is to date still controversial whether thrombophilia also increases the risk of recurrent VTE³. The estimated relative risk of recurrence in patients with thrombophilia is small, as compared with patients without thrombophilia³. The estimated odds ratios (ORs) for the natural anticoagulant deficiencies, as described mainly in retrospective analyses, were 2.5¹⁵. In one prospective study, the follow-up of the Leiden Thrombophilia Study, the risk of recurrence appeared even more moderate, with an OR of 1.8⁹. A meta-analysis studied the risks of recurrence in patients with factor V Leiden and the prothrombin G20210A mutation. The risk of recurrence was found consistently to be 1.2 to 1.4-fold higher in patients with factor V Leiden and 0.7 to 1.7-fold higher in patients with the prothrombin mutation¹⁶. Recently, even individuals with homozygous factor V Leiden and/or homozygous prothrombin G20210A or double heterozygous carriers of factor V Leiden

and prothrombin G20210A have been shown not to have a high risk of recurrent venous thrombosis¹⁷. Compared with noncarriers, crude OR for recurrence was 1.2 (95% confidence interval, 0.9 to 1.6) for heterozygous carriers of factor V Leiden, 0.7 (95% confidence interval, 0.4 to 1.2) for prothrombin G20210A, 1.2 (95% confidence interval, 0.5 to 2.6) for homozygous carriers of factor V Leiden and/or prothrombin G20210A, and 1.0 (95% confidence interval, 0.6 to 1.9) for double heterozygotes of both mutations.

For the other thrombophilic defects, less data are available³. Elevated levels of FVIII:c above 150% were associated with an approximate 2-fold increased risk of recurrent VTE. This risk raised till 6-fold in those with FVIII:c levels above the 90th percentile, corresponding to 234% and 294%, respectively^{3,18}. These results could not be reproduced in the LETS follow-up study, in which an OR of only 1.3 was found⁹. The data on estimated risk of recurrence for elevated levels of FIX and FXI are scarce, but their impact on recurrence seems negligible⁹. The attribution of mild hyperhomocysteinaemia in terms of risk of recurrence appears low (1.8 to 2.7), and treating hyperhomocysteinaemia did not show a decrease in the number of recurrences^{3,13}. The risk of recurrence in antiphospholipid or anticardiolipin antibodies was investigated in four studies³. The outcomes regarding relative risk for recurrence ranged between 2- and 6-fold. These results are difficult to interpret, given that in these studies the antiphospholipid and anticardiolipin antibodies or lupus anticoagulant were not tested repetitively (as suggested by international guidelines)¹⁴. Moreover, duration of anticoagulant treatment differed substantially³.

However, given that a thrombophilic defect can be demonstrated in at least 50% of patients with a VTE, testing patients with a first VTE for thrombophilia has gained in interest tremendously and has become a common clinical practice in several countries¹⁹. A Cochrane review tried to systematically identify if any solid evidence exist to support this practice to test for thrombophilia for optimizing secondary prevention of VTE²⁰. The authors explored published literature by the Cochrane Peripheral Vascular Diseases Group trials register, MEDLINE, EMBASE, and the CENTRAL database, and reference lists. Any randomized controlled trials and controlled clinical trials comparing the rate of recurrent VTE in patients with VTE who were tested for thrombophilia and patients with VTE who were not tested for thrombophilia were potentially eligible. No studies were included because no study has ever been published. They only identified the protocol of the NOSTRADAMUS (Necessity Of Screening for Thrombophilia At Diagnosis of venous thromboembolism to Assess Most Unresolved Issues) trial²⁰, designed by the same Dutch

research group of the authors. The NOSTRADAMUS was a multicentre randomized controlled trial, and was designed to assess whether this strategy is beneficial in terms of clinical outcomes (the composite endpoint of recurrent VTE and bleeding risk), quality of life and costs. The authors aimed to include 1.336 patients with a first VTE. The intervention group would be tested for thrombophilia and subsequently receive the test results. Additional anticoagulant treatment for a predefined period would be initiated in patients found to have thrombophilia, while others would receive a standard predefined duration of treatment. Patients in the control group they would receive the standard predefined duration of treatment. Primary outcomes were the risk of recurrent VTE, clinically important bleeding and the composite outcome of both. However, the NOSTRADAMUS trial was prematurely terminated due to a low inclusion rate. Several reasons account for this, but the main problem was the competition with industry-initiated intervention studies²⁰. The authors concluded their systematic review claiming for a randomized controlled trial to definitely answer if thrombophilia testing is clinically relevant or not²⁰.

Other potential advantages and disadvantages of thrombophilia should be taken into account for determining its clinical utility. Thrombophilia testing may help to better understand the cause of VTE or give us the opportunity to track asymptomatic family members and, subsequently, take preventive measures in condition at high risk of VTE. Conversely, testing for thrombophilia might lead to needless expenses, anxiety, and social problems, such health insurance or life insurance³.

American College of Chest Physicians (ACCP) guideline recommendation

Undoubtedly, one of the major and controversial changes that have been made between 2004 and 2008 editions of the ACCP guidelines is the optimal duration of anticoagulation after VTE^{2,21,22}. First of all, it is now recommended to anticipate the evaluation of the risk to benefit ratio of long-term anticoagulation for the secondary prevention of unprovoked VTE at three months after the index event². Furthermore, the presence of thrombophilia is no longer a major consideration in the risk stratification of the patients. In the last edition of the ACCP guidelines, the panel clearly stated "The presence of hereditary thrombophilia has not been used as a major factor to guide duration of anticoagulation for VTE in these guidelines because evidence from prospective studies suggests that these factors are not major determinants of the risk of recurrence"²². The majority of these cited

prospective studies have been published before the previous edition, the 7th, in which authors suggested a different approach based on thrombophilia²¹. In particular they stated: “For patients with a first episode of VTE who have documented antiphospholipid antibodies or who have two or more thrombophilic conditions (eg, combined factor V Leiden and prothrombin 20210 gene mutations), we recommend treatment for 12 months (Grade 1C+). We suggest indefinite anticoagulant therapy in these patients (Grade 2C)”²¹. “For patients with a first episode of VTE who have documented deficiency of antithrombin, deficiency of protein C or protein S, or the factor V Leiden or prothrombin 20210 gene mutation, homocysteinemia, or high factor VIII levels (> 90th percentile of normal), we recommend treatment for 6 to 12 months (Grade 1A). We suggest indefinite therapy as for patients with idiopathic VTE (Grade 2C)”²¹.

Conclusion

Thrombophilia can be identified in about half of all patients presenting with VTE. Testing has increased tremendously for various indications, but whether the results of such tests help in the clinical management of patients has not definitely established. Increasing indirect evidence suggest that thrombophilia should not be performed, on a routine basis, in all VTE patients with the aim to guide duration of anticoagulant therapy.

References

1. Barritt DW, Jordan SC. Anticoagulant drugs in the treatment of pulmonary embolism: a controlled trial. *Lancet* 1960; 1:1309-1312.
2. Kearon C, Kahn S, Agnelli G, Goldhaber S, Raskob GE, Comero A. Antithrombotic therapy for venous thromboembolic disease: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (8th edition). *Chest* 2008;133:454S-545S.
3. Cohn DM, Roshani S, Middeldorp S. Thrombophilia and venous thromboembolism: implications for testing. *Semin Thromb Hemost* 2007; 33: 573-81.
4. Egeberg O. Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh* 1965;13:516-30.
5. Mannucci PM, Viganò S. Deficiencies of protein C, an inhibitor of blood coagulation. *Lancet* 1982;2:463-7.
6. Schwarz HP, Fischer M, Hopmeier P, Batard MA, Griffin JH. Plasma protein S deficiency in familial thrombotic disease. *Blood* 1984;64:1297-300.
7. Tait RC, Walker ID, Perry DJ et al. Prevalence of antithrombin deficiency in the healthy population. *Br J Haematol* 1994;87:106-12.
8. Tait RC, Walker ID, Reitsma PH et al. Prevalence of protein C deficiency in the healthy population. *Thromb Haemost* 1995;73:87-93.
9. Christiansen SC, Cannegieter SC, Koster T, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Thrombophilia, clinical factors, and recurrent venous thrombotic events. *JAMA* 2005;293:2352-61.
10. Bertina RM, Koeleman BF, Koster T et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994;369:64-7.
11. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996;88:3698-703.
12. Koster T, Blann AD, Briët E, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis. *Lancet* 1995;345:152-5.
13. Den Heijer M, Willems HP, Blom HJ et al. Homocysteine lowering by B vitamins and the secondary prevention of deep-vein thrombosis and pulmonary embolism. A randomized, placebo-controlled, double blind trial. *Blood* 2007;109:139-44.
14. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006;4:295-306.
15. De Stefano V, Leone G, Mastrangelo S et al. Clinical manifestations and management of inherited thrombophilia: retrospective analysis and follow-up after diagnosis of 238 patients with congenital deficiency of antithrombin III, protein C, protein S. *Thromb Haemost* 1994;72:352-8.
16. Ho WK, Hankey GJ, Quinlan DJ, Eikelboom JW. Risk of recurrent venous thromboembolism in patients with common thrombophilia: a systematic review. *Arch Intern Med* 2006;166:729-36.
17. Lijfering WM, Middeldorp S, Veeger NJ, Hamulyák K, Prins MH, Büller HR, van der Meer J. Risk of recurrent venous thrombosis in homozygous carriers and double heterozygous carriers of factor V Leiden and prothrombin G20210A. *Circulation*. 2010;121:1706-12.
18. Kyrle PA, Minar E, Hirschl M et al. High plasma levels of factor VIII and the risk of recurrent venous thromboembolism. *N Engl J Med* 2000;343:457-62.
19. Bauer KA. The thrombophilias: well-defined risk factors with uncertain therapeutic implications. *Ann Intern Med* 2001;135:367-73.
20. Cohn DM, Vansenne F, De Borgie CAJ, Middeldorp S. Thrombophilia testing for prevention of recurrent venous thromboembolism. *Cochrane Database Syst Rev* 2009;CD007069.
21. Buller HR, Agnelli G, Hull RD, et al. Antithrombotic therapy for venous thromboembolic disease: the seventh ACCP conference on antithrombotic and thrombolytic therapy. *Chest* 2004;126 (3 Suppl):401S- 453S.
22. Squizzato A, Ageno W. The 8th American College of Chest Physicians Guidelines, A perspective on venous thromboembolism guidelines. *Thromb Haemost* 2009;101:31-35.

Tratamiento antitrombótico

COORDINADORES: P. MARCO. *Alicante*
P. DOMÈNECH. *Barcelona*

TROMBOPROFILAXIS EN PATOLOGÍAS NO QUIRÚRGICAS

M. MONREAL

*Servicio de Medicina Interna.
Hospital Germans Trias i Pujol. Badalona (Barcelona)*

La enfermedad tromboembólica venosa (ETV) en pacientes inmovilizados por causa no quirúrgica no solamente es más frecuente que tras una intervención quirúrgica, sino que también es más grave. En un artículo de nuestro grupo demostramos que la incidencia de hemorragias graves (3 veces más frecuente), la muerte por hemorragia (9 veces más) y la muerte por embolia pulmonar (4 veces más) son más frecuentes en los pacientes médicos con ETV que en los quirúrgicos. Por ello es especialmente importante la administración de una correcta profilaxis en los pacientes inmovilizados por una enfermedad no quirúrgica.

Revisamos la experiencia del registro RIETE y encontramos 7.200 pacientes que desarrollaron una ETV tras una inmovilización de causa no quirúrgica, de un total de 30.327 pacientes. Un 47% de los casos se presentó como embolia pulmonar y la mortalidad a los 3 meses fue del 14%. Las causas más frecuentes de inmovilización fueron los traumatismos y la demencia (con un 35% de los casos entre ambos). La mitad de los pacientes sufrió la inmovilización en su domicilio, y solamente un 24% recibió tromboprofilaxis.

THE NEW PHARMACEUTICAL ANTITHROMBOTIC AGENTS (ANTIPLATELET AND/OR ANTICOAGULANTS)

M.M. SAMAMA

Hôtel Dieu University Hospital. Paris (France)

Antiplatelet and/or anticoagulants are essential in the prevention and treatment of venous and arterial thrombosis. Platelets play a major role in atherothrombosis.

New antiplatelet agents

Novel antiplatelet agents include mainly: already licensed intravenous prasugrel, ticagrelor orally active,

intravenous cangrelor and elinogrel both active orally and intravenously. Prasugrel or Efient® is more potent with a more rapid onset and a much less inter-individual variability of response than clopidogrel. Its therapeutic superiority is associated with a higher rate of bleeding in the TRITON trial (patients undergoing coronary interventions). Ticagrelor is a new ADP platelet receptor antagonist with a rapid onset, which was superior to clopidogrel in the PLATO study without an increase in the rates of major bleeding. It is the first antiplatelet agent which reduced total mortality.

Platelet thrombin receptors antagonists (PAR-1) is a new class of oral antiplatelet agents in development in patients with atherothrombosis with an expected reduced bleeding potential compared to the currently licensed antiplatelet agents. Finally, some clinical studies are evaluating the triple association of two antiplatelet agents, aspirin, clopidogrel, and one new anti-Xa or anti-IIa orally active anticoagulant in patients with atrial fibrillation and coronary stent(s).

New anticoagulant agents

Several newer anticoagulants are under clinical development. Recently two of them, Dabigatran etexilate/Pradaxa®, and Rivaroxaban/Xarelto® have been licensed in Europe and Canada for the prevention of thromboembolic events following major orthopedic surgery such as total hip and knee replacement. Apixaban, edoxaban and YM150 are three other direct reversible inhibitors of FXa, which are in clinical development. Ongoing Phase II and III clinical trials assess their efficacy in the secondary prevention and treatment of deep vein thrombosis and pulmonary embolism, and in the long term prevention of stroke in patients with non-valvular atrial fibrillation and in combination with aspirin and clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. The RE-LY study has shown a superiority of dabigatran over vitamin K antagonists in patients with atrial fibrillation. A small increase in the rate of acute myocardial infarction in the group receiving dabigatran is difficult to interpret. Positive results in the treatment and in the secondary prevention of venous thromboembolic episodes have been obtained in phase III trials conducted with the new anticoagulant agents (EINSTEIN DVT with rivaroxaban positive results presented at ESC last September). Several other anti-thrombotic molecules including semuloparin, an ultra low molecular weight heparin, are currently in different stages of clinical development. In addition to being administered orally for several of them, the newer anticoagulant agents have a more balanced

benefit/risk ratio and a wider therapeutic window. They have a rapid onset of action, a predictable anticoagulant effect that does not require routine laboratory monitoring. However, their influence on clotting tests has been well documented and should not be ignored. They have minor food and drug interactions. They are highly specific and targeted to a single coagulation factor, and could carry similar or less hemorrhagic risks compared to the older anticoagulant agents. Finally, they may be used in a broader variety of patients, especially the acutely ill medical patients, and the elderly at risk of thrombosis without any dosage adjustment, regardless of the patient age, gender, body weight, or in patients with mild renal impairment.

The use of these new drugs in the general world will hopefully confirm the promising results of clinical trials.

References

1. Samama MM, Gerotziafas GT. Newer anticoagulants in 2009. *J Thromb Thrombolysis* 2010; 29: 92-104.
2. Leonardi S, Rao SV, Harrington RA, Bhatt DI, Gibson CM, Roe MT, Kochman J, Huber K, Zeymer U, Madan M, Gretler DD, McClure MW, Paynter GE, Thompson V, Welsh RC. Rationale and design of the randomized, double-blind trial testing INtraveNous and Oral administration of elinogrel, a selective an reversible P2Y(12)-receptor inhibitor, versus clopidogrel to eVALuate Tolerability and Efficacy in nonurgent Percutaneous Coronary Interventions patients (INNOVATE-PCI). *Am Heart J* 2010;160: 65-72.
3. Wiviott SD, Antman EM, Braunwald E. New drugs and technologies : Prasugrel. *Circulation* 2010;122:394-403.
4. Coccheri S. Antiplatelet drugs – Do we need new options? With a reappraisal of direct thromboxane inhibitors. *Drugs* 2010;70:887-908.
5. Siller-Matula JM, Krumhuber J, Jilma B. Pharmacokinetic, pharmacodynamic and clinical profile of novel antiplatelet drugs targeting vascular diseases. *British Journal of Pharmacology* 2010;159:502-517.

Linfoma de Hodgkin

COORDINADORES: A. SUREDA. *Barcelona*

C. MONTALBÁN. *Madrid*

Resumen del simposio

El linfoma de Hodgkin (LH) es en todos los sentidos un *faux ami*: a primera vista parece que sabemos todo sobre su biología, cómo tratarlo en casi cualquier circunstancia y que es casi una suerte tener este diagnóstico porque casi todos los pacientes se van curar. Nada está más lejos de la realidad. Hasta hace muy poco no se tenía la certeza de si era una enfermedad inflamatoria o neoplásica y, si era neoplásica, cuáles eran las verdaderas células tumorales ni cuál era su posible estirpe. Sus características epidemiológicas y su relación con el EBV apoyaban su naturaleza inflamatoria, sin poder interpretar cuál era el papel del virus. Es cierto que los estudios de Stanford permitieron valorar la importancia de la extensión de la enfermedad para poder adaptar el tratamiento adecuado con radioterapia y quimioterapia, y que gracias a esta estrategia, tratamientos clásicos como el MOPP y el más reciente (aunque ya muy lejano en el tiempo) ABVD permitían obtener una buena respuesta y la curación de una mayoría de los pacientes. Lo cierto es que estos resultados eran a costa de una enorme toxicidad a medio y largo plazo que daba lugar a gran morbilidad y a la muerte de una muy importante proporción de pacientes curados del LH por mielodisplasia, leucemias, segundas neoplasias sólidas o por complicaciones cardíacas y pulmonares. La otra gran incógnita ha sido, fuera de la estricta estratificación en los estadios de Ann Arbor, cómo seleccionar los pacientes que iban a responder mal al tratamiento y se iban a morir como consecuencia de la enfermedad. Por todas estas cuestiones, lo cierto es que hasta un tercio de los pacientes puede acabar muriendo de la enfermedad o de las consecuencias de su tratamiento.

Muchas de estas cuestiones ya son conocidas, aunque sólo en parte resueltas, y estos aspectos son los que se van a comentar en éste simposio. En primer lugar, se va a discutir la biología del linfoma de Hodgkin, del que ya sabemos que es una neoplasia y que es una neoplasia de linfocitos B que derivan del folículo linfoide, donde algunos linfocitos que sufren mutaciones ineficaces, en vez de entrar en apoptosis, sobreviven con un daño irreversible en la maquinaria para hacer su función última (expresar y producir inmunoglobulinas) y adoptan un aspecto peculiar, las células de Reed-Sternberg (CRS) y las células de Hodgkin (CH), en las que sólo las técnicas moleculares permiten identificarlas como lo que son: linfocitos B derivados del folículo. Los avances en los instrumentos para su estudio fino han permitido demostrar que en su biología son clave las alteraciones del ciclo celular y los desequilibrios entre la apoptosis y la proliferación, y que la interacción entre estas células neoplásicas y las células de su ambiente es compleja y bidireccional. Esta interacción contribuye, por un lado, a su abigarrada estructura histológica y, por otro, a las manifestaciones inflamatorias (síntomas sistémicos) y al crecimiento del tumor. Estas alteraciones e interacciones entre las células tumorales (CRS/CH) y su entorno van a marcar el comportamiento del tumor, su respuesta a los tratamientos y, en último término, sus posibilidades de curación. Esta información va a contribuir a la identificación precoz de los pacientes de alto riesgo que van a requerir tratamientos de mayor intensidad (y toxicidad, que se ha de evitar al resto de los pacientes), y la identificación de posibles dianas moleculares que pueden ser el objetivo de tratamientos más selectivos y eficaces.

El segundo punto que se discutirá será el de las nuevas certezas en los tratamientos del LH, dirigidos a obtener la mayor eficacia terapéutica con el mínimo de toxicidad. Los últimos estudios de varios grupos internacionales han permitido establecer el nuevo paradigma del tratamiento de los estadios iniciales favorables, limitándolo a sólo dos ciclos de ABVD junto con bajas dosis (20Gy) de radioterapia de campo afecto. En situación parecida se encuentra la aproximación a los pacientes con enfermedad inicial, con datos que les proporcionan mayor riesgo (enfermedad inicial desfavorable), en la que una combinación de 4 ciclos de ABVD o 2+2 ABVD/BEACOPP con dosis bajas de radioterapia de campo afecto (ligera-mente ma-

yor en el grupo del AVBD) proporciona también excelentes resultados minimizando la toxicidad. Aunque el ABVD es todavía el estándar de tratamiento del LH avanzado, el BEACOPP escalado ha sido en al menos 3 estudios superior al ABVD, aunque su toxicidad ha conducido a nuevos estudios intentando reducir su intensidad (y por tanto su toxicidad) sin comprometer su eficacia. El siguiente aspecto que se discutirá es el papel de la quimioterapia intensiva en los casos que tienen recaídas después del tratamiento de primera línea y que podrían responder a dosis más altas de quimioterapia. Las cuestiones fundamentales son, por un lado, intentar identificar los casos que pueden ser quimiosensibles (y van a poder responder al aumento de intensidad del tratamiento) de los que no lo son y son ya de entrada (probablemente por alteraciones moleculares estructurales del propio tumor) primariamente refractarios al tratamiento convencional e incluso a la quimioterapia intensiva del autotransplante de precursores hemopoyéticos. Por otro lado, es fundamental valorar en estos pacientes el efecto de otras modalidades de tratamiento, como el trasplante alogénico y el trasplante alogénico de intensidad reducida, que explota otros efectos además de la propia intensidad de la quimioterapia.

El último aspecto de la discusión es el valor del PET en el manejo del LH. A pesar de los buenos resultados que nos proporcionan las nuevas informaciones y actitudes terapéuticas, es necesario todavía afinar más y reducir el tratamiento a los pacientes que responden bien e intensificarlo o modificarlo en alguna medida a los que no lo hacen. El PET permite identificar a estos pacientes en dos situaciones básicas. Evaluar, después del tratamiento convencional, a los pacientes que han alcanzado una “remisión metabólica”, es decir, una respuesta con desaparición de la masa tumoral y ausencia de captación en las zonas previamente afectas y la valoración de las eventuales masas residuales no tumorales. Por otro lado, evaluar la respuesta a los primeros ciclos de tratamiento y adaptar la intensidad del tratamiento subsiguiente al nivel de respuesta metabólica del linfoma. En estos dos aspectos, el papel del PET se está consolidando en el LH como esencial y muy por encima de su utilidad en otras situaciones.

ADVANCES ON CLASSICAL HODGKIN LYMPHOMA BIOLOGY

B. SÁNCHEZ-ESPIRIDIÓN¹, C. MONTALBÁN², M.A. PIRIS¹, J.F. GARCÍA^{1,3}

¹ *Molecular Pathology Programme. Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO).*

² *Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid.*

³ *M.D. Anderson International España. Madrid*

Hodgkin lymphoma (HL) is one of the most frequent lymphomas, representing roughly 10 percent of all lymphoproliferative disorders and with an estimated incidence of about 3 new cases per 100,000 persons per year in Western countries. About 95% of cases belong to the classical form of the disease (classical HL, cHL), while the remaining 5% represent nodular lymphocyte predominant HL (NLPHL)¹.

cHL represent a distinctive model of histological complexity, with a minor population of the characteristic tumor cells, the Hodgkin and Reed-Sternberg (HRS) cells diluted in a reactive inflammatory background composed of non-neoplastic B- and T-cells, macrophages, eosinophils, neutrophils and plasma cells^{2,3}. This microenvironment is most likely essential for HRS cell survival, as indicated from the difficulty to grow HRS cells in culture or in immunodeficient mice⁴.

HRS cells are unique in the extent to which they have lost the characteristic B cell-associated gene expression pattern. Deregulation of transcription factor networks plays a key role in this reprogramming process. HRS cells show strong constitutive activity of the transcription factor NF-kappaB^{1,5}. Multiple mechanisms likely contribute to this deregulated activation, including signaling through particular receptors and genetic lesions, thus identifying NF-kappaB inhibition as an interesting therapeutic approach.

Also, HRS cells are latently infected by Epstein-Barr virus in about 40% of patients², and an important role of this virus in HL pathogenesis has been described, in particular for cases in which HRS cells had lost the capacity to express a B-cell receptor.

Additionally, the complex relationship between the HRS cells and their microenvironment is only partially understood, although important, if fragmentary, advances are steadily being made⁶. Essentially, this microenvironment represents an ineffective TH2-type immune response, in which a large number of chemokines and cytokines are implicated. HRS cells attract many cells into the lymphoma tissue resulting in an inflammatory microenvironment that likely promotes the survival of HRS cells and helps them to escape an attack from cytotoxic T or NK cells^{3,7,8}. A better understanding

of the essential cellular interactions may offer novel approaches for a targeted therapy of this malignancy.

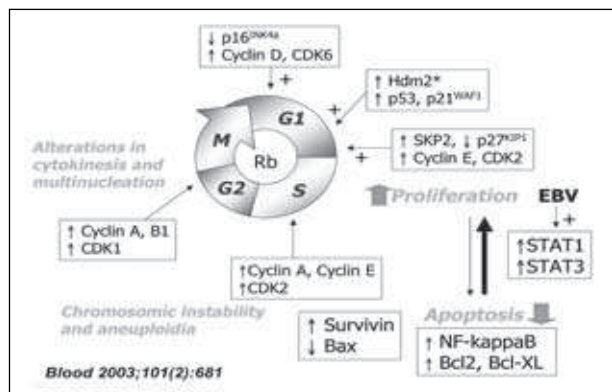
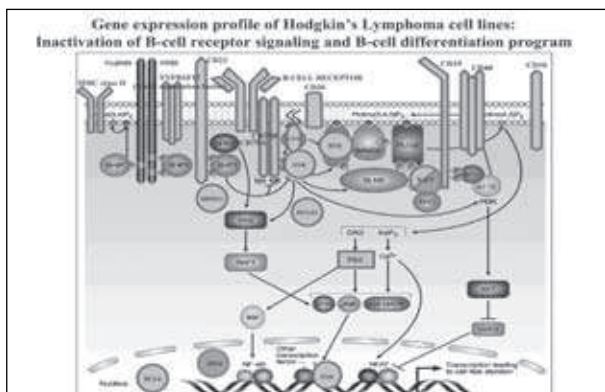
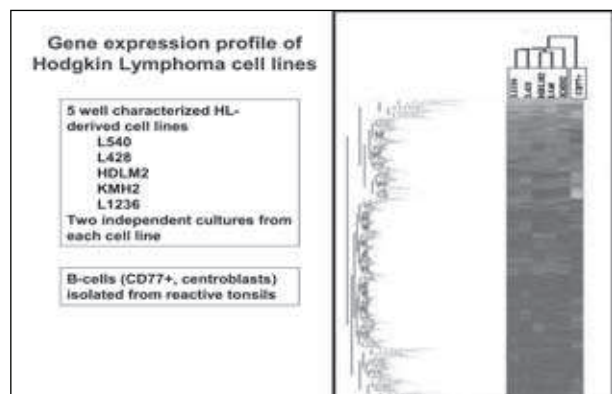
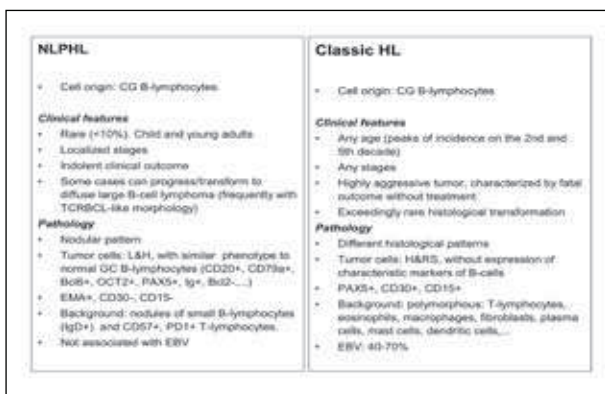
cHL is assumed to be a curable tumor, but an important fraction of patients with advanced disease do not respond favorably to the current standard chemotherapy regimens based on adriamycin⁹. The most widely used and reproducible prognostic score is based on clinical and analytical parameters integrated in the International Prognostic Score (IPS), but still fails to identify accurately, at the moment of diagnosis, a significant fraction of patients with very poor prognosis¹⁰. Recent studies note how the IPS score did not show significant prognostic influence and modern series of patients and, from the individual components of the IPS, only stage IV disease remains significant in multivariate analyses¹¹. In agreement, we have also described low value of the IPS scoring in the identification of risk groups with sufficiently good or poor outcome in more recently treated populations¹², characterized by more accurate pathologic diagnosis, improved control of therapy, use of growth factors, and enhanced supportive care. Thus, identification of truly high risk populations requires supplementation with molecular markers, in order to establish a more rational risk-adapted treatment strategy.

Clinical outcome of cHL has been found to be related with the expression of multiple biological markers alone or in combination, expressed either by the tumor HRS cells, macrophages, regulatory T-cells or other non-neoplastic cell subpopulations. Recently, we have described a quantitative RT-PCR assay for patients with advanced cHL, incorporating a limited number of genes and pathways from tumor and microenvironment cell components, designed for application to routine formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples^{12,13}. The final model incorporates a 4-cluster/11-gene signature integrated in a molecular risk algorithm that can identify patient subgroups with highly different probabilities of treatment failure. Additionally, the model can incorporate one of the well established clinical variables (stage IV), thus integrating the main molecular characteristics of the tumors related with treatment response and the tumor burden estimation in a single scoring system. The multivariate Cox model indicates that most patients with stage IV cHL and with a high MRS (≥ 0.3) will have a very poor outcome, with 5-year FFS probability of 24.3 percent and OS probability of 76.3 percent¹².

Although these results are promising, further validation in a larger and independent series of patients is needed for the model to become established as part of the clinical routine. Moreover, the predictive value of this model in patients treated with modern intensive chemotherapy –such as BEACOPP or BEACOPP-escalated– need to be independently tested.

References

- Garcia JF, Camacho FI, Morente M, et al: Hodgkin and Reed-Sternberg cells harbor alterations in the major tumor suppressor pathways and cell-cycle checkpoints: analyses using tissue microarrays. *Blood* 101:681-9, 2003.
- Montalban C, Garcia JF, Abaira V, et al: Influence of biologic markers on the outcome of Hodgkin's lymphoma: a study by the Spanish Hodgkin's Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol* 22:1664-73, 2004.
- Sanchez-Aguilera A, Montalban C, de la Cueva P, et al: Tumor microenvironment and mitotic checkpoint are key factors in the outcome of classic Hodgkin lymphoma. *Blood* 108:662-8, 2006.
- Herreros B, Sanchez-Aguilera A, Piris MA: Lymphoma microenvironment: culprit or innocent? *Leukemia* 22:49-58, 2008.
- Bednarski BK, Baldwin AS, Jr., Kim HJ: Addressing reported pro-apoptotic functions of NF-kappaB: targeted inhibition of canonical NF-kappaB enhances the apoptotic effects of doxorubicin. *PLoS One* 4:e6992, 2009.
- Skinnider BF, Mak TW: The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 99:4283-97, 2002.
- Alvaro T, Lejeune M, Salvado MT, et al: Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clin Cancer Res* 11:1467-73, 2005.
- Tzankov A, Meier C, Hirschmann P, et al: Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 93:193-200, 2008.
- Canellos GP, Anderson JR, Propert KJ, et al: Chemotherapy of advanced Hodgkin's disease with MOPP, ABVD, or MOPP alternating with ABVD. *N Engl J Med* 327:1478-84, 1992.
- Hasenclever D, Diehl V: A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. *N Engl J Med* 339:1506-14, 1998.
- Moccia A, Donaldson J, Chhanabhai, Hoskins P, Klasa R, Gayscone R, et al. The International Prognostic Factor Project Score (IPS) in Advanced Stage Hodgkin Lymphoma Has Limited Utility in Patients Treated in the Modern Era. In: 51st ASH annual meeting and exposition; 2009 Dec 5-8; New Orleans, Louisiana; ASH 2009, Abstract 1554.
- Sánchez-Espiridión B, Montalbán C, López A, et al. A molecular risk score based on four functional pathways for advanced classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2010 May 17. [Epub ahead of print].
- Sanchez-Espiridion B, Sanchez-Aguilera A, Montalban C, et al: A TaqMan low-density array to predict outcome in advanced Hodgkin's lymphoma using paraffin-embedded samples. *Clin Cancer Res* 15:1367-75, 2009.



NEW ASPECTS IN THE TREATMENT OF HODGKIN LYMPHOMA

A. ENGERT

*Department I of Internal Medicine,
University Hospital of Cologne. Cologne (Germany)*

The treatment of patients with Hodgkin lymphoma (HL) has improved dramatically over the last decades. Today, more than 90% of patients with early favorable stages and more than 80% of those in early unfavorable and advanced stage achieve long term remission. The allocation to treatment is based on clinical stage and a number of risk factors.

The treatment of choice for those in early stages is combined modality treatment consisting of 2-4 cycles of chemotherapy followed by involved field radiotherapy (IFRT). Based on a number of clinical studies performed by the German Hodgkin Study Group (GHSG) and the EORTC, two cycles of ABVD followed by IF radiotherapy are regarded standard for these patients. This is based on the GHSG studies HD7 and HD10 and the EORTC studies H7F and H8F. The final analysis of HD10 demonstrates that 2 cycles of ABVD are equivalent to 4 cycles when combined with 20 Gy involved field radiotherapy. Thus, 2 x ABVD + 20 Gy IFRT are the new standard of care for early favorable patients in the GHSG perspective. Open questions for this risk group include possible modifications of the ABVD regimen and the use of PET to identify good and bad-risk patients.

Patients in early unfavorable stages HL are being treated with 4-6 cycles of chemotherapy followed by IFRT. Very similar to the early favorable group, ABVD has become the regimen of choice. Earlier studies such as the GHSG HD8 study and the EORTC H8U trial demonstrated that radiotherapy in the larger extended field (EF) technique is not superior to IFRT but is associated with higher toxicity. Thus, also for patients with early unfavorable disease, IFRT has become standard. The final analysis of the GHSG HD11 study demonstrated that 4 cycles of ABVD need to be combined with 30 Gy IFRT. More recently, our HD14 study was closed with significant advantages for 2 x BEACOPP^{escalated} + 2 x ABVD followed by 30 Gy IFRT.

For advanced-stage patients, our HD9 trial had compared 8 x (COPP/ABVD) with 8 x BEACOPP^{baseline} and 8 x BEACOPP^{escalated}. The 10-years update of this study confirmed BEACOPP^{escalated} as standard of care in our hands with a superior tumor control of 18% at 10-years between BEACOPP^{escalated} and COPP/ABVD as well as an overall survival advantage of 11%. More recent studies also including PET were aimed at reducing toxicity and will be presented.

MONITORING THE TREATMENT OF HODGKIN LYMPHOMA WITH FDG PET

M. MEIGNAN¹, A. GALLAMINI²

*¹ Nuclear Medicine Department. CHU Henri Mondor,
University Paris Est. Creteil (France).*

*² Hematology Department BMT Unit. Az Ospedaliera S.
Croce e Carle. Cuneo (Italy)*

Hodgkin's lymphoma (HL) is a curable neoplasm given that, after a minimum follow-up of 6 years, more than 90% of patients are still alive and 80% are considered cured. Limited-stage and advanced stage require different treatment modalities with different prognosis; the radiotherapy fields have been progressively reduced and progressively moved from involved field to involved node for the most limited disease. ABVD treatment with INR has been considered for long the gold standard of treatment for limited stage disease. ABVD is still the gold standard in advanced-stage: However, in at least three randomized studies, BEACOPP escalated has been definitely proven superior to ABVD both in terms of progression-free survival and overall survival. Prognostic factors seemed no longer necessary, as treatment was successfully adapted to disease burden¹. However the high-performance results of the current therapy of HL have been achieved at a cost of early and late toxicity such as severe cytopenias, infections, amenorrhea, and secondary tumors²⁻⁴. Moreover, more than two-thirds of the patients who would have responded to less intensive chemotherapy regimen were exposed to the risk of overtreatment. Although limited, the use of radiotherapy is matter of debate in the limited stages.

PET/CT with F18 deoxyglucose introduced in the last decade has revealed a sensitive and specific tool for classifying patients in early or advanced stage, facilitating the identification of nodal and extranodal sites and guiding the field of radiotherapy⁵⁻⁶. In 83 patients with HL, it has been reported that (18)F-FDG PET/CT highly improves sensitivity for diagnosis of bone/bone marrow lesions in HL compared to conventional staging⁷. In a recent systematic review the overall sensitivity and specificity for initial staging for NHL and HL were 97% and 100% respectively⁸. Most recent data have shown that all patients (100%) with Hodgkin disease have a significant (18)F-FDG avidity⁹. This high uptake is mainly explained by the fact that the Hodgkin tumor is a mixed of few, scattered neoplastic RS cells (1%) with more than 90% of non-neoplastic mononuclear bystander cells with a high metabolic activity responsible for the high FDG uptake¹⁰. Several reports in the literature have also demonstrated the high sensitivity and specificity of FDG-PET in tumor response as-

assessment at the end of treatment. In a meta-analysis performed in 2006 from 13 studies on 408 HL patients, upon exclusion of other studies not fulfilling the minimal requirements for review (full ring of CT-PET, adequate follow-up, definition of the reference test), Zijlstra and colleagues were able to demonstrate a pooled sensitivity and specificity of PET in defining treatment outcomes of 84% and 90%, respectively¹¹. In 2007 FDG-PET was proposed as an essential tool in defining treatment response and it has been integrated in the previous definition on CR, PR, stable or progressive disease by the International Workshop Criteria on Treatment Response in Lymphomas¹². Recently FDG-PET demonstrated 95.9% accuracy in restaging for patients with HL with CRu/PR after first-line therapy and was judged highly cost-effective¹³.

Interim FDG-PET, performed after a one to three cycles of chemotherapy, has been proven to reliably predict treatment outcome in more than 90% of HL patients¹⁴⁻²¹, with a sensitivity and a specificity ranging between 43% and 100%, and 67% and 100%, respectively²².

Therefore interim PET has been proposed to drive risk adapted therapeutic strategy with de-escalation or escalation according to the stage and the type of the trial. Many trials aimed are ongoing worldwide on this purpose. As an example in early-stage HL patients the cooperative H10 study (EORTC, GELA and ILL) is aimed at assess the outcome of two cohort of favourable and unfavourable HL patients in which a PET response-adapted strategy is performed: radiotherapy is omitted to PET-negative patients while the therapy is intensified with BEACOPPesc followed by radiotherapy. In advanced stage HL patients the purpose of improving outcome of PET-2 positive, after 2 ABVD patients has been debated²³ but, to our knowledge, only two studies have been published so far reporting the impact of PET response-adapted therapy in advanced-stage HL²⁴⁻²⁵.

In the first study patients were treated according to IPS risk-class: those with IPS of 3 or higher received 2 cycles of escalated BEACOPP, the others received 2 cycles of standard BEACOPP. Subsequent therapy was administered according to results of early interim Gallium-67 (⁶⁷Ga) or PET scan. Baseline or escalated BEACOPP was given in negative or positive interim scan patients, respectively. The 5-year event-free survival (EFS), and overall survival (OS) rates were 85% and 90%, respectively. In the second study, a small cohort of 44 high-risk, advanced-stage HL patients with IPS score ≥ 3 underwent interim PET scan after 2 escalated BEACOPP courses: patients with negative PET-2 scan were treated with ABVD x 4 courses, while PET-2-positive patients were treated with high-dose chemotherapy followed by autologous stem-cell transplantation (ASCT)²⁵. Thirteen (29%) of the patients showed a positive PET-2 scan and underwent ASCT, while 31

PET-2-negative patients were treated with ABVD x 4 courses. After a mean follow-up of 48 months the PFS for the entire cohort of patients was 78% and the OS 95%. Moving from the preliminary reports presented in 2004 on the role of PET-2 in predicting treatment outcome in HL^{26,27}, several Italian clinical centers on behalf of GITIL (Gruppo Italiano Terapie Innovative nei Linfomi) decided from 2006, to verify, in a retrospective way, a working hypothesis: (1) if very poor-prognosis, PET-2 positive patients after two ABVD cycles could be rescued with BEACOPP in at least half of cases; (2) if the overall outcome of the entire cohort of advanced-stage, ABVD treated patients in whom a small subset of very poor-prognosis, interim PET positive patients was rescued with BEACOPP could be improved. Quite recently the final results of this retrospective study in a cohort of 162 IIB-IVB stage or IIA stage with unfavorable prognosis HL patients have been presented²⁸. Considering only the 158 patients out of 162 enrolled in the trial, in which treatment was adapted to PET-2 results as reported by the local PET center, the 2-year overall and failure free survival was 98% and 88.5%, respectively. The 2-years FFS for PET-2 negative patients was 92.5%, significantly higher than that of the 23 patients with a positive PET-2 (2-years FFS 64%, $P = 0.0002$).

However until now interim PET analysis has been hampered by the interobserver variability of the evaluation of the minimal residual uptake observed after one-3 cycles of chemotherapy. This was due to the absence of firm criteria of interim PET reporting and to the use of end treatment criteria which are inappropriate. In Hodgkin lymphoma (HL), the bystander cells are switched-off very early (1-2 cycles) by chemotherapy⁷. However the residual uptake can be due to chemosensitive residual tumour cells but also to cells of the lymph node micro environment which could be of deleterious prognosis significance (CD68+ macrophages) in HL²⁹. The treatment efficacy is usually judged visually by comparing the residual activity to that of a reference background (RB) which can be nearby background, mediastinal blood pool (MBP) or liver but the optimum cut-off has not been defined yet. Based on the Gallamini Hutchings's series it seems that a SUVmax cut-off of 3.5 in the residual site would exhibit the best discrimination between responders and non responders patients²¹. In this regards the liver as a reference background for interim PET reporting has indeed many advantages over the MBP. Liver has well defined limits with a relatively high SUVmax around 2.5 which stays stable after 2 cycles of chemotherapy. Recently Barrington et al have introduced for the RATHL trial a five point scale grading the residual uptake versus the MBP and the liver³⁰. They have clearly shown in their study that using the liver background gives a much higher intercenter reproducibility than using the

MBP. This scale has been adopted during a consensus meeting in Deauville in 2009 and is now under validation in an international validation study³¹.

FDG PET is a well accepted technique for staging guiding radiotherapy and end therapy assessment in HL. It should be an invaluable tool for prognostic evaluation and guiding patient tailored strategy in the next few years.

References

- Hasenclever D The disappearance of prognostic factors in Hodgkin's disease. *Ann Oncol* 2002;13 Suppl 1:75-8.
- Behringer K, Breuer K, Reineke T, May M, Nogova L, Klimm B, et al. Secondary amenorrhea after Hodgkin's lymphoma is influenced by age at treatment, stage of disease, chemotherapy regimen, and the use of oral contraceptives during therapy: a report from the German Hodgkin's Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol* 2005 Oct 20;23(30):7555-64.
- Josting A, Wiedenmann S, Franklin J, May M, Sieber M, Wolf J, et al. Secondary myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes in patients treated for Hodgkin's disease: a report from the German Hodgkin's Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol* 2003 Sep 15;21(18):3440-6. Epub 2003 Mar 7.
- Engert A, Diehl V, Franklin J, Lohri A, Dörken B, Ludwig Wd, et al. Escalated-Dose BEACOPP in the treatment of patients with advanced-stage Hodgkin's Lymphoma: 10 years of follow-up of the GHSG HD9 study. *J Clin Oncol* 2009 Sep 20;27(27):4548-5.
- Paes FM, Kalkanis DG, Sideras PA, Serafini AN. FDG PET/CT of extranodal involvement in non-Hodgkin lymphoma and Hodgkin disease. *Radiographics*. Jan-Feb 2010;30(1):269-291.
- Pommier P, Dussart S, Girinsky T, et al. Impact of 18F-Fluoro-2-deoxyglucose Positron Emission Tomography on Treatment Strategy and Radiotherapy Planning for Stage I-II Hodgkin Disease: A Prospective Multicenter Study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. May 7 2010.
- Moulin-Romsee G, Hindie E, Cuenca X, et al. (18)F-FDG PET/CT bone/bone marrow findings in Hodgkin's lymphoma may circumvent the use of bone marrow trephine biopsy at diagnosis staging. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. Jun 2010;37(6):1095-1105.
- Kwee TC, Kwee RM, Nievelstein RA. Imaging in staging of malignant lymphoma: a systematic review. *Blood*. Jan 15 2008;111(2):504-516.
- Weiler-Sagie M, Bushelov O, Epelbaum R, et al. (18)F-FDG avidity in lymphoma readdressed: a study of 766 patients. *J Nucl Med*. Jan 2010;51(1):25-30.
- Gallamini A, Fiore F, Sorasio R, Meignan M. Interim positron emission tomography scan in Hodgkin lymphoma: definitions, interpretation rules, and clinical validation. *Leukemia & lymphoma*. Nov 2009;50(11):1761-1764.
- Zijlstra JM, Lindauer-van der Werf G, Hoekstra OS, Hooft L, Riphagen, Il, Huijgens PC. 18F-fluoro-deoxyglucose positron emission tomography for post-treatment evaluation of malignant lymphoma: a systematic review. *Haematologica*. Apr 2006;91(4):522-529.
- Juweid ME, Stroobants S, Hoekstra OS, et al. Use of positron emission tomography for response assessment of lymphoma: consensus of the Imaging Subcommittee of International Harmonization Project in Lymphoma. *J Clin Oncol*. Feb 10 2007;25(5):571-578.
- Cerci JJ, Trindade E, Pracchia LF, et al. Cost effectiveness of positron emission tomography in patients with Hodgkin's lymphoma in unconfirmed complete remission or partial remission after first-line therapy. *J Clin Oncol*. Mar 10 2010;28(8):1415-1421.
- Rigacci L, Castagnoli A, Carpaneto A, Carrai V, Vaggelli L, Matteini M. Can (18)F-FDG PET after first cycle chemotherapy predict the efficacy of therapy in Hodgkin's disease? *Haematologica* 2002 May; 87 (5):ELT24.
- Hutchings M, Mikhaeel NG, Fields PA, Nunan T, Timothy AR. Prognostic value of interim FDG-PET after two or three cycles of chemotherapy in Hodgkin lymphoma. *Ann Oncol* 2005 Jul;16(7):1160-8.
- Hutchings M, Loft A, Hansen M, Pedersen LM, Buhl T, Jurlander J, et al. FDG-PET after two cycles of chemotherapy predicts treatment failure and progression-free survival in Hodgkin lymphoma. *Blood* 2006 Jan 1;107(1):52-9.
- Gallamini A, Rigacci L, Merli F, Nassi L, Bosi A, Capodanno I, et al. The predictive value of positron emission tomography scanning performed after two courses of standard therapy on treatment outcome in advanced stage Hodgkin's disease. *Haematologica* 2006 Apr;91(4):475-81.
- Kostakoglu L, Coleman M, Leonard JP, Kuji I, Zoe H, Goldsmith SJ. PET predicts prognosis after 1 cycle of chemotherapy in aggressive lymphoma and Hodgkin's disease. *J Nucl Med* 2002 Aug;43(8):1018-27.
- Kostakoglu L, Goldsmith SJ, Leonard JP, Christos P, Furman RR, Atasever T, et al. FDG-PET After 1 Cycle of Therapy Predicts Outcome in Diffuse Large Cell Lymphoma and Classic Hodgkin Disease. *Cancer* 2006 Dec 1; 107(11):2678-87.
- Zinzani PL, Tani M, Fanti S, Alinari L, Musuraca G, Marchi E, et al. Early positron emission tomography (PET) restaging: a predictive final response in Hodgkin's disease patients. *Ann Oncol* 2006 Aug;17(8):1296-300.
- Gallamini A, Hutchings M, Rigacci L, Specht L, Merli F, Hansen M, et al. Early interim [18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography is prognostically superior to international prognostic score in advanced-stage Hodgkin's lymphoma: a report from a joint Italian-Danish study. *J Clin Oncol* 2007 Aug 20;25(24):3746-52.
- Terasawa T, Lau J, Bardet S et al.: Fluorine-18-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography for Interim Response Assessment of Advanced-Stage Hodgkin's Lymphoma and Diffuse Large B-Cell Lymphoma: A Systematic Review. *J Clin Oncol* 2009 Apr 10;27(11):1906-14.
- Ziakas PD, Poulou LS. Improving outcome after positive interim PET in advanced Hodgkin's disease: reality vs. expectation. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008 Aug;35(8): 1573-5.
- Dann EJ, Bar-Shalom R, Tamir A, Haim N, Ben-Shachar M, et al. Risk-adapted BEACOPP regimen can reduce the cumulative dose of chemotherapy for standard and high-risk Hodgkin lymphoma with no impairment of outcome. *Blood* 2007 Feb 1;109(3):905-9.
- Avigdor A, Bulvik S, Levi I, Dann EJ, Shemtov N, Perez-Avraham G, et al. Two cycles of escalated BEACOPP followed by four cycles of ABVD utilizing early-interim PET/CT scan is an effective regimen for advanced high-risk Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 2010 Jan;21(1):126-32.
- Gallamini A, Raviolo E, Merli F, Rigacci L, Nassi L, Santini S, et al. Predictive value of positron emission tomography (PET) performed after two cycles of standard chemotherapy on treatment outcome in Hodgkin disease [abstract]. Abstracts for the 6th International Symposium on Hodgkin lymphoma; 2004 Sep 18-21; Cologne, Germany. *Eur J Haematol* 2004 Sep;73 Suppl 65:28:abstract D04.
- Hutchings M, Eigtved A, Specht L. Early prediction of chemotherapy treatment response in Hodgkin lymphoma with positron emission tomography [abstract]. Abstracts for the 6th International Symposium on Hodgkin lymphoma; 2004 Sep 18-21; Cologne, Germany. *Eur J Haematol*. 2004 Sep;73 Suppl 65:29:abstract D05.
- Fiore F, Patti S, Viviani A, Rossi F, Di Raimondo M, Cantonetti T, Feldman A, Biggi S, Barrington A, Gallamini;

Effect of early chemotherapy intensification with BEACOPP in high-risk, interim-PET positive, advanced-stage Hodgkin lymphoma on overall treatment outcome of ABVD. *J Clin Oncol* 28:15s, 2010 (suppl; abstr 8006).

29. Diehl V. Hematology. Are macrophages the bad guys in Hodgkin lymphoma? *Nature reviews*. Jun 2010;7(6): 301-302.
30. Barrington SF, Qian W, Somer EJ, et al. Concordance between four European centres of PET reporting criteria designed for use in multicentre trials in Hodgkin lymphoma. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. May 27 2010.
31. Meignan M, Gallamini A, Meignan M, Gallamini A, Haioun C. Report on the first international workshop on interim-PET scan in lymphoma. *Leukemia & lymphoma*. Aug 2009;50(8):1257-1260.

TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS EN EL LINFOMA DE HODGKIN. PAPEL DE LOS NUEVOS FÁRMACOS EN EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD REFRACTARIA

A. SUREDA

Departament d'Hematologia.

Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona

Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos en el linfoma de Hodgkin

El linfoma de Hodgkin (LH) es una patología altamente sensible al tratamiento de primera línea. Cerca del 90% de los pacientes, incluso aquellos que debutan en estadios avanzados, pueden ser curados con los modernos esquemas de quimioterapia (QT) seguidos en ocasiones de radioterapia (RT)^{1,2}. Aquellos pacientes que son primariamente refractarios o que recaen después de una remisión completa (RC) tienen un peor pronóstico. Las dosis altas de QT seguidas de un trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (TASPE) son consideradas en el momento actual el tratamiento estándar para aquellos pacientes en recaída o refractarios^{3,4}. Sin embargo, los resultados del TASPE dependen en gran parte de una serie de factores pronósticos, entre los cuales cabe destacar el periodo de tiempo entre la primera RC y la primera recaída, el estadio clínico a la recaída y la quimiosensibilidad de la enfermedad antes del TASPE⁵⁻⁹. Por tanto, y a pesar de que el TASPE es capaz de curar a un determinado porcentaje de pacientes, algunos subgrupos no tienen un buen pronóstico con este tratamiento y pueden ser eventualmente candidatos a otras estrategias terapéuticas.

Trasplante alogénico con tratamiento de acondicionamiento mieloablativo en el LH: Una perspectiva histórica

Los primeros estudios que valoraron el papel del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH) en el LH aparecieron a mediados de los años 80^{10,11}. El número de pacientes incluido en estos estudios era escaso y la posibilidad de evaluar el potencial terapéutico de esta estrategia imposible de conseguir. Dos estudios de registro publicados al mismo tiempo desde ambos lados del océano Atlántico ofrecieron perspectivas un tanto desalentadoras. Gajewski analizó 100 pacientes con LH en recaída tratados con un alo-TPH de hermano histocompatible y reportados al International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR)¹². Una proporción significativa de pacientes no estaban en RC antes del trasplante, presentaban un mal estado general y tenían infecciones activas en el momento del trasplante. Casi el 50% de los pacientes recibieron irradiación corporal total (ICT) como tratamiento de acondicionamiento. La supervivencia global (SG), supervivencia libre de enfermedad (SLE) y tasa de recaídas (TR) a los 3 años fueron del 21%, 15% y 65%, respectivamente. Los problemas más importantes en el periodo del postrasplante inmediato fueron la persistencia de la enfermedad de base y las complicaciones infecciosas. El desarrollo de enfermedad del injerto contra el huésped aguda y/o crónica (EICHa/EICHc) no redujo de manera significativa el riesgo de recaída. Al mismo tiempo, Milpied realizó un estudio casos-control dentro del Lymphoma Working Party (LWP) del European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT), incluyendo 45 trasplantes autólogos y 45 trasplantes alogénicos¹³. La SG, supervivencia libre de progresión (SLP), recaída y mortalidad relacionada con el procedimiento (MRP) fueron del 25%, 15%, 61%, y 48% y 37%, 24%, 61%, y 27% después del alo-TPH y del TASPE, respectivamente. La tasa de muertes tóxicas a los 4 años fue significativamente superior en el grupo de alo-TPH ($p = 0,04$). Incluso en aquel subgrupo de pacientes con enfermedad sensible al momento del trasplante, la SG actuarial a los 4 años fue del 30% para el alo-TPH y del 64% para el TASPE ($p = 0,007$). Esta diferencia era debida fundamentalmente a elevada MRP tras el alo-TPH (65% vs. 12%, $p = 0,005$), que estaba básicamente asociada al desarrollo de EICH y/o episodios infecciosos concomitantes. A pesar de que el desarrollo de EICHa grado \geq II se asoció con un riesgo significativamente inferior de recaída, también se encontró asociado con una SG más baja.

A pesar de que los pobres resultados obtenidos con el alo-TPH podían ser en parte explicados por las características especialmente adversas de los pacientes, la elevada MRP demostrada en estos primeros estu-

Tabla 1. Tratamientos de acondicionamiento

Estudio, esquema terapéutico	Referencia	N.º de pacientes	Edad mediana (años)	MRP	Tasa de recaídas	SG	SLP (años)
EBMT, variado	14	89	30	24%	57%	27%	18% a 5 años
UK, AMF	15	49	32	16%	45%	56%	39% a 4 años
España, MF ± ATG	16	40	31	25%	44%	48%	32% a 2 años
Seattle, F + TBI	17	90	28-33	0-18%	40-63%	53-58%	23-51% a 2 años
Houston, MF	18	58	32	15%	55%	64%	32% a 2 años
GITMO, CFT	19	32	-	3%	81%	32%	16% a 3 años

MRP: mortalidad relacionada con el procedimiento; SG: supervivencia global; SLP: supervivencia libre de progresión; EBMT: European Group for Blood and Marrow Transplantation; AMF: fludarabina-melfalán-alemtuzumab; MF ± ATG: fludarabina-melfalán-gammaglobulina antitumoral; MF: fludarabina-melfalán; CFT: ciclofosfamida-fludarabina-tiotepa.

dios hizo que el entusiasmo de la comunidad científica por este procedimiento terapéutico no fuera muy elevado.

Regímenes de acondicionamiento de intensidad reducida

Dada la elevada MRP observada en pacientes con LH tratados con un alo-TPH mieloablato, la utilización de regímenes de intensidad reducida (alo-TIR) pareció una opción potencialmente adecuada. El objetivo de estos tratamientos es la reducción de la toxicidad directamente relacionada con el tratamiento, manteniendo sin embargo una inmunosupresión suficiente para poder facilitar el injerto del donante y permitir el desarrollo posterior del llamado efecto injerto *versus* linfoma. Estos regímenes de intensidad reducida desplazan el efecto antilinfomatoso basado en el propio tratamiento de acondicionamiento hacia el efecto antilinfoma de las células inmunes transferidas con el injerto. La marcada reducción de la toxicidad directamente relacionada con estos esquemas extendió la utilización del alo-TPH a pacientes de edad avanzada, pacientes con comorbidades y pacientes en los que el TASPE había fracasado.

La literatura dispone ahora de diferentes estudios que presentan los resultados a largo plazo del trasplante alogénico con tratamiento de acondicionamiento de intensidad reducida (alo-TIR) en pacientes con LH (Tabla 1). Estos resultados son un poco difíciles de comparar entre sí por la diferente selección de pacientes y de regímenes de acondicionamiento pero, en general, podemos decir que la MRP se ha reducido de manera significativa. Esta reducción en la MRP fue confirmada por el LWP del EBMT que comparó pacientes con LH alotrasplantados con regímenes de acondicionamiento mieloablato frente a pacientes alotrasplantados con regímenes de intensidad reducida entre los años 1997 y 2002¹⁴. La MRP a los 3 años fue del 48% con el es-

quema mieloablato frente a 24% en el grupo de intensidad reducida ($p = 0,003$; Figura 1).

A pesar de que los regímenes de intensidad reducida han permitido la realización de los trasplantes alogénicos de manera más segura, la recaída después del procedimiento es sin duda alguna la causa más frecuente de fracaso del mismo. La intensidad del tratamiento de acondicionamiento/actividad antilinfoma del mismo puede ser un factor importante en la determinación de las tasas de recaída²⁰. Esto puede ser debido a la necesidad de un periodo más largo de remisión clínica para permitir que el efecto injerto *versus* linfoma haga su efecto. La respuesta injerto *versus* linfoma temprana está con frecuencia retrasada debido a la utilización de fármacos inmunosupresores para prevenir la EICH tras la utilización de un inóculo con células linfoides T o la utilización de un inóculo deplecionado de células T, pero que con frecuencia necesita de la infusión de linfocitos del donante (ILDs) posteriormente. Algunos regímenes no mieloablato se asocian a tasas de recaída muy elevadas^{17,19}. Este concepto de in-

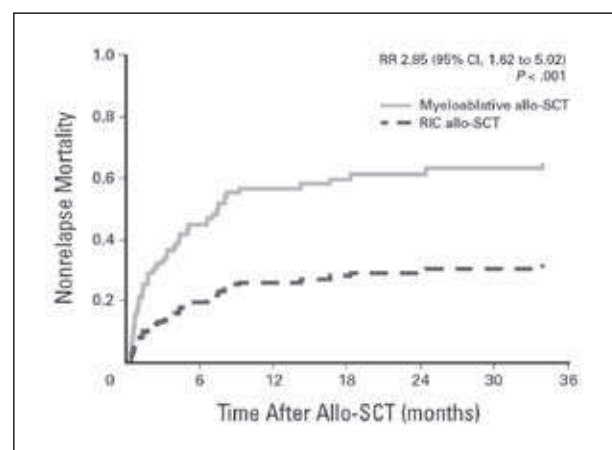


Figura 1. Mortalidad relacionada con el procedimiento tras el trasplante alogénico en el linfoma de Hodgkin en función de la intensidad del régimen de acondicionamiento. Sureda et al. JCO, 2008.

tensidad de dosis está también apoyado por los datos del estudio comparativo del EBMT, en donde la tasa de recaídas después de un alo-TPH mieloablatoivo fue del 32% frente a un 58% después de un trasplante de intensidad reducida¹⁴. Además, dentro del tratamiento de acondicionamiento de intensidad reducida, la tasa de recaídas más elevada y la menor SG se observa en aquellos pacientes que reciben un tratamiento de acondicionamiento basado en dosis bajas de ICT ($p < 0,04$), uno de los regímenes con menor toxicidad. Otros estudios también han demostrado mejores resultados a largo plazo de aquellos pacientes alotrasplantados con regímenes más intensos que contienen fludarabina y melfalán²⁰ y el esquema BEAM-alemtuzumab ha demostrado también conseguir un buen control de la enfermedad a medio plazo²¹.

Factores pronósticos para los resultados a largo plazo del alo-TIR

El LWP del EBMT realizó un estudio retrospectivo que incluía una población de 285 pacientes con LH refractario o en recaída tratados con un alo-TIR con el objetivo de identificar factores pronósticos para el seguimiento a largo plazo²². Sesenta pacientes fallecieron de MRP tras una mediana de 90 días del alo-TIR. La incidencia acumulada de la MRP a los 100 días, un año y dos años fue del 11%, 19% y 21%, respectivamente. En el estudio multivariado, los factores pronósticos adversos para la MRP fueron el mal estado general al alo-TIR, la enfermedad refractaria al alo-TIR, la edad superior a 45 años y el haber realizado el trasplante antes del año 2002.

Con una mediana de seguimiento de 26 meses (extremos, 3-94) meses, 126 pacientes estaban vivos y 159 habían fallecido. La SG y SLP estimadas al año, dos y tres años fueron del 67% y 52%, 43% y 39%, 29% y 25%, respectivamente. En el análisis multivariado, los pacientes en RC o enfermedad quimiosensible, aquellos con un buen estado general, ausencia de diferencia de sexo entre donante y receptor y serología CMV -/- presentaron una SG significativamente mejor. Para la SLP un buen estado general al alo-TPH, el ir al trasplante en RC o enfermedad quimiosensible y pareja donante-receptor diferente a receptores masculinos y donante femeninos se asociaron a mejores resultados en el estudio multivariado. Considerando la enfermedad refractaria y el mal estado general como factores pronósticos adversos tanto para SG como SLP, aquellos pacientes sin ningún factor de mal pronóstico presentaron una SLP y SG a los 3 años del 42% y 56% frente al 8% y 25% de los pacientes con uno o dos factores de mal pronóstico.

Estos resultados están de acuerdo con lo que previamente se había publicado en series más pequeñas. El Grupo Cooperativo de UK también ha reportado que

la situación de la enfermedad de base al trasplante es el factor pronóstico más importante tanto para la SG como para la SLP, siendo los resultados significativamente mejores para aquellos pacientes que fueron al trasplante en RC¹⁵. La situación de la enfermedad de base fue también el factor predictivo más importante para los pacientes incluidos dentro de la serie española¹⁶ al igual que los de la serie actualizada del MD Anderson Cancer Center¹⁸, a pesar de que en ambos estudios el número de pacientes incluido fue demasiado pequeño como para poder realizar estudios más específicos.

Evidencia de la existencia de un efecto injerto frente a un linfoma

A pesar de que el alo-TIR está basado desde el punto de vista teórico en la existencia de un efecto injerto *versus* linfoma, existen pocos estudios que sean capaces de demostrar de manera convincente su actividad en el terreno del LH. Muchos de los estudios realizados con tratamiento de acondicionamiento mieloablatoivo se encontraban asociados a una MRP tan elevada que hubiera sido casi completamente imposible evidenciar un efecto injerto *versus* linfoma si éste hubiera existido. En el contexto del alo-TIR parece existir una cierta evidencia de reducción de la tasa de recaídas después del trasplante cuando se desarrolla EICH.

La evidencia más convincente de la actividad del efecto del injerto contra el LH proviene de la utilización de ILDs para tratar a aquellos pacientes que recaen después del alo-TPH. La tasa de respuestas a las ILDs se ha reportado entre el 15% y el 54%, con RC en aproximadamente el 30% de los pacientes. Algunos de los pacientes habían recibido al mismo tiempo QT o RT pero también se han visto respuestas ante la infusión de linfocitos solos y éstas han sido duraderas. Parece existir una tasa de respuestas a las ILDs más elevadas en la serie de UK y no está claro si es la más elevada incidencia de quimerismo mixto en los pacientes que reciben alemtuzumab la que promueve respuestas de tipo injerto *versus* tumor, al igual que sucede en modelos animales. La dosis óptima de linfocitos T a administrar para conseguir un efecto beneficioso injerto *versus* receptor es desconocida aún en el momento actual, a pesar de que muchos grupos están utilizando una pauta de dosis escalada para intentar reducir el riesgo y severidad de la EICH. A diferencia de lo que sucede con el linfoma folicular, existe evidencia preliminar que indica que frente a una clara recaída de la enfermedad de base, en el LH no se desarrolla un efecto beneficioso injerto frente a tumor en ausencia de EICH.

Papel del alo-TIR en los pacientes que recaen tras un TASPE

El TASPE ha demostrado que es capaz de rescatar adecuadamente a aquellos pacientes que recaen después de un tratamiento inicial o son primariamente refractarios^{3,4}.

Por el contrario, los resultados del alo-TPH mioablativo han sido muy decepcionantes en pacientes con LH, debido básicamente a la elevada MRP. No existen estudios aleatorizados prospectivos que comparen el TASPE con el alo-TPH, sin embargo un estudio retrospectivo del EBMT demuestra mejoría en la supervivencia de aquellos pacientes que son alotrasplantados tras una recaída después de un TASPE y el alo-TPH se acabó convirtiendo en el tratamiento de consolidación de elección en pacientes en recaída o refractarios¹⁷. A pesar de los excelentes resultados que el TASPE puede conseguir en determinados subgrupos de pacientes, existe un subgrupo de pacientes que progresa/recae después de un TASPE y cuyo pronóstico es extremadamente pobre, con una supervivencia mediana después de la recaída inferior a un año^{23,24}.

Aunque algunos pacientes pueden conseguir buenos resultados a largo plazo tras la realización de un segundo trasplante autólogo, éstos representan en general un grupo seleccionado de pacientes que representan recaídas tardías (más allá de los 3 años) después de un primer trasplante²⁵. Aparte de este pequeño grupo de pacientes que puede beneficiarse de un segundo trasplante autólogo, hay otros que pueden no ser candidatos a un alo-TPH. Estos últimos pueden incluir pacientes con enfermedad agresiva y pobremente controlada o pacientes con múltiples comorbidades que son considerados no aptos para el procedimiento.

Con el desarrollo de los tratamientos de acondicionamiento de intensidad reducida, el interés por el alo-TPH como tratamiento de rescate de aquellos pacientes que recaen después de un TASPE se ha incrementado de manera significativa^{20,26}. Esto es debido a la drástica reducción de la MRP asociada al desarrollo de los mismos¹⁵. A pesar de que no existen estudios aleatorizados que comparen los resultados de la QT ± RT en pacientes recaídos después de un TASPE con los del alo-TPH, sí que se han realizado comparaciones con grupos controles. El grupo cooperativo de UK identificó un grupo de pacientes que recayeron después de un TASPE acondicionado con BEAM, que presentaban una recaída quimiosensible y que habían sobrevivido como mínimo 12 meses después de la recaída y, por tanto, podían haber sido eventuales candidatos para un alo-TIR²⁷. Estos pacientes fueron comparados con otro grupo de pacientes tratados más recientemente con un alo-TIR. Estos dos grupos no di-

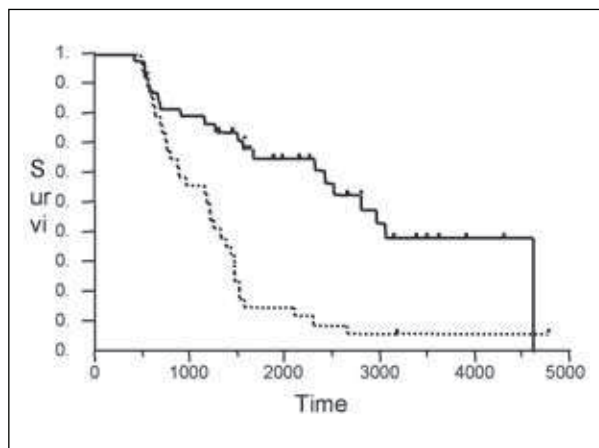


Figura 2. Supervivencia global desde el trasplante autólogo para el grupo del trasplante alogénico (n = 38; línea sólida) y el grupo control (n = 34; línea punteada). Supervivencia global estimada a los 5 años para el grupo del trasplante 65% y para el grupo control 15%, $p < 0.0001$. Thomson et al., BMT, 2008.

ferían entre sí en edad, número de líneas previas de QT o en tiempo desde el diagnóstico hasta el TASPE, pero sí había una pequeña diferencia entre el tiempo de la recaída hasta el TASPE (13 meses en el grupo alo-TIR vs. 10 meses en el grupo tratado de manera convencional). Por el contrario, el 34% de los pacientes del grupo alo-TIR tenían una enfermedad quimiorrefractaria al trasplante. Tanto la SG desde el diagnóstico como desde el TASPE fueron significativamente mejores para aquellos pacientes tratados con un alo-TIR. La SLP de todos los pacientes alotrasplantados fue del 34% a los 5 años y del 42% en el subgrupo de pacientes quimiosensibles, lo que sugiere que estos resultados iniciales prometedores se pueden acabar transformando en una mejor supervivencia a largo plazo (Figura 2). Un estudio similar que incluía un grupo de 161 pacientes con LH en recaída después de un TASPE y que fueron separados en función de la disponibilidad o no de donante para la realización de un alo-TPH demostró también beneficios significativos en términos de SG y SLP para aquellos pacientes con donante y que al final fueron alotrasplantados²⁸.

En resumen, el alo-TPH es en el momento actual una estrategia terapéutica que ha retomado notable interés en el campo del LH al conseguirse reducir de manera significativa la MRP con la utilización de los regímenes de intensidad reducida. En el momento actual, el problema más importante es la tasa elevada de recaídas después del trasplante. A pesar de que el trasplante alogénico no tiene aún ninguna indicación considerada como estándar, los resultados de la literatura parecen indicar que aquellos pacientes que recaen después de un TASPE y en los que se les puede realizar un alo-TPH tiene mejor pronóstico que aquellos que son tratados con QT convencional.

Papel de los nuevos fármacos en el tratamiento de la enfermedad refractaria

Los avances recientes en la patología, biología e inmunología del LH han permitido identificar diferentes moléculas diana que están en el momento actual bajo investigación preclínica y clínica^{29,30}. Por ejemplo, las células de Hodgkin y las de Reed-Sternberg (CRS) expresan diferentes receptores que pertenecen a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF), entre los cuales podemos incluir receptores pro-supervivencia (CD30, CD40, TACI, BCMA y RANK) y receptores pro-muerte celular (Fas y receptores tipo 1 y 2 de muerte celular TRAIL)^{31,32}. Los receptores pro supervivencia comparten similares funciones biológicas, incluyendo la inducción de citoquinas y la secreción de chemoquinas, y la activación de determinadas vías de señalización celular como NF- κ B, ERK/MAPK, y PI3-kinasa/Akt/mTOR^{33,34}. Estos receptores están siendo explorados como estrategias terapéuticas novedosas mediante la utilización de gran variedad de anticuerpos monoclonales (AcMo).

CD30

La densa expresión del antígeno CD30 en las CRS, junto con su altamente restringida expresión, lo convierte en una diana obvia para el desarrollo de AcMo terapéuticos^{35,36}. Aparte de en su forma transmembrana, CD30 también se encuentra en una forma soluble que puede ser detectada en el suero de pacientes con linfoma anaplásico de células T y con LH³⁷⁻³⁹. Por tanto, y a diferencia de lo que sucede con CD20 que no es frecuente detectarlo en suero, la presencia de CD30 soluble puede eventualmente atenuar la eficacia terapéutica de los Ac anti-CD30.

Los resultados de dos ensayos clínicos que utilizaban AcMo anti-CD30 desnudos de primera generación en pacientes con LH en recaída dieron resultados desalentadores, quizá debido a una unión antigénica pobre y/o a propiedades de activación de las células efectoras^{40,41}. Otra posibilidad que se consideró fue que el antígeno CD30 circulante soluble neutralizara *in vivo* la actividad de estos anticuerpos.

En el momento actual, se están desarrollando diferentes estrategias para mejorar la eficacia terapéutica de los anticuerpos anti-CD30. Por ejemplo y en un intento de obviar el efecto neutralizante del antígeno CD30 soluble, es posible en el momento actual construir un anticuerpo anti-CD30 que se pueda unir de manera selectiva a la forma transmembrana⁴². Sin embargo, esta aproximación no ha sido testada desde el punto de vista clínico. Una aproximación diferente pretendía mejorar la unión al antígeno y la afinidad y especificidad del receptor Fc α IIIA al anticuerpo.

Para conseguirlo, se humanizó un anticuerpo quimérico anti-CD30 cAC10^{43,44}. Estudios *in vitro* demostraron que XmAb2513 tenía una actividad antiproliferativa más potente comparada con la de los anticuerpos cAC10 y 5F11. En el momento actual, existe un estudio en fase I con XmAb2513 que está reclutando pacientes en Estados Unidos⁴⁵. Se han incluido 17 pacientes que han recibido dosis de entre 0,3 mg/kg a 12 mg/kg cada 2 semanas sin haber alcanzado aún la máxima dosis tolerada. Un paciente tratado con dosis de 9 mg/kg consiguió una RP, sugiriendo que este nuevo Ac podría ser más activo que los anticuerpos de primera generación.

Utilizando una estrategia alternativa, el AcMo anti-CD30 cAC10 se conjugó a un agente antimicrotubulo sintético, monometil-auristatina E (MMAE), dando lugar a una nueva inmunotoxina conjugada llamada SGN-35⁴⁶. El anticuerpo es utilizado como un sistema de entrega y, por tanto, es capaz de demostrar una potente eficacia terapéutica independiente de la citotoxicidad mediada por anticuerpos. SGN-35 ha sido recientemente evaluado en dos ensayos clínicos fase I, en donde se incluyeron pacientes con linfoma anaplásico y con LH. En el primer estudio, SGN-35 era administrado por vía endovenosa cada 3 semanas⁴⁷. Se incluyeron un total de 45 pacientes que fueron tratados con dosis de entre 0,1 y 3,6 mg/kg. Cuarenta y dos tenían un LH refractario, 76% de los cuales habían fracasado a un TASPE previo. El tratamiento fue aceptablemente tolerado, a pesar de que las toxicidades limitantes de dosis (neutropenia e hiperglicemia) se observaron con la utilización de dosis superiores a 1,8 mg/kg. Un 37% de los pacientes consiguió una RP o una RC y el 88% de los pacientes presentaron una reducción de la masa tumoral⁴⁷. Otro estudio fase I evaluó la eficacia y toxicidad de SGN-35 administrado de manera semanal⁴⁸. Resultados preliminares demostraron que pueden administrarse de manera segura dosis de hasta 1,2 mg/kg. De 17 pacientes evaluables, 7 consiguieron una RC, uno una RP resultando en una tasa de respuestas global del 88%. En el momento actual SGN-35 está siendo evaluado en dos ensayos clínicos fase II que buscan la aprobación del fármaco en linfoma anaplásico y LH. También en pacientes con LH y alto riesgo de recaída después de un TASPE se acaba de iniciar un ensayo a nivel internacional que valora SGN-35 como tratamiento de mantenimiento post-TASPE frente a placebo en un intento de reducir la tasa de recaídas después del procedimiento autólogo.

Inhibidores de las histonas deacetilasas

Está bien establecido el hecho de que la modificación postranscripcional de las histonas desempeña un papel

importante en la transcripción génica y está mediada por diversas enzimas, entre las cuales se encuentran las histonas acetiltransferasas (HAT) y las histonas deacetilasas (DAC)⁴⁹. Estas enzimas median la acetilación y deacetilación de residuos de lisina específicos de proteínas histonas y no histonas, incluyendo factores de transcripción (p53, STAT3, MYC, GATA-1, GATA-2, E2F, NF- κ B, receptores nucleares, HIF-1 α y TEL), α -tubulina y HSP90^{49,50}. El equilibrio entre HAT y DAC es crítico para regular la expresión y el estado funcional de una gran variedad de proteínas que están involucradas en la proliferación, supervivencia, angiogénesis e inmunidad⁵¹⁻⁵³. Hasta el momento, se han identificado 18 HDAC en humanos y éstas están agrupadas en dos categorías diferentes: HDAC dependientes de zinc y HDAC dependientes de NAD^{54,55}. Además, las HDAC están clasificadas en 4 clases diferentes: clase I (HDAC 1, 2, 3, 8 y 11); clase II (HDAC 4, 5, 6, 7, 9 y 10); clase III (SIRT 1-7) y clase IV (HDAC 11). Las HDAC de clase III son dependientes de NAD, mientras que las otras clases son dependientes de zinc.

En el momento actual existen diferentes inhibidores farmacológicos de las HDAC dependientes de zinc que pueden ser utilizadas dentro de ensayos clínicos, sin embargo, sólo un inhibidor (vorinostat, SAHA) ha sido aprobado recientemente por la Food and Drug Administration (FDA). Vorinostat y panobinostat (LBH 589) inhiben las HDAC clase I y II (los llamados paninhibidores), mientras que MGCD1030 y etinostat (SNDX-275, anteriormente MS-275) inhiben preferentemente las de clase I (inhibidores llamados selectivos).

A pesar de que las CRS son de origen B, sólo muy infrecuentemente expresan antígenos B⁵⁶. Esta pérdida del fenotipo B ha demostrado estar regulada de manera epigenética y puede ser reversible desde el punto de vista terapéutico^{57,58}. Algunos inhibidores de las HDAC tienen actividad antiproliferativa *in vitro* frente a líneas celulares de CRS. En un estudio reciente, vorinostat ha demostrado inducir apoptosis en líneas celulares de LH y mostrar sinergismo con la QT⁵⁹. Además, vorinostat inhibió la fosforilación y transcripción de STAT6 en líneas celulares de LH, un efecto que se vio asociado con un descenso en la expresión y secreción de citoquinas tipo T_H2 y quemoquinas⁶⁰. Finalmente, los inhibidores de las HDAC, solos o en combinación con agentes demetilantes, han demostrado inducir la expresión del antígeno carcinogénico testicular (CTA) y, por tanto, pueden ser capaces de inducir *in vivo* respuestas antitumorales favorables⁶¹.

Dos paninhibidores de las HDAC están siendo investigados para el tratamiento del LH en recaída. En el primer estudio, panobinostat fue evaluado en el contexto de un ensayo fase I que incluía también pacientes con LH en recaída⁶². Cinco de 13 pacientes (38%) consiguieron remisiones parciales. Los efectos secundarios más frecuentes incluyeron fatiga, trom-

bocitopenia, náuseas y diarrea. Basado en esta actividad clínica tan prometedora, recientemente se ha finalizado la inclusión de un estudio internacional fase II que considera la utilización de panobinostat en pacientes con LH en recaída para confirmar estos resultados preliminares⁶³. En un segundo estudio, el *Southwest Oncology Group* (SWOG) utilizó vorinostat en pacientes con LH en recaída⁶⁴. Veinticinco pacientes fueron tratados con 200 mg de vorinostat, administrado dos veces al día durante 14 días en ciclos de 21 días. A diferencia de panobinostat, vorinostat sólo tiene una actividad clínica modesta en esta situación; un solo paciente (4%) consiguió una remisión parcial.

De manera colectiva, tanto los inhibidores de clase I como clase II demuestran actividad clínica valorable en pacientes con LH en recaída y multitratados previamente. Estudios futuros deberían examinar el patrón de expresión de HDAC en el LH para determinar si un determinado patrón de expresión puede predecir respuestas al tratamiento. Además, puesto que los inhibidores de HDAC son capaces de modular una gran variedad de proteínas relacionadas con la supervivencia, deberían investigarse también regímenes en combinación.

Rituximab

El anticuerpo monoclonal anti-CD20 rituximab fue evaluado en el tratamiento de pacientes con LH clásico. A pesar de que el antígeno CD20 no es expresado frecuentemente en las CRS, sí es altamente expresado en las células B que forman parte del microambiente. En este sentido, se hipotetizó que las remisiones clínicas inducidas por rituximab en pacientes con LH clásico eran debidas a la depleción de las células B del microambiente, al ataque directo sobre las pocas CRS que expresaban CD20 y quizá, también al ataque directo a los progenitores de las CRS⁶⁵. En un estudio piloto llevado a cabo en el MD Anderson Cancer Center se trataron 22 pacientes con LH clásico en recaída (6 de los cuales demostraron expresión para el CD20) con 6 dosis semanales de rituximab⁶⁶. Cinco (22%) pacientes consiguieron remisión completa o parcial de manera independiente a la expresión de CD20 y las respuestas se limitaron a aquellos pacientes que sólo tenían enfermedad nodal.

En un estudio posterior, los mismos investigadores combinaron rituximab con ABVD en 52 pacientes con LH clásico de recién diagnóstico⁶⁷. Con una mediana de seguimiento de 32 meses, la supervivencia libre de evento (SLEv) estimada fue del 82% y la SG del 100%. La SLEv mejoró en todos los diferentes grupos de riesgo: fue del 92% en aquellos pacientes con un máximo de 1 factor de mal pronóstico, del 86% en aquellos pa-

cientes que presentaron como máximo 2 factores de mal pronóstico y del 73% en aquellos pacientes con 3 a 5 factores de riesgo. En el momento actual, estos datos están siendo confirmados en un estudio multicéntrico aleatorizado, en donde ABVD es comparado con rituximab-ABVD.

Lenalidomida

Dos grupos independientes han investigado la eficacia de lenalidomida en pacientes con LH resistente o refractario. En el primer estudio, Fehniger *et al.* reportaron su experiencia con lenalidomida administrada a dosis de 25 mg al día en ciclos de 21 o 28 días⁶⁸. El tratamiento se mantenía hasta la progresión de la enfermedad o la aparición de efectos secundarios inaceptables. A pesar de que se admitieron reducciones de dosis para paliar toxicidades hematológica y no hematológica, 4 de los 12 pacientes evaluables respondieron (1 remisión completa y 3 respuestas parciales). El 47% de los pacientes desarrolló neutropenia grados 3-4 y el 27%, trombopenia. En un segundo estudio, Kuruvilla *et al.* trataron a 15 pacientes con LH refractario con el mismo esquema terapéutico que el estudio anterior⁶⁹. Dos pacientes consiguieron una remisión completa y 7 una enfermedad estable, con una mediana de tiempo a la progresión de 3,2 meses. Seis pacientes pararon el tratamiento debido a progresión de la enfermedad y cinco debido a toxicidad por el fármaco. Cuatro pacientes desarrollaron neutropenia grados 3-4 y trombopenia y 5 pacientes toxicidad cutánea grados 1-2. Estos datos indican cierta eficacia de lenalidomida como agente único en el tratamiento de los pacientes con LH en recaída o refractario.

Bendamustina

Finalmente, existen datos de la eficacia de bendamustina como fármaco único en el tratamiento del LH refractario⁷⁰. En este estudio fase II, en donde se pretende la utilización de bendamustina como tratamiento de rescate antes de la realización de un alo-TPH, fueron incluidos 18 pacientes. Bendamustina fue utilizada a dosis de 120 mg/m² ev x 2 días en ciclos de 28 días. De los 16 pacientes evaluables para respuesta, 2 progresaron rápidamente antes de la primera evaluación. De los 14 restantes, 12 respondieron dando lugar a una tasa de respuestas global del 75% (6 RC y 6 remisiones parciales). La toxicidad grado 3-4 más importante fue la hematológica, mientras que las náuseas y los vómitos constituyeron los efectos secundarios no hematológicos más frecuentes.

En resumen, en el momento actual existen una serie de nuevos fármacos que han demostrado actividad

clínica prometedora en pacientes con LH en recaída o refractarios. Queda por decidir, y éste será uno de los objetivos de la investigación en los próximos años, la eficacia de combinaciones de estos nuevos fármacos, así como el momento más adecuado para su empleo dentro del esquema terapéutico actual de los pacientes con LH.

Bibliografía

1. Horning SJ, Hoppe RT, Breslin S, Bartlett NL, Brown BW, Rosenberg SA. Stanford V and radiotherapy for locally extensive and advanced Hodgkin's disease: mature results of a prospective clinical trial. *J Clin Oncol* 2002; 20: 630-7.
2. Diehl V, Franklin J, Pfreundschuh M et al. Standard and increased-dose BEACOPP chemotherapy compared with COPP-ABVD for advanced Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 2003; 348: 2386-95.
3. Linch DC, Winfield D, Goldstone AH et al. Dose intensification with autologous bone-marrow transplantation in relapsed and resistant Hodgkin's disease: results of a BNLI randomised trial. *Lancet* 1993; 341: 1050-4.
4. Schmitz N, Pfistner B, Sextro M et al. Aggressive conventional chemotherapy compared with high dose chemotherapy with autologous haematopoietic stem cell transplantation for relapsed chemosensitive Hodgkin's disease: a randomised trial. *Lancet* 2002; 359: 2065-71.
5. Sureda A, Arranz R, Iriando A et al. Autologous stem cell transplantation for Hodgkin's disease: results and prognostic factors in 494 patients from the Grupo Español de Linfomas/Transplante Autólogo de Médula Ósea Spanish Cooperative Group. *J Clin Oncol* 2001; 19: 1395-404.
6. Lazarus HM, Loberiza FR, Zhang M-J et al. Autotransplants for Hodgkin's disease in first relapse or second remission: a report from the autologous blood and marrow transplant registry (ABMTR). *Bone Marrow Transplant* 2001; 27: 387-96.
7. Horning SJ, Chao NJ, Negrin RS, et al. High-dose therapy and autologous hematopoietic progenitor cell transplantation for recurrent or refractory Hodgkin's disease: analysis of the Stanford University results and prognostic indices. *Blood* 1997; 89: 801-13.
8. Brice P, Bouabdallah R, Moreau P et al. Prognostic factors for survival after high-dose therapy and autologous stem cell transplantation for patients with relapsing Hodgkin's disease: analysis of 280 patients from the French registry. *Bone Marrow Transplant* 1997; 20: 21-6.
9. Sweetenham JW, Taghipour G, Milligan D et al, on behalf of the Lymphoma Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. High-dose therapy and autologous stem cell rescue for patients with Hodgkin's disease in first relapse after chemotherapy: results from the EBMT. *Bone Marrow Transplant* 1997; 20: 745-52.
10. Appelbaum FR, Sullivan KM, Thomas ED et al. Allogeneic marrow transplantation in the treatment of MOPP-resistant Hodgkin's disease. *J Clin Oncol* 1985; 3: 1490-4.
11. Phillips GL, Reece DE, Barnett MJ et al. Allogeneic marrow transplantation for refractory Hodgkin' disease. *J Clin Oncol* 1989; 7: 1039-45.
12. Gajewski JL, Phillips GL, Sobocinski KA et al. Bone marrow transplants from HLA-identical siblings in advanced Hodgkin's disease. *J Clin Oncol* 1996; 14: 572-8.
13. Milpied N, Fielding AK, Pearce RM, Ernst P, Goldstone AH. Allogeneic bone marrow transplant is not better than autologous transplant for patients with relapsed Hodgkin's disease. *J Clin Oncol* 1996; 14: 1291-6.

14. Sureda A, Robinson S, Canals C et al. Reduced-intensity conditioning compared with conventional allogeneic stem-cell transplantation in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma: an analysis from the Lymphoma Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *J.Clin.Oncol.* 2008; 26: 455-462.
15. Peggs KS, Hunter A, Chopra R et al. Clinical evidence of a graft-versus lymphoma effect after reduced intensity allogeneic transplantation. *Lancet* 2005; 365: 1906-8.
16. Alvarez I, Sureda A, Caballero D et al. Nonmyeloablative stem cell transplantation is an effective therapy for refractory or relapsed Hodgkin's lymphoma: results of a Spanish Prospective Cooperative Protocol. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12: 172-83.
17. Burroughs LM, O'Donnell PV, Sandmaier BM et al. Comparison of outcomes of HLA-matched related, unrelated, or HLA-haploidentical related hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning for relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; 14: 1279-1287.
18. Anderlini P, Saliba R, Acholonu S et al. Fludarabine-melphalan as a preparative regimen for reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation in relapsed and refractory Hodgkin's lymphoma: the updated M.D. Anderson Cancer Center experience. *Haematologica* 2008; 93: 257-64.
19. Corradini P, Doderio A, Farina L et al. Allogeneic stem cell transplantation following reduced-intensity conditioning can induce durable clinical and molecular remissions in relapsed lymphomas: pre-transplant disease status and histotype heavily influence outcome. *Leukemia* 2007; 21: 2316-2323.
20. Anderlini P, Saliba R, Acholonu S et al. Reduced-intensity allogeneic stem cell transplantation in relapsed and refractory Hodgkin's disease: low transplant-related mortality and impact of intensity of conditioning regimen. *Bone Marrow Transplant* 2005; 35: 943-951.
21. Faulkner RD, Craddock C, Byrne JL et al. BEAM-alemtuzumab reduced-intensity allogeneic stem cell transplantation for lymphoproliferative diseases: GVHD, toxicity, and survival in 65 patients. *Blood* 2004; 103: 428-434.
22. Robinson SP, Sureda A, Canals C et al. Reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation for Hodgkin's lymphoma: identification of prognostic factors predicting outcome. *Haematologica* 2009; 94: 230-238.
23. Vose JM, Bierman PJ, Anderson JR et al. Progressive disease after high-dose therapy and autologous transplantation for lymphoid malignancy: clinical course and patient follow-up. *Blood* 1992; 80: 2142-2148.
24. Varterasian M, Ratanatharathorn V, Uberti JP et al. Clinical course and outcome of patients with Hodgkin's disease who progress after autologous transplantation. *Leuk Lymphoma* 1995; 20: 59-65.
25. Smith SM, van BK, Carreras J et al. Second autologous stem cell transplantation for relapsed lymphoma after a prior autologous transplant. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; 14: 904-912.
26. Carella AM, Beltrami G, Carella M, Jr et al. Immunosuppressive non-myeloablative allografting as salvage therapy in advanced Hodgkin's disease. *Haematologica* 2001; 86: 1121-1123.
27. Thomson KJ, Peggs KS, Smith P et al. Superiority of reduced-intensity allogeneic transplantation over conventional treatment for relapse of Hodgkin's lymphoma following autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41: 765-770.
28. Sarina B, Castagna L, Farina L, et al. Allogeneic transplantation improves the overall and progression-free survival of Hodgkin lymphoma patients relapsing after autologous transplantation: a retrospective study based on the time of HLA typing and donor availability. *Blood* 2010; 115: 3671-3677.
29. Buglio D, Georgakis G, Younes A. Novel small-molecule therapy of Hodgkin lymphoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2007; 7: 735-740.
30. Kuppers R. The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 15-27.
31. Clodi K, Younes A. Reed-Sternberg cells and the TNF family of receptors/ligands. *Leuk Lymphoma* 1997; 27: 195-205.
32. Fiumara P, Snell V, Li Y, et al. Functional expression of receptor activator of nuclear factor kappaB in Hodgkin disease cell lines. *Blood* 2001; 98: 2784-2790.
33. Younes A, Garg A, Aggarwal BB. Nuclear transcription factor-kappa B in Hodgkin's disease. *Leuk Lymphoma* 2003; 44: 929-935.
34. Zheng B, Fiumara P, Li YV, et al. MEK/ERK pathway is aberrantly active in Hodgkin disease: a signaling pathway shared by CD30, CD40, and RANK that regulates cell proliferation and survival. *Blood* 2003; 102: 1019-1027.
35. Younes A, Carbone A. CD30/CD30 ligand and CD40/CD40 ligand in malignant lymphoid disorders. *Int J Biol Markers* 1999; 14: 135-143.
36. Younes A, Aggarwal BB. Clinical implications of the tumor necrosis factor family in benign and malignant hematologic disorders. *Cancer* 2003; 98: 458-467.
37. Pizzolo G, Vinante F, Morosato L, et al. High serum level of the soluble form of CD30 molecule in the early phase of HIV-1 infection as an independent predictor of progression to AIDS. *AIDS* 1994; 8: 741-745.
38. Fattovich G, Vinante F, Giustina G, et al. Serum levels of soluble CD30 in chronic hepatitis B virus infection. *Clin Exp Immunol* 1996; 103: 105-110.
39. Giacomelli R, Cipriani P, Lattanzio R, et al. Circulating levels of soluble CD30 are increased in patients with systemic sclerosis (SSc) and correlate with serological and clinical features of the disease. *Clin Exp Immunol* 1997; 108: 42-46.
40. Bartlett NL, Younes A, Carabasi MH, et al. A phase 1 multidose study of SGN-30 immunotherapy in patients with refractory or recurrent CD30+ hematologic malignancies. *Blood* 2008; 111: 1848-1854.
41. Ansell SM, Horwitz SM, Engert A, et al. Phase I/II study of an anti-CD30 monoclonal antibody (MDX-060) in Hodgkin's lymphoma and anaplastic large-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2007; 25: 2764-2769.
42. Nagata S, Ise T, Onda M, et al. Cell membrane-specific epitopes on CD30: potentially superior targets for immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 7946-7951.
43. Hammond PW, Vafa O, Jacinto J, et al. A humanized anti-CD30 monoclonal antibody, XmAbTM2513, with enhanced in vitro potency against CD30-positive lymphomas mediated by high affinity Fc-receptor binding [abstract]. *Blood* 2005; 106: 1470.
44. Lawrence CE, Hammond PW, Zalevsky J, et al. XmAbTM2513, an Fc engineered humanized anti-CD30 monoclonal antibody, has potent in vitro and in vivo activities, and has the potential for treating hematologic malignancies [abstract]. *Blood* 2007; 110: 2340.
45. Younes A, Zalevsky J, Blum KA, et al. Evaluation of the pharmacokinetics, immunogenicity, and safety of XmAb(R)2513 in the ongoing study XmAb2513-01: a phase 1 study of every other week XmAb2513 to evaluate the safety, tolerability, and pharmacokinetics in patients with Hodgkin lymphoma or anaplastic large cell lymphoma [abstract]. *Blood* 2008; 112: 5012.
46. Ofazoglu E, Kissler KM, Sievers EL, Grewal IS, Gerber HP. Combination of the anti-CD30-auristatin-E antibody-drug conjugate (SGN-35) with chemotherapy improves antitumor activity in Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol* 2008; 142: 69-73.
47. Younes A, Forero-Torres A, Bartlett NL, et al. Multiple complete responses in a phase 1 dose-escalation study of the an-

- tibody-drug conjugate SGN-35 in patients with relapsed or refractory CD30-positive lymphomas [abstract]. *Blood* 2008; 112: 1006.
48. Bartlett N, Forero-Torres A, Rosenblatt J, et al. Complete remissions with weekly dosing of SGN-35, a novel antibody-drug conjugate (ADC) targeting CD30, in a phase I dose-escalation study in patients with relapsed or refractory Hodgkin lymphoma (HL) or systemic anaplastic large cell lymphoma (sALCL) [abstract]. *Proc ASCO* 2009; 27: 8500.
 49. Glozak MA, Seto E. Histone deacetylases and cancer. *Oncogene* 2007; 26: 5420–5432.
 50. Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* 2005; 363: 15–23.
 51. Heider U, Kaiser M, Sterz J, et al. Histone deacetylase inhibitors reduce VEGF production and induce growth suppression and apoptosis in human mantle cell lymphoma. *Eur J Haematol* 2006; 76: 42–50.
 52. Wang S, Yan-Neale Y, Cai R, Alimov I, Cohen D. Activation of mitochondrial pathway is crucial for tumor selective induction of apoptosis by LAQ824. *Cell Cycle* 2006; 5: 1662–1668.
 53. Brogdon JL, Xu Y, Szabo SJ, et al. Histone deacetylase activities are required for innate immune cell control of Th1 but not Th2 effector cell function. *Blood* 2007; 109: 1123–1130.
 54. Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 769–784.
 55. Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 38–51.
 56. Schwering I, Brauninger A, Klein U, et al. Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 2003; 101: 1505–1512.
 57. Ushmorov A, Ritz O, Hummel M, et al. Epigenetic silencing of the immunoglobulin heavy-chain gene in classical Hodgkin lymphoma-derived cell lines contributes to the loss of immunoglobulin expression. *Blood* 2004; 104: 3326–3334.
 58. Ushmorov A, Leithauser F, Sakk O, et al. Epigenetic processes play a major role in B-cell-specific gene silencing in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2006; 107: 2493–2500.
 59. Buglio D, Georgiakis GV, Hanabuchi S, et al. Vorinostat inhibits STAT6-mediated TH2 cytokine and TARC production and induces cell death in Hodgkin lymphoma cell lines. *Blood* 2008; 112: 1424–1433.
 60. Shichijo S, Yamada A, Sagawa K, et al. Induction of MA-GE genes in lymphoid cells by the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine. *Jpn J Cancer Res* 1996; 87: 751–756.
 61. Khan N, Jeffers M, Kumar S, et al. Determination of the class and isoform selectivity of small-molecule histone deacetylase inhibitors. *Biochem J* 2008; 409: 581–589.
 62. Prince HM, George D, Patnaik A, et al. Phase I study of oral LBH589, a novel deacetylase (DAC) inhibitor in advanced solid tumors and non-Hodgkin's lymphoma [abstract]. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3500.
 63. Younes A, Sureda A, Ben-Yehuda D, et al. Phase II study of oral panobinostat in patients with relapsed/ refractory Hodgkin lymphoma (HL) after high-dose chemotherapy with autologous stem cell transplant (ASCT) [abstract]. *Haematologica* 2009; 94: 34.
 64. Kirschbaum MH, Goldman BH, Zain JM, et al. Vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) in relapsed or refractory Hodgkin lymphoma: SWOG 0517 [abstract]. *Blood*. 2007; 110: 2574.
 65. Jones RJ, Gocke CD, Kasamon YL, et al. Circulating clonotypic B cells in classic Hodgkin lymphoma. *Blood* 2009; 113: 5920–5926.
 66. Younes A, Romaguera J, Hagemester F, et al. A pilot study of rituximab in patients with recurrent, classic Hodgkin disease. *Cancer* 2003; 98: 310–314.
 67. Wedgwood AR, Fanale MA, Fayad LE, et al. Rituximab + ABVD improves event-free survival (EFS) in patients with classical Hodgkin lymphoma in all International Prognostic Score (IPS) groups and in patients who have PET positive disease after 2–3 cycles of therapy [abstract]. *Blood* 2007; 110: 215.
 68. Fehniger TA, Larson S, Trinkaus K, et al. A phase II multicenter study of lenalidomide in patients with relapsed or refractory classical Hodgkin lymphoma (cHL): preliminary results [abstract]. *Blood* 2008;112: 2595.
 69. Kuruvilla J, Taylor D, Wang L, Blattler C, Keating A, Crump M. Phase II trial of lenalidomide in patients with relapsed or refractory Hodgkin lymphoma [abstract]. *Blood* 2008; 112: 3052.
 70. Moskowitz AJ, Hamlin PA, Gerecitano J, et al. Bendamustine is highly active in heavily pre-treated relapsed and refractory Hodgkin lymphoma and serves as a bridge to allogeneic stem cell transplant [abstract]. *Blood* 2009; 114: 720.

El hematólogo ante la ley. Diversas materias fundamentales de derecho para el adecuado ejercicio de la especialidad

COORDINADORES: A. SANTIAGO. *Madrid*

E. FELIU. *Barcelona*

Resumen del simposio

Una máxima del Estado de Derecho es el imperio de la ley, bajo el cual, todos sin excepción posible, quedamos sometidos. La posibilidad por ello de verse libre del deber de cumplimiento de la ley alegando ignorancia de la misma es hoy día impracticable, por lo que, sin duda, resulta imprescindible estar bien informados de la regulación legal que afecta a la labor profesional médica para no cometer errores y actuar de modo acertado en toda acción y decisión. La actividad profesional del hematólogo, como la de cualquier médico en general, se ha ido haciendo más compleja desde un punto de vista técnico, gracias al avance de la medicina, pero también, desde un punto de vista jurídico, se ha ido tornando más complicada y exquisita gracias al perfeccionamiento del Derecho. Existe una *lex artis* médica (conjunto de criterios por los que el médico se considera que actúa de manera correcta y fiel de acuerdo a lo comúnmente aceptado por la ciencia médica) que obliga al facultativo a ser impecable en su aplicación técnica del conocimiento médico existente, pero dicha *lex artis* como concepto se ha enriquecido con un componente jurídico que ha incorporado la exigencia de un correcto papel como informador al paciente y como protector en paralelo de sus derechos fundamentales.

Así pues, el médico de hoy día se ve obligado a tener en cuenta criterios no tan estrictamente médicos para el mejor desempeño de su labor en favor del paciente y se ve obligado a aceptar diversos condicionamientos en su modo de ejercer la medicina para adecuarlo de modo preciso a las exigencias legalmente establecidas, so pena de ser sancionado en caso de no hacerlo. Teniendo esto en cuenta, debemos ser conscientes de que el médico es socialmente observado, ya no sólo en su calidad como profesional dotado de conocimientos y medios científicos imprescindibles para el adecuado uso de la medicina, sino también como garante prioritario de los derechos y libertades del paciente, lo que sin duda redobla nuestra responsabilidad.

En este simposio se pretende esbozar unas pinceladas sobre aquellas áreas fundamentales del ejercicio de la especialidad de la hematología y hemoterapia que pueden verse especialmente comprometidas por ser sustrato especial de regulación del Derecho positivo. Con ello parece evidente que los temas de responsabilidad jurídica del ejercicio profesional, del manejo y protección de la información genética y del consentimiento informado debían ser abordados como materias capitales de este debate. Esos son básicamente los tres bloques fundamentales del presente simposio, si bien somos conscientes de que existen muchos otros asuntos de índole jurídico-médica no menos importantes o de menor interés que resultaba imposible abordar en su totalidad en el presente trabajo.

En el primer bloque, el Dr. Evarist Feliu nos habla de lo frecuente que es el error en el ejercicio sanitario y cómo este se produce la mayor parte de las veces por fallo humano. La conclusión principal, tras diversos estudios sobre esta problemática nos conduce invariablemente hacia la certeza de que resulta cardinal el diseñar e implementar programas de vigilancia que minimicen el riesgo de incursión en el error (sistemas a prueba de errores o "Poka-Yoke"). La búsqueda de la excelencia en la asistencia médica sólo podrá lograrse desarrollando, en todos los sistemas sanitarios, procedimientos bien elaborados de gestión y control de la calidad, así como mecanismos de acreditación y certificación convenientemente adaptados a la finalidad de cada sistema o área de trabajo.

El Dr. Sergio Romeo enlaza con esta materia del error médico y la posible negligencia, exponiendo los supuestos fundamentales de la exigencia de responsabilidad jurídica que pueden gravitar sobre el hematólogo actual. Establece así los 3 niveles clásicos de responsabilidad (administrativa, civil y penal) bajo los cuales el médico, ante una acción u omisión que genere al paciente un perjuicio demostrable, puede ver-

se sancionado y obligado a prestar a aquél una compensación reparativa por el daño producido. La demostración de responsabilidad del médico es inusual en el campo de lo penal, afortunadamente, porque es muy infrecuente y porque exige la certeza jurídica del dolo (intención de dañar) o de la imprudencia grave, generadora de delito. Sin embargo, va siendo cada vez más frecuente en el campo de lo civil y en el de lo contencioso-administrativo la existencia de demandas que reclaman compensaciones pecuniarias alegando responsabilidad civil del médico o responsabilidad patrimonial de la Administración pública, lo cual demuestra un mayor grado de exigencia social de la calidad del sistema sanitario ante la que no podemos permanecer indiferentes. En el caso de la exigencia de responsabilidad civil del médico sigue siendo necesario poder demostrar mediante prueba o ausencia de la misma la existencia de culpa (negligencia), mientras que en el caso de la responsabilidad patrimonial de la Administración, basta tan sólo con demostrar una relación causal entre el funcionamiento del sistema sanitario público y la producción del daño para que se reconozca judicialmente el derecho a ser indemnizado.

En el siguiente bloque, la Dra. Pilar Nicolás se adentra en el complicado mundo de la protección jurídica de la información genética del individuo y los biobancos, tomando como base la Ley de Investigación Biomédica 14/2007. Aclara con ello conceptos jurídicos fundamentales en esta materia que no son intercambiables con los clásicamente acuñados en medicina, como por ejemplo el de "dato genético". En medicina el dato genético es aquel que está controlado por la información contenida en la secuencia de uno o varios genes sin más, mientras que en términos jurídicos se considera dato genético sólo a aquella información de características básicas de una persona que sea de carácter heredable, es decir, el matiz de que la información sea un dato de herencia es clave para conformar el concepto jurídico y sobre dicha idea clave se desarrolla todo el entramado legal relativo a la protección de este derecho fundamental.

En el último bloque, el Dr. Alfonso Santiago centra su ponencia en el consentimiento informado del paciente, definiendo de modo pormenorizado las claves esenciales de su correcta práctica y tratando de exponer las bases jurídicas fundamentales que han hecho de este procedimiento hoy día un acto céntrico de la práctica médica cotidiana. Explica para ello los términos fundamentales de las leyes y convenios éticos reguladores relacionados con esta materia, y trata de estimular el debate en este campo mediante unas reflexiones críticas planteadas al final de su trabajo.

Como vemos, el Derecho afecta de modo muy evidente al ejercicio profesional del médico moderno. Como conclusión principal más interesante tras las reflexiones suscitadas por este simposio deberíamos asumir que al médico actual no le basta ya sólo con disponer de una adecuada capacitación técnica para un ejercicio profesional de calidad, sino que también se demanda de él un adecuado rigor en el cumplimiento de sus deberes jurídicos fundamentales, tan relacionados éstos directamente con el respeto y cuidado de los derechos y libertades fundamentales de su paciente. El médico hoy día debe estar ineludiblemente dotado de una adecuada cultura jurídica básica y una sensibilidad especial con objeto de ser un profesional íntegramente formado y no fallar a la demanda social que ahora tan claramente se le exige en todos los órdenes (médico, jurídico y por supuesto, social).

EL ERROR EN HEMATOLOGÍA Y HEMOTERAPIA. CASUÍSTICA REAL

E. FELIU¹, B. XICOY¹, M.^a ROZMAN²,
J.T. NAVARRO¹, F. MILLÀ¹, J. JUNCÀ¹,
J.M.^a RIBERA¹, J.L. AGUILAR², J.L. VIVES
CORRONS³, J. RODRÍGUEZ VILLANUEVA⁴,
R. GOVINDARAJAN⁵, Á. URBANO⁶,
C. ROZMAN⁷

¹ Servicios de Hematología Clínica y de Laboratorio. Institut Català d'Oncologia. Hospital Germans Trias i Pujol. Badalona. ² Unidad de Hematopatología. Hospital Clínic. Barcelona. ³ Unidad de Eritropatología. Hospital Clínic. Barcelona. ⁴ Servicio de Transfusión. Complejo Hospitalario de Pontevedra. ⁵ Profesor/colaborador ESADE. ⁶ Servicio de Hematología. Hospital Clínic. Barcelona. ⁷ Profesor emérito. Universidad de Barcelona

Introducción

Errar es humano pero, pese a todo, resultaría imperdonable ocultar los errores y no aprender de ellos. Cuando acudimos al Diccionario de la Real Academia de la Lengua Española y buscamos la palabra "error" encontramos la siguiente definición: "Concepto equivocado o juicio falso, acción desacertada o equivocada, cosa hecha erradamente". En medicina, como en todas las ciencias y las áreas de la vida, se comenten errores. Así pues, se dice que en el tiempo que se tarda en leer la página editorial de una revista, ocho pacientes se verán afectados por errores médicos y que uno de ellos, por dicha causa, morirá. A la vez, sabemos que el 3% de todos los pacientes ingresados en un hospital sufren invariablemente las consecuencias de los errores médicos. También se dice que una compañía aérea perderá nuestro equipaje con menos probabilidad que con la que nosotros cometamos un error médico.

Los errores médicos son, por tanto, una parte desafortunada pero inherente a la práctica médica. En los hospitales de Estados Unidos fallecen anualmente entre 44.000 y 98.000 pacientes como consecuencia directa de los errores médicos. En Dinamarca, uno de cada diez pacientes hospitalizados es víctima de una acción médica mal dirigida y se calcula que al menos la mitad de estos incidentes se podrían evitar. La conciencia sobre este problema ha llevado al hecho de que hasta un tercio de médicos y enfermeras daneses consideren la posibilidad de abandonar la profesión, porque les preocupa cometer errores y perjudicar a los pacientes.

Una vez asumido que la medicina, como todas las empresas humanas, no es perfecta, debemos procurar que su ejercicio apunte siempre hacia la búsqueda de

la excelencia, de modo que del error debe emanar una corriente de exigencia científica que prevenga o dificulte su repetición.

En la presente ponencia se analizan, a partir de una experiencia propia centrada en el análisis semanal de casos problemáticos o complejos, los errores que pueden cometerse durante el ejercicio de nuestra profesión como médicos especialistas en hematología y hemoterapia dedicados al diagnóstico y tratamiento de los pacientes afectados de enfermedades de la sangre y órganos hematopoyéticos, así como los que se cometen en el área de la transfusión sanguínea. A continuación, se realizan algunas consideraciones sobre los errores en el ámbito de nuestra especialidad y los mecanismos para evitarlos o reducirlos al máximo.

El error en hematología y hemoterapia

Como en otras especialidades de la medicina, en el ejercicio de la hematología y hemoterapia, los procedimientos diagnósticos, las decisiones terapéuticas y la integración de la clínica con el laboratorio son complejos y, por tanto, están sometidos a la posibilidad de error. Un buen procedimiento para resolver problemas diagnósticos y/o terapéuticos en pacientes afectados de hemopatías y detectar errores cometidos durante la asistencia diaria a los enfermos lo constituyen las sesiones clínico-citológicas. Desde el año 1982 hasta la actualidad, un grupo interdisciplinario de especialistas, predominantemente hematólogos (clínicos, citólogos, citogenetistas, biólogos moleculares, hemopediatras) y patólogos, nos reunimos una vez por semana en unas sesiones científicas interactivas de unos 45 minutos de duración, en dos hospitales: en el Servicio de Hematología y el Laboratorio de Hematopatología del Hospital Clínic de Barcelona y en el Servicio de Hematología del Institut Català d'Oncologia del Hospital Germans Trias i Pujol de Badalona.

Entre 1982 y 2007 analizamos 1.000 pacientes con el objetivo de resolver un problema diagnóstico y/o una decisión terapéutica, o simplemente con un objetivo docente debido al gran interés del caso. Los diagnósticos fueron los siguientes: síndromes linfoproliferativos crónicos (529), leucemias agudas (129), síndromes mieloproliferativos crónicos (86), síndromes mielodisplásicos (68), insuficiencias medulares (35), enfermedades no hematológicas (35), citopenias aisladas (27), enfermedades del sistema mononuclear fagocítico (22), síndromes mielodisplásicos/mieloproliferativos (20) y casos sin diagnóstico después de la sesión (49). Los errores fueron clasificados como: diagnósticos (D) y terapéuticos (T), propios (P) o de otras instituciones (ajenos) (A). Las principales causas de error fueron clasificadas como: a) falta de experiencia, b) mala práctica, c) precipitación, d) mal soporte logístico y e) inex-

plicable. El periodo de 25 años fue dividido en dos mitades y se comparó el número de errores cometidos durante el primer y el segundo periodo mediante el test de la ji al cuadrado, considerando como estadísticamente significativa una $p < 0,05$.

Entre los 1.000 casos, se detectaron 40 errores (4%), de los cuales 27 fueron diagnósticos y terapéuticos, y 13 sólo diagnósticos. En cuanto al tipo de error, 18 lo fueron por falta de experiencia, 8 por mala práctica, 8 por precipitación, 4 por mal soporte logístico y 2 por causa inexplicable. Veintidós errores fueron propios y 18 ajenos. Diez errores fueron detectados en el primer periodo (sobre 255 casos) y 30 en el segundo (sobre 745). No hubo diferencia significativa entre el primer y segundo periodo (3,9 frente a 4%; $p = 0,941$). Hubo un error que condujo al fallecimiento del paciente debido a un tratamiento incorrecto (Tabla 1, caso 34).

En el presente estudio encontramos una frecuencia de error del 4%, la cual es aparentemente alta. Sin embargo, si tenemos en cuenta que los pacientes discutidos no eran casos estándar, sino que planteaban importantes problemas diagnósticos y terapéuticos, entonces este índice de error podría considerarse bajo. Por otra parte, la mayoría de estos errores fueron debidos a falta de experiencia. No hubo diferencias significativas en el número de errores realizados en cada periodo, a pesar de disponer en el segundo de nuevas técnicas de diagnóstico clínico (RMN, PET, TC) y de laboratorio (citometría de flujo, citogenética, biología molecular), que nos han ayudado a mejorar el diagnóstico y el tratamiento, lo cual es una prueba inequívoca de que si estas nuevas herramientas no se aplican adecuadamente, los errores pueden seguir surgiendo con mayor frecuencia y facilidad. La condición humana todavía aparece como el factor más destacado que lleva a los médicos, enfermeras y demás personal sanitario a cometer errores, siendo la inexperiencia y urgencia para tratar al paciente las principales razones para cometerlos. En efecto, las mejores herramientas para que el médico pueda realizar un diagnóstico correcto y un tratamiento apropiado son la experiencia y la disponibilidad de tiempo. En medicina es bueno dudar, tomarse un tiempo y leer las situaciones clínicas con cuidado antes de tomar decisiones. No es aconsejable correr y, en cualquier caso, siempre hay que huir de la precipitación. Por otra parte, muchos de los errores terapéuticos fueron causados por decisiones individuales que se hicieron sin consultar al grupo, a pesar de la dificultad del caso, olvidando que el conocimiento científico del equipo es siempre superior al de un solo individuo. Debemos acordarnos de la importancia de compartir las decisiones relativas al tratamiento de los pacientes antes de prescribir el mismo y de la importancia que tiene la formación de los residentes, así como la nuestra propia, en este sentido.

Consideraciones

Como cualquier actividad humana, la medicina no puede quedar libre de incertidumbres e imperfecciones. Algunos autores señalan que la medicina puede aprender mucho de otros campos, como por ejemplo, la aviación, particularmente en relación con los aspectos de seguridad. Así, la incidencia de accidentes aéreos es de un accidente por cada millón de transportes, mientras que en este mismo sector, se pierden unas 6.000-7.000 maletas por cada millón de equipajes transportados. Estas cifras muestran que los errores humanos pueden ser prevenidos hasta el grado de exigencia que nos interese. Como en ello la vida humana no está en juego, la industria aeronáutica no se ha interesado en reducir los errores en la manipulación del equipaje. En cambio, cuando se trata de la seguridad de los pasajeros, el mismo sector es capaz de eliminar los errores casi hasta la inexistencia. Si bien es cierto que hay una notable diferencia entre el sector del transporte aéreo y la sanidad, ya que las variables a controlar en este último ámbito son más numerosas, su variabilidad es mayor y la intervención humana es más compleja y exhaustiva.

Los errores son incuestionablemente mucho más frecuentes que el fraude como fuente de información errónea. Berthold Brecht dejó dicho que “la finalidad de la ciencia no es la de abrir las puertas a la sabiduría infinita, sino la de poner unos límites al error infinito”. Es cierto que hemos pasado de una época en la que hacíamos los diagnósticos de las hemopatías a *pulmón libre* a otra en la que los hacemos mediante *inmersión con botellas de aire comprimido*, gracias a los múltiples procedimientos diagnósticos, tanto clínicos como de laboratorio, de que disponemos actualmente (pruebas de imagen, morfología, citohistoquímica, citogenética, citometría de flujo, biología molecular) y que minimizan notablemente la posibilidad de error. Con todo, el error y la imperfección siempre acechan, aunque es cierto que sin su concurso no avanzaríamos. La medicina está llena de errores que no fueron corregidos a tiempo, bien sea por negligencia, comodidad, insensatez, falta de experiencia o por problemas organizativos, y que se han transmitido de generación en generación hasta llegar a nuestros días, y es bien sabido que pasar por alto los errores o fallos del pasado es condenarse a repetirlos. En efecto, no hay progreso ni avance científico que no sea susceptible de errar, lo cual nos obliga a mantener siempre alta la guardia, para evitar el desastre. En cualquier caso, muchas veces, peor que equivocarse es no actuar frente al daño.

Un punto muy importante en el manejo del error médico consiste en saber reconocer y admitir su existencia y, llegado el caso, saber pedir excusas por ello. El reconocimiento del mismo no va a concedernos automáticamente la credibilidad perdida, pero puede resultar imprescindible para poder reanudar el trabajo con normalidad y adquirir la plena convicción de un correcto

Tabla 1. Resumen de los 40 errores detectados entre 1.000 casos discutidos en las sesiones clínico-citológicas

N.º	D/T	C	EP/EA	Diagnóstico erróneo	Diagnóstico correcto
1	D/T	P	EP	Trombocitemia esencial	Trombocitosis secundaria (vasculitis)
2	D/T	P	EP	Púrpura trombótica trombocitopénica	Síndrome mielodisplásico
3	D/T	P	EP	Recaída de un linfoma linfoblástico T	Tuberculosis
4	D/T	MP	EP	Carcinoma de origen desconocido	Linfoma no hodgkiniano
5	D	MP	EP	Mielofibrosis idiopática	Anemia aplásica
6	D/T	MP	EP	Linfoma no hodgkiniano (esplenectomía)	Síndrome de Alagille
7	D/T	IN	EP	Enfermedad linfoproliferativa crónica	Hiperesplenismo secundario a cirrosis hepática
8	D/T	FE	EA	Síndrome mielodisplásico	Anemia aplásica
9	D	FE	EP	Leucemia aguda linfoblástica Ph-	Leucemia aguda linfoblástica Ph+
10	D/T	FE	EP	Linfoma no hodgkiniano de tipo MALT del colon	Linfoma no hodgkiniano del manto del colon
11	D/T	MSL	EP	Linfoma no hodgkiniano de tipo MALT del yeyuno	Linfoma no hodgkiniano del manto del yeyuno
12	D	MP	EP	Bazo accesorio	Linfoma no hodgkiniano (en anemia hemolítica autoinmune)
13	D	MP	EP	Anemia por déficit de hierro debida a hernia de hiato	Neoplasia cecal
14	D/T	FE	EA	Anemia aplásica	Tricoleucemia
15	D/T	FE	EP	Linfoma no hodgkiniano inmunoblástico	Sarcoma granulocítico (recaída de leucemia mieloide aguda)
16	D/T	MSL	EP	Hepatitis vírica	Linfoma no hodgkiniano T con afectación hepática
17	D	FE	EA	Hiperplasia folicular reactiva	Linfoma no hodgkiniano folicular
18	D	FE	EA	Mielofibrosis idiopática	Linfoma no hodgkiniano con afectación de la médula ósea y fibrosis
19	D/T	MP	EA	Linfoma no hodgkiniano	Carcinoma metastático indiferenciado
20	D/T	FE	EA	Anemia aplásica	Leucemia mieloide aguda hipoplásica
21	D	FE	EA	Mieloma múltiple	Leucemia mieloide aguda
22	D	FE	EP	Leucemia neutrofilica crónica	Reacción leucemoide paraneoplásica
23	D/T	FE	EA	Recaída medular de un linfoma no hodgkiniano	Leucemia aguda mieloide secundaria (LMA 5)
24	D	FE	EA	Leucemia aguda linfoblástica	Infección vírica
25	D/T	FE	EA	Linfoma no hodgkiniano de célula B grande	Linfoma de Hodgkin
26	D/T	FE	EA	Anemia aplásica	Síndrome mielodisplásico
27	D/T	MP	EP	Linfoma no hodgkiniano-T	Linfoma histiocítico verdadero
28	D/T	IN	EA	Síndrome mielodisplásico/anemia aplásica	Panmielosis con fibrosis
29	D/T	P	EP	Síndrome hipereosinofílico	Eosinofilia secundaria
30	D/T	FE	EA	Agranulocitosis	Leucemia aguda promielocítica
31	D/T	MP	EA	Carcinoma de pulmón de células en grano de avena	Linfoma B difuso de célula grande
32	D	FE	EA	Tricoleucemia	Leucemia linfoblástica aguda
33	D/T	FE	EA	Linfoma no hodgkiniano	Tricoleucemia
34	D/T	MP	EP	Fallo renal de etiología desconocida	Oxaluria primaria
35	D	P	EA	Granulomatosis de Wegener	Linfoma no hodgkiniano nasal T/NK en fase leucémica
36	D	P	EA	Hiperplasia folicular cutánea	Linfoma no hodgkiniano de células T cutáneo
37	D	MSL	EA	Sarcoma granulocítico	Linfoma no hodgkiniano de células NK
38	D7/T	FE	EP	Linfoma no hodgkiniano plasmablastico	Sarcoma
39	D/T	P	EP	Linfoma no hodgkiniano de la zona marginal	Trombocitopenia periférica inmune
40	D/T	MSL	EP	Linfoma de Burkitt	Linfoma B difuso de célula grande

D: diagnóstico; D/T: diagnóstico/terapéutico; C: causa del error; FE: falta de experiencia; IN: inexplicable; MSL: mal soporte logístico; MP: mala práctica; P: precipitación; EP: errores propios; EA: errores ajenos.

proceder. De hecho, se dice que la experiencia es simplemente el nombre que damos a la suma de los errores que hemos cometido. Algunas personas dicen que cuando se detecta un error, lo menos importante es el culpable. Dedicar un tiempo a descubrir al causante del error es perderlo para lo que es realmente fundamental, subsanarlo y descubrir lo que nos enseña. Debemos asumirlo, analizarlo y emplear su mensaje siempre para mejorar. Un error bien estudiado lleva más lejos que muchos éxitos científicos. Si consideramos, por tanto, que el error inspira la innovación, no debe personalizarse sino analizarse y diseccionarse exigentemente; no tiene culpables sino responsables que deben estar bien dispuestos a aprender de él. En consecuencia, podemos afirmar que el error es un capítulo ineludible en la historia del éxito y que no hay que tenerle más miedo del debido, pues el miedo al error, el pánico a equivocarse, aniquila la creatividad y la innovación y nos lleva a un indeseable inmovilismo. Por otra parte, si bien es cierto que los pacientes son las primeras víctimas de los errores, no lo es menos que los médicos y enfermeras son los segundos. El sentimiento de culpabilidad, las noches de insomnio y el ego dañado tras haber cometido un error médico avalan lo antedicho. Sin embargo, no debemos confiar en alguien que “crea no haber cometido nunca un error”.

Uno de los momentos en que el personal puede cometer errores por falta de conocimientos se produce cuando se incorpora a las plantillas personal nuevo o suplente y no se les proporciona la formación y orientación necesarias en su puesto de trabajo para evitar los riesgos. Esta situación puede agravarse en determinadas fechas, especialmente en verano y en vacaciones de Navidad y Semana Santa. Conviene también recordar que muchas veces son los problemas organizativos los que dan lugar a que se produzcan errores humanos en el diagnóstico y tratamiento de los pacientes, independientemente de que los médicos, las enfermeras, los técnicos, los administrativos, los farmacéuticos, los físicos, los celadores y demás personal implicado estén trabajando correctamente, cumpliendo con sus respectivas responsabilidades.

El problema real no suele ser el operario, sino el proceso operativo, y radica en que no se conoce de manera objetiva el grado de riesgo que existe en nuestros procesos. La calidad de nuestro trabajo depende de la calidad de nuestros procesos. Un proceso que permite un margen excesivo de error humano no es un buen proceso. Un profesional que comete un error no tiene ninguna culpa, porque el error es una característica común de todos los seres humanos y ninguno, por sí solo, puede evitarlo de modo totalmente seguro. Por ello, los procesos tienen que ser diseñados *a prueba de errores*, lo que los japoneses llaman *Poke-Yokes* en los procesos de fabricación de coches. Para evitar errores, las iniciativas actuales incluyen varios conceptos como simplicidad, información, automatización, estandarización,

controles de calidad y orden. La aplicación de la gestión de la calidad debe potenciarse, ya que la misma puede ahorrar, y no es un eufemismo, miles de vidas al año, con la corrección de tantos y tantos errores evitables. Las herramientas formales que se han utilizado han sido las de la acreditación de los hospitales americanos (Joint Commission on the Accreditation of Hospitals –JACHO–), adaptada a los hospitales españoles por la Fundación Avedis Donabedian, el Modelo Europeo de Excelencia (European Foundation for Quality Management –EFQM–) y el modelo ISO 9001 de la International Organization for Standardization.

Desafortunadamente, muchas organizaciones sanitarias están implantando la gestión por procesos e incluso consiguiendo certificaciones ISO 9001 u otras normas de calidad vigentes, frecuentemente con la participación de consultores y auditores que no entienden del todo sus procesos. El resultado es que se limitan a documentar los procesos tal cual, en lugar de analizarlos y rediseñarlos para conseguir que sean seguros (es decir, diseñados de tal manera que hagan muy difícil o imposible el error humano), que cumplan con la legislación vigente y que garanticen la calidad. Si hay ganas de hacer las cosas bien a la primera, si hay ganas de promover la excelencia, ISO 9001 ofrece muchos mecanismos de gestión, entre ellos, métodos para detectar los fallos y eliminar las causas de raíz, abandonando el viejo hábito de buscar “culpables” y creando la cultura de mejorar los procesos y sistemas.

La preocupación por la calidad ha propiciado en el sistema sanitario español, al igual que en otros países, la elaboración de guías y recomendaciones, cuyo objetivo es mejorar la asistencia de los pacientes y evitar errores. La aplicación de sistemas de gestión de la calidad en el ámbito del trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) se ha convertido en una prioridad, al tratarse de un proceso multidisciplinario complejo y asociado a una elevada toxicidad. En una reciente publicación en *Medicina Clínica*, hemos analizado el impacto de la implantación de los estándares de acreditación del JACIE versión 2.0 (Joint Accreditation Committee of the International Society for Cellular Therapy and European Group for Blood and Marrow Transplantation), en el programa de TPH del Institut Català d'Oncologia del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol de Badalona. La implantación de los estándares del JACIE ha supuesto más rigurosidad a la hora de cumplir los protocolos del TPH, una definición por escrito de todos aquellos procedimientos que se realizaban de una forma más o menos sistematizada y un registro de todas las desviaciones significativas y deficiencias propias del programa que, una vez detectadas, eran tributarias de mejora. También ha determinado una mayor implicación de todas las personas que participan en el proceso del TPH, con un plan de formación conjunto y una mayor concienciación de que se trata de una labor en equipo. Ello ha repercutido en una

mejoría de la asistencia de los pacientes receptores de un TPH y en una mayor satisfacción por parte de los profesionales implicados. Con la creación del Comité Conjunto de Acreditación en octubre de 2006, integrándose en dicha institución el JACIE, el CAT (Comité de Acreditación para la Transfusión Sanguínea) y la ONT (Organización Nacional de Trasplantes) con el apoyo de la SEHH (Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia) y la SETS (Sociedad Española de Transfusión Sanguínea y Terapia Celular), se ha desarrollado e impulsado un sistema común de acreditación de centros de obtención, procesamiento e implante de progenitores hematopoyéticos. De este modo, se ha promovido una práctica clínica y de laboratorio de sobrada calidad en el ámbito del TPH en España.

Otra área de la Hematología y Hemoterapia donde se ha progresado mucho en cuanto al establecimiento de sistemas de calidad ha sido el laboratorio. En el año 2000, el Laboratorio de Hematología del Hospital Germans Trias i Pujol inició el proceso necesario para conseguir la Certificación de Calidad ISO 9002. Para ello, se adiestró a todo el personal de las diversas áreas de laboratorio y se transformó toda la documentación de la que se disponía en "formato ISO". Todo el personal recibió formación por parte de una empresa externa dedicada a la labor de auditorías y calidad y, progresivamente, se fueron redactando todos los "procedimientos" de cada una de las técnicas que se realizaban, de todos los aparatos del laboratorio y de todos los procesos. Se constituyó un Comité de Calidad, en el que estaban representados todos los estamentos, y se comenzaron a hacer reuniones en donde se discutían aspectos de la documentación y organización, entre otros. El trabajo fue duro pero, gracias a la colaboración de todo el personal, en el verano de 2001 se consiguió la Certificación ISO 9002. La Certificación ISO de Calidad supone documentar toda una serie de procesos que se realizan en el laboratorio y que requieren un gran control, de tal manera que todo el aparataje y reactivos deben estar calibrados según normas internacionales y todo debe estar convenientemente documentado. Además, todos los procesos, desde el inicio hasta la finalización de los mismos con la entrega de los resultados, pasando por los pasos intermedios, deben controlarse, dejando constancia de la persona o personas que intervienen en ellos. En la Norma ISO de calidad se tienen muy en cuenta también otros aspectos importantes, como son la formación del personal, los temas de seguridad e higiene en el trabajo y la habilitación del personal para las diferentes tareas, entre otros. Actualmente, la norma ha cambiado, sobre todo en lo que se refiere al formato de algunos documentos, y se denomina ISO 9001/2008, pero en definitiva no ha variado el concepto básico de la calidad. Cada año se realizan auditorías internas de todas las secciones y la certificación se revalida anualmente mediante una auditoría externa realizada por una empresa acreditada para ello. En de-

finitiva, la valoración es muy positiva, ya que se trabaja de una manera más ordenada, más documentada y con mayor seguridad y, por tanto, se disminuye notablemente la posibilidad de error.

En el mismo sentido, la tarea del Comité de Estandarización en Hematología (CEH), uno de los grupos de trabajo de la SEHH, consiste en promover el desarrollo y empleo de técnicas diagnósticas y unidades estandarizadas, así como mejorar la calidad del laboratorio de Hematología mediante el desarrollo de un programa para la evaluación externa de la calidad. Desde octubre de 2008 funciona además en una plataforma *on line* (www.hemqual.com), lo que junto al contenido del Programa de Calidad de Laboratorios Clínicos, asumido desde el año 1997, ha contribuido en gran manera a minimizar los errores en el laboratorio. Por otra parte, también ha sido fundamental la contribución del Grupo de Laboratorio y Gestión (GLAGE), cuyo objetivo principal es el desarrollo del laboratorio general de hematología y hemoterapia, tanto en sus aspectos analíticos como en los de organización y gestión de calidad y costes, entre otros aspectos.

En el área de la transfusión, el Programa de Acreditación en Bancos de Sangre, actualmente llevado a cabo por el CAT (Fundación Comité de Acreditación en Transfusión, Terapia Celular y Tisular), que con sus acreditaciones, que serán certificaciones una vez se alcance la acreditación de ENAC (Entidad Nacional de Acreditación), asegura la calidad de todas las tareas que se realizan en los bancos de sangre y la continuidad en la calidad en los servicios y productos mediante las auditorías de seguimiento anual, ha sido también crucial para minimizar la producción de errores en este campo. El desarrollo del Programa de Hemovigilancia estatal en el año 2004, con su red de programas de hemovigilancia autonómicos, ha sido también un instrumento eficiente para detectar y notificar de una manera homogénea los efectos adversos y no deseables de la transfusión de los componentes sanguíneos. Esta práctica, de una manera u otra, ya se venía realizando, pero no de forma sistematizada.

El objetivo del programa ha sido monitorizar la información de los errores y de los cuasi-errores relacionados con la transfusión, tan importantes éstos como los primeros, pues su detección evita el desencadenamiento de un fallo de mayor riesgo que pudiera conducir a la muerte del paciente.

Según el Informe de Hemovigilancia del año 2008 (Ministerio de Sanidad y Política Social) en España se han transfundido 2.000.131 unidades de componentes sanguíneos y se han notificado 165 errores en su administración, lo que supone un 9% del total de incidentes notificados, representando un ligero incremento respecto a los años 2006 y 2007.

La principal causa de error se deriva principalmente de fallos humanos. En el 34% de los casos se administró el componente sanguíneo a un paciente diferente al destinatario real, en un 18% de los casos no se ad-

ministraron componentes irradiados como estaría indicado y en otro 16% se detectó un error de incompatibilidad ABO. En dicho informe también se constata que los errores notificados se producen en el 60% de los casos en el entorno próximo al paciente (prescripción, extracción de la muestra, transfusión...).

El Programa de Hemovigilancia en un hospital no puede limitarse a la detección del error y el cuasi-error, sino que ha de analizar las causas y en qué medida se pueden corregir o minimizar, pues siendo la causa mayoritaria el fallo humano el objetivo no podrá ser eliminarlo por completo. La detección de los errores ha de ir seguida del análisis y de la proposición de medidas que permitan su corrección, así como de la evaluación de la eficacia. En todos los hospitales se dispone, por imperativo legal, de un comité hospitalario de transfusión, comité que es imprescindible activar para poder garantizar una transfusión sanguínea eficiente.

Los puntos débiles en los procesos de transfusión han sido ampliamente analizados e identificados: transfusión realizada por enfermeras de las unidades hospitalarias que realizan multitareas, formación insuficiente del personal en el proceso, inexistencia de procedimientos documentados actualizados, carencia de guías de uso de componentes sanguíneos y efectos adversos, ausencia de automatización en los laboratorios de transfusión, ausencia de tecnología informática, ausencia de auditorías y un sistema de comunicación deficiente entre el servicio de transfusión y los usuarios finales del servicio.

Los programas de hemovigilancia hospitalaria no deben limitarse a lograr la reducción de los errores y los efectos adversos de la transfusión, sino que deben ampliar sus objetivos al logro de un *uso óptimo de los componentes sanguíneos*, para evitar transfusiones innecesarias o no efectivas. Para ello es imprescindible consensuar entre los diferentes profesionales implicados en la transfusión unas guías de uso óptimo de componentes sanguíneos y lograr un funcionamiento proactivo de los comités hospitalarios de transfusión.

En definitiva, en el campo del diagnóstico y tratamiento de los pacientes afectados de hemopatías, pueden cometerse errores y puede aprenderse mucho de ellos, aunque ciertamente tampoco debemos abusar de dicha sistemática para profundizar en nuestro aprendizaje. Lo ideal, al fin y al cabo, sería aprender y mejorar sin dar excesivo margen al concurso del error. En este sentido, los procedimientos de control de calidad, acreditaciones y certificaciones actualmente existentes contribuyen en gran medida a disminuir la posibilidad de error y deberían ser por ello adecuadamente desarrollados e implementados en todos los sistemas sanitarios que quieran aspirar a conseguir una elevada tasa de calidad.

Agradecimientos

A todos los compañeros de los Servicios de Hematología y Unidades de Hematopatología de los hospitales Germans Trias i Pujol de Badalona y Clínic de Barcelona que han participado en las sesiones clínico-citológicas a lo largo de más de 25 años.

A la Fundación Internacional Josep Carreras para la lucha contra la leucemia, por la concesión de la ayuda FIJC-P/EF09.

Al Instituto de Salud Carlos III por la concesión de la beca FIS 051409. Ministerio de Sanidad y Consumo.

Bibliografía

- Govindarajan R. La excelencia en el sector sanitario con ISO 9001. Madrid: McGraw Hill Interamericana; 2008.
- Ferrá C, Jiménez-Lorenzo MJ, Feliu E, Ribera JM, en representación del Programa de Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos del Institut Català d'Oncologia-Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Implicaciones y coste de la implantación de un programa de calidad (JACIE) en un Programa de Trasplante. *Med Clin (Barc)* 2010 Mar 18.
- Rutllan M, Navarro JL, Sierra J, Feliu E (eds). Asociación Española de Hematología y Hemoterapia: 50 años de historia. Madrid: Grupo Acción Médica; 2009.
- Jericó P. La nueva gestión del talento: construyendo compromiso. 1.ª ed. Madrid: Prentice Hall; 2008.
- Reason J. Human errors: models and management. *BMJ* 2000; 172: 768-70.
- Davis BD. The scientist's world. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 1-12.
- Weingart SN, Wilson RM, Gibert RW, et al. Epidemiology of medical error. *BMJ* 2000; 18: 774-7.
- Tudela P, Mòdol JM, Tor J. Errores diagnósticos: un importante efecto adverso de la asistencia hospitalaria. *Med Clin (Barc)* 2005; 124: 118.
- Berwick DM. Errors today errors tomorrow. *N Engl J Med* 2003; 348: 2570-2.
- Pietro DA, Shyavitz LJ, Smith RA, Auerbach BS. Detecting and reporting medical errors: why the dilemma. *BMJ* 2000; 320: 794-6.
- Pierluissi E, Fischer MA, Campbell AR, Landefeld CS. Discussion of medical errors in morbidity and mortality conferences. *JAMA* 2003; 290: 2838-42.
- Gallagher TH, Waterman AD, Ebers AG, Fraser VJ, Levinson W. Patients' and physicians' attitudes regarding the disclosure of medical errors. *JAMA* 2003; 289: 1001-7.
- Volpp K, Grande D. Residents' suggestions for reducing errors in teaching hospitals. *N Engl J Med* 2003; 348: 851-5.
- Criado MT. Error médico: evitable e inevitable. *Med Clínic (Barc)* 2000; 115: 137-40.
- Thomas EJ, Brennan TA. Incidence and types of preventable adverse events in elderly patients: population based review of medical records. *BMJ* 2000; 320: 741-4.
- Spinosa JA, Nolan TW. Errors by emergency physicians in interpreting radiographs: longitudinal study. *BMJ* 2000; 320: 737-40.
- Cook RI, Render M, Woods DD. Gaps in continuity of care and progress on patient safety. *BMJ* 2000; 320: 791-4.
- Gérvás J, Pérez-Fernández M. El resultado intermedio como problema clínico y de salud pública. A propósito de la mortalidad por cervastatina. *Med Clin (Barc)* 2002; 119: 254-9.
- Dean B, Schachter M, Vincent C, Barber N. Causes of prescribing errors in hospital inpatients: a prospective study. *Lancet*. 2002; 359: 1373-8.

- Shojania KG, Burton EC, Mc Donald KM, Goldman L. Changes in rates of autopsy detected diagnostic errors over time. *JAMA* 2003; 289: 2849-56.
- Blendon RJ, DesRoches CM, Brodie M, et al. Views of practicing physicians and the public on medical errors. *N Engl J Med* 2002; 347: 1933-40.
- Wu AW. Medical error: the second victim. *BMJ* 2000; 18: 726-7.
- Bayés R, Morera M. El punto de vista del paciente en la práctica clínica hospitalaria. *Med Clín (Barc)* 2000; 115: 141-4.
- Vincent CH. Understanding and responding to adverse events. *N Engl J Med* 2003; 348: 1051-6.
- Krampera M, Venturi F, Benedetti F, et al. Computer-based drug management in a bone marrow transplant unit: a suitable tool for multiple prescriptions even in critical conditions. *Br J Haematol* 2004; 125: 50-7.
- Bobb A, Gleason K, Husch M, Feinglass J, Yarnold PR, Noskin GA. The epidemiology of prescribing errors. *Arch Intern Med* 2004; 164: 785-92.
- Sexton J, Thomas E, Helmreich R. Error, stress, and teamwork in medicine and aviation: cross sectional surveys. *BMJ* 2000; 320: 745-9.
- Gaba DM. Anaesthesiology as a model for patient safety in health care. *BMJ* 2000; 320: 785-8.
- Weissman J, Annas C, Epstein AM, et al. Error reporting and disclosure systems. Views from Hospital leaders. *JAMA* 2005; 293: 1359-66.
- Gallagher TH, Studdert D, Levinson W. Disclosing harmful medical errors to patients. *N Engl J Med* 2007; 356: 2713-9.
- Longo DR, Hewett JE, Ge B, Schubert S. The long road to patient safety. A status report on patient safety systems. *JAMA* 2005; 294: 2858-66.
- Goldhaber-Fiebert SN, Goldhaber-Fiebert JD, Rosow CE. Knowledge-based errors in anesthesia: a paired, controlled trial of learning and retention. *Can J Anaesth* 2009; 56: 35-45.

LA RESPONSABILIDAD CIVIL Y PENAL DEL HEMATÓLOGO ANTE EL ERROR O LA NEGLIGENCIA

S. ROMEO MALANDA

Profesor de Derecho Penal.

Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

Introducción

La medicina no es una ciencia exacta. Y los profesionales de la sanidad no son personas infalibles. Esto hace que en muchas ocasiones una atención sanitaria no tenga como resultado la curación del paciente enfermo, sino su empeoramiento –en ocasiones con daños irreversibles o efectos letales– o, al menos, la no mejoría de su salud. Evidentemente, esto ocurre en todas las áreas de la medicina. Y la hematología no es una excepción.

La hematología es una ciencia o especialidad médica que comprende el estudio de la etiología, diagnóstico, tratamiento, pronóstico y prevención de las enfermedades de la sangre y órganos, los órganos hematopo-

yéticos (médula ósea, ganglios linfáticos, bazo, etc.), tanto sanos como enfermos. En este ámbito, tanto la práctica médica (en recientes estudios), como la práctica jurídica (a través de sentencias de los tribunales), ponen de manifiesto que en ocasiones se comenten errores médicos, bien de carácter diagnóstico (al no determinar correctamente el padecimiento del paciente), bien de carácter terapéutico (al ofrecer una asistencia médica equivocada). No es infrecuente que ambos tipos de errores estén estrechamente vinculados (tratamiento equivocado derivado de un erróneo diagnóstico). Varias son las razones a las que cabe achacar tales errores: impericia del profesional sanitario, precipitación, negligencia del profesional, falta de medios materiales o error en el funcionamiento de los mismos, etc.

En este trabajo vamos a realizar una breve exposición de la responsabilidad jurídica a la que se exponen los profesionales sanitarios en el área de hematología derivada de su actuación incorrecta, por unos u otros motivos. Queda fuera del mismo las posibles responsabilidades disciplinarias o deontológicas en las que pudieran incurrir por infracción de los Códigos de conducta de la profesión médica o enfermera, en su caso.

Fundamentos de la responsabilidad civil y penal en medicina

Responsabilidad civil (en sentido amplio)

Consideraciones previas

Cuando hablamos de responsabilidad civil (en sentido amplio), estamos haciendo referencia a los supuestos responsabilidad por el daño. En estos casos no existe una sanción impuesta por la Administración Pública debida a la infracción de una norma jurídica que hemos incumplido, sino una condena (judicial) que nos impone un deber de reparar el daño producido por nuestro comportamiento. Es preciso que haya existido un daño efectivo (físico o moral). En el ámbito sanitario, el daño será normalmente un perjuicio para la salud, llegando en algunos casos a la pérdida de la vida. Ese daño ha de poder ser evaluable económicamente e individualizado con relación a una persona o a un grupo de personas. La responsabilidad consistirá normalmente en el pago de una determinada cantidad de dinero. La diferencia entre esta indemnización por daños y perjuicios y la sanción administrativa de multa es que, mientras ésta última consiste en la entrega de la cantidad en cuestión al Estado, la indemnización que deriva de la condena por responsabilidad civil ha de entregarse a la persona que ha sufrido el daño, en compensación por el mismo.

Bajo el término “responsabilidad civil” se incluyen los dos regímenes de responsabilidad civil aplicables

hoy a la responsabilidad sanitaria en España. Por una parte, la responsabilidad en la asistencia privada (responsabilidad civil en sentido estricto) y, por otro lado, la responsabilidad civil en la asistencia sanitaria pública, más conocida como responsabilidad patrimonial de las Administraciones Públicas sanitarias.

La responsabilidad civil (en sentido estricto): la asistencia sanitaria privada

La doctrina de la responsabilidad sanitaria se ha construido sobre la base del derecho común de la responsabilidad civil, esto es, a partir de los arts. 1902 y ss del Código civil. El ámbito de aplicación de esta doctrina es, no obstante, bastante limitado en la actualidad, al circunscribirse esencialmente al ámbito de la asistencia sanitaria privada, es decir, la prestada por profesionales en ejercicio libre de su profesión o por centros, instituciones o establecimientos cuya calificación sólo puede ser hecha de forma negativa (los no públicos).

Con base en esta doctrina, hay que afirmar que la responsabilidad civil del profesional liberal está gobernada por el principio de culpa, es decir, para condenar a una persona se requiere haber constatado una actuación al menos negligente de la misma. Estos casos suelen ser más complejos que aquellos en los que se demanda a la Administración Pública, pues aquí hay que concretar individualmente la responsabilidad y pueden plantearse problemas en cuanto a la prueba.

Responsabilidad patrimonial de las Administraciones Públicas sanitarias: la asistencia sanitaria pública

Las Administraciones Públicas (estatal, autonómicas, locales e institucionales) son hoy, en España, los principales prestadores de asistencia sanitaria. La responsabilidad por daños derivados de la prestación de servicios de salud por parte de la Administración Pública no está sujeta, sin embargo, a la normativa anteriormente expuesta, sino que su regulación se halla en la Ley 30/1992, de 26 de noviembre, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común (arts. 139 y ss.). Como dice el 139.1 Ley 30/1992, en el mismo sentido que el art. 106.2 de la Constitución, “los particulares tendrán derecho a ser indemnizados por las Administraciones Públicas correspondientes, de toda lesión que sufran en cualquiera de sus bienes y derechos, salvo en los casos de fuerza mayor, siempre que la lesión sea consecuencia del funcionamiento normal o anormal de los servicios públicos”.

En la Disposición Adicional Duodécima de la Ley 30/1992 (tras la reforma operada por la Ley 4/1999, de 13 de enero) se dispone claramente que la responsabilidad patrimonial de los organismos del Sistema Na-

cional de Salud y de los centros sanitarios concertados con ellas, por los daños y perjuicios causados por o con ocasión de la asistencia sanitaria, y las correspondientes reclamaciones, seguirán la tramitación administrativa prevista en esta Ley, correspondiendo su revisión jurisdiccional al orden contencioso-administrativo en todo caso. Es, así pues, indiscutible que el orden jurisdiccional civil ya no es competente (como sí lo fue en tiempos pasados, junto con el laboral) para conocer de reclamaciones contra una Administración sanitaria, aunque la acción se entable también contra la persona física supuestamente causante del daño.

Por supuesto, existe un derecho de repetición de la Administración sanitaria contra la persona o personas (a su servicio) a quienes fuera imputable el acto determinante de la responsabilidad de aquélla. Como dice el art. 145.2 Ley 30/1992, “la Administración correspondiente, cuando hubiere indemnizado a los lesionados, exigirá de oficio de sus autoridades y demás personal a su servicio la responsabilidad en que hubieran incurrido por dolo, o culpa o negligencia graves [...]. Para la exigencia de dicha responsabilidad se ponderarán, entre otros, los siguientes criterios: el resultado dañoso producido, la existencia o no de intencionalidad, la responsabilidad profesional del personal al servicio de las Administraciones Públicas y su relación con la producción del resultado dañoso”.

Criterios para la determinación de la responsabilidad por el daño

En el ámbito de la sanidad, los profesionales sanitarios se comprometen a prestar un servicio, cuyo incumplimiento o cumplimiento defectuoso dará lugar a responsabilidad. De este modo, en el ámbito de la responsabilidad patrimonial de la Administración, al igual que sucede con la responsabilidad civil común, no existirá responsabilidad y, en consecuencia, derecho a recibir una indemnización por parte del demandante, cuando no pueda apreciarse culpa alguna en el actuar del prestador del servicio sanitario.

Se trata, pues, de comparar entre la prestación efectivamente ejecutada por el profesional sanitario y la debida en el caso concreto. La actuación debida debe establecer conforme a una serie de reglas conocidas como *lex artis*. La *lex artis* puede definirse como “aquel criterio valorativo para calibrar la diligencia exigible en todo acto o tratamiento médico” (Sentencia del Tribunal Supremo –STS– de 18 de diciembre de 2006) y “comporta no sólo el cumplimiento formal y protocolario de las técnicas previstas, aceptadas generalmente por la ciencia médica y adecuadas a una buena praxis, sino la aplicación de tales técnicas con el cuidado y precisión exigible de acuerdo con las circunstancias y los riesgos inherentes a cada intervención según su naturaleza” (STS de 23 de mayo de 2006). La *lex ar-*

tis debe establecerse caso por caso, teniendo en cuenta aspectos tales como la especialización del sujeto, la complejidad del acto, las condiciones en las que éste se realiza y los medios disponibles o la trascendencia vital para el paciente.

La falta de actuación del profesional sanitario conforme a las pautas exigidas por la *lex artis* supone la consideración de dicho actuar al menos como negligente, y de ahí que quepa exigirse responsabilidad, siempre y cuando se haya podido igualmente constatar la existencia de una relación causal entre dicho comportamiento y el daño que manifiesta el demandante, daño que, como se ha expuesto más arriba, debe poder ser evaluado económicamente.

Nuestro Tribunal Supremo suele incluir la prestación del consentimiento como un aspecto integrante de la *lex artis*. Así, se afirma que “el consentimiento informado es de esa forma presupuesto y elemento esencial de la *lex artis* y como tal forma parte de toda actuación asistencial [...] constituyendo una exigencia ética y legalmente exigible a los miembros de la profesión médica [...]” (SSTS de 23 de julio de 2003, 21 de diciembre de 2005, 15 de noviembre de 2006, 16 de enero de 2007, entre otras muchas). De este modo, la *lex artis* abarcaría dos elementos diferentes: por un lado, la que podríamos denominar *lex artis* técnica (esto es, los estándares de actuación correcta en el ámbito asistencial de la profesión médica en el caso concreto) y, por otro, que se produzca con el consentimiento del paciente en la práctica del acto médico.

De lo anterior se desprende que es posible incurrir en responsabilidad incluso cuando se ha producido un daño, aunque la actuación del profesional sanitario se ha realizado con pleno respecto a la *lex artis* técnica, siempre que el paciente no haya sido informado de esa eventualidad. De ahí la exigencia legal de proporcionar al paciente toda la información que sea necesaria para que éste puede decidir si se somete o no al acto médico en cuestión. Así, el art. 4 de la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica, establece que “toda actuación en el ámbito de la salud de un paciente necesita el consentimiento libre y voluntario del afectado [...]. La información que, como regla general, se proporcionará verbalmente dejando constancia en la historia clínica comprende, como mínimo, la finalidad y la naturaleza de cada intervención, sus riesgos y sus consecuencias”. Mucho más discutible es la consideración de la ausencia de información como daño moral evaluable independientemente al margen de la existencia de un daño físico constatado. Parece que estos casos deberían resolverse conforme a las reglas de la responsabilidad administrativa y no civil.

De esta manera, se entienden las numerosas sentencias condenatorias en supuestos en los que el profesio-

nal sanitario ha actuado conforme a la *lex artis* técnica y, aún así, se ha producido un daño, al no haberse informado adecuadamente al paciente de la posibilidad de que éste aconteciera aún realizando el acto médico correctamente. Ello puede suceder tanto respecto a actos diagnósticos (p. ej., porque en relación con la prueba analítica en cuestión siempre quede un margen para falsos positivos o falsos negativos, dado el desarrollo tecnológico actual del instrumental analítico), como respecto a actos terapéuticos (p. ej., existe un riesgo conocido de que la intervención tenga ciertos efectos secundarios o no consiga los efectos esperados).

Responsabilidad penal

El último nivel de responsabilidad jurídica los constituye la responsabilidad penal. La responsabilidad penal deriva de la realización de comportamientos activos u omisivos contemplados en la ley penal cuando una persona (física) ha provocado intencionada o imprudentemente peligros o lesiones a bienes o intereses protegidos por el Derecho penal.

La responsabilidad penal requiere que el hecho cometido esté expresamente previsto como infracción penal (delitos, en los casos más graves, y faltas, para los casos menos graves) en una norma jurídica (normalmente recogida en el Código penal). Así sucede con los supuestos más típicos de responsabilidad penal en el ámbito médico: los delitos de homicidio (arts. 138 y ss.), aborto (arts. 144 y ss.), lesiones (arts. 147 y ss.) y lesiones al feto (arts. 157 y s.). Por supuesto, hay otros delitos en los que pueden incurrir los profesionales sanitarios (p. ej., delitos contra la intimidad –violación del secreto profesional–, delitos contra la libertad –si no se ha requerido el consentimiento del paciente–, o delito de intrusismo), pero dada la naturaleza de este trabajo, no vamos a referirnos a ellos.

La sanción que se imponga no va dirigida a cubrir los daños causados al paciente, sino que en los casos en que se imponga una multa, ese dinero queda en manos del Estado, sin perjuicio de que en los supuestos en los que se impone responsabilidad penal, ésta lleva aparejada también la responsabilidad civil. En estos casos, el juez penal, además de imponer la pena correspondiente, determinará cuál es la indemnización civil por daños y perjuicios que la víctima debe recibir por parte del responsable penal (en todo caso, una persona física, un profesional de la sanidad) o de una institución que actúa como responsable civil solidario, normalmente el hospital en el que presta sus servicios o la Administración Pública si se trata de sanidad pública (arts. 116 y ss. del Código penal).

La responsabilidad penal puede tener lugar por acción o por omisión. Para que tales comportamientos

sean punibles se requiere que concurra en ellos intencionalidad (dolo) o falta de cuidado (imprudencia) por parte del profesional sanitario. La responsabilidad penal dolosa no suele ser habitual en el ejercicio de las profesiones sanitarias. Lo más normal es que la conducta penalmente relevante lo sea por imprudencia, al no haberse adoptado las medidas adecuadas u observar el cuidado necesario cuando sea previsible que de su actividad pueda derivarse un resultado lesivo (adecuación de la actuación a la *lex artis*). Como se ha dicho anteriormente, siempre que exista responsabilidad penal por imprudencia, habrá también responsabilidad civil (y a la pena habrá que añadir la indemnización correspondiente), pero no siempre que haya negligencia constitutiva de responsabilidad civil va a haber igualmente responsabilidad penal por imprudencia, pues las reglas para establecer la responsabilidad penal son más estrictas que las seguidas para determinar la responsabilidad civil. Además, la responsabilidad penal requiere individualizar a la o las personas en concreto a las que imputar el daño y muchas veces esto no es posible, pues el daño se debe más a cuestiones de mal funcionamiento del servicio de salud que a responsabilidades individuales.

La imprudencia que da lugar a responsabilidad penal puede ser grave (lo que dará lugar a un delito) o leve (que será constitutiva de falta). En las faltas no se imponen penas de prisión. Además, en los casos de imprudencia grave (que en los delitos contra la vida o la integridad están castigados con penas de prisión), se prevé la figura de la imprudencia profesional, normalmente aplicada a los profesionales sanitarios, y que supone añadir a la pena de prisión otra de inhabilitación para el ejercicio de la profesión por un tiempo determinado.

Supuestos de responsabilidad jurídica en hematología

Responsabilidad por errores diagnósticos

Uno de los actos médicos que puede dar lugar a responsabilidad en hematología es el diagnóstico incorrecto de la enfermedad, muchas veces derivado de la incorrecta realización de un análisis sanguíneo. En estos casos puede producirse un falso positivo o un falso negativo. En los casos de falso positivo se detecta una patología que el paciente no padece, lo que puede llevar a aplicar un tratamiento incorrecto, el cual causa nuevos daños, empeora los que ya se han manifestado o simplemente impide aplicar un tratamiento correcto que pudiera tener efectos positivos sobre el paciente. En estos casos, se produce una concurrencia de error diagnóstico y de tratamiento (responsabilidad por acción). Por su parte, en los casos de falsos negativos, se des-

cartará una determinada enfermedad y, normalmente, no se aplicará un tratamiento adecuado a la patología existente. En estos casos, el error de diagnóstico no tiene que ir acompañado necesariamente de un error de tratamiento asociado al mismo, sino que habrá una ausencia de tratamiento (responsabilidad por omisión).

Un ejemplo de este tipo de responsabilidad lo encontramos en la STS de 19 de julio de 2007, que analiza el caso de una persona que reclama por los daños sufridos a resultas de un diagnóstico erróneo de anticuerpos VIH, que le tuvieron durante casi cuatro años con la eventualidad del desarrollo de la enfermedad (falso positivo causante de un daño moral al pensar que iba a desarrollar la enfermedad y verse sometido a retrovirales). El Tribunal Supremo confirma la condena al pago de veinte millones de pesetas, considerando que “la práctica médica en sí misma negligente, como es la que resulta de no haber repetido la prueba ante la normalizada clínica que presentaba el paciente, manteniendo durante varios años el consumo indebido del medicamento retroviral. En segundo, se vuelve a hacer supuesto de la cuestión, puesto que parte de hechos distintos de los que la sentencia declara probados respecto de la repetición de los controles, cuyo incumplimiento supone una evidente vulneración de la *lex artis* en la práctica de una actuación que se hace de forma rutinaria y ajena a la técnica médica o científica que exigía el caso y esta omisión mantuvo al paciente en una angustiada e insegura situación sobre su estado, determinante de un daño causalmente vinculado a la actuación del médico y del resto de los demandados”.

En el caso de los falsos negativos, los tribunales españoles han aplicado en algunos casos la llamada “teoría de la pérdida de oportunidad”. Un retraso en el diagnóstico o un error en éste pueden suponer, y de hecho suponen en un número importante de casos, una amonización considerable en las expectativas de vida o de curación del paciente que pueden dar lugar a un supuesto de responsabilidad patrimonial. En la pérdida de oportunidad hay, pues, una cierta pérdida de una alternativa de tratamiento, pérdida que se asemeja en cierto modo al daño moral y que, por ello, en estos casos se convierte en el concepto indemnizable (Sentencia del Tribunal Superior de Justicia de Galicia, de 23 de enero de 2008).

De la amplia –y casuística– Jurisprudencia dictada en aplicación de esta doctrina, cabe deducir los siguientes requisitos, de cuya concurrencia depende en gran medida el éxito de la reclamación: a) que exista, de acuerdo con las máximas de experiencia, una probabilidad suficiente de mejora o de curación del padecimiento en el supuesto de haber recibido la adecuada asistencia sanitaria; b) que el daño tenga carácter cierto, y no sea meramente eventual, hipotético, futuro o un mero temor a sufrirlo con posterioridad; c) que exista un nexo causal directo entre la falta de asisten-

cia o el error de diagnóstico y la disminución de las posibilidades de curación o de salvar la vida.

Por supuesto, la responsabilidad por errores diagnósticos, cuando la prueba se ha practicado correctamente, pero el error entra dentro del margen de error posible dado el estado de la técnica y del conocimiento médico, dependerá de si el paciente ha sido o no informado de la posibilidad de dicho margen de error y ha asumido su producción a través del consentimiento.

Por regla general, el error en el diagnóstico no es tipificable como infracción penal, salvo que por su entidad y dimensiones constituya una equivocación inexcusable. Como dice la STS de 13 de noviembre de 1992, “los simples errores científicos o de diagnóstico no pueden ser objeto de sanción penal, a no ser que sean de magnitud tal de que modo evidente se aparten de lo que hubiera detectado cualquier médico de nivel y preparación similar y con semejantes medios a su alcance”.

Responsabilidad por errores de tratamiento. Especial referencia a la responsabilidad derivada de transfusiones sanguíneas

Transfusión de sangre contaminada

Entre los supuestos de responsabilidad en hematología por errores en el tratamiento destaca el de la transfusión de sangre contaminada. Sirva como ejemplo el caso siguiente, que sirve para exponer la doctrina uniforme de nuestra jurisprudencia al respecto: “El recurrente, nacido el 28 de febrero de 1980, padece coagulopatía congénita (hemofilia tipo B: deficiencia moderada de factor IX, con una tasa del 73% a enero de 1991). Esta patología le fue diagnosticada a la edad de once años, por el Servicio de Hematología del Hospital Infanta Cristina de Badajoz en enero de 1991, donde le fueron administradas en cuatro ocasiones –desde enero a septiembre de 1991– dosis de 1.000 UI/dosis de concentrados hemoderivados (factor de coagulación IX). [...] En junio de 1992, tras las pertinentes pruebas, se determinó serología a VHC positiva, constatándose la enfermedad (hepatitis C)” (Sentencia del Tribunal Superior de Justicia de Extremadura de 28 de abril de 2008).

Reconoce la sentencia que “la Administración no viene obligada a responder del daño cuando ha empleado los medios de control a su alcance sobre las donaciones y productos y el contagio se ha producido al no existir métodos o técnicas que permitan apreciar la presencia del virus en las donaciones”. Sin embargo, los concentrados hemoderivados le fueron administrados en cuatro ocasiones desde enero a septiembre de 1991, fecha en la que ya era posible haber realizado los análisis oportunos para comprobar si estaba contaminada (los reactivos que posibilitaron la detec-

ción de anticuerpos frente a dicho virus se empezaron a comercializar a principios de 1990, como recuerda la propia sentencia), lo cual no se hizo, contravieniéndose de esta manera las reglas de la *lex artis*.

Errores transfusionales

La Sentencia de la Audiencia Provincial de Álava de 12 de mayo de 2009 confirma la condena a la acusada, enfermera de la UCI, como autora criminalmente responsable de un delito de lesiones por imprudencia grave (arts. 147 y 152.1.1º del Código penal), a la pena de cuatro meses de prisión, e indemnizar por vía de responsabilidad civil –en concepto de daño moral– a la víctima en la cantidad principal de 25.000 euros. Los hechos por los que resulta condenada se refieren a un error transfusional, utilizando una sangre equivocada. Así, dice la sentencia que la condenada “no comprobó, debiendo hacerlo, que las bolsas del concentrado de hematíes que iba a transfundir a Emilio correspondían a este paciente ‘y que las consecuencias del error transfusional requirieron tratamiento médico intenso y rápido’”. También se dice que la acusada tuvo dos oportunidades de enmendar su error, la primera al colocar la primera bolsa haciendo una comprobación que no llevó a cabo y la segunda vez, cuando colocó la segunda bolsa de concentrados. Sin embargo, no fue hasta dos horas después, cuando ya se habían transfundido las dos bolsas, y cuando el enfermo empezaba a colapsarse y era más que evidente que algo había fallado, es decir, cuando ya no había vuelta atrás, el momento en el que se tuvo constancia del error.

Por lo que respecta a la previsibilidad del error transfusional, entiende el Tribunal que el mismo es más que evidente, tal como indica el propio protocolo de acto transfusional del Hospital de Santiago, que recoge cuáles han de ser las actuaciones a llevar a cabo ante una reacción transfusional. Es decir, que la posibilidad de error en un proceso de transfusión se contempla como posible. Y en este sentido, y de forma previa a la transfusión, se exigen una serie de medidas de precaución pretransfusionales para evitar este error. Así, se exige identificar correctamente y completamente la correspondencia entre paciente y producto a transfundir. Se dice, además, que “el mayor riesgo de error de identificación se encuentra en el momento mismo de la transfusión”. Esto lleva a concluir que ése es el momento en el que se debe tener mayor cautela, y ser muy riguroso con las identificaciones. En este sentido, existe regulación legal que indica las medidas de seguridad a adoptar en el momento de proceder a la transfusión. Así, el artículo 19.1 del Real Decreto 1088/2005 recoge cómo “La administración de una transfusión de sangre o de alguno de sus componentes deberá ir precedida de la comprobación inequívoca, por parte de la persona que la realiza, de los datos de identificación del paciente y

de los datos de identificación de la unidad de sangre o componente sanguíneo a él destinado”. En definitiva, que la posibilidad de equívoco en la actuación llevada a cabo por la enfermera se contempla como muy probable, tanto en el protocolo como en la regulación legal sobre transfusiones, y por ello exige la adopción de unas medidas de seguridad muy concretas, que la propia condenada reconoció no adoptar.

Negativa a la transfusión de sangre por razones ideológicas. El caso de los menores de edad

La confrontación entre el derecho a la vida y el derecho a la libertad religiosa ha dado lugar a cuestiones de gran importancia en el ámbito jurídico. En España, los conflictos se han planteado esencialmente con los Testigos de Jehová. La creencia religiosa de los Testigos de Jehová y la actitud coherente con ella pueden plantear serios conflictos asistenciales y jurídicos cuando el rechazo de la transfusión viene acompañado por una situación de grave peligro para la vida de un miembro de este grupo religioso, como, por ejemplo, si ha sufrido una importante hemorragia como consecuencia de un accidente o de una enfermedad (p. ej., una úlcera gástrica o intestinal), o va a ser sometido a una intervención quirúrgica que previsiblemente requerirá el soporte de la transfusión sanguínea. Este conflicto se plantea en torno a dos derechos fundamentales: el derecho a la vida y el derecho a la libertad religiosa, consagrados respectivamente en los artículos 15 y 16 de la Constitución. Ambos derechos tienen el mismo rango jurídico.

Tras un periodo de cierta indefinición en el último cuarto del siglo pasado, lo cierto es que tras la aprobación del Código penal y la redacción del delito de auxilio al suicidio (art. 143 del Código penal), y muy especialmente con las previsiones de la Ley 41/2002 respecto a la necesidad de consentimiento para someterse a un acto médico y la regulación expresa del derecho a rechazar un tratamiento médico, la problemática jurídica a este respecto ha quedado muy minimizada. De este modo, podemos plantearnos los siguientes escenarios:

1. Si el paciente adulto y capaz rechaza el tratamiento médico consistente en una transfusión de sangre, dicha decisión ha de ser plenamente respetada por el equipo médico. Una persona adulta mentalmente sana y libre de presiones psicológicas externas puede rechazar el tratamiento, incluso aunque con su decisión ponga en peligro su propia vida, sin que con ello se incurra en un delito de auxilio al suicidio por omisión. Así se desprende claramente de los arts. 2.4 y 21.1 de la Ley 41/2002.

En su Sentencia de 27 de junio de 1997, el Tribunal Supremo ya mantuvo que “el adulto capaz puede enfrentar su objeción de conciencia al tratamien-

to médico, debiéndose respetar su decisión [...]”, y decisiones judiciales posteriores de otros órganos jurisdiccionales acogen abiertamente este parecer. Por ejemplo, la Audiencia Provincial de las Palmas, en el Auto de 7 de septiembre de 1999, debe “dilucidar cuál ha de ser, desde el punto de vista jurídico-legal, el alcance de la negativa de una persona que se confiesa miembro de los llamados Testigos de Jehová, a recibir una transfusión de sangre considerada necesaria para el médico que la asiste en su enfermedad, así como cuál es la postura de dicho profesional igualmente en el ámbito jurídico-legal”. El conflicto surge ante la negativa de la paciente a ser transfundida, por lo cual se solicita a la autoridad judicial que si se produce una “necesidad vital”, se autorice que “los médicos que atienden al enfermo actúen de la forma que estimen más conveniente para preservar la vida de aquél aplicando el tratamiento más adecuado al caso”. Surge así, reconocen los magistrados, “un conflicto entre el proceder, según sus respectivas conciencias, del enfermo y del médico –tan respetables la del uno como la del otro, incluso desde el punto de vista jurídico-legal, al amparo del artículo 16 de la Constitución Española [...]. Consiste en un conflicto que se plantea puramente en la esfera interna y más íntima del ser humano –su conciencia, su psique– en la que no entra el Derecho Positivo, como tampoco entra, o no debe entrar, ninguna persona ajena al sujeto e cuestión». Planteado el conflicto sujeto a análisis en tales términos, decide la Audiencia Provincial lo siguiente: “la respuesta judicial a peticiones como la sometida a conocimiento de esta Sala es la de sugerir que la medida a adoptar sea la que dicten las conciencias de enfermo y médico, si logran ponerse de acuerdo en un diálogo estrictamente privado, íntimo, libre de interferencias extrañas; y si tal acuerdo de orden estricta y exclusivamente moral, de conciencia, anímico, no se produce, decidir, como así se hace en el presente supuesto, que prevalezca la postura del enfermo pero imponiendo previamente a éste, o a su familiar más próximo, si aquél se encuentra inconsciente, la firma de una declaración escrita exponiendo que le prohíbe al médico el que le realice una transfusión de sangre cualquiera que sea el estado del enfermo en cuestión, y aunque de ello dependa su vida”.

2. La cuestión es muy distinta cuando se pone en peligro la vida humana ajena por dar preferencia a la libertad religiosa. Esto es particularmente grave cuando el afectado es un menor o un incapaz (enfermo o deficiente mental –aunque no haya sido incapacitado–) o un paciente que ha perdido la conciencia y no puede expresar su voluntad. En concreto, la cuestión se ha planteado ante la hipotética negativa de los padres a que el hijo reciba una transfusión de sangre vital, por pertenecer al grupo religioso de

los Testigos de Jehová. Este conflicto debe resolverse en favor del interés de mayor valor desde el punto de vista jurídico, que es la vida o la salud del menor. Así, se admite que una negativa al tratamiento del hijo menor por razón de las creencias religiosas (p. ej., oponerse a una transfusión de sangre) constituiría un ejercicio incorrecto o abusivo de la patria potestad, debiendo actuar entonces el médico en defensa de la vida de su paciente, bien interviniendo directamente, si se encuentra en una situación urgente y de riesgo vital, o acudiendo al juez, si a pesar de la urgencia se cuenta con tiempo suficiente para solicitar tal consulta.

3. Cuando el propio menor se niega a someterse a una intervención necesaria para la protección de su salud o su vida, se produce un conflicto entre la capacidad de decisión del menor sobre su salud (que encuentra acomodo los arts. 162.II.1o del Código civil y 9.3.c) de la Ley 41/2002) y la vida. Aunque pueden plantearse algunas dudas sobre la validez de la decisión del menor cuando éste cuenta con más de dieciséis años o está emancipado, la doctrina mayoritaria y la jurisprudencia (Sentencia del Tribunal Constitucional 154/2002, de 18 de julio, en su fundamento jurídico 10) se inclina por entender que, ante estos dos intereses en conflicto, debe primar el segundo, con lo cual podrá autorizarse que la intervención se lleve a cabo negando eficacia a la decisión adoptada por el menor.

Bibliografía

- Hernández Plasencia JU. Responsabilidad penal de los profesionales biosanitarios. En: CM Romeo (dir.). Enciclopedia de Bioética y Bioderecho. Granada: Comares; 2010 (en prensa).
- Méjica J. Contagios transfusionales. Un repertorio de cuestiones jurídicas y criterios jurisprudenciales. En: L Martínez-Calcerada, R De Lorenzo y Montero. Derecho médico. Tratado de Derecho sanitario. Tomo I. Madrid: Colex; 2001.
- De Ángel Yagüez R. Responsabilidad civil de los profesionales biosanitarios. En: Carlos M. Romeo Casabona (dir.). Enciclopedia de Bioética y Bioderecho. Granada: Comares; 2010 (en prensa).
- Romeo CM. ¿Límites de la posición de garante de los padres respecto al hijo menor? (la negativa de los padres, por motivos religiosos, a una transfusión de sangre vital para el hijo menor). Revista de Derecho Penal y Criminología 1998; 2.
- Romeo CM, Emaldi A, Escajedo L, Nicolás P, Romeo S, Urruela A. La Ética y el Derecho ante la biomedicina del futuro. Bilbao: Universidad de Deusto; 2006.
- Santos MJ. Sobre la capacidad del menor para el ejercicio de sus derechos fundamentales. Comentarios a la TC S 154/2002 de 18 de julio. La Ley, 12 de diciembre de 2002.
- Seuba JC. La responsabilidad civil por uso de sangre o productos hemoderivados contaminados. Un estudio Jurisprudencial, Derecho Privado y Constitución, no 13, Enero-Diciembre, 1999.
- Silva JM. Responsabilidad penal por contagio hospitalario. Derecho y Salud Enero-Junio 2000; 8 (1).
- Gallardo MJ. De nuevo sobre el concepto de *lex artis*: especial referencia a la doctrina de la pérdida de oportunidad y el daño desproporcionado o culpa virtual. Diario La Ley; 1.

LA PROTECCIÓN JURÍDICA DE LA INFORMACIÓN GENÉTICA, MUESTRAS BIOLÓGICAS Y BIOBANCOS

P. NICOLÁS

Cátedra Interuniversitaria de Derecho y Genoma Humano. Universidad de Deusto. Universidad del País Vasco. Bilbao

Introducción. Marco normativo

La reflexión sobre las implicaciones éticas de la obtención de información genética comenzó a extenderse durante los años ochenta y se plasmó incluso en textos de organismos internacionales, como recomendaciones del Consejo de Europa, textos sin fuerza jurídica vinculante pero con una importante trascendencia como llamada de atención a los agentes implicados en general, y a los Gobiernos en particular, sobre la emergencia de un nuevo objeto de protección. En la siguiente década, se aprobaron ya declaraciones internacionales e incluso tratados entre Estados, y se fueron concretando principios muy generales en requerimientos y guías más concretos. En los primeros años del siglo XXI, la atención ha evolucionado hacia normas todavía más específicas, y en España ha entrado en vigor la Ley 14/2007, de Investigación Biomédica (LIB), que dedica su título V a “Análisis genéticos, muestras biológicas y biobancos” (artículos 44 a 71).

El fundamento sobre el que se construye esta nueva regulación es doble: por una parte, recoge una inquietud que, como se acaba de esbozar, se había puesto de manifiesto hacía ya algunos años; por otra parte, proyecta sobre un objeto particular una serie de normas que de hecho eran ya aplicables a la información genética antes de la entrada en vigor de la LIB, y articula algunas reglas particulares. Estas normas son las referidas a la protección de datos de carácter general, a los derechos de los pacientes y a la documentación clínica que se aplicarán en lo no previsto en la LIB.

La LIB es una ley básica, cuyo desarrollo por parte de la Administración Central está previsto para algunas materias, como el consejo genético, los biobancos, la circulación internacional de muestras biológicas para investigación *in vitro* o los Comités de Ética de la Investigación, que sustituyen a los Comités Éticos de Investigación Clínica. Además, las comunidades autónomas en el ámbito de sus competencias tienen la potestad en ocasiones y en otras la obligación de establecer su propia regulación. La LIB, pues, es el cimiento de un cuerpo jurídico que se irá construyendo en esta materia.

Para finalizar estos breves apuntes introductorios, merece la pena llamar la atención sobre el ámbito de

aplicación de la LIB, cuestión de importancia sobre todo a efectos del capítulo II del Título V. A pesar de publicarse como “Ley de Investigación Biomédica”, las disposiciones sobre “análisis genéticos” se aplican también cuando su objetivo es diagnóstico. Como señala la exposición de motivos: “por razones de coherencia sustantiva y sistemática y en atención a los importantes derechos de las personas que pueden hallarse implicados en este tipo de análisis, esta Ley no podía renunciar a establecer el marco jurídico en el que ha de situarse la realización de análisis genéticos con cualquier finalidad, incluida la diagnóstica”.

Definiciones

La delimitación de los conceptos a efectos jurídicos es trascendental para delimitar el ámbito de aplicación de una Ley, sobre todo si se refiere a materias de un elevado componente técnico. Así, es interesante recordar lo siguiente:

- *Dato genético de carácter personal* es “información sobre las características hereditarias de una persona, identificada o identificable, obtenida por análisis de ácidos nucleicos u otros análisis científicos”. Es decir, la regulación prevista para los datos genéticos se aplicará a los que tengan un componente hereditario y se obtengan por análisis científicos, en la misma línea seguida por textos internacionales, como la Declaración Internacional de la UNESCO sobre Datos Genéticos Humanos, del año 2003. No se establecen distintos niveles de regulación para estos datos en función de la mayor o menor trascendencia de la información para el sujeto (datos más o menos “sensibles”), en la misma línea de lo que ocurre con los datos de salud en general.

- *Muestra biológica* es “cualquier material biológico de origen humano susceptible de conservación y que pueda albergar información sobre la dotación genética característica de una persona”. Como soporte de datos genéticos, los principios de protección de éstos se aplican también a este material. Sin embargo, la LIB regula las muestras biológicas sólo cuando se utilicen en el ámbito de la investigación y no en las muestras obtenidas y almacenadas con fines exclusivamente diagnósticos. Para estas últimas no existe una regulación general en nuestro ordenamiento jurídico, a salvo de alguna previsión muy particular en algunas autonomías para determinadas muestras y de alguna referencia en la LIB (artículo 48.2); la regulación más cercana es la prevista para la historia clínica, que se podría aplicar por analogía.

- En cuanto a los conceptos de *dato genético* o *muestra de carácter personal/disociado/codificado/anonimizado/anónimo*, recuérdese que el derecho a la protección de datos en general tiene por objeto proporcionar una información que pueda vincularse con una identidad (datos

de carácter personal). De este hecho deriva la necesidad (y la posibilidad) de que un sujeto ejerza el control sobre la información que se refiere a él mismo. Un dato o una muestra es de carácter personal cuando existe la posibilidad de establecer un vínculo con un individuo determinado, porque está identificado o es identificable. Por el contrario, no son objeto del derecho a la protección de datos aquéllos registrados sin un nexo con una persona identificada o identificable (anónimos), o los que estando vinculados a un sujeto se anonimizan al eliminar totalmente dicho vínculo (datos anonimizados). Ahora bien, sí son datos de carácter personal los codificados o disociados, siempre que la codificación o disociación sea reversible. Cuando esta posibilidad no exista o cuando para que pueda llevarse a cabo sean precisos medios “no razonables” (que exigen una cantidad de esfuerzo, riesgos o inversión económica desproporcionados) se entiende que los datos no son de carácter personal.

- El “análisis” que entra dentro del marco regulador del título V es “todo procedimiento destinado a detectar la presencia, ausencia o variantes de uno o varios segmentos de material genético, lo cual incluye las pruebas indirectas para detectar un producto génico o un metabolito específico que sea indicativo ante todo de un cambio genético determinado”. Para aclarar el significado de “pruebas indirectas” es muy útil acudir al Protocolo Adicional al Convenio de Biomedicina del Consejo de Europa sobre análisis genéticos en el ámbito sanitario, del año 2008. Según este protocolo, análisis genético es el cromosómico, el análisis de DNA o RNA, u otro a través del cual se obtenga una “información equivalente”. “Información equivalente” es la que se sabe vinculada a características genéticas, aunque se haya logrado a través de otras técnicas, sin necesidad de otros análisis (se trataría, por ejemplo, del análisis de productos como proteínas); al contrario, no se consideran análisis genéticos los que aportan resultados que por sí solos no son indicativos de una “modificación genética”, y que requieren de otras pruebas para confirmar este hecho. La diferencia se ilustra en el informe explicativo al protocolo con el ejemplo de la hipercolesterolemia familiar: un alto nivel de colesterol en sangre no es suficiente para diagnosticar esta enfermedad, puesto que puede responder a otros factores. Por consiguiente, este análisis no se considera “análisis genético”.

- *Biobanco* es un “establecimiento público o privado, sin ánimo de lucro, que acoge una colección de muestras biológicas concebida con fines diagnósticos o de investigación biomédica y organizada como una unidad técnica con criterios de calidad, orden y destino”. Un biobanco, pues, es algo más que una mera acumulación de muestras y requiere una cierta estructura y organización. La LIB regula los biobancos con finalidad de investigación tanto como objetivo fundamental como residual o secundario.

Mecanismos de protección de los datos genéticos

El individuo ostenta un derecho de control sobre sus datos genéticos y sobre sus muestras biológicas, lo cual significa que a él le corresponde decidir sobre si quiere conocer o no la información, quién puede acceder a los datos, para qué se utilizan y hasta cuándo (derecho a la autodeterminación informativa).

Primero, y como garantía reforzada, los datos genéticos sólo pueden ser obtenidos, utilizados o cedidos si el sujeto ha consentido de manera expresa y por escrito, y una vez que haya recibido la información adecuada para comprender la finalidad y condiciones de la obtención y uso de los datos (descrita en el artículo 47 para los análisis genético con fines de investigación en el ámbito sanitario). No obstante, si los datos se someten a procedimientos de anonimización, pueden ser utilizados con fines epidemiológicos, de salud pública, de investigación o de docencia (artículo 50.2 de la LIB), cosa que no ocurre con las muestras biológicas, para cuya anonimización se requiere el consentimiento del sujeto (téngase en cuenta, por otra parte, que si bien ésta es la regla general, se prevén excepciones, en el artículo 58.2, y un régimen especial para las que fueron obtenidas antes de la entrada en vigor de la LIB, en la Disposición Transitoria Segunda; no está regulada la utilización de muestras de fallecidos con fines de investigación, aunque se alude a esta posibilidad en el artículo 62 –que parece más relevante cuando no se emitió consentimiento en vida–).

Además, como excepción al requisito de consentimiento para la cesión de datos genéticos ante una situación de interés sanitario general, la autoridad competente, previo informe favorable de la Agencia Española de Protección de Datos o las Agencias Autonómicas en su caso, podrá autorizar la utilización de datos genéticos codificados, siempre asegurando que no puedan relacionarse o asociarse con el sujeto fuente por parte de terceros (artículo 50.3 de la LIB).

Por otra parte, la LIB prevé que “en el caso de análisis genéticos a varios miembros de una familia, los resultados se archivarán y comunicarán a cada uno de ellos de forma individualizada. En el caso de personas incapacitadas o menores se informará a sus tutores o representantes legales” (artículo 51.2). Sin embargo, esto no significa que cuando se trate de análisis a menores no se deban seguir las reglas generales sobre quién ha de prestar el consentimiento en el ámbito médico (se valorará la madurez del menor y, en todo caso, lo prestará por sí mismo cuando se tenga 16 años o más). La obligatoriedad de comunicar en todo caso la información a los tutores o representantes legales llama la atención por apartarse de aquel régimen general. Asimismo, en el ámbito de la investigación científica, “La obtención de muestras bioló-

gicas de menores de edad [...] estará sometida a las siguientes condiciones: d) que se cuente con la autorización por parte de los representantes legales del menor o de la persona incapacitada o que, en su caso, existan garantías sobre el correcto consentimiento de los sujetos fuente”, lo que implica también la necesidad de valorar la madurez del menor para tener en cuenta su opinión en esa medida.

En segundo lugar, obtenida la información genética, ésta se conservará en la historia clínica del paciente (si se trata de información obtenida en, o con aplicación en, el ámbito clínico) y los profesionales sanitarios del centro o establecimiento tendrán acceso a los datos que consten en la misma, en tanto sea pertinente para la asistencia que presten al paciente (artículo 50.1 de la LIB), lo cual parece hacer referencia al establecimiento de niveles de acceso a la historia, cosa que debería implantarse en los centros. Todos los profesionales que accedan a los datos están sujetos al secreto profesional y “sólo con el consentimiento expreso y escrito de la persona de quien proceden se podrán revelar a terceros datos genéticos de carácter personal (artículo 51 de la LIB), incluidos familiares, como se dijo más arriba. Téngase en cuenta que antes de consentir al análisis, el sujeto debe ser informado de la relevancia que los resultados pudieran tener para los miembros de su familia y de que será él en su caso quien decida sobre la comunicación (artículo 47.4º de la LIB). No se han previsto excepciones a esta regla, lo cual no significa que no se puedan aplicar las causas de justificación previstas en la legislación, de manera que estaría justificada la ruptura del deber de secreto si se persiguiera proteger un interés de igual o mayor entidad que el mal que se estaría causando al romper el deber de secreto.

En tercer lugar, el sujeto tiene derecho a conocer los datos que se hayan obtenido del análisis, es decir, tiene derecho de acceso a la información (artículo 49 de la LIB). La ley prevé que todo el proceso de diagnóstico genético se lleve a cabo en un ámbito asistencial y por profesionales especializados y centros acreditados (artículos 56 y 57 de la LIB), por consiguiente, la transmisión de información genética con relevancia para la salud del sujeto debe desarrollarse en ese contexto. Queda pendiente todavía el desarrollo reglamentario de las condiciones concretas en que el consejo genético se ha de llevar a cabo.

La información que el sujeto debe conocer es aquella científicamente validada, es decir, cuyo significado se pueda interpretar de manera que incida en la salud y en la vida del sujeto o de sus familiares (artículo 26 de la LIB). Pero también se ha de tener en cuenta que el paciente o sujeto de la información puede optar por la ignorancia y expresar este deseo al emitir su consentimiento (artículo 49.2 de la LIB). Se prevé que, si en estos casos la información es necesaria

“para evitar un grave perjuicio para la salud de sus familiares biológicos, se podrá informar a los afectados o a su representante legalmente autorizado. En todo caso, la comunicación se limitará exclusivamente a los datos necesarios para estas finalidades” (artículo 49.2 de la LIB) (esta disposición parece contradictoria con el requisito de consentimiento del sujeto para la transmisión de la información a terceros).

En relación con el derecho de acceso a la información genética, es relevante la cuestión de la eventual consulta sobre datos de familiares fallecidos o el análisis de sus muestras almacenadas. La LIB nada dice sobre la primera cuestión, pero teniendo en cuenta el régimen de acceso a la historia clínica de fallecidos, así como la posibilidad de análisis de las muestras (lo que sí se prevé en el artículo 48.2), debe reconocerse este derecho cuando exista necesidad para la protección de la salud. Advierte la LIB que tal derecho decae si el fallecido lo hubiese prohibido expresamente en vida y así se acreditara, aunque parece adecuado entender que en situaciones de riesgo grave dicha oposición podría carecer de efecto.

Finalmente, en cuanto al derecho a la cancelación de los datos, la LIB establece un periodo mínimo de cinco años desde la fecha en que fueron, durante el cual es obligatorio el mantenimiento; a partir de este periodo el interesado podrá solicitar la cancelación (Artículo 52.1 de la LIB). El periodo se corresponde con el mínimo establecido para la historia clínica en la Ley 41/2002, que se ha ampliado en las normativas de las comunidades autónomas. Ahora bien, teniendo en cuenta la previsión más específica de la LIB, parece que no cabe aplicar, en tanto no se prevea expresamente, dichos periodos como obligatorios (durante los cuales no cabe el derecho a la cancelación) para la conservación de los datos genéticos. Si no mediase solicitud de cancelación, los datos se conservarán durante el plazo que sea necesario para preservar la salud del paciente o de terceros relacionados con él (artículo 52.2 de la LIB), de lo cual se podrán derivar periodos muy extensos. Fuera de estos supuestos, los datos únicamente podrán conservarse, con fines de investigación, de forma anonimizada, sin que sea posible la identificación del sujeto fuente (artículo 52.3).

Si los datos se obtuvieron en el marco de un proyecto de investigación, y no son datos de la historia clínica, el periodo de almacenamiento lo marca el cumplimiento de las finalidades que justificaron su recogida, en el marco de las cuales el sujeto consintió a la obtención y utilización de aquéllos. Si en este contexto se solicitara la revocación del consentimiento, el ejercicio de este derecho no supondrá la cancelación de los datos cuando se hubieran obtenido como resultado de una investigación (artículo 59.1b).

En fin, la LIB ha introducido muchos matices importantes en la gestión de los datos genéticos con el

fin de asegurar la calidad y el control de la información. Pero para la efectividad de esta regulación es necesario un esfuerzo por parte tanto de los profesionales como de las administraciones involucradas. Éste es el reto que se afrontará en los próximos años, una vez construidos los pilares normativos básicos.

Bibliografía

- Comisión Europea. 25 recomendaciones sobre las repercusiones éticas, jurídicas y sociales de los test genéticos. Bruselas; 2005.
- Grupo del artículo 29 sobre Protección de Datos. Documento de trabajo sobre datos genéticos. Bruselas: Comisión Europea; 2004.
- Joint Committee on Medical Genetics. Consent and confidentiality in genetic practice Guidance on genetic testing and sharing genetic information. London: Royal College of Physicians; 2006.
- Masiá J (ed.). Pruebas genéticas. Genética, derecho y ética. Bilbao: Universidad Pontificia de Comillas - Desclée De Brouwer; 2004.
- OECD. Directrices para garantizar la calidad de los estudios genéticos moleculares, Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo; 2007.
- Seoane JA. De la intimidad genética al derecho a la protección de datos genéticos. La protección iusfundamental de los datos genéticos en el Derecho español (a propósito de las SSTC 290/2000 y 292/2000, de 30 de noviembre) (Parte I y II). Revista de Derecho y Genoma Humano 2002; núms. 16 y 17.
- Varga O, Sequeiros J. Definitions of Genetic Testing in European and other legal documents. European Commission; 2009.
- Wertz DC, Fletcher JC, Berg K. Review of Ethical Issues in Medical Genetics. Geneva: WHO; 2003.

EL CONSENTIMIENTO INFORMADO EN HEMATOLOGÍA. LAS CLAVES DE LA INFORMACIÓN MÉDICA Y EL CONSENTIMIENTO DEL PACIENTE EN HEMATOLOGÍA Y HEMOTERAPIA

A.J. SANTIAGO MARÍ

Fundación PETHEMA.

Hospital Clínico San Carlos. Madrid

El concepto jurídico básico del consentimiento

El consentir, en el ámbito de las relaciones humanas, supone tolerar o acceder a lo que otro u otros proponen, cuando lo que tales pretenden no resulta inequívocamente beneficioso en todos sus aspectos. En dicho sentido, hablamos del consentimiento como un acto decisorio de indudable fuerza que sólo tiene verdadera razón de ser cuando lo que se propone es emprender una acción hu-

mana que conlleva posibles consecuencias negativas o hipotéticos riesgos para aquel o aquellos que lo otorgan y sobre los cuales se ejerce tal acción. El acto de consentir, por tanto, goza de auténtico significado vital para la persona que consiente y, por supuesto, posee plena entidad jurídica, habiendo sido así “sacralizado” en el Derecho positivo actual en muy diversos órdenes, en la base del reconocimiento del derecho fundamental a la libertad del individuo como clave sustancial de su dignidad humana.

La medicina, como muchas otras áreas de desarrollo humano, y realmente casi más que ninguna otra actividad del hombre contemporáneo, aunque se la supone buena *per se*, y sólo debe ser ejercida por profesionales capaces y suficientemente adiestrados, con una deontología y una vocación socialmente excepcionales, es en sí misma una práctica arriesgada y, por tanto, no puede hoy día ignorar la realidad jurídica existente del deber de obtención del consentimiento consciente del enfermo, el cual se ha constituido como una exigencia jurídica y profesional de ineludible cumplimiento. El acto médico no puede desprenderse, por ello, de su naturaleza jurídica en cuanto a su vertiente informativa, por cuanto en él se asume la decisión conjunta de actuación determinada sobre el otro que conllevará muchas veces ansiados beneficios pero también posibles riesgos indeseables que comprometerán su bienestar y su futuro.

El derecho del paciente a decidir sobre su destino es un derecho fundamental que ha sido constitucionalizado en todos los países desarrollados y que constituye el eje fundamental del ordenamiento jurídico sanitario vigente (Ley 41/2002 básica reguladora de la autonomía del paciente, Ley General de Sanidad, entre otras) y de las principales declaraciones normativas éticas promulgadas (Declaración Universal de Derechos humanos, Convenio de Derechos Humanos y Biomedicina de Oviedo, por ejemplo).

Para que el paciente pueda decidir acertadamente, es evidente que requiere disponer de la información adecuada y suficiente que le permita comprender su estado y situación, y que le capacite para elegir entre las opciones disponibles a su alcance. Para ello es imprescindible el concurso del profesional médico y esta necesaria cooperación en la interrelación con el enfermo, facilitándole la información adecuada y obteniendo del mismo su consentimiento expreso, ha sido reglada como un deber ético, legal y profesional inexcusable del facultativo hasta el punto de que su omisión, aunque fuera involuntaria, genera responsabilidad. El consentimiento informado encaja así como pieza fundamental de la *lex artis ad hoc* (conjunto de criterios por los que el médico se considera que actúa de

manera correcta y fiel de acuerdo a lo comúnmente aceptado por la ciencia médica para el caso médico concreto de su paciente), constituyéndose en un acto médico más, y su aparición en la medicina ha sido una de las grandes aportaciones del Derecho, que ha determinado un cambio muy considerable en el modo de entender la relación médico-paciente y en la forma de orientar y condicionar el libre ejercicio de la medicina.

La tradición médica ha sido practicada durante siglos bajo un modelo paternalista-hipocrático regido exclusivamente por el principio de beneficencia y no maleficencia, bajo el cual se consideraba que era muy difícil que el médico pudiera transferir toda su experiencia y saber al enfermo, por lo que la decisión que pudiera tomar éste era siempre de menor calidad que la del galeno, lo que generaba una relación de subordinación plena del enfermo y no tenía en cuenta su posible disenso. La visión moderna entiende, sin embargo, que la realidad de cada persona es compleja y que influyen muchos otros factores de la personalidad del individuo que pueden condicionar las decisiones que afectan a la autonomía de éste, no pudiendo quedar la medicina fuera de esta consideración. Por decirlo de otro modo, el médico es el más calificado en cuanto al saber técnico necesario para aplicar una correcta medicina en el paciente, pero ignora muchas de las motivaciones y circunstancias personales de aquel que son también importantes a la hora de decidir su destino en cualquier orden, si asumimos que cada individuo es el dueño real del mismo. La integración del saber médico objetivo y de la subjetividad del paciente en un justo equilibrio es lo que se pretende con el adecuado ejercicio del consentimiento informado.

Componentes y requisitos del consentimiento informado

Actualmente se considera que no es jurídicamente admisible un acto médico si no cumple claramente tres requisitos fundamentales: que esté indicado, que se realice de acuerdo a la *lex artis ad hoc* y que se lleve a cabo con el consentimiento válido del paciente (se considera consentimiento válido sólo aquel que se obtiene del paciente tras haber sido éste adecuadamente informado).

De acuerdo a la definición concreta que la vigente Ley 41/2002 hace del consentimiento informado, éste se determina como la conformidad libre, voluntaria y consciente de un paciente, manifestada en el pleno uso de sus facultades después de recibir la información adecuada, para que tenga lugar una actuación que afecta a su salud. Así pues, la ley establece dos momentos fundamentales en

el proceso gradual del consentimiento informado, el de la información adecuada, en el cual el paciente ejerce su derecho a saber, y el del consentimiento en sí mismo, en el cual el paciente ejerce su derecho a decidir. El derecho a saber se complementa con el derecho a no saber y se podría concretar como un derecho global del individuo a conocer toda la información que considere necesaria para poder adoptar su decisión, parte de esa información o nada de la misma, pues es también posible que el paciente, en pleno ejercicio de su autonomía decida rehusar a recibir la información y delegar en su médico parte o toda libertad de decisión. En cualquier caso, el médico ejerce en la relación con el paciente un papel clave de informador, debiendo aportar sistemáticamente aquellos datos y explicaciones en lenguaje comprensible que capaciten al enfermo para enjuiciar los beneficios y riesgos presumibles del acto médico y le permitan así adquirir un papel de protagonista activo en el proceso de decisión sobre su salud.

Para que el consentimiento sea válido, es imprescindible que concurran una serie de requisitos que se han ido conformando en la doctrina jurídica:

- Que el paciente goce de capacidad para comprender la información que se le transfiere y sea capaz de adoptar una decisión racional coherente con dicha información.
- Que se produzca en momento adecuado, lo que se asume que se realice de modo previo al acto médico, con una antelación (jurisprudencialmente aceptada) de al menos 24 horas.
- Que sea prestado libremente y sin vicios de la voluntad que puedan invalidarlo (coacciones, engaño, etc.).
- Que se produzca en la forma debida exigida por la ley. Actualmente, la Ley establece que la forma del consentimiento informado debe ser, por regla general, oral, pero se exige la necesidad de la transcripción por escrito del proceso en los casos especiales de intervención quirúrgica, procedimientos diagnósticos y terapéuticos invasores y, en general, en todo acto médico que suponga un riesgo o inconveniente de notoria y previsible repercusión negativa sobre el estado físico o la salud del paciente.
- Que pueda ser revocable en cualquier momento sin necesidad de formalidad especial alguna. En tanto esta revocación expresa no se produzca, se sobreentiende que el consentimiento se mantiene.

Contenido del consentimiento informado

De acuerdo al Convenio de Oviedo y la doctrina jurisprudencial acumulada, existe un consenso sobre lo

que se considera un “contenido mínimo” de la información que debe transmitirse al paciente en el consentimiento informado. Este contenido mínimo es aquel que le capacite para comprender la finalidad, naturaleza, riesgo y consecuencias del acto médico.

Sin embargo, la ley 41/2002, en su artículo 10, ha especificado un poco más el contenido obligado de la información que debe recibir el paciente, fijando así un “contenido básico”, el cual engloba de manera expresa los siguientes tipos de información:

1. Las consecuencias relevantes que se originarán con seguridad (problemas típicos y frecuentes para todo paciente sometido al acto médico), como por ejemplo podría ser la inmunosupresión producida por un tratamiento quimioterápico mieloablativo.
2. Los riesgos asociados a las circunstancias particulares del paciente (problemas específicos para el propio paciente), como por ejemplo podría ser el agravamiento de una cardiopatía previa por el uso de ciertos fármacos.
3. Los riesgos típicos (aunque sean muy infrecuentes), como por ejemplo una reacción transfusional hemolítica en el uso de la transfusión de un hemoderivado.
4. Las contraindicaciones (aquellas circunstancias en las que existe un riesgo especial derivado de la realización del acto médico concreto y, por ello, se desaconseja o se recomienda una especial precaución).

La Ley 41/2002 añade, además, una indicación genérica que ofrece pocas dudas: cuanto más dudoso sea el resultado de una intervención, más necesario resulta el previo consentimiento por escrito del paciente. En definitiva se pretende que el paciente reciba aquella información considerada adecuada y que no es otra que la que resulta esencial para comprender los riesgos generales y particulares de la intervención, su contexto especial y las posibles alternativas, con objeto de que pueda tomar una decisión lógica pero matizada por su propia escala de valores y prioridades. Pese a todo, el Consejo Interterritorial de Salud, en su sesión plenaria del 6 de noviembre de 1995, adoptó un acuerdo que ha trascendido hasta la fecha y que define muy pormenorizadamente los contenidos precisos que se requieren expresamente para la elaboración de un documento de consentimiento informado. Tales contenidos se muestran en la Tabla 1.

Cabe destacar un matiz interesante en este punto, respecto a la jurisprudencia del Tribunal Supremo, en relación con las peculiaridades de la hematología y hemoterapia como especialidad. El máximo tribunal considera información deficiente aquella que conlleve falta de información sobre tratamientos alternativos, así como que no haga constar la necesidad de someterse a análisis y cuidados preventivos cuando exista riesgo de recidiva de la enfermedad o ésta sea crónica o progresiva. Estas consideraciones son, por tanto, interesantes de tener muy en cuenta, más si cabe, en el

Tabla 1. Contenidos de un documento de consentimiento informado/según el acuerdo del consejo interterritorial de salud del 6 de noviembre de 1995

En todo documento escrito específico de consentimiento informado deben figurar los siguientes apartados, enunciados de forma breve y en lenguaje comprensible, de manera que los conceptos médicos puedan entenderse por la generalidad de los usuarios:
Datos personales del paciente
Nombre y apellidos del médico que informa, que no tiene necesariamente que ser el mismo que realice el procedimiento en el que se consiente
Nombre del procedimiento que se vaya a realizar, con explicación breve y sencilla del objetivo del procedimiento, en qué consiste el mismo y la forma en que se va a llevar a cabo
Descripción de las consecuencias seguras de la intervención que deban considerarse relevantes o de importancia, como por ejemplo, la pérdida de un miembro
Descripción de los riesgos típicos del procedimiento: - Se entiende por tales aquellos cuya realización deba esperarse en condiciones normales, conforme a la experiencia y al estado actual de la ciencia. Se incluyen también aquellos que, siendo infrecuentes pero no excepcionales, tienen la consideración clínica de muy graves
Descripción de los riesgos personalizados: - Deben entenderse por éstos los que están relacionados con las circunstancias personales de los pacientes y hacen referencia al estado previo de salud, a la edad, a la profesión, a las creencias, valores y actitudes de los pacientes, o a cualquier otra circunstancia de análoga naturaleza
A criterio del facultativo, puede incluirse la información que haga referencia a las molestias probables del procedimiento y sus consecuencias
Declaración del paciente de haber recibido información acerca de los extremos indicados en los apartados anteriores, así como de alternativas diferentes al procedimiento, con pros y contras, de forma que el paciente participe, si así lo desea, en la elección de la más adecuada, y que dicha elección tenga en cuenta sus preferencias
Manifestación del paciente acreditativa de estar satisfecho con la información recibida y de haber obtenido información sobre las dudas planteadas y sobre la posibilidad de revocar en cualquier momento el consentimiento informado, sin expresión de causa, así como la expresión de su consentimiento para someterse al procedimiento
Fecha y firmas del médico que informa y del paciente
Apartado para el consentimiento a través de representante legal en caso de incapacidad del paciente
Apartado para la revocación del consentimiento, que deberá figurar en el propio documento

ejercicio del consentimiento informado en pacientes aquejados de hemopatías malignas.

Condiciones del consentimiento informado

La ley actual es leal a la realidad al establecer que la regla general para la práctica del consentimiento informado se ejerza, para la mayor parte de la actividad sanitaria, de modo verbal. El error jurídico del derogado artículo 10.5 de la Ley General de Sanidad de establecer una obligación verbal y escrita del consentimiento para todo tipo de acto médico habría podido conducir a una burocratización inaceptable de la medicina y es afortunadamente corregido por la Ley 41/2002 en su artículo 8.2. Así pues, actualmente se establece la generalidad del vehículo oral de la información, pero se definen tres tipos de intervenciones en las que se exige expresamente la materialización por escrito del consentimiento informado. Estos tres supuestos son:

- Intervención quirúrgica.
- Procedimientos diagnósticos y terapéuticos invasivos.

- En general, los procedimientos que supongan riesgos o inconvenientes de notoria y previsible repercusión negativa para la salud del paciente.

Por otro lado, la ley establece que la información que se proporcione al paciente ha de ser veraz, suficiente, comprensible y adecuada. Respecto al medio, se asume como apropiado el poder utilizar formularios impresos, si bien éstos deben ser específicos del acto médico incurrido y deben contar con espacio para la anotación de información específica relacionada con las características particulares del paciente. De cualquier modo, el Consejo Interterritorial de Salud, en su documento de consenso de 1995, también establece pormenorizadamente las condiciones exigidas en la práctica del consentimiento informado. Tales condiciones se muestran en la Tabla 2.

La responsabilidad profesional en el consentimiento informado

El consentimiento informado es hoy día un acto jurídico de primer orden, por derivarse de él consecuencias jurídicas, y construye, junto al consentimiento del médico, el proceso complejo, bilateral y negocial que supone el

Tabla 2. Algunas condiciones exigidas en la práctica del consentimiento informado/según el acuerdo del consejo interterritorial de salud del 6 de noviembre de 1995

Debe realizarse con antelación suficiente (salvo en la excepción de urgencia prevista por ley)
No se consideran válidos documentos genéricos que no estén adaptados al tipo concreto de acto médico del cual se informa y solicita el consentimiento
Los documentos de consentimiento informado deben extenderse por duplicado, uno de ellos a disposición del paciente, debiendo quedar el otro en la institución sanitaria, incorporado a la historia clínica correspondiente
El destinatario de la información es siempre el paciente capaz, por lo que debe ser éste el que otorgue y firme el consentimiento, salvo las excepciones establecidas en el Artículo 10.6 de la Ley General de Sanidad:
a) Cuando la no intervención suponga un riesgo para la salud pública,
b) Cuando no esté capacitado para tomar decisiones, en cuyo caso, el derecho corresponderá a sus familiares o personas a él allegadas
c) Cuando la urgencia no permita demoras por poderse ocasionar lesiones irreversibles o existir peligro de fallecimiento
· Cuando el paciente no quiera recibir la información, ésta debe transmitirse a los familiares o en su defecto a la persona que designe.
· El consentimiento informado debe ser firmado por los menores cuando, a juicio facultativo, reúnan las condiciones de madurez suficientes para otorgarlo
· Cuando a juicio facultativo el paciente, aún siendo mayor de edad, no tenga capacidad de discernimiento para decidir acerca de una intervención, debe requerirse el consentimiento informado de los parientes o allegados más próximos

contrato de prestación de servicios médicos. Entendiéndose así, es evidente que resulta de aplicación el artículo 1.261 del Código Civil que considera hecho imprescindible para la formalización válida de la relación contractual, el libre consentimiento de las partes, de manera que la ausencia de consentimiento efectivo del paciente determinaría la nulidad del contrato, produciéndose entonces la exigencia de responsabilidad sobre las consecuencias negativas derivadas del proceso.

Es evidente que todo acto médico sobre un paciente consciente y con capacidad, que acepta voluntariamente ser tratado por un profesional médico, es al menos tácitamente consentido por éste, pues no se lleva a cabo a la fuerza, pero la ley y la jurisprudencia en esta materia inciden en el aspecto sustancial de la validez del consentimiento, la cual sólo puede lograrse con una información previa adecuada. El paciente puede consentir sin contar con información alguna, como de hecho tantas veces así ha sucedido, lo que se denomina "consentimiento desinformado" (consentimiento prestado sin una información adecuada previa) pero este tipo de consentimiento es considerado por el ordenamiento jurídico actual un consentimiento no válido y, en términos judiciales, eso significa que la valoración que de él se hace es prácticamente equivalente a la de la inexistencia del consentimiento. El consentimiento no válido (consentimiento desinformado o ausencia del consentimiento informado) conduce invariablemente a los jueces a valorar la acción del médico como profesionalmente incorrecta y, en caso de daños al paciente derivados del acto médico realizado, genera responsabilidad civil, conllevando por ello una condena en el campo reparativo, si bien hasta la fecha nunca ha sido considerada en sí misma como generadora de responsabilidad penal.

Respecto a la graduación de la reparación exigible al médico, podemos decir que, si bien la interpreta-

ción jurídica dominante en esta materia es la de no penalizar al médico por la ausencia de un consentimiento válido exactamente en la misma proporción que la que sería aplicable al hecho de provocar al paciente un daño claro por culpa del facultativo (es decir, no se exige un deber íntegro de reparación del daño acontecido en la misma medida); sin embargo, sí se asume que el médico debe compensar al paciente por el perjuicio acaecido, porque se considera que la omisión del deber de información supone el incumplimiento de un deber jurídico fundamental que privó a su paciente de la oportunidad de enjuiciar subjetivamente los riesgos del acto médico y le impidió poder decidir, en caso de contar con toda la información necesaria, no someterse al mismo. Como resulta indemostrable que el paciente se hubiera podido someter igualmente al acto médico, aún conociendo la información del riesgo asociado al mismo, se asume jurídicamente que el paciente es víctima de dicha privación de libertad y que el médico, por tanto, debe asumir las consecuencias de esa usurpación de su derecho, compensando a aquél por los trastornos sufridos en la medida de su extensión, gravedad e irreversibilidad de los daños y perjuicios producidos. Los requisitos para que una consecuencia negativa del acto médico sea indemnizable se basan en la relación demostrada de causalidad, por la cual el paciente debe haber sufrido un daño personal cierto y probado que sea clara consecuencia de la intervención médica practicada y del que no hubiera sido advertido previamente, si bien se requiere que se trate de un riesgo típico aunque fuera infrecuente, y no extraordinario.

El enfoque jurídico actual también viene a considerar el consentimiento informado escrito y firmado como el mejor medio de prueba, aunque no el único, del hecho informativo del que es responsable el médico y del consentimiento expreso otorgado por su

paciente sobre aquello que le ha sido propuesto médicamente para su supuesto bien. Es recomendable, por tanto, que el médico, tanto en actos bajo consentimiento oral como escrito, acredite siempre en la historia clínica el haber cumplido con su deber reglado de información y obtención del consentimiento, por ser esto un medio de prueba adicional que puede serle muy útil en su defensa en caso necesario de tener que demostrar el ejercicio satisfecho de esta responsabilidad. Recordemos que en caso de litigio, la carga de la prueba recae sobre el médico, por ser imposible para el paciente demostrar un hecho negativo (el no haber sido convenientemente informado previo al consentimiento) y sí ser posible para el médico el acreditar la realización del hecho positivo de la información debida. En este sentido, cabe aclarar que, si bien se acepta como válida legalmente la información meramente verbal en numerosos actos médicos (los no definidos por la ley como de obligada constancia escrita del consentimiento: cirugía, técnicas invasivas, actos de riesgo o notoria repercusión negativa), la posibilidad para el médico de demostrar que ésta fue realizada y que se ajustó a los requerimientos legales mínimos exigibles se torna mucho más complicada, a no ser que se disponga de elementos adicionales de prueba como la incorporación de esta información a la historia clínica, el testimonio de testigos sin tacha o la presentación de otros medios alternativos de prueba (grabaciones, e-mail, entre otros).

La Ley 41/2002 establece que la historia clínica es un documento clave en el registro de los procesos de información y consentimiento con el paciente y recomendación de hecho a los profesionales sanitarios que adquieran el hábito de incorporar en ella comentarios y anotaciones de lo que hablan con sus pacientes, de manera que se pueda dilucidar claramente el adecuado respeto de los derechos de información de los enfermos y el correcto cumplimiento del proceso continuado de consentimiento informado.

Por otro lado, cabe decir que el documento de consentimiento informado no es un documento exonerador de responsabilidad respecto a la exigencia de buena praxis médica por el mero hecho de existir. Es simplemente un documento que, cuando es válido, acredita que el paciente ha sido adecuadamente informado, es consciente de su realidad, la asume, entiende su alcance y decide libremente ser sometido al procedimiento diagnóstico o terapéutico sobre el que el médico le ha informado, asumiendo los riesgos no evitables y renunciando a cualquier otra posible alternativa disponible de las que el médico también le habrá informado, pero no constituye un documento probatorio del buen proceder médico posterior ni libera al profesional de su responsabilidad en caso de negligencia o franca impericia. Por ello, cuando es válido, es un documento con valor probatorio a efectos jurídicos del

cumplimiento del deber de informar, pero no necesariamente del correcto proceder del profesional en el acto médico consentido y practicado.

Situaciones excepcionales del consentimiento informado

El consentimiento informado no puede ser ejercitado en la misma forma en determinadas situaciones excepcionales en las que el deber de informar no cuente con un margen que haga factible su perfecto cumplimiento o no sea pertinente. Estas situaciones excepcionales en las que se releva al médico de su deber de información y obtención previa del consentimiento se han definido legalmente y son las siguientes:

- Situación médica urgente que no permita la participación del enfermo o sus familiares o allegados en el proceso informativo y decisorio, y que conlleve un riesgo inmediato grave para aquél (urgencia vital que conlleve lesiones irreversibles o fallecimiento del paciente). Esto no supone una limitación definitiva, pues en realidad se considera que existe un consentimiento implícito o presunto y que, en cuanto a la información, simplemente se produce un retraso en la aportación de la misma; *a posteriori* se debe siempre informar al paciente y/o a los familiares.

- Riesgo para la salud pública en los términos expresamente definidos por la ley (vacunaciones obligatorias por epidemia, imposición de cuarentena, entre otros).

- Situaciones jurídicas conflictivas especiales en las que se emita una orden judicial de proceder respecto al acto médico (alimentación forzosa en huelga de hambre, transfusión en persona que rehúsa a la misma por convicción religiosa, entre otros).

- Por estado de necesidad terapéutica, el cual se puede producir por lo que ha venido en denominarse “privilegio terapéutico”, que es aquella situación por la cual el médico, bajo su propio criterio profesional y el conocimiento de la psicología médica, decide una restricción o suavización de la información que debe proporcionar al paciente con objeto de evitarle un perjuicio o agravamiento de su estado psico-físico de salud. Esta información moderada es la que algunos juristas llaman la “verdad soportable” y que los médicos, sobre todo los de especialidades de enfermedades graves como los hematólogos, conocemos tan bien. En cualquier caso, cuando el médico crea oportuno limitar la información al paciente por estado de necesidad terapéutica, deberá observar el cumplimiento de dos requisitos adicionales muy importantes: la explicación razonada de las circunstancias en la historia clínica del paciente y la comunicación de la decisión profesional a las personas vinculadas a éste.

Aparte del estado de necesidad asociado a un acto médico de emergencia, se pueden producir otros esta-

dos de necesidad terapéutica, como por ejemplo el que sucede en la situación denominada “de hallazgo médico”. Esta situación es la que se refiere al hallazgo imprevisto de una lesión o sustrato de enfermedad en el curso de un acto terapéutico (p. ej., cirugía, endoscopia intervencionista). La casuística es abundante al respecto y, en este caso, se concibe que sería más perjudicial para el paciente omitir el acto terapéutico con objeto de solicitarle *a posteriori* el consentimiento, lo que conllevaría tener que repetir de nuevo el acto invasivo y generar una demora adicional perjudicial, que solucionar en curso directamente ese hallazgo no diagnosticado previamente si el médico lo ve factible y es un acto de evidente necesidad médica, de acuerdo al criterio de beneficencia del paciente. La valoración que se hace en Derecho en estas situaciones ha venido siendo interpretada de modo muy similar a la de la situación excepcional de urgencia médica, cuando la necesidad terapéutica no ofrecía discusión.

Existe un último supuesto que no exime al médico de su deber de obtención del consentimiento, si bien le impide poder informar al enfermo. Este supuesto es el referido al deseo del paciente de no ser informado sobre su salud. El derecho a no saber ha de ser igualmente respetado dentro del ejercicio de la autonomía del paciente, si bien es obligado que el médico haga constar dicha circunstancia en la historia clínica y comunique la decisión a las personas vinculadas al paciente procurando recabar de éstas el consentimiento debido.

Reflexiones críticas sobre el consentimiento informado

A nadie se le ocurriría pensar que su dignidad humana pueda verse menoscabada porque un profesional al que se contrata para un servicio (un mecánico, un fontanero, un taxista...) no le haga partícipe de todo el procedimiento técnico que seguirá para ofrecerle el resultado positivo para el que éste fue contratado. Lo que realmente importa en tal situación es que el profesional garantice una serie de medios y el conocimiento y experiencia necesarios para poder ofrecer el servicio profesional que se le demanda y se garantice así un resultado positivo, sin esperar que el acto quede invalidado por el hecho de que la información aportada no haya sido adecuada. En medicina, no es así porque el sustrato del ejercicio no es un objeto, sino la propia persona. El médico no está obligado a garantizar un resultado positivo pero sí los medios, la pericia y los conocimientos adecuados para atender el problema de salud del que se le requiere intervención, lo cual debería seguir siendo siempre lo verdaderamente esencial dentro de la práctica médica; sin embargo, al profesional médico se le exige también, en aras de la dignidad del paciente y su derecho fundamental de liber-

tad, que informe de todo lo relevante y que someta al criterio del paciente, tras la información que lo capacite para ello, la decisión final del acto médico y a veces las vías de su realización. El médico tiene en tal proceso muchas veces el dilema, a la hora de informar, de hasta qué punto de prolijidad resulta procedente aportar la información relativa a la salud del paciente y hasta qué punto de sometimiento a la decisión de éste debe condicionar su método de trabajo y su actitud reglada como profesional. De hecho, la legislación al uso relacionada con la regulación del derecho de información y consentimiento del paciente denota también esa sutil incertidumbre y hasta incurre en cierta contradicción cuando pretende pormenorizar el modo en que se debe cumplir con el respeto a los derechos fundamentales del paciente en ciertas condiciones límite o cuando intenta establecer una norma general para toda práctica cotidiana que, por fuerza, es imposible perfeccionar para todo supuesto posible hasta el grado que la ley exigentemente demanda.

Los profesionales médicos sabemos bien que la medicina es muy compleja ya de por sí y que resulta de mayor dificultad ejercerla teniendo por objetivo convertir todo acto médico en un acto impecablemente legal en todos sus aspectos. Determinadas situaciones de emergencia, de incertidumbre sobre la capacidad del paciente, de duda sobre el papel debido ante los familiares, de dificultad práctica de articular procedimientos en acciones que requieren pleno dinamismo para que sean médicamente eficaces o efectivas, son ejemplos de lo difícil que puede resultar materializar el ideal jurídico en toda la práctica médica cotidiana y de lo sujeta que puede estar a sospecha o mal juicio la práctica médica si se pone excesivo hincapié en la formalidad del acto médico por encima de su verdadera finalidad.

La medicina es complicada y extraordinariamente amplia en su conocimiento, por lo que resulta muy difícil, en la mayor parte de las ocasiones, proveer al paciente de todos aquellos elementos de juicio necesarios como para permitirle participar de modo activo en el sabio proceso de la decisión al nivel que las circunstancias muchas veces demandan. El paciente no suele poseer un conocimiento médico suficiente como para decidir en un plano estrictamente técnico, mejor que su galeno, lo más conveniente para su salud, y surge con ello un primer problema crucial en la relación médico-paciente, el de la transmisión del conocimiento necesario para tomar las decisiones más acertadas. Por otro lado, el problema de salud es del paciente y esa condición lo hace vulnerable a la hora de decidir. Por ello, es posible que el paciente, además de carecer de la formación técnica suficiente, pueda experimentar en ocasiones un proceso anómalo de decisión debido a la distorsión que pueda ejercer la influencia de su subjetividad. Los temores, la ansiedad o depresión por

sentirse amenazado en su salud y el miedo a la muerte pueden condicionar de modo claro todo análisis y elección e impedirle decidir con un mínimo de objetividad lo mejor para su caso. La necesaria toma en consideración de los valores del paciente resulta innegable en el proceso de interrelación médico-paciente y el facultativo debe esforzarse en comprender esa dinámica psicológica propia del enfermo, pero los médicos sabemos muy bien cómo pueden trastocarse todos estos elementos condicionantes de la personalidad en momentos tan críticos como el de la vivencia de enfermedad.

Existe un énfasis doctrinal jurídico importante en considerar el consentimiento informado como un derecho fundamental del paciente directamente relacionado con su derecho de libertad y dignidad personales, lo que no se puede poner en tela de juicio, pero no parece existir ese mismo énfasis o preocupación en ocasiones al respecto de la calidad de la decisión del paciente en el marco de su papel de debilidad por estar enfermo y por desconocer los entresijos de la ciencia médica.

Llegados a este punto, y sabiendo que queda tan claro lo que es exigido en el plano jurídico, en donde la legislación presente establece incluso una cierta preeminencia de la soberanía del paciente frente a ningún otro posible criterio, parece ineludible intentar asumir el empeño de incrementar la calidad de la información transmitida al enfermo para evitar así el posible riesgo de una decisión equivocada debida a un déficit de conocimiento o una subjetividad distorsionante del proceso intelectual. Si el paciente es quien tiene la última palabra, resulta evidente que debe refinarse al máximo el proceso de la comunicación con él para que comprenda del mejor modo posible los riesgos y el alcance de las decisiones diagnósticas o terapéuticas que le puedan ser propuestas en beneficio de su salud, pero esto es bien complicado. Las frases “¿usted que haría?”, “si usted lo tiene claro ¿por qué me viene ahora con papeles?” o “¿y si firmo quién me garantiza que todo se hará bien?” son bastante frecuentes en la boca de nuestros pacientes, porque el documento de consentimiento informado no puede evitar ser percibido tanto por médico como por paciente como un elemento anómalo en la relación directa médico-enfermo, mal que nos pese.

Hay algo que quizá no encaje en toda esta tradición jurídica moderna cuando, asumiendo que todos perseguimos un mismo objetivo, comprobamos que la existencia del consentimiento informado no es vista positivamente por algunos médicos ni tampoco por algunos pacientes. En el caso de tales facultativos, el consentimiento corre el riesgo de ser entendido como un mero trámite insustancial que nunca podrá retener toda la información prolija necesaria ni transferir al paciente una sabiduría repentina sobre todo posible ries-

go y avatar, y que supone, en el mejor de los casos, un engorro más en la apretadísima práctica profesional diaria. Por el lado de los pacientes, es curioso observar cómo, en ciertas personas, el consentimiento es visto como un documento por medio del cual el médico podría tratar de conseguir eludir su responsabilidad, privando por ello al paciente de posibles reclamaciones posteriores ante una hipotética mala praxis. Esta visión deformada del espíritu real de la información entre médico y paciente y de la toma de decisiones puede llegar a ser tan extrema hasta el punto de habernos encontrado en alguna ocasión con algún paciente que pretendía negociar algún extremo del documento de consentimiento informado o introducir en él determinadas salvaguardas o cláusulas, como si de un contrato privado negociable en sus condiciones y previsiones se tratase.

Estas actitudes denotan ciertamente la existencia aún de una cierta ignorancia o confusión sobre este tema y la carencia de convicción que quizá existe todavía en algunas personas acerca de la necesidad real del consentimiento informado escrito. El documento de consentimiento informado no supone transferir ni una parte ni toda la autoridad científica o profesional al paciente, así como tampoco supone relevar al médico de su deber de máximo esmero y excelencia en el ejercicio de la medicina bajo la *lex artis*. El documento de consentimiento informado es un documento que materializa un acto puntual de comunicación y asunción de responsabilidades para ambas partes; por un lado, del médico informando y haciendo consciente al paciente de la situación en la que se encuentra, anunciándole el despliegue de todos los recursos disponibles diagnósticos y terapéuticos oportunos para su caso concreto, informándole sobre la idoneidad entre las diversas opciones y explicándole las posibles consecuencias de adoptar o no determinadas decisiones; y por otro lado, del paciente, asumiendo éste la responsabilidad de entrar en dicha información con un grado pormenorizado de conocimiento, tratando de adquirir la debida consciencia de su relevancia para su caso concreto y decidiendo con su médico lo que pueda considerarse procedente para la mejor salvaguarda de su salud.

Desgraciadamente, no existe acto médico sin incertidumbre y en el que todo riesgo sea completamente nulo. La legislación moderna impone el deber de informar de ello en cada situación y de hacer copartícipe al paciente en todas las decisiones relevantes sobre su salud, permitiéndole obtener la información en cantidad suficiente y de manera convenientemente adaptada a su nivel de comprensión, como para que su decisión goce de una mínima calidad, y responsabilizando asimismo al médico en primera persona de la eficacia de tal labor informativa. El médico, por tanto, debe ser muy consciente del impecable papel de responsabili-

dad que la ley le exige en esto y debe, por supuesto, dedicar su máximo interés y esfuerzo a seguir actuando de modo correcto en su desempeño de la medicina (lo realmente esencial) pero debe también cuidar el resto de exigencias que la ley de él espera, mediante el máximo cuidado de los procedimientos de consentimiento informado y el esmerado registro en la historia clínica de todos los avatares relacionados con la evolución del enfermo y el proceso informativo, que permitan mostrarle como el principal artífice de una continua búsqueda de la óptima comunicación con el enfermo.

Conseguir una adecuada comunicación con el paciente acerca de su salud debe ser un objetivo continuo y sistemático en la asistencia global del mismo y no únicamente en el delicado momento de la decisión médica concreta, en el que, curiosamente, se tiende a ver el documento de consentimiento informado, por muchos, como un principio y un fin en sí mismo de toda comunicación necesaria. El documento de consentimiento informado, si bien nadie niega que, bien elaborado y formulado, supone una herramienta precisa y prueba fehaciente de la transmisión de una información pertinente al paciente, así como de la aceptación por éste de una decisión, no puede ser objetivo único de la comunicación entre un paciente y su médico. La comunicación médico-paciente debe ser mucho más amplia, permitiendo a este último adquirir la mayor confortabilidad posible y tratando de obtener de él su máxima convicción y confianza.

Sólo entendiendo el consentimiento informado como un auténtico proceso, global, continuado y dinámico de la interrelación personal médico-paciente conseguiremos conciliar el objetivo de desarrollar una medicina científica y a la vez plenamente social, propia de nuestro siglo.

Agradecimientos

A D. Evarist Feliu Frasnado, *catedrático de Hematología y amigo, director del ICO y presidente de la SEHH, por su incansante apoyo en todas mis iniciativas académicas y por enseñarme el verdadero significado de las palabras bondad, integridad y entrega real a los demás.*

A D. Joaquín Díaz Mediavilla, *jefe clínico del Hospital Clínico San Carlos de Madrid y amigo, que me dio la oportunidad de aprender la especialidad de uno de los mejores y que siempre ha estado a mi lado para guiarme y señalarme*

el verdadero camino de la justicia, la ética médica y el servicio a los pacientes.

A D. Carmelo Jiménez Segado, *juez sustituto, profesor en la Facultad de Ciencias Políticas y Sociología de la Universidad Complutense y amigo, por sus valiosas enseñanzas, su entusiasmo y su aliento continuos para iniciarme en el estudio de la Ciencia del Derecho, y animarme a escribir sin complejos sobre materia jurídico-médica.*

Bibliografía

1. Lizárraga Bonelli E, et al. La responsabilidad civil y penal del médico. Madrid: Ilustre Colegio Oficial de Médicos; 1999.
2. Martínez-Pereda JM. Algunos efectos producidos por la implantación del consentimiento informado en España. La Ley: Revista Jurídica Española de Doctrina, Jurisprudencia y Bibliografía (Repertorio acumulativo anual de estudios doctrinales) 2006; 4: 1368-78.
3. Rodríguez Fernández R. El consentimiento informado. Su evolución jurisprudencial. Diario La Ley (Sección Doctrina) 9 marzo 2010; año XXXI (7358).
4. Lorenzo R, Carreras E, Santiago Marí AJ, et al. El consentimiento informado en hematología y hemoterapia. Madrid: Edimsa (Editores Médicos) y AEHH; 2009.
5. Sánchez Caro JL, Abellán F. Derechos y deberes de los pacientes: ley 41/2002 de 14 de noviembre: consentimiento informado, historia clínica, intimidad e instrucciones previas. Madrid: Comares; 2003.
6. Lluch XA. El juez civil ante la investigación biomédica. Consejo General del Poder Judicial. Cuadernos de Derecho Judicial. X-2004. Madrid; 2005.
7. Sánchez Gómez A. Contrato de servicios médicos y contrato de servicios hospitalarios. Madrid: Tecnos; 1998.
8. Galán Cortés JL. La responsabilidad médica y el consentimiento informado. Revista Médica del Uruguay. Sindicato Médico del Uruguay 1999; 15 (1): 5-12.

Normativa legal

Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de documentación clínica. Publicada en BOE n.º 274 del 15 de noviembre de 2002.

Ley 14/1986, de 25 de abril, General de Sanidad. Publicada en BOE n.º 101 del 29 de abril de 1986.

Consejo de Europa. Convenio de Asturias de Bioética. Convenio para la protección de los derechos humanos y la dignidad del ser humano con respecto a las aplicaciones de la biología y la medicina. Oviedo, 4 de abril de 1997. Publicada su ratificación en BOE n.º 251 del 20 de octubre de 1999.

Acuerdo del Consejo Interterritorial sobre Consentimiento Informado. Adoptado en la Sesión Plenaria de 6 de noviembre de 1995. Disponible en: www.aeds.org/documentos/docconsen.htm.

Células madre leucémicas: caracterización, biología y utilidad clínica

COORDINADORES: J.C. CIGUDOSA. *Madrid*
P. MENÉNDEZ. *Granada*

Resumen del simposio

Este simposio tiene como misión presentar, de una forma comprensiva y accesible a los profesionales de la Hematología, los últimos avances del conocimiento de la biología y la caracterización genética e inmunofenotípica de las células madre leucémicas. Del resultado de estos avances experimentales se desprenden múltiples aspectos prácticos que permiten desarrollar, o al menos empezar a desarrollar, aplicaciones clínicas y/o terapéuticas.

Tomando como referencia la definición de células madre leucémica más comúnmente aceptada, esto es, la subpoblación de células tumorales que reúnen al menos dos características básicas, la capacidad de autorrenovación y de diferenciación uni o, más frecuentemente, multilineal, en el simposio se abordarán varios temas específicos relevantes para entender el futuro de esta línea de investigación y sus aplicaciones en la clínica.

En primer lugar, en la ponencia del grupo que lidera el Dr. Sánchez-García del Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer de Salamanca, se abordará la descripción del papel del gen de fusión BCR-ABL como elemento único y suficiente de regenerar una leucemia mieloide crónica a partir del compartimento de células madre. En concreto, se detallarán los efectos leucemogénicos y de reprogramación del programa de diferenciación que tiene BCR-ABL, así como las implicaciones de estos efectos en el manejo de la enfermedad mínima residual y en la eficacia terapéutica de las nuevas drogas sobre este tipo de células madre leucémicas mutadas.

En la ponencia del grupo del Dr. Menéndez, se discutirá el papel y la biología del gen de fusión MLL-AF4 –procedente de la translocación t(4;11)(q21;q23)– en el mismo contexto biológico. Este grupo ha demostrado que esta fusión está presente, además de en los blastos, en las células madre mesenquimales de la médula ósea de esos pacientes (sin que haya plasticidad fenotípica). También presentará datos sobre la generación de modelos celulares con genes de fusión en células madre embrionarias de origen humano.

En tercer lugar, la ponencia de los Dres. Quintana y Segovia se centrará en aclarar conceptos sobre la caracterización y definición de célula madre leucémica en leucemia mieloide aguda, y en exponer las distintas aproximaciones que se están empleando para conocer su origen y para desarrollar nuevas terapias contra esta leucemia; es decir, nos presentarán datos sobre la identificación de esas células madre y sobre los modelos existentes y su utilidad para conocer los procesos moleculares relacionados con la resistencia de esta estirpe a las terapias actuales.

Para finalizar, la ponencia del grupo del Dr. Orfao pondrá en evidencia las limitaciones prácticas para estudiar este tipo celular, originadas en la dificultad inherente a su identificación, purificación y caracterización. En estos procesos adquiere un especial protagonismo la caracterización inmunofenotípica de las células madre leucémicas. A ello contribuyen la disponibilidad de un número cada vez más amplio de anticuerpos monoclonales, dirigidos contra distintas proteínas, con expresión compartida por parte de células madre normales y leucémicas. Esta ponencia recogerá la información más relevante del área y nos presentará datos sobre caracterización fenotípica de células troncales en un amplio panel de patologías oncohematológicas (desde neoplasias mieloides crónicas a procesos linfoides agudos).

LA CÉLULA MADRE LEUCÉMICA EN LA LMC, SU PAPEL EN LA EMR Y EN EL ENTORNO DE LA TERAPIA MOLECULAR

C. VICENTE-DUEÑAS, I. GONZÁLEZ-HERRERO, I. ROMERO-CAMARERO, I. SÁNCHEZ-GARCÍA

Experimental Therapeutics and Translational Oncology Program. Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer. CSIC. Universidad de Salamanca

Introduction

Since the discovery that human tumors contain activated oncogenes by the pioneer work of Mariano Barbacid, Geoffrey Cooper, Robert Weinberg, and Michael Wigler¹⁻⁴, many efforts have been made to elucidate the causal role that these oncogenes play in cancer development. These previous works have shown that oncogene expression is not only required for initiation of cancer but also for the maintenance of the disease and have kept oncogenes firmly in focus as therapeutic targets. In mouse models where oncogene expression is driven by tissue-specific promoters, tumors arise at high frequency, but disappear again when the inducing stimulus is switched off⁵⁻⁷, suggesting that oncogenes are the Achilles' heel of cancers⁸. Overall these observations define an homogenous role for oncogenes within cancer cells, as brief inactivation of the single tumor-inducing oncogene can cause remission in these model systems. These observations are consistent with a "hands on" role for oncogenes in regulating tumor formation in a similar way to the control of cell fate determination as a function of lineage-specific factors⁹.

This current "hands on" model of cancer is in agreement with the fact that in human cancers, all cancerous cells carry the same oncogenic genetic lesions. However, it is also a very well-known fact that cancers are composed by heterogeneous cell types^{10,11}, suggesting that, in the control of oncogenesis, the nature of the target cells suffering the effects of oncogenic activity might play an important role. In fact, therapy based on the "hands on" model of cancer fails to eradicate tumours in humans, as it is well illustrated by the BCR-ABL kinase inhibitors such as imatinib/STI571, which can target the differentiated tumour cells of chronic myeloid leucemia (CML) but fail to eradicate the BCR-ABL-expressing stem cells^{12,13}. On the contrary, these observations are compatible with the cancer stem cell (CSC) theory of cancer that suggests that tumors are hierarchically organized tissues¹⁴⁻¹⁶. If that was indeed the case, then cancer could be created and maintained similarly to any other normal stem cell-driven tissue,

like the hematopoietic system. In a normal stem cell-driven tissue, genetic programming of stem cells is all what is required to (re)constitute all differentiated cells forming the tissue, and the genetic information responsible for the stem cell programming does not need to be anymore present within the differentiated cells that form the tissue, implying a different function for oncogenes within CSCs. Thus, we reasoned that a similar organization could be underlying cancer formation. In order to initially address this biological question, we have used the *BCR-ABLp210* oncogene¹⁷.

Limiting BCR-ABLp210 expression to stem cells induces CML in mice

A major barrier for the understanding of the contribution that CSCs make to the development and maintenance of cancer and their suitability as a target was the lack of a system to limit oncogene expression to the CSC compartment. To elucidate if cancer is a stem cell-driven tissue, we used the *Sca1* locus control region to limit oncogene expression to the stem cell compartment in a transgenic mouse setting¹⁷. We have initially focused on the effects of the *BCR-ABLp210* oncogene, linked to chronic myeloid leukaemia (CML) in humans^{18,19}. CML is widely accepted to be a stem cell disorder that begins as a prolonged chronic phase, characterized by high leukocyte counts and enlarged spleen and liver. In all patients, the chronic phase of CML in the end gives rise to a blast crisis that is indistinguishable from acute leukemia. The specific BCR-ABL inhibitor STI571 is able to eliminate the BCR-ABL-expressing differentiated cells that constitute the bulk of the tumour, but it cannot eliminate BCR-ABL-expressing CSCs^{12,13}.

When the expression of BCR-ABL is restricted to the *Sca1*⁺ cells in mice, these *Sca1-BCR-ABLp210* mice fully develop CML. In these *Sca1-BCR-ABLp210* mice, although initiation takes place within the stem cell/progenitor population, the oncogene is switched off in the tumor differentiated cells which constitute the bulk of the tumor. In the paper by Perez-Caro *et al.*¹⁷, quantitative RT-PCR analysis of *BCR-ABL* transcripts was used to define patterns of *BCR-ABL* gene expression in pure populations of hematopoietic cells. Overall, *BCR-ABL* is not expressed in lineage-positive hematopoietic progenitors, but it could be that BCR-ABL target genes could continue to be expressed in the absence of BCR-ABL. These genes could be targets of a "hit and run" mode of action in which BCR-ABL turns genes on in stem cells but is not required for maintaining their expression at later stages of development. However, neither BCR-ABL protein nor downstream signaling were detected in *Sca1*⁺Lin⁺ cells of *Sca1-BCR-ABLp210* mice. The data support the hypothesis that

BCR-ABL downstream targets are switched off after the silencing of *BCR-ABL*. It might appear then counter-intuitive and surprising that cancers develop efficiently in these mice since in actual human cancers all cancerous cells carry the oncogenic genetic lesions, not only the cancer stem cells. Nevertheless, CML arises in these mice indicating that silencing of *BCR-ABL* is not critical for generation of differentiated tumor cells and suggesting a “hands off” role for BCR-ABL in regulating tumor formation (Figure 1).

To determine whether the continuous presence of BCR-ABL is necessary for the maintenance of CSCs we treated diseased *Sca1-BCR-ABLp210* mice with the specific BCR-ABL inhibitor STI571 and we found that the course of the CML disease was not modified upon treatment. These observations demonstrate that blocking BCR-ABL function (or at least abolishing its

tyrosinekinase activity) is not efficient in eliminating the CSCs, in agreement with both of the above-mentioned observations showing that STI571 treatment fails to eradicate the *BCR-ABL*-expressing stem cells in human patients^{12,13} and the development of CML in our BCR-ABL “hands-off” model (Figure 1).

But because we wanted to address the question of whether CSCs are required continuously for maintenance of the CML disease, we used a model in which *Sca1*⁺, *BCR-ABL*-expressing cells are deleted in the presence of gancyclovir. After elimination of the CSC, we were able to eradicate the whole tumour. These observations formally prove that CSCs are required continuously for maintenance of the CML disease. However, abolishing BCR-ABL function is not critical for the generation of differentiated tumor cells. In our view, this constitutes the most convincing evidence to date that these cancers arise and are driven by a cell fate change within the stem cells, and that this population is the ultimate target for cancer therapy. In total, the data suggest a “hands off” role for BCR-ABL in regulating cancer formation.

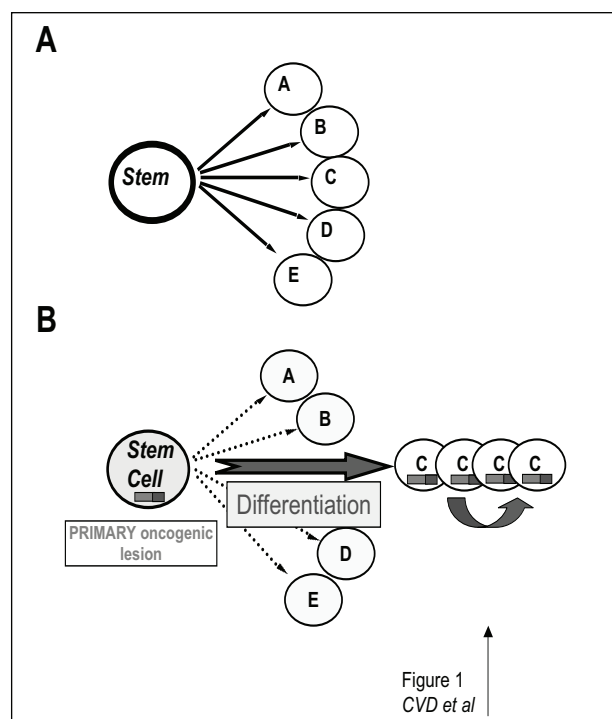


Figure 1. A “hands off” role for BCR-ABL in regulating CML formation. (A) Adopting a lineage amongst two or more options is a fundamental developmental decision in multicellular organisms. The control of cell-fate determination of a stem cell is a function of the balance between lineage-specific factors. (B) In our stem cell-driven cancer model, the expression of the oncogenic alteration is restricted to the progenitor compartment but is nevertheless capable of generating a full-blown tumour with all its differentiated cellular components, showing a hands-off role for BCR-ABL in regulating CML formation. This model implicitly relies in the fact that the oncogenic presence in the CSC compartment originates (epi)genetic latent alterations which are responsible for the posterior appearance of the tumoral phenotype¹⁷. Consistent with this, forced expression of these genes can –in certain cellular environments– select or impose a lineage outcome, explaining why most chimeric oncogenes created after chromosomal translocations are found only in one type of tumor.

How does BCR-ABL program stem cells to make a CML?

In order to identify the genes that are associated with BCR-ABLp210-induced reprogramming of stem cells we performed a supervised analysis of the transcriptional profiles of CSCs purified from *Sca1-BCR-ABLp210* mice versus HSCs from control mice. The data identified a set of genes that are reproducibly differentially regulated in CSCs versus control stem cells. Because the CSC hypothesis could imply that cancer results from the activation of dormant embryonic-rest cells^{10,11}, we next proceeded to examine, in CSCs from *Sca1-BCR-ABLp210* mice, the expression of embryonic surface markers that have been previously identified in undifferentiated mouse embryonic stem cells and we could show that CSCs in *Sca1-BCR-ABLp210* mice present embryonic figures¹⁷. Although overall these observations identify potential attractive targets for selective CSC removal, they may also just reflect the function of the oncogene at the stem cell level.

A “hands off” role for BCR-ABL in regulating tumor formation

In human pathologies and in most animals models of cancer, the oncogenic alteration(s) is(are) present in all the cellular types that compose the tumoral tissue, from the cancer stem cells to the more differentiated types. In our stem cell-driven cancer model, the ex-

pression of the oncogenic alteration is restricted to the progenitor compartment but is nevertheless capable of generating a fullblown tumour with all its differentiated cellular components, showing a hands-off role for BCR-ABL in regulating CML formation. Of course, this model implies that the oncogenic activity in the cancer stem cell compartment causes (epi)genetic latent alterations which are responsible for the later appearance of the tumoral phenotype¹⁷. In fact, our initial characterization of CSCs has shown that BCR-ABL causes secondary genetic or epigenetic changes (such as DNA methylation, centrosome abnormalities and consequent aneuploidy, and others) which may be inherited by subsequent generations regardless of the lack of continued *BCR-ABL* expression. Thus, *BCR-ABL* oncogene inactivation cannot change this epigenetic/genetic context at the CSC level, in agreement with the common occurrence of tumor relapse by which human CML evolves to escape BCR-ABL pharmacological inactivation. Moreover, these results show that the control of oncogenesis is a function of both the target-cell and the genetic oncogenic alteration(s), being the molecular mechanisms of action of BCRABLp210 at the CSC level different from those acting at later stages of tumoral cell differentiation.

Conclusions and future directions

Despite a better understanding of the biology of tumor cells, the treatment of most cancers has no significantly changed for the past four decades, and the decreasing mortality has been mostly the result of early detection and prevention rather than the consequence of effective therapeutics²⁰⁻²². Thus, the cells and genetic lesions responsible for maintaining the disease remain an intriguing and exciting topic of research, since these cells have been posited to be responsible for resistance to conventional therapies, recurrence, and metastasis²³.

We have shown that cancer growth and elimination was achieved by targeting oncogene expression to the CSCs only¹⁷. Thus, if the growth potential of a cancer depends on CSCs and on oncogenes that can function in a hands-off manner, it seems important to know how to eradicate these cells and/or inactivate the hands-off mechanism. Similarly, assessing the ability of any candidate therapy to destroy these cells would seem crucial to predicting its efficacy²⁴. The evidence for the existence of CSCs in human tumors is based on the creation of mice that are sufficiently immunodeficient to tolerate the growth of primary human cells into them²⁴. However, this growth does not exclude the possibility that engraftment rather than cancer stem cell activity correlates with a particular phenotype²⁵. CSC-based models, as the one described in Perez-Caro *et al.*¹⁷, allow bypassing the limitations and experimen-

tal variability of the xenotransplant models. An enormous advantage of our CSC-based models is that they not only enable syngeneic transplantation but they also allow studying the disease at its early stages in order to analyse the changes in CSCs long before the cancer can be phenotypically (= clinically) detected.

Besides the therapy *per se*, an essential element in cancer management is the evaluation of treatment efficacy. Therefore, new clinical methodologies need to be developed to evaluate the efficacy of CSC-based therapies and here again the CSC-based models will be pivotal to achieve this aim.

But perhaps the most crucial question of all is whether hands-off regulation mechanisms can be found in other cancer types, especially tumours of epithelial origin, which represent the bulk of human cancers. Importantly, a small subset of *Sca1-BCR-ABLp210* mice develop additional solid tumors. Considering that Sca1 has been identified as an almost universal stem cell marker in many different tissues, these data suggest that stem cell-driven oncogenesis is not specific to only hematopoietic tissues, but rather represents a broader mechanism for deregulation of stem cell differentiation, providing a paradigm that can be applied to solid-organ cancers. Thus, it is to be expected that CSCs from different cancer types will share many similarities, implying that similar CSC-based therapeutic approaches could be used in many different cancers. The challenge is now to find a way to specifically target CSCs and/or the hands-off oncogenic regulation mechanism without causing toxicity to normal cells.

Acknowledgements

We thank the members of our laboratories, past and present, for their essential contributions to many of the papers discussed herein, and apologize to colleagues whose work was not cited due to space limitations. Special thanks to Drs Rafael Jiménez, and César Cobaleda for many helpful discussions. Research in ISG group is supported partially by FEDER and by MICINN (SAF2009-08803), Junta de Castilla y León (CSI13A08 and proyecto Biomedicina 2009-2010), MEC OncoBIO Consolider-Ingenio 2010 (Ref. CSD2007-0017), NIH grant (R01 CA109335-04A1), Sandra Ibarra Foundation and by Group of Excellence Grant (GR15) from Junta de Castilla y León.

References

1. Santos E, Tronick SR, Aaronson SA, Pulciani S, Barbacid M. T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB-and Harvey-MSV transforming genes. *Nature* 1982; 298(5872): 343-347.
2. Lane MA, Sauten A, Cooper GM. Stage-specific transforming genes of human and mouse B- and T-lymphocyte neoplasms. *Cell*. 1982; 28(4): 873-880.

3. Parada LF, Tabin CJ, Shih C, Weinberg RA. Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature*. 1982; 297(5866): 474-478.
4. Goldfarb M, Shimizu K, Perucho M, Wigler M. Isolation and preliminary characterization of a human transforming gene from T24 bladder carcinoma cells. *Nature*. 1982; 296(5856): 404-409.
5. Chin L, Tam A, Pomerantz J, Wong M, Holash J, Bardeesy N, et al. Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance. *Nature*. 1999; 400(6743):468-472.
6. Huettner CS, Zhang P, Van Etten RA, Tenen DG. Reversibility of acute B-cell leukaemia induced by BCR-ABL1. *Nat Genet*. 2000; 24(1):57-60.
7. Boxer RB, Jang JW, Sintasath L, Chodosh LA. Lack of sustained regression of c-MYC-induced mammary adenocarcinomas following brief or prolonged MYC inactivation. *Cancer Cell*. 2004; 6(6):577-586.
8. Weinstein IB. Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science*. 2002; 297(5578):63-64.
9. Cobaleda C, Busslinger M. Developmental plasticity of lymphocytes. *Curr Opin Immunol*. 2008; 20(2):139-148.
10. Cohnheim, J. Ueber entzündung und eiterung. *Path Anat Physiol Klin Med* 1867; 40, 1-79.
11. Virchow, R. (1855). Editorial. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Med*.
12. Graham SM, Jorgensen HG, Allan E, Pearson C, Alcorn MJ, Richmond L, et al. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood* 2002; 99: 319-325.
13. Jorgensen HG, Holyoake T. Characterization of cancer stem cells in chronic myeloid leukaemia. *Biochem Soc Trans* 2007; 35 (Part 5): 1347-1351.
14. Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., and Weissman, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-111.
15. Perez-Caro, M., and Sanchez-Garcia, I. Killing time for cancer stem cells (CSC): discovery and development of selective CSC inhibitors. *Curr Med Chem* 2006; 13: 1719-1725.
16. Dalerba, P., Cho, R. W., and Clarke, M. F. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med* 2007; 58: 267-284.
17. Pérez-Caro M, Cobaleda C, González-Herrero I, Vicente-Dueñas C, Bermejo-Rodríguez C, Sánchez-Beato M, et al. Cancer induction by restriction of oncogene expression to the stem cell compartment. *EMBO J*. 2009; 28(1): 8-20.
18. Koefler, H. P., and Golde, D. W. Chronic myelogenous leukemia--new concepts (first of two parts). *N Engl J Med* 1981; 304: 1201-1209.
19. Melo, J. V., and Barnes, D. J. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 441-453.
20. Etzioni, R., Urban, N., Ramsey, S., McIntosh, M., Schwartz, S., Reid, B., et al. The case for early detection. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 243-252.
21. Chabner, B. A., and Roberts, T. G., Jr. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 65-72.
22. Huff, C. A., Matsui, W., Smith, B. D., and Jones, R. J. The paradox of response and survival in cancer therapeutics. *Blood* 2006; 107: 431-434.
23. Sánchez-García I, Vicente-Dueñas C, Cobaleda C. The theoretical basis of cancer-stem-cell-based therapeutics of cancer: can it be put into practice? *Bioessays*. 2007; 29(12):1269-1280.
24. Cobaleda, C., Gutierrez-Cianca, N., Perez-Losada, J., Flores, T., Garcia-Sanz, R., Gonzalez, M., et al. A primitive hematopoietic cell is the target for the leukemic transformation in human Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000; 95: 1007-1013.

ETIOLOGÍA Y ORIGEN CELULAR DE LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA B DEL LACTANTE CON REORDENAMIENTO MLL-AF4

C. BUENO¹, R.M. MONTES¹, P. CATALINA¹, R. RODRÍGUEZ¹, G.J. MELEN¹, V. RAMOS¹, P.J. REAL¹, M. ARRIERO², Á. LASSALETTA², J. GARCÍA-CASTRO¹, R. GARCÍA-SANZ³, L. MARTÍN⁴, A. ORFAO⁴, P. MENÉNDEZ¹

¹ Andalusian Stem Cell Bank. Centro de Investigación Biomédica. Consejería de Salud. Universidad de Granada. ² Hospital Infantil Niño Jesús. Madrid. ³ Departamento de Hematología. Unidad de Biología Molecular y Tipaje HLA. Hospital Universitario de Salamanca. ⁴ Servicio de Citometría de Flujo. Universidad de Salamanca. Centro de Investigación del Cáncer. Salamanca

Etología de la leucemia del lactante con reordenamiento MLL-AF4

La leucemia del lactante (niños < 1 año) representa prácticamente en su totalidad una leucemia linfoblástica aguda pro-B (LLA-pro B). Esta leucemia tiene una prevalencia relativamente baja en comparación con leucemias pediátricas que afectan a estadios más tardíos (LLA-pre B); sin embargo, la LLA-pro B se caracteriza por su extremadamente corta latencia (3-6 meses) además de por su agresividad, ya que tiene una supervivencia libre de enfermedad y una supervivencia a los 5 años inferior al 20%¹.

En los últimos años se han aportado datos que ayudan a entender mejor la etiología de la LLA-pro B del lactante. Así, se sabe que reordenamientos de gen MLL constituyen el marcador genético más común de este tipo de leucemias^{2,3}. Estudios realizados en gemelos monocigóticos con idéntica LLA pro-B junto con estudios retrospectivos en muestras recogidas en el momento del nacimiento (prueba del talón) en lactantes con leucemia MLL-AF4+ revelaron que esta translocación ocurre a nivel prenatal durante el desarrollo embrionario o fetal^{4,5}. Sin embargo, parece claro que la presencia de reordenamiento del gen MLL no es suficiente para desarrollar la leucemia, siendo necesaria la aparición de alteraciones secundarias adicionales^{3,6}.

Existen estudios epidemiológicos y genéticos que ponen de manifiesto un claro componente genotóxico capaz de romper el gen MLL en el feto y no en la madre. Los reordenamientos del gen MLL podrían ser el resultado de la exposición transplacental durante el desarrollo embrionario a sustancias que alteran la función de la topoisomerasa I (enzima encargada de reparar rupturas en el ADN), que está altamen-

te expresada durante el desarrollo fetal⁷⁻¹³. Entre los posibles agentes genotóxicos, el más estudiado es el etopósido (VP16). El etopósido es un inhibidor de la topoisomerasa I, utilizado en protocolos de quimioterapia y que se ha postulado como posible responsable del 5-15% de las leucemias agudas secundarias a tratamiento¹⁴. Recientemente, se ha sugerido que dietas ricas en bioflavonoides, una fuente de inhibidores de la topoisomerasa I en la dieta, podría causar rupturas del gen MLL dando lugar al gen de fusión MLL-AF4, teniendo un papel fundamental en el proceso de leucemogénesis^{15,16}.

Se ha demostrado *in vitro* que la exposición a altas dosis de etopósido puede originar rupturas en el gen MLL en células embrionarias de ratón⁸, células stem hematopoyéticas de origen fetal¹² y de células CD34+ de cordón umbilical^{7,10,11}. Nosotros quisimos ahondar en el efecto del etopósido durante el desarrollo embrionario humano, y más concretamente conocer si bajas dosis de etopósido inducen rupturas del gen MLL en células madre embrionarias humanas (CMEH) y estudiar si dichas rupturas conferían a las CMEH alguna ventaja proliferativa y/o selectiva. Las CMEH son igual de sensibles al etopósido que las células CD34+ de cordón umbilical, en términos de reordenamientos del gen MLL. Sin embargo, el análisis de la distribución del ciclo celular en células tratadas con etopósido *versus* células sin tratar demostró que la presencia de reordenamientos del gen MLL no confirió a las células ninguna ventaja proliferativa (células en fase de síntesis 64,4% y 63,1%, respectivamente) poniendo de manifiesto que la presencia de reordenamientos del gen MLL en CMEH no es suficiente para inducir transformación celular, siendo necesaria la aparición de otras alteraciones. Curiosamente, la exposición continuada a bajas dosis de etopósido indujo la aparición de otras alteraciones cromosómicas numéricas y/o estructurales en CMEH, pero no en células CD34+ de cordón umbilical. Estos datos sugieren que la exposición continuada a inhibidores de la topoisomerasa I durante el desarrollo embrionario podría inducir reordenamientos del gen MLL, haciendo a las células más inestables genómicamente. Además, cabe destacar que las células hematopoyéticas derivadas de CMEH en estadios tempranos (día +15 de diferenciación) son más susceptibles a rupturas del gen MLL inducidas por etopósido que células hematopoyéticas derivadas de CMEH en estadios más tardíos (día +22) (2,9% y 1,9%, respectivamente). Estos datos sugieren que la célula diana en LLA pro-B podría ser una célula de origen embrionario o una célula hematopoyética temprana en desarrollo y esto explicaría que en dichos pacientes el gen de fusión esté presente en el momento del nacimiento⁹.

Origen celular de la leucemia infantil con reordenamiento MLL-AF4

Nuevas perspectivas en la asociación de la expresión del antígeno NG2 y la presencia de reordenamientos del gen MLL en leucemias infantiles

La expresión del antígeno NG2 (*Neuron-gial antigen 2*) en leucemias se asoció inicialmente a leucemias con reordenamientos en gen MLL¹⁷. De hecho, en los últimos años se ha incluido en los paneles de diagnóstico de leucemias mediante inmunofenotipo debido a su potencial valor predictivo de dichos reordenamientos en leucemias agudas¹⁸. Sin embargo, al analizar de manera detallada los estudios en los que se evalúa dicha correlación, siempre existe un porcentaje variable de casos en los que existe expresión de NG2 sin presentar ningún reordenamiento del gen MLL^{19,20}, mientras que también existen casos en los que, existiendo reordenamientos, no hay expresión de NG2^{18,20,21}. Más recientemente, se ha sugerido que la expresión del antígeno NG2 podría asociarse específicamente sólo con 2 de los 80 reordenamientos descritos del gen MLL, MLL-AF4 y MLL-AF9 y no con el resto¹².

En base a la controversia suscitada sobre la relevancia clínica de la expresión de NG2, quisimos profundizar en la asociación entre la presencia de reordenamiento del gen MLL y la expresión de NG2. Más concretamente quisimos explorar la hipótesis de que la presencia del antígeno NG2 en ciertas leucemias podía deberse a la existencia de una subpoblación minoritaria dentro de las células hematopoyéticas stem/progenitoras CD34+ normales que coexpresan NG2 y que podrían ser las células diana donde ocurren los reordenamientos MLL.

En primer lugar, descartamos la asociación entre la expresión de NG2 y la presencia de reordenamientos del gen MLL al analizar la expresión de NG2 en diferentes líneas celulares con y sin reordenamientos. Así, vimos que células que carecían de reordenamientos del gen MLL (REH y 293T) mostraban expresión del antígeno NG2 identificado con el anticuerpo 7.1, mientras que células que presentaban reordenamientos del gen MLL (RS4;11) carecían de expresión de NG2. Estos datos fueron confirmados por citometría de flujo y RT-PCR.

Nuestra hipótesis es que la expresión de NG2 depende de la célula en la que se originaba la leucemia. Así, si el proceso leucémico se iniciaba en una célula que expresaba NG2, dicha leucemia sería NG2+. Para que esto fuera así debería existir una subpoblación minoritaria de células NG2+ dentro de la fracción de células hematopoyéticas CD34+. Cuando analizamos un elevado número de células CD34+ (2×10^5 células) en muestras de sangre de cordón umbilical y médula ósea, somos capaces de detectar un porcentaje del 2,1% y 0,83%,

respectivamente, que coexpresan CD34 y NG2. Además, si nuestra hipótesis fuera cierta, debería existir una subpoblación de precursores de células dendríticas normales coexpresando NG2, ya que el 60% de las leucemias de células dendríticas muestran expresión de NG2 (C. Bueno y cols. 2004, datos propios sin publicar). Al analizar los precursores de células dendríticas CD34+ mediante marcajes múltiples con anticuerpos conjugados con 6 colores, de nuevo encontramos que una minoría de dichos precursores también coexpresan NG2. Para ir más lejos, analizamos la expresión de NG2 en muestras de CMEH como potenciales células diana prenatales y, sorprendentemente, encontramos que el 6% de las células muestran expresión de NG2.

Todo junto parece indicar que la expresión de NG2 no estaría relacionada con reordenamientos a nivel de genes MLL, estando presente en diversas subpoblaciones de precursores/progenitores celulares, lo que podría apoyar que si el proceso leucémico se inicia en uno de estos precursores/progenitores la leucemia se manifestará clínicamente como NG2+.

En la actualidad nos encontramos en fase de buscar colaboradores para disponer de diferentes subtipos de leucemias agudas con reordenamiento MLL, con el fin de aislar la población NG2+ y NG2- y trasplantarla en ratones inmunodeficientes (NOD/SCID), en aras de establecer qué población celular está enriquecida en células con capacidad de iniciar la leucemia, *leukemic stem cells*.

Presencia del reordenamiento MLLAF4 en células madre mesenquimales (CMM) de pacientes infantiles con leucemia pro-B MLLAF4+

Actualmente existen datos que hacen pensar que las translocaciones cromosómicas (MLL-AF4, BCR-ABL, TEL-AML1 e hiperdiploidía) asociadas a leucemias infantiles podrían estar presentes en las CMM de la médula ósea de estos pacientes pediátricos. Estos datos se basan en lo siguiente:

i) Una proporción de leucemias agudas carece de expresión del marcador panleucocitario CD45, lo que indica que la leucemia podría tener un origen prehematopoyético.

ii) Un porcentaje de los tumores secundarios a las leucemias infantiles son tumores mesenquimales²² (sarcomas óseos o de tejido blando), lo cual sugiere que el tratamiento citotóxico destruye el clon tumoral hematopoyético, pero no las posibles CMM que formaban parte del clon maligno. Actualmente, se conoce además que las CMM son más resistentes a la quimioterapia, como indica el hecho de que la reconstitución del estroma tras un trasplante alogénico procede generalmente del receptor y sólo muy infrecuentemente del donante²³⁻²⁶.

iii) La existencia de células estromales con dichas translocaciones podría explicar, en parte, la mayor sensibilidad en la detección de enfermedad mínima residual de las técnicas moleculares (PCR) respecto a la citometría (sólo analiza células hematopoyéticas).

Existen estudios previos en los que se muestra la presencia en células endoteliales del gen de fusión BCR-ABL y otras alteraciones genéticas asociadas a linfomas de pacientes con LMC^{27,28}, lo que sugiere la presencia de un precursor hemangioblástico capaz de producir células endoteliales y hematopoyéticas a nivel clonal.

La existencia de estudios que muestran que la translocación MLL-AF4+ ocurre a nivel prenatal durante el desarrollo embrionario^{4,5} puede insinuar que dicho reordenamiento aparezca en un precursor prehematopoyético mesodérmico capaz de dar lugar a células hematopoyéticas y mesenquimales. De hecho, existe una gran controversia en torno a la presencia de alteraciones cromosómicas en CMM de pacientes con mieloma múltiple o síndromes mielodisplásicos^{29,30} y si el estroma medular puede o no formar parte del clon tumoral.

Con dichos antecedentes quisimos ahondar en la presencia en CMM de diferentes genes de fusión y anomalías cromosómicas específicas de leucemias pediátricas. Se analizaron células mesenquimales de un total de 38 pacientes: TEL-AML1⁺ (n = 12), BCR-ABL⁺ (n = 5), AML1ETO⁺ (n = 1), hiperdiploides (n = 10), MLL-AF4⁺ (n = 4), MLL-AF9⁺ (n = 3), ML-AF10⁺ (n = 1) y MLLENL⁺ (n = 2). Merece destacar que, de todas las muestras analizadas, únicamente en aquellas procedentes de neonatos con leucemia pro-B MLL-AF4⁺ un porcentaje considerable de las células mesenquimales mostraban la translocación (Tabla 1)³¹. No sólo fuimos capaces de identificar reordenamiento mediante hibridación *in situ* fluorescente (iFISH), sino que confirmamos la expresión del gen de fusión mediante RT-PCR a tiempo real. En ningún caso observamos cariotipos tetraploides, lo que nos permite excluir que la detección del gen de fusión MLL-AF4 se deba a la fusión celular de un blasto con una CMM (datos no mostrados). Además, se realizaron estudios de reordenamiento VD(J)H de las IgG, y en ningún paciente se encontró ningún reordenamiento en las CMM, lo que demuestra inequívocamente que no ha existido proceso alguno de dediferenciación o plasticidad. Estos datos sugieren que las CMM de estos niños formarían parte del clon tumoral, ya que la translocación ocurre durante el desarrollo embrionario, la latencia de la enfermedad es extremadamente corta y por lo tanto puede haber cierta relación en el desarrollo de las CMM y los blastos leucémicos.

Finalmente, ensayos de sobreexpresión de estos oncogenes de fusión en CMM indican que estas translocaciones son compatibles con un fenotipo mesenquimal y que la expresión de la proteína de fusión no

Tabla 1. Presencia de genes de fusión leucémicos (e hiperdiploidía) en CMM de médula ósea de un grupo de 38 niños diagnosticados con distintos tipos de leucemia aguda

Paciente ID	Diagnóstico	Citogenética (gen de fusión)	Edad (meses)	Fusión en las CMM (% CMM positivas)	Casos positivos en cada grupo diagnóstico
1	Pre-B-ALL	t(12;21) TEL-AML1	30	NO	0 / 12 (0%)
2	Pre-B-ALL	t(12;21) TEL-AML1	24	NO	
3	Pre-B-ALL	t(12;21) TEL-AML1	36	NO	
4	Pre-B-ALL	t(12;21) TEL-AML1	42	NO	
5	Pre-B-ALL	t(12;21) TEL-AML1	70	NO	
6	Pre-B-ALL	t(12;21) TEL-AML1	84	NO	
7	Pre-B-ALL	t(12;21) TEL-AML1	42	NO	
8	Pre-B-ALL	t(12;21) TEL-AML1	96	NO	
9	Pre-B-ALL	t(12;21) TEL-AML1	60	NO	
10	Pre-B-ALL	t(12;21) TEL-AML1	48	NO	
11	Pre-B-ALL	t(12;21) TEL-AML1	30	NO	
12	Pre-B-ALL	t(12;21) TEL-AML1	54	NO	
13	M2-AML	t(8;21) AML1-ETO	144	NO	0 / 1 (0%)
14	Pre-B-ALL	t(9;22) BCR-ABL	72	NO	0 / 5 (0%)
15	Pre-B-ALL	t(9;22) BCR-ABL	48	NO	
16	Pre-B-ALL	t(9;22) BCR-ABL	60	NO	
17	Pre-B-ALL	t(9;22) BCR-ABL	72	NO	
18	Pre-B-ALL	t(9;22) BCR-ABL	72	NO	
19	T-ALL	Hyperdiploid	30	NO	0 / 10 (0%)
20	Pre-B-ALL	Hyperdiploid	48	NO	
21	Pre-B-ALL	Hyperdiploid	24	NO	
22	Pre-B-ALL	Hyperdiploid	36	NO	
23	Pre-B-ALL	Hyperdiploid	36	NO	
24	Pre-B-ALL	Hyperdiploid	48	NO	
25	Pre-B-ALL	Hyperdiploid	142	NO	
26	Pre-B-ALL	Hyperdiploid	24	NO	
27	Pre-B-ALL	Hyperdiploid	60	NO	
28	Pre-B-ALL	Hyperdiploid	18	NO	
29	Pro-B-ALL	t(4;11) MLL-AF4	6	SÍ (4%)	4 / 4 (100%)
30	Pro-B-ALL	t(4;11) MLL-AF4	11	SÍ (7%)	
31	Pro-B-ALL	t(4;11) MLL-AF4	6	SÍ (7%)	
32	Pro-B-ALL	t(4;11) MLL-AF4	4	SÍ (8%)	
33	M5-AML	t(9;11) MLL-AF9	180	NO	0 / 6 (0%)
34	M5-AML	t(9;11) MLL-AF9	12	NO	
35	M2-AML	t(9;11) MLL-AF9	7	NO	
36	M5-AML	t(10;11) MLL-AF10	15	NO	
37	Pre-B-ALL	t(11;19) MLL-ENL	7	NO	
38	AML	t(11;19) MLL-ENL	9	NO	

ALL: leucemia linfoblástica aguda; AML: leucemia mieloblástica aguda. Nótese que todos los pacientes MLL-AF4+ son recién nacidos (< 11 meses de edad).

altera la homeostasis de las CMM (datos no mostrados), lo que sugiere que la presencia del oncogén no es suficiente para la transformación celular, sino que son necesarias posteriores alteraciones.

Desarrollo de un modelo de leucemia infantil MLL-AF4+ basado en el uso de células madre embrionarias humanas (CMEH) y de cordón umbilical

En la actualidad no existen modelos de enfermedad que nos permitan reproducir la LLA pro-B en el labo-

ratorio. La existencia de dichos *bona fide* modelos es clave para entender mecanismos celulares y moleculares que subyacen a la etiología y patogénesis de estas leucemias y dirigir futuros ensayos de *screening* de fármacos. Recientemente se han desarrollado dos modelos en ratón (modelo *knock-in* y modelo *inverter*) en los cuales la expresión de MLL-AF4 desarrolla fenotipos que poco tienen que ver con lo observado en los pacientes (distinto tipo de leucemia). Además, estos modelos presentan una latencia y una penetrancia de la enfermedad que tampoco se corresponde con lo observado en los pacientes pediátricos.

El oncogén de fusión MLL-AF4 está presente de manera prácticamente exclusiva en leucemias linfoblásticas agudas pro-B infantiles con pronóstico muy adverso. Como se ha comentado anteriormente, estudios recientes indican que estos niños ya expresan el oncogén al nacimiento, lo que indica que se origina a nivel prenatal^{4,5}. Sin embargo, se desconoce la naturaleza de la célula diana (embrionaria o fetal) que sufre la translocación y los mecanismos responsables de su asociación exclusiva a línea B. Sin embargo, hasta la fecha, los esfuerzos encaminados a establecer un modelo de enfermedad para MLL-AF4 en ratón y líneas celulares transformadas han sido decepcionantes, al obtenerse un fenotipo leucémico y una latencia *in vivo* que no se corresponde con lo observado en los pacientes³². Nuestra hipótesis es que en estos modelos *in vitro* e *in vivo* la célula que ha sido transducida puede estar en un estadio (jerárquico u ontogénico) de diferenciación hematopoyética inadecuado³³.

En base a esta hipótesis, nos propusimos explorar el impacto de MLL-AF4 en el desarrollo hematopoyético humano en células madre embrionarias humanas (CMEH). Estudios preliminares con CMEH transgénicas que expresan el gen de fusión MLLAF4 sugieren que dicho gen de fusión podría tener un papel no sólo a nivel de células madre hematopoyéticas sino en precursores anteriores, ya que al analizar la diferenciación hematopoyética a partir de las CMEHMLLAF4⁺ existe un aumento significativo de hemangioblastos identificados por su fenotipo CD45⁻CD31⁺CD34⁺, como se ha descrito anteriormente (datos no mostrados)³⁴. Actualmente estamos analizando el papel leucemogénico de MLL-AF4 solo o en combinación con mutaciones activadoras en el receptor FLT3 que se ha descrito que están presentes en un porcentaje significativo de leucemias pro-B MLLAF4⁺³⁵.

Actualmente, nos encontramos haciendo un estudio comparativo del efecto de MLL-AF4 en CMEH y células CD34⁺ de cordón umbilical ya que constituyen los dos estadios ontogénicamente más precoces.

Agradecimientos

Agradecemos a los Dres. Isidro Prat y María del Carmen Rodríguez, del Banco de Cordón Umbilical de Málaga, por provisionarnos con muestras primarias de cordón umbilical. Igualmente, agradecemos a Félix García-Sánchez, del Centro Regional de Transfusiones de la Comunidad Autónoma de Madrid, por su ayuda en la obtención de material genómico de muestras pediátricas. Este proyecto ha sido financiado por la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (TCMR0028/2006 a J.G.-C y PM, TCMR0029/2006 y TCMR0030/2006 a PM y 0108/2007 a RR), la Consejería de Innovación Ciencia y Empresa (P08-CTS-3678) a PM, la Fundación Internacional Josep Carreras (ED-Thomas-05) a PM y CB, la AECC a RR, la Marie Curie a VR-M (PIIF-GA-2009-236430)

el FIS a PM (PI070026), CB (CP07/0059) y PJR (CP09/0063) y el MICINN a PM (PLE-2009-0111).

Bibliografía

- Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2006 Jan 12;354(2):166-78.
- Caslini C, Alarcon AS, Hess JL, Tanaka R, Murti KG, Biondi A. The amino terminus targets the mixed lineage leukemia (MLL) protein to the nucleolus, nuclear matrix and mitotic chromosomal scaffolds. *Leukemia*. 2000 Nov;14(11):1898-908.
- Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Knight D, Kearney L, Slany R, Greaves M. MLL chimeric protein activation renders cells vulnerable to chromosomal damage: an explanation for the very short latency of infant leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2006 Aug;45(8):754-60.
- Ford AM, Ridge SA, Cabrera ME, Mahmoud H, Steel CM, Chan LC, et al. In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukaemias. *Nature*. 1993 May 27;363(6427):358-60.
- Gale KB, Ford AM, Repp R, Borkhardt A, Keller C, Eden OB, et al. Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Dec 9;94(25):13950-4.
- Moorman AV, Hagemeijer A, Charrin C, Rieder H, Secker-Walker LM. The translocations, t(11;19)(q23;p13.1) and t(11;19)(q23;p13.3): a cytogenetic and clinical profile of 53 patients. European 11q23 Workshop participants. *Leukemia*. 1998 May;12(5):805-10.
- Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Janssen J, Maas LM, Godschalk RW, Nijhuis JG, van Schooten FJ. Dietary flavonoids induce MLL translocations in primary human CD34⁺ cells. *Carcinogenesis*. 2007 Aug;28(8):1703-9.
- Blanco JG, Edick MJ, Relling MV. Etoposide induces chimeric Mll gene fusions. *FASEB J*. 2004 Jan;18(1):173-5.
- Bueno C, Catalina P, Melen GJ, Montes R, Sanchez L, Ligeiro G, et al. Etoposide induces MLL rearrangements and other chromosomal abnormalities in human embryonic stem cells. *Carcinogenesis*. 2009 Sep;30(9):1628-37.
- Libura J, Slater DJ, Felix CA, Richardson C. Therapy-related acute myeloid leukemia-like MLL rearrangements are induced by etoposide in primary human CD34⁺ cells and remain stable after clonal expansion. *Blood*. 2005 Mar 1;105(5):2124-31.
- Libura J, Ward M, Solecka J, Richardson C. Etoposide-initiated MLL rearrangements detected at high frequency in human primitive hematopoietic stem cells with in vitro and in vivo long-term repopulating potential. *Eur J Haematol*. 2008 Sep;81(3):185-95.
- Moneyppenny CG, Shao J, Song Y, Gallagher EP. MLL rearrangements are induced by low doses of etoposide in human fetal hematopoietic stem cells. *Carcinogenesis*. 2006 Apr;27(4):874-81.
- Zandvliet DW, Hanby AM, Austin CA, Marsh KL, Clark IB, Wright NA, et al. Analysis of foetal expression sites of human type II DNA topoisomerase alpha and beta mRNAs by in situ hybridisation. *Biochim Biophys Acta*. 1996 Jun 7;1307(2):239-47.
- Felix CA, Megonigal MD, Chervinsky DS, Leonard DG, Tsuchida N, Kakati S, et al. Association of germline p53 mutation with MLL segmental jumping translocation in treatment-related leukemia. *Blood*. 1998 Jun 15;91(12):4451-6.
- Spector LG, Xie Y, Robison LL, Heerema NA, Hilden JM, Lange B, et al. Maternal diet and infant leukemia: the DNA topoisomerase II inhibitor hypothesis: a report from the children's oncology group. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005 Mar;14(3):651-5.

16. Strick R, Strissel PL, Borgers S, Smith SL, Rowley JD. Dietary bioflavonoids induce cleavage in the MLL gene and may contribute to infant leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Apr 25;97(9):4790-5.
17. Behm FG, Raimondi SC, Frestedt JL, Liu Q, Crist WM, Downing JR, et al. Rearrangement of the MLL gene confers a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia, regardless of presenting age. *Blood*. 1996 Apr 1;87(7):2870-7.
18. Hilden JM, Smith FO, Frestedt JL, McGlennen R, Howells WB, Sorensen PH, et al. MLL gene rearrangement, cytogenetic 11q23 abnormalities, and expression of the NG2 molecule in infant acute myeloid leukemia. *Blood*. 1997 May 15;89(10):3801-5.
19. Schwartz S, Rieder H, Schlager B, Burmeister T, Fischer L, Thiel E. Expression of the human homologue of rat NG2 in adult acute lymphoblastic leukemia: close association with MLL rearrangement and a CD10(-)/CD24(-)/CD65s(+)/CD15(+) B-cell phenotype. *Leukemia*. 2003 Aug;17(8):1589-95.
20. Wuchter C, Harbott J, Schoch C, Schnittger S, Borkhardt A, Karawajew L, et al. Detection of acute leukemia cells with mixed lineage leukemia (MLL) gene rearrangements by flow cytometry using monoclonal antibody 7.1. *Leukemia*. 2000 Jul;14(7):1232-8.
21. Mauvieux L, Delabesse E, Bourquelot P, Radford-Weiss I, Bencecure A, Flandrin G, et al. NG2 expression in MLL rearranged acute myeloid leukaemia is restricted to monoblastic cases. *Br J Haematol*. 1999 Dec;107(3):674-6.
22. Kersun LS, Wimmer RS, Hoot AC, Meadows AT. Secondary malignant neoplasms of the bladder after cyclophosphamide treatment for childhood acute lymphocytic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2004 Mar;42(3):289-91.
23. Garcia-Castro J, Balas A, Ramirez M, Perez-Martinez A, Madero L, Gonzalez-Vicent M, et al. Mesenchymal stem cells are of recipient origin in pediatric transplantations using umbilical cord blood, peripheral blood, or bone marrow. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2007 Jun;29(6):388-92.
24. Koc ON, Peters C, Aubourg P, Raghavan S, Dyhouse S, De-Gasperis R, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells remain host-derived despite successful hematopoietic engraftment after allogeneic transplantation in patients with lysosomal and peroxisomal storage diseases. *Exp Hematol*. 1999 Nov;27(11):1675-81.
25. Rieger K, Marinets O, Fietz T, Korper S, Sommer D, Mucke C, et al. Mesenchymal stem cells remain of host origin even a long time after allogeneic peripheral blood stem cell or bone marrow transplantation. *Exp Hematol*. 2005 May;33(5):605-11.
26. Stute N, Fehse B, Schroder J, Arps S, Adamietz P, Held KR, et al. Human mesenchymal stem cells are not of donor origin in patients with severe aplastic anemia who underwent mismatched allogeneic bone marrow transplant. *J Hematother Stem Cell Res*. 2002 Dec;11(6):977-84.
27. Gunsilius E, Duba HC, Petzer AL, Kahler CM, Grunewald K, Stockhammer G, et al. Evidence from a leukaemia model for maintenance of vascular endothelium by bone-marrow-derived endothelial cells. *Lancet*. 2000 May 13;355(9216):1688-91.
28. Streubel B, Chott A, Huber D, Exner M, Jager U, Wagner O, et al. Lymphoma-specific genetic aberrations in microvascular endothelial cells in B-cell lymphomas. *N Engl J Med*. 2004 Jul 15;351(3):250-9.
29. Corre J, Mahtouk K, Attal M, Gadelorge M, Huynh A, Fleury-Cappellesso S, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells are abnormal in multiple myeloma. *Leukemia*. 2007 May;21(5):1079-88.
30. Lopez-Villar O, Garcia JL, Sanchez-Guijo FM, Robledo C, Villaron EM, Hernandez-Campo P, et al. Both expanded and uncultured mesenchymal stem cells from MDS patients are genomically abnormal, showing a specific genetic profile for the 5q- syndrome. *Leukemia*. 2009 Apr;23(4):664-72.
31. Menendez P, Catalina P, Rodriguez R, Melen GJ, Bueno C, Arriero M, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells from infants with MLL-AF4+ acute leukemia harbor and express the MLL-AF4 fusion gene. *J Exp Med*. 2009 Dec 21;206(13):3131-41.
32. Metzler M, Forster A, Pannell R, Arends MJ, Daser A, Lobato MN, et al. A conditional model of MLL-AF4 B-cell tumorigenesis using inverter technology. *Oncogene*. 2006 May 25;25(22):3093-103.
33. Bueno C, Garcia-Castro J, Montes R, Menendez P. Human Embryonic Stem Cells: A Potential System For Modeling Infant Leukemia Harboring MLL-AF4 Fusion Genes. *Drug Disc Today: Dis Models*. 2008;4:53-9.
34. Wang L, Li L, Shojaei F, Levac K, Cerdan C, Menendez P, et al. Endothelial and hematopoietic cell fate of human embryonic stem cells originates from primitive endothelium with hemangioblastic properties. *Immunity*. 2004 Jul;21(1):31-41.
35. Kottaridis PD, Gale RE, Linch DC. Flt3 mutations and leukaemia. *Br J Haematol*. 2003 Aug;122(4):523-38.

CÉLULA MADRE LEUCÉMICA EN LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

Ó. QUINTANA-BUSTAMANTE, J.C. SEGOVIA

Unidad de Diferenciación y Citometría.

División de Hematopoyesis y Terapia Génica.

CIEMAT (Madrid)

Las células madre hematopoyéticas (CMH) constituyen el compartimento responsable de la generación y mantenimiento de los diversos linajes hematopoyéticos presentes en el individuo. Se ha descrito un modelo similar en ciertos tipos de cáncer, en el que las células madre son las responsables de la aparición, mantenimiento y supervivencia de estos tumores. En concreto, la implicación de células madre y de progenitores ha sido ampliamente estudiada en el origen y mantenimiento de la leucemia mieloide aguda (LMA). Las células madre leucémicas (CML) comparten muchas características con las CMH normales, situándose ambas en la cúspide de un sistema jerarquizado, presentan numerosas características comunes y comparten un inmunofenotipo muy similar. Por lo tanto, la identificación de las propiedades que definen a las CML de una forma única nos permitirá determinar cuáles son los mecanismos moleculares que han dirigido su transformación maligna, y nos facilitará el diseño de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas específicamente a CML. En esta revisión nos centraremos en la definición de CML en LMA y en las distintas aproximaciones que se están empleando para conocer su origen y para desarrollar nuevas terapias contra la LMA.

El sistema hematopoyético es un sistema jerárquico, sustentado por CMH. Esta población celular

presenta la capacidad de autorrenovación debido a divisiones simétricas y origina progenitores diferenciados mediante divisiones asimétricas, los cuales poseen una menor autorrenovación. Mediante sucesivos pasos de diferenciación y amplificación celular, son los responsables de generar el total de las células funcionales maduras hematopoyéticas presentes en el organismo.

Durante el proceso leucémico se alteran las propiedades de autorrenovación y diferenciación en alguno de los compartimentos del sistema hematopoyético, resultando en la acumulación de células blásticas inmaduras, al no ser capaces de producir células totalmente diferenciadas y funcionales¹.

En este trabajo, definiremos qué se entiende por célula madre leucémica (CML) en la leucemia mieloide aguda (LMA), centrándonos en su identificación y en los distintos modelos usados para determinar su origen, para terminar con los diversos modelos que en la actualidad explican el desarrollo de LMA y el lugar que ocupan las CML en cada uno de ellos.

Origen de LMA y de CML

El proceso leucémico es un proceso patogénico que transcurre en varias etapas en que se alteran los mecanismos normales de control del sistema hematopoyético, como autorrenovación, proliferación, capacidad de diferenciación o resistencia a la apoptosis^{1,2}. La inapropiada regulación de estos procesos conlleva la adquisición de una capacidad leucémica. La alteración de estos procesos se produce de una manera secuencial, donde una primera mutación alteraría alguna de estas funciones y, dependiendo de la naturaleza de este primer evento oncogénico, se podría favorecer la aparición de una o de varias mutaciones que terminarían de desarrollar la leucemia. Existen primeras mutaciones que incrementan la inestabilidad genética, favoreciendo la aparición de las siguientes anomalías. Sin embargo, otras mutaciones son incapaces de favorecer la aparición de segundos eventos leucémicos, como es el caso de AML1-ETO o mutaciones en C/EBP α en humanos, a pesar de que su expresión altere el comportamiento normal de las células hematopoyéticas. Una posible explicación a la no aparición de LMA con la expresión de estos oncogenes es el hecho de que la concentración de distintos factores de transcripción es importante para el establecimiento de LMA. Distintos trabajos recogen que, independientemente de que tengan lugar mutaciones oncogénicas, la alteración en la expresión de factores de transcripción clave puede ser esencial para el desarrollo leucémico.

A pesar del origen clonal de los tumores, existe una heterogeneidad dentro del mismo; no todas las célu-

las dentro de un tumor tienen las mismas características y potencialidad. Para explicar esta variabilidad dentro del tumor se ha recurrido a dos modelos:

i) Modelo estocástico, en el que todas las células dentro de un tumor son biológicamente equivalentes, y sólo bajo ciertas influencias, tanto extrínsecas como intrínsecas, algunas, si no todas, adquieren la capacidad de iniciar el tumor.

ii) Modelo jerarquizado basado en CML, en el que la capacidad de generar el tumor reside en una pequeña población de células de tumor.

El modelo estocástico ha sido recientemente confirmado en mieloma por el grupo del Dr. Morrison, gracias al uso de los nuevos modelos de ratones inmunodeficientes, demostrando que el 25% de las células de los mielomas primarios son capaces de regenerar la enfermedad cuando son trasplantadas en ratones NOD/SCID/IL2 γ ^{neg}¹⁸. A pesar de este trabajo, el modelo de CML sigue vigente en LMA. Aunque la frecuencia de células con capacidad de iniciar el tumor ha aumentado al utilizar estos nuevos modelos de ratones inmunodeficientes, se sigue manteniendo una estructura jerarquizada dentro de este tipo de leucemia. El Dr. J.E. Dick mantiene el concepto de célula madre tumoral, definida como el tipo celular dentro de la población cancerosa, con capacidad para regenerar el tumor, y cuya frecuencia varía entre distintos tumores e incluso dentro de distintos pacientes dentro de una misma patología¹⁹. Recientemente, el Dr. Greaves ha establecido un paralelismo original en el desarrollo de leucemia linfocítica aguda y la teoría de Charles Darwin, en el que se integra tanto el modelo estocástico como el jerarquizado basado en célula madre tumoral; en este modelo una célula normal adquiere una alteración tumoral que, si ofrece alguna ventaja a la célula para su autorrenovación, ésta convertiría a la célula en CM tumoral o en pre-CM tumoral. Esta mutación perduraría en toda su progenie y, después, otras mutaciones podrían aparecer, volviendo a seleccionarse en la población de CML todas aquellas que hubieran superado la presión selectiva descrita en la teoría de Darwin. Como resultado, existiría una evolución clonal dentro de la población de células madre tumorales²⁰.

Célula madre leucémica

Dentro de una población leucémica existe heterogeneidad celular. Esta diversificación dentro de una población de origen clonal nos indica la existencia de procesos de diferenciación y/o cambio desde una célula con capacidad de generar LMA o CML, pero ¿cuál sería el origen de esta heterogeneidad? La inestabilidad genética de ciertos tumores podría ser responsable de la diversificación de la población maligna, pero

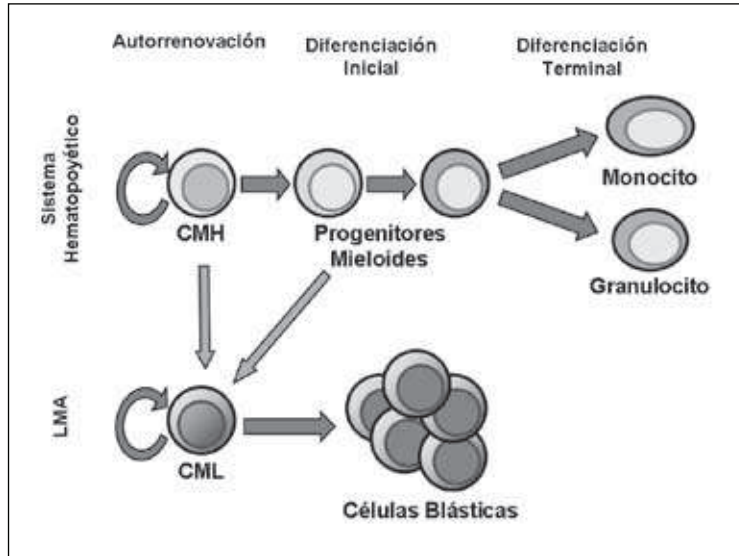


Figura 1. Modelo jerarquizado de LMA: CMH normales y CML presentan capacidad de autorrenovación. CML son originadas tanto desde CMH como de progenitores mieloides más diferenciados, mediante la adquisición de distintos eventos que alteran el desarrollo normal del sistema hematopoyético.

los procesos de diferenciación propios de los sistemas jerárquicos como el sistema hematopoyético, basados en células madre, explican la heterogeneidad dentro de los tumores, en los que una reducida población de células madre del tumor (CMT) son las responsables de la generación y mantenimiento del resto de poblaciones del tumor. Este proceso está claramente representado en LMA, donde a partir de las CML se reproduce la estructura del desarrollo hematopoyético de una manera distorsionada^{1,2} (Figura 1).

Identificación de células madre leucémicas en LMA

Las primeras evidencias que confirmaban la estructura basada en células madre en leucemia fueron descritas en modelos de ratón, donde células leucémicas originaban clonalmente colonias tanto *in vivo* como *in vitro*. La existencia de una subpoblación dentro de la población leucémica con capacidad clonogénica *in vitro* también se describió más tarde en humanos. A finales de los noventa, el grupo del Dr. J. Dick caracterizó fenotípicamente una población dentro de muestras de LMA, con capacidad de injertar y de iniciar LMA en ratones inmunodeficientes (SCID y NOD/SCID). En este modelo xenogénico el injerto leucémico era altamente representativo de la enfermedad original de los pacientes, con un patrón de diseminación y una morfología de los blastos similar. A esta población se la denominó células con capacidad de iniciar leucemia en ratones SCID

(SL-IC del inglés *Scid-leukemia initiating cell*)^{3,4}, estableciéndose un modelo jerárquico en LMA similar a lo que se había descrito en el sistema hematopoyético. Este grupo determinó que la población de CML en distintos pacientes de LMA residía en la fracción CD34⁺/CD38⁻, la cual era capaz de reproducir en ratones inmunodeficientes todos los tipos celulares que estaban presentes en las muestras originales de los pacientes de LMA. Rápidamente se intentó caracterizar la población CML con distintas combinaciones de marcadores de superficie, con los que se podría discriminar de CMH normales, como CD34⁺/CD90⁻, CD34⁺/CD31⁻/HLA-DR⁻, CD34⁺/CD117⁺, o más recientemente CD96⁺.

Con esta jerarquía dentro de LMA, se establece el modelo de CML, en el que las CML son las responsables de la generación y del mantenimiento del total de la población leucémica, al perpetuar el crecimiento del resto de blastos presentes en LMA. Las CML presentan una capacidad de autorrenovación por la cual se perpetuarían en el paciente, y en su diferenciación generarían la población de blastos dominante en LMA, los cuales representan etapas aberrantes de la diferenciación mielóide normal. En este modelo, la LMA estaría constituido por una población heterogénea, donde las CML son distinguibles del resto de las células blásticas más diferenciadas. Por lo tanto, y debido a la función de CML en la generación y progresión de LMA, las terapias más eficaces se basarían en un mayor conocimiento de la naturaleza de CML, para desarrollar estrategias diseñadas específicamente contra CML, sin afectar a las CMH normales.

Modelos de estudio de CML en LMA

Desde el último cuarto de siglo, se ha confirmado la existencia y caracterizado la naturaleza de CML en LMA (revisado por J.A. Kennedy y F. Barabe⁵). Los modelos xenogénicos han sido imprescindibles para la caracterización de CML de muestras primarias de pacientes con LMA. Gracias a los modelos de ratones inmunodeficientes se han descrito distintos marcadores fenotípicos de CML, su frecuencia de autorrenovación y su estructura jerárquica³. Estos estudios han permitido un posterior análisis molecular más detallado y han abierto nuevas estrategias terapéuticas para combatir las CML.

El estudio de CML también se ha beneficiado de la contribución de modelos murinos, como los mode-

los basados en la transducción de células madre hematopoyéticas de ratón con retrovirus o lentivirus, codificando translocaciones humanas y otros oncogenes. En estos modelos, las CMH de ratones donadores son infectadas con vectores virales y trasplantadas en ratones receptores, donde se observa la aparición del fenotipo leucémico debido a la presencia de un oncogén o de una proteína quimérica producto de una translocación. De forma similar, se han empleado modelos de ratones transgénicos, en los que uno de los alelos con un potencial oncogénico es expresado de una forma condicional. Estos modelos animales han mostrado que la patología observada varía considerablemente dependiendo del tipo de mutación introducida. Por ejemplo, la expresión de la quinasa Flt3 activa no es suficiente para inducir LMA, pero, por el contrario, la expresión de distintos factores de transcripción mutados (por ejemplo, HoxA9 o K-Ras) es suficiente para provocar leucemia, aunque en algunos casos es necesario un periodo de latencia de varios meses para observarse LMA, lo que indica que se requiere una segunda mutación para el completo desarrollo de la enfermedad. En otros estudios se ha modelizado el desarrollo de LMA introduciendo combinaciones de dos mutaciones leucemogénicas, reproduciéndose el patrón molecular observado en LMA humanas. Otros grupos también han descrito una rápida progresión a LMA cuando se expresan dos oncogenes (HoxA9 y Meis1), o cuando se combina la expresión de AML1-ETO con tratamientos con agentes mutagénicos, como nitrosourea⁶. Basándose también en modelos de ratón, el grupo del Dr. Weisman identificó que retrovirus expresando MLL-ENL eran capaces de transformar CMH en CML, pero también de conferir capacidad de autorrenovación a progenitores hematopoyéticos comprometidos (CMP y GMP), indicando que el origen de las CML no sólo se restringía al compartimento más primitivo de la hematopoyesis⁷. Además, sugiere que para el desarrollo de LMA no es necesario que una alteración leucemogénica se produzca en CMH, sino que una mutación en el compartimento de progenitores hematopoyéticos puede ser suficiente para originar LMA. El efecto de la expresión de MLL-ENL en progenitores tiene además dos posibles efectos: que esta translocación confiera la capacidad de autorrenovación a progenitores mieloides, o bien que facilite la rápida aparición de una segunda mutación y sea ésta la responsable de la nueva propiedad de autorrenovación de los progenitores hematopoyéticos. La posibilidad de originarse CML a partir de progenitores también se ha visto más recientemente en modelos transgénicos, donde se expresan distintas formas mutadas del gen *C/ebp-α*. En este modelo de LMA en ratón, el compartimento capaz de sustentar el desarrollo leucémico se localiza en progenitores hematopoyéticos más com-

prometidos⁸. La modificación genética en modelos murinos, desarrollada en los últimos años, ha hecho posible el estudio del papel de distintos oncogenes o translocaciones en el desarrollo de LMA. Por ejemplo, la expresión específica de AML1-ETO en CMH consigue reproducir la enfermedad observada en pacientes⁹, algo que no se había conseguido al expresar la misma translocación mediante retrovirus. Recientemente se han desarrollado distintos modelos de ratón modificados genéticamente, en los que es posible inducir específicamente distintas translocaciones (MLL-AF9, MLL-AF4, MLL-ENL, AML1-ETO). Estos modelos suponen un avance, al constituir la aproximación más fisiológica para el estudio del desarrollo leucémico.

Actualmente, muchos grupos han desarrollado modelos leucémicos humanizados, más cercanos a lo observado en clínica, ya que en los modelos murinos no siempre se mimetiza por completo lo observado en pacientes de LMA. Al igual que en los modelos animales, los vectores virales han sido utilizados para la introducción de oncogenes en CMH humanas. La transducción de CD34⁺ normales con retrovirus que expresan la translocación AML1-ETO consigue la inhibición de la diferenciación e incrementa el automantenimiento y la supervivencia de CMH *in vitro*¹⁰. En estos modelos humanizados, se ha conseguido reproducir el carácter bifenotípico (LMA y/o leucemia linfocítica aguda) de la enfermedad generada por la presencia de ciertas translocaciones. Asimismo, F. Barabé y colaboradores han descrito que la expresión de MLL-ENL en CD34⁺ de cordón umbilical origina en un modelo xenogénico leucemia linfocítica aguda B, y sólo cuando se induce la diferenciación *in vitro* de las células transducidas se consigue generar LMA¹¹. Resultados obtenidos en el laboratorio de la Dra. D. Bonnet consiguen mimetizar diferentes características de LMA en células progenitoras humanas (identificadas como negativas a la expresión de marcadores de linaje) cuando son transducidas con distintas formas mutadas de *C/EBPα*, que, si bien no consiguen generar LMA, sí reproducen lo observado en pacientes de LMA con distintas mutaciones en el gen de *CEBPA* (O. Quintana-Bustamante y D. Bonnet, en preparación). Recientemente se ha determinado que el efecto de la expresión de MLL-AF9 en CD34⁺ depende de las señales extrínsecas sobre CML, pudiéndose originar leucemia linfocítica o mielode¹².

Además, los grupos que han trabajado con muestras primarias de pacientes de LMA trasplantadas en ratones inmunodeficientes han contribuido a la caracterización de la población de CML³. En la actualidad, la utilización de otras cepas de ratones inmunodeficientes, con las NOD/SCID/ $\beta 2m^{neg}$ o NOD/SCID/IL2 γ^{neg} , más permisivos para el injerto de poblaciones hematopoyéticas humanas, ha permitido identi-

ficar células leucémicas con características de CML en otras poblaciones más diferenciadas, como es el caso de CD34⁺/CD38⁺¹³. El uso de muestras primarias de pacientes ha permitido caracterizar a la población de CML como una población heterogénea. Incluso en determinados tipos de LMA, la población de CML ya no está restringida a la población CD34⁺/CD38⁻, sino también al compartimiento más diferenciado, CD34⁺/CD38⁺¹³. CML de un mismo paciente presentan distintos potenciales de crecimiento, siendo las CML más quiescentes las responsables del mantenimiento a largo plazo de CML y de la recidiva después del tratamiento con quimioterapia¹⁴. Estas observaciones confirman la similitud entre CMH normales y sus contrarias CML, lo cual hace más difícil plantear un tratamiento realmente selectivo contra CML. Pero en los últimos años son muchos los grupos que se han volcado en la identificación de características de CML para ser empleados como posibles dianas en un futuro tratamiento contra la LMA. Por ejemplo, marcadores de superficie específicos en CML de pacientes como CD96, CD44¹⁵ o CD123¹⁶ han sido utilizados para identificar las células madre malignas o incluso para erradicarlas en los modelos xenogénicos. Este año el grupo del Dr. Ishikawa ha desarrollado un original protocolo para la eliminación de LMA en ratones inmunodeficientes, aprovechando la característica de quiescencia de las CML. Los autores indujeron la entrada en ciclo celular mediante el tratamiento con G-CSF, después de lo cual eliminaron las células en ciclo mediante la administración con Ara-C. La combinación de G-CSF junto quimioterapia consiguió incrementar la supervivencia de animales receptores secundarios, confirmando la eliminación de las CML responsables del mantenimiento de LMA y de la recaída después del tratamiento¹⁷. El modelo xenogénico de trasplante de muestras de pacientes de LMA también ha sido utilizado para evaluar la efectividad contra LMA de tratamientos más convencionales para otros tipos tumorales, como es el caso de IFN- β .

Perspectivas futuras

En el diseño eficaz de nuevas estrategias para combatir LMA, es necesario conocer las características de las CML y las diferencias existentes con las CMH normales. Estas nuevas aproximaciones están basadas en la identificación de los procesos responsables del bloqueo de la diferenciación, del potencial de proliferación y de supervivencia, así como de la capacidad de autorrenovación de CML. Por lo tanto, el desarrollo de nuevos modelos en los que se identifique la sucesión de eventos por los que una célula hematopoyética normal se transforma en CML con capacidad de

generar LMA se hace cada vez más necesario para el desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas específicas contra esta enfermedad. Las CML constituyen las células responsables del desarrollo tumoral, pero también son los mejores candidatos para las nuevas terapias contra la LMA.

Bibliografía

1. Warner JK, Wang JC, Hope KJ, Jin L, Dick JE. Concepts of human leukemic development. *Oncogene*. 2004;23:7164-7177.
2. Jordan CT, Guzman ML. Mechanisms controlling pathogenesis and survival of leukemic stem cells. *Oncogene*. 2004;23:7178-7187.
3. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997;3:730-737.
4. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994;367:645-648.
5. Kennedy JA, Barabe F. Investigating human leukemogenesis: from cell lines to in vivo models of human leukemia. *Leukemia*. 2008;22:2029-2040.
6. Yuan Y, Zhou L, Miyamoto T, Iwasaki H, Harakawa N, Hetherington CJ, Burel SA, Lagasse E, Weissman IL, Akashi K, Zhang DE. AML1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:10398-10403.
7. Cozzio A, Passegue E, Ayton PM, Karsunky H, Cleary ML, Weissman IL. Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors. *Genes Dev*. 2003;17:3029-3035.
8. Kirstetter P, Schuster MB, Bereshchenko O, Moore S, Dvinge H, Kurz E, Theilgaard-Monch K, Mansson R, Pedersen TA, Pabst T, Schrock E, Porse BT, Jacobsen SE, Bertone P, Tenen DG, Nerlov C. Modeling of C/EBP α mutant acute myeloid leukemia reveals a common expression signature of committed myeloid leukemia-initiating cells. *Cancer Cell*. 2008;13:299-310.
9. Fenske TS, Pengue G, Mathews V, Hanson PT, Hamm SE, Rizaz N, Graubert TA. Stem cell expression of the AML1/ETO fusion protein induces a myeloproliferative disorder in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:15184-15189.
10. Mulloy JC, Cammenga J, MacKenzie KL, Berguido FJ, Moore MA, Nimer SD. The AML1-ETO fusion protein promotes the expansion of human hematopoietic stem cells. *Blood*. 2002;99:15-23.
11. Barabe F, Kennedy JA, Hope KJ, Dick JE. Modeling the initiation and progression of human acute leukemia in mice. *Science*. 2007;316:600-604.
12. Wei J, Wunderlich M, Fox C, Alvarez S, Cigudosa JC, Wilhelm JS, Zheng Y, Cancelas JA, Gu Y, Jansen M, Dimartino JF, Mulloy JC. Microenvironment determines lineage fate in a human model of MLL-AF9 leukemia. *Cancer Cell*. 2008;13:483-495.
13. Taussig DC, Miraki-Moud F, Anjos-Afonso F, Pearce DJ, Allen K, Ridler C, Lillington D, Oakervee H, Cavenagh J, Agrawal SG, Lister TA, Gribben JG, Bonnet D. Anti-CD38 antibody-mediated clearance of human repopulating cells masks the heterogeneity of leukemia-initiating cells. *Blood*. 2008;112:568-575.
14. Ishikawa F, Yoshida S, Saito Y, Hijikata A, Kitamura H, Tanaka S, Nakamura R, Tanaka T, Tomiyama H, Saito N, Fukata M, Miyamoto T, Lyons B, Ohshima K, Uchida N, Taniguchi

- S, Ohara O, Akashi K, Harada M, Shultz LD. Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nat Biotechnol.* 2007;25:1315-1321.
15. Jin L, Hope KJ, Zhai Q, Smadja-Joffe F, Dick JE. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat Med.* 2006;12:1167-1174.
 16. Jin L, Lee EM, Ramshaw HS, Busfield SJ, Peoppl AG, Wilkinson L, Guthridge MA, Thomas D, Barry EF, Boyd A, Gearing DP, Vairo G, Lopez AF, Dick JE, Lock RB. Monoclonal antibody-mediated targeting of CD123, IL-3 receptor alpha chain, eliminates human acute myeloid leukemic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2009;5:31-42.
 17. Saito Y, Uchida N, Tanaka S, Suzuki N, Tomizawa-Murawawa M, Sone A, Najima Y, Takagi S, Aoki Y, Wake A, Taniguchi S, Shultz LD, Ishikawa F. Induction of cell cycle entry eliminates human leukemia stem cells in a mouse model of AML. *Nat Biotechnol;*28:275-280.
 18. Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Johnson TM, Morrison SJ. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature.* 2008;456:593-598.
 19. Dick JE. Looking ahead in cancer stem cell research. *Nat Biotechnol.* 2009;27:44-46.
 20. Greaves M. Cancer stem cells: Back to Darwin? *Semin Cancer Biol.*

CARACTERIZACIÓN INMUNOFENOTÍPICA DE LAS CÉLULAS MADRE LEUCÉMICAS

A. ÓRFÃO, M. PÉREZ ANDRÉS,
A. GARCÍA MONTERO, S. MATARRAZ,
B. PAIVA, C. FERNÁNDEZ, J. FLORES,
A. LÓPEZ, J. CIUDAD, J. ALMEIDA

*Departamento de Medicina.
Centro de Investigación del Cáncer y Servicio
de Citometría. Universidad de Salamanca*

Introducción

Durante décadas se ha asumido que las hemopatías malignas y el cáncer en general derivan del acúmulo de diferentes alteraciones genéticas que facilitan la proliferación y/o la supervivencia de las células de un tejido concreto, bloqueadas en un estadio madurativo determinado¹. Dichas alteraciones afectan a oncogenes y/o genes supresores de tumor, que con frecuencia implican vías de señalización relacionadas con la proliferación y la apoptosis y sus mecanismos de regulación¹⁻⁷. Dado que en condiciones normales la gran mayoría de las células de un tejido, como el tejido hematopoyético, sufren una rápida renovación, y que el desarrollo de un tumor maligno habitualmente requiere de la adquisición de múltiples lesiones genéticas, es poco probable que el corto tiempo de vida de dichas células permita el acúmulo de los eventos oncogénicos requeridos en las mis-

mas. Por todo ello, desde hace tiempo se plantea una hipótesis alternativa que sugiere que la célula diana de dichas alteraciones genéticas sería una célula poco representada en la muestra que se comportaría como una verdadera célula madre leucémica. Según el concepto que plantea la existencia de células madre leucémicas, éstas constituirían únicamente una pequeña parte de todas las células del tumor y reunirían al menos dos características básicas: i) la capacidad de autorrenovación, y ii) de diferenciación uni o, más frecuentemente, multilineal⁸⁻¹⁰. A lo largo de las dos últimas décadas se ha acumulado un número creciente de evidencias experimentales sobre la veracidad de este modelo, especialmente en el caso de las hemopatías mieloides^{8,9,11-14}.

Además de las dos propiedades anteriores, el concepto de célula madre leucémica con frecuencia lleva asociado otras características celulares, que no siempre resultan imprescindibles, y que incluso pueden generar cierta controversia acerca de las características particulares de este pequeño compartimiento celular tumoral. Entre ellas se incluyen propiedades diversas como: i) capacidad clonogénica, ii) quiescencia, iii) resistencia a fármacos, iv) e inmadurez¹⁵⁻¹⁹. La capacidad de autorrenovación supone que las células madre leucémicas mantienen capacidad proliferativa y de expansión clonal, aunque habitualmente se encuentren fuera del ciclo celular en un estado quiescente, que además les confiere mayor resistencia a tratamientos quimioterápicos convencionales; por otra parte, la capacidad de diferenciación supone un grado, al menos relativo, de inmadurez celular.

Por analogía con las células madres embrionarias, se ha sugerido que algunas vías de señalización celular que están activas de forma específica en estas células podrían contribuir a conferir propiedades de célula madre a una célula leucémica, además de facilitar su identificación y caracterización. Se han referido como vías asociadas a células madre tumorales las vías de Hedgehog (Hh) y Gli1, Notch, PTEN, BMI-1, WNT y p53, entre otras. En común, dichas vías se han asociado con la capacidad de autorrenovación de células madre normales²⁰ y se encuentran comúnmente alteradas en diferentes tipos de neoplasias²¹, donde se cree que podrían contribuir a la alteración de la regulación de la capacidad de autorrenovación y la proliferación tumoral²¹.

Una de las limitaciones más importantes a la hora de poder avanzar en el conocimiento de las células madre leucémicas reside en la dificultad inherente a su identificación, purificación y caracterización. Así, en la actualidad la definición de célula madre leucémica sigue requiriendo de la demostración de sus capacidades funcionales de autorrenovación y diferenciación, reflejadas en su capacidad de reproducir la enfermedad por sí sola, en presencia de un micromedio ambiente

tumoral adecuado. Los tests funcionales encaminados a evaluar dicha función son múltiples; de entre los más aceptados y de uso más extendido, cabe destacar: 1) la capacidad de reproducir la enfermedad en un modelo animal con un patrón trasplantable a otros animales (p. ej.: ratones) inmunocomprometidos y 2) la capacidad de formar colonias *in vitro* en cultivos no adherentes, en forma de esferoides multicelulares o agregados esféricos de células^{18,22}.

Este tipo de ensayos resulta imprescindible para demostrar las características fenotípicas que reúnen las células madre leucémicas asociadas a diferentes hemopatías malignas, los marcadores comunes a todas ellas y/o a células madre normales presentes en tejidos hematopoyéticos, lo que posteriormente facilita su purificación y caracterización detallada. Por todo ello, en este proceso adquiere especial protagonismo la caracterización inmunofenotípica de las células madre leucémicas. A ello contribuyen la disponibilidad de un número cada vez más amplio de anticuerpos monoclonales, dirigidos contra distintas proteínas, con expresión compartida por parte de células madre normales y leucémicas.

No obstante todo lo anterior, hay que destacar que, con frecuencia, el desarrollo de una neoplasia no depende únicamente de la presencia de células tumores con capacidad clonogénica, sino también de un micromedio ambiente adecuado a su supervivencia y expansión, incluyendo el espacio físico requerido para su desarrollo^{23,24}.

Células madre leucémicas

Las leucemias constituyen un grupo heterogéneo de neoplasias malignas de células hematopoyéticas linfoides y/o mieloides. La identificación de diferentes compartimientos madurativos de células blásticas en pacientes con leucemia mieloblástica aguda (LMA) puso de manifiesto la existencia de una organización jerárquica del clon leucémico en estos pacientes, en la que, mientras que una proporción significativa de las células tumorales muestra una rápida capacidad proliferativa, las células madre leucémicas, fenotípicamente más inmaduras, únicamente representan un pequeño compartimiento de células quiescentes^{17,18}. Este modelo de organización jerárquica descrito a principios de los años noventa para las LMA podría ser válido en la mayoría de las hemopatías clonales con afectación de las líneas mieloides –síndromes mielodisplásicos (SMD), neoplasias mieloproliferativas (NMP), mastocitosis sistémica (MS) y hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN)–, a excepción de la leucemia promielocítica aguda, en la que se cree que el evento leucémico ocurriría a nivel de un precursor comprometido

ya a línea mieloides con capacidad de diferenciación limitada a línea de granulocito neutrófilo y basófilo²⁵. Por el contrario, el origen de las leucemias linfoides como la leucemia linfoblástica aguda (LLA) se situaría en precursores hematopoyéticos y comprometidos a línea linfoides y con escasa capacidad de diferenciación multilineal; en los síndromes linfoproliferativos crónicos (SLPC) B y T, se cree que el precursor leucémico compartiría además, con el compartimiento mayoritario de células tumorales, patrones específicos de reordenamiento de los genes de las inmunoglobulinas (Ig) y de las distintas cadenas del receptor de célula T para antígeno (TCR)²⁶⁻²⁸. Todo ello apunta a que desde el punto de vista ontogénico la célula “madre” leucémica en neoplasias linfoides habitualmente se acercaría más a una célula ya comprometida a línea linfoides, con un grado variable de diferenciación, que a una célula madre hematopoyética con capacidad de diferenciación multilineal. El momento exacto de aparición del evento (o eventos) oncogénico variaría dependiendo de la enfermedad en cuestión y su patogenia. Así, en la leucemia linfática crónica (LLC) y otros SLPC B y T como las leucemias de linfocitos grandes granulares (LGL), se cree que la expansión de las células neoplásicas podría tener su origen en la expansión clonal de células B, T o NK inmunocompetentes/senescentes reactivas, al existir una asociación estrecha entre algunas de estas neoplasias y procesos de estimulación antigénica crónica –p. ej.: LGL-T CD4 y citomegalovirus^{29,30} o linfoma MALT gástrico e infección por *H. pylori*³¹–. Finalmente, en el caso del mieloma múltiple y la leucemia de células plasmáticas se barajan opciones diversas según las cuales la enfermedad podría tener su origen en linfocitos B clonotípicos que han pasado por el centro germinal y han sufrido el cambio de isotipo de Ig^{26,32}.

No obstante, existen al menos tres situaciones en el caso de las LLA en las que esta noción se pone en tela de juicio, planteándose que en estas neoplasias la célula madre leucémica podría mantener también capacidad de diferenciación multilineal; dichas situaciones incluirían: i) un pequeño subgrupo de LLA de línea T en la que se observan recaídas como LMA³³⁻³⁵; ii) leucemias que muestran características bifenotípicas y/o bilineales³⁶, y iii) LLA *de novo* que cursan con reordenamientos del gen MLL³⁷ y BCR/ABL con punto de ruptura a nivel de MBCR³⁸.

Caracterización fenotípica de células madre leucémicas

En la actualidad se cree que las células madre únicamente representan una pequeña proporción de todas las células leucémicas de un paciente^{15,21}. Además,

Tabla 1. Rasgos fenotípicos más importantes de las potenciales células madre leucémicas en las distintas neoplasias hematológicas

Neoplasia hematológica	Célula madre leucémica	Compartimento fenotípico
SMD/NMP	Célula madre hematopoyética no comprometida	CD13 ⁺ CD34 ⁺ CD38 ^{-/+d} CD133 ⁺
LMA	Célula madre hematopoyética no comprometida	CD13 ⁺ CD34 ⁺ CD38 ^{-/+d} CD117 ⁻ CD123 ⁺ CD133 ⁺
LPA	Progenitor mielóide	CD34 ⁺ CD38 ⁺ cMPO ⁺
LLA: · LLA-B MLL/AF4+	Progenitor linfoide Precursor inmaduro prehematopoyético	CD34 ⁺ CD19 ⁺ nTdt ⁺ CD34 ⁻ CD38 ^{-/+d} CD45 ⁻ CD105 ⁺
SLPC: · SLPC-B · SLPC-T · GM	Linfocito maduro Linfocito B <i>naïve</i> /memoria Linfocito T memoria/efector Linfocito B memoria/CP inmadura	CD19 ⁺ CD27 ^{-/+} CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD27 ⁺

CP: célula plasmática; GM: gammapatías monoclonales; LLA: leucemia linfoblástica aguda; LMA: leucemia mieloblástica aguda; LPA: leucemia promielocítica aguda; NMP: neoplasias mieloproliferativas; SLPC: síndrome linfoproliferativo crónico; SMD: síndrome mielodisplásico.

en general se asume que éstas muestran un fenotipo más inmaduro que les acerca a la célula madre hematopoyética normal^{17,18}. Aunque esto es cierto en las hemopatías clonales mieloides, cada vez existe mayor evidencia de que en las neoplasias linfoides maduras la célula madre leucémica podría presentar características fenotípicas cercanas a las del compartimento celular diferenciado mayoritario³⁹.

En la actualidad disponemos de una amplia batería de técnicas encaminadas a la caracterización inmunofenotípica de precursores hematopoyéticos normales y leucémicos. De todas ellas resulta especialmente útil la citometría de flujo, al permitir analizar simultáneamente varios marcadores fenotípicos en un gran número de células, con la posibilidad de separar además físicamente varias subpoblaciones celulares para su posterior estudio fenotípico, genético o molecular^{40,41}. Aunque el conocimiento existente en la actualidad acerca de las características inmunofenotípicas de las células madre leucémicas sigue siendo relativamente limitado, a continuación revisaremos las características fenotípicas que delimitan en diferentes hemopatías las características de aquellos compartimentos celulares candidatos a contener este tipo de células leucémicas (Tabla 1).

Síndromes mielodisplásicos (SMD) y neoplasias mieloproliferativas (NMP)

Durante décadas se ha discutido si el precursor clonal en los SMD sería una célula madre hematopoyética no comprometida vs. comprometida a serie mielóide⁴². Hallazgos recientes sugieren que podría tratarse de un precursor incluso más inmaduro, al detectarse

alteraciones genéticas comunes en precursores hematopoyéticos CD34⁺ inmaduros y células madre mesenquimales, obtenidas tanto tras cultivo *in vitro*, como *ex vivo*, directamente a partir de muestras primarias de médula ósea de pacientes con SMD⁴³. Dentro de los precursores CD34 afectaría de forma precoz a células que característicamente muestran positividad para CD133 y CD13, en ausencia de expresión (o expresión débil) de CD38 y otras características fenotípicas comunes con la célula madre hematopoyética normal de médula ósea⁴² (Tabla 1).

Hoy se reconoce que en la práctica totalidad de las neoplasias mieloproliferativas crónicas, incluidas la leucemia mielóide crónica, la policitemia vera y la trombocitemia esencial, la célula madre leucémica presentaría un fenotipo superponible al de la célula madre hematopoyética CD34⁺, en la que, en ausencia de marcadores característicos de compromiso madurativo a serie linfoide (CD19⁻, CyCD79a⁻, Tdt⁻), precursor de neutrófilo (CyMPO⁻, CD15⁻, CD13débil), monocito (CD64⁻), serie eritroide (CD36⁻, CD71lo, CD235a⁻) o megacariocítica (CD61⁻, CD42⁻, CD41⁻, CD36⁻) y CD38, se observa positividad para marcadores de célula madre hematopoyética como CD133, CD13 y CD45débil, con un perfil más proliferativo⁴⁴.

Leucemias mieloblásticas agudas (LMA)

Además de las NMP y los SMD, las LMA se considera que constituyen también una enfermedad de la célula madre hematopoyética, con la posible excepción de la leucemia promielocítica aguda. Diferentes trabajos sugieren que el precursor leucémico responsable del mantenimiento a largo plazo de la LMA sería una célula con capacidad de autorrenovación y diferenciación multilineal cuyas características fenotípicas incluirían: coexpresión de CD34 y CD133, junto a una baja tasa proliferativa^{8,11}. A diferencia de las células madre normales, estos precursores leucémicos carecerían de expresión de CD90 y CD117, y presentarían expresión de CD123, IRF-1 (del inglés *interferon regulatory factor 1*) y DAPK (del inglés *death-associated protein kinase*), entre otras características fenotípicas⁴⁵⁻⁴⁷.

Leucemias linfoblásticas agudas

A diferencia de lo que ocurre en la mayoría de las LMA, durante años se ha considerado que las LLA tendrían su origen en un precursor hematopoyético ya comprometido a línea linfoide. Así se ha descrito la presencia de células con capacidad clonogénica en las LLA de precursores B, tanto en la fracción CD34+/CD19+/CD38- como entre las células CD34+/CD19+/CD38+⁴⁸. Sin embargo, más recientemente se ha sugerido que diferentes subgrupos citogenéticos de LLA de precursores B asociados a alteraciones cromosómicas recurrentes, como los reordenamientos de los genes MLL, BCR/ABL, TEL/AML1 o hiperdiploidía, podrían tener su origen en precursores más inmaduros⁴⁹⁻⁵³ con expresión de CD133 en ausencia de CD19 y CD38⁵⁴. No obstante, estudios citogenéticos sobre células madre mesenquimales sólo han encontrado reordenamientos idénticos a los de los blastos leucémicos en pacientes con reordenamiento MLL/AF4³⁷. Al igual que ocurría en otras hemopatías, estas células estarían incluidas dentro de la fracción de células mesenquimales de médula ósea con fenotipo CD105+, CD13+, CD90+, CD34- y CD45-.

Síndromes linfoproliferativos crónicos (SLPC) y mieloma múltiple (MM)

Desde el punto de vista ontogénico, dentro de los SLPC podemos distinguir tres subtipos diferentes de neoplasias: SLPC asociados a infección de las células tumorales por virus (p. ej.: leucemia linfoma T del adulto e infección por el virus HTLV-1), SLPC asociados a estimulación antigénica crónica (p. ej.: linfoma MALT gástrico asociado a infección por *Helicobacter pylori*) y otros SLPC en los que habitualmente existe un reordenamiento cromosómico característico que podría estar en el origen de la enfermedad (p. ej.: linfoma folicular con t[14;18]). En todos ellos se cree que la capacidad transformante y/o de expansión clonal se situaría en una célula fenotípicamente cercana a la célula tumoral expandida, sin que se haya alcanzado a definir sus características fenotípicas. No obstante, cabe destacar que en el caso de los linfomas linfoplasmocíticos con frecuencia se observan, junto a una población clonal de células plasmáticas con fenotipo inmaduro (sIg+, CD20+, CD45^{hi}), linfocitos B de memoria sIgM+, CD24+ y CD27+ con características más inmaduras y expresión de la misma versión de cadena ligera y región variable de Ig⁵⁵. Asimismo, a lo largo de los años se han descrito algunas crisis blásticas de LLC en las que el precursor leucémico mostraba un fenotipo característico de LLA con idéntico reordenamiento de los genes de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (IGH) que el

observado en las células de la LLC, planteando interrogantes acerca del posible origen de esta enfermedad (González *et al.*, comunicación personal).

De forma similar, resultados recientes sugieren que en el mieloma múltiple (MM) la célula madre mielomatosa podría presentar un fenotipo más inmaduro, ubicándose dentro del compartimiento de linfocitos B de memoria CD19+ con fenotipo CD34-, PCA-1+, CD45^{hi}, CD45RO+, CD11b+, y CXCR5+. A diferencia de las células B normales, estos linfocitos B serían RHAMM+⁵⁶. No obstante, estos resultados no han podido ser confirmados por otros autores, que sugieren que en el MM la célula madre tumoral, más que un linfocito maduro de memoria, podría estar constituida por células precursoras de las células plasmáticas que ya han realizado el cambio de isotipo de Ig⁵⁷ y que, respecto a la población mayoritaria de células plasmáticas clonales, muestran menor expresión de marcadores de diferenciación como CD138 junto a positividad para CD20⁴¹.

Otras hemopatías clonales

En este apartado merecen ser destacadas en especial la HPN y las mastocitosis sistémicas. En ambas se reconoce que el precursor clonal diana de las mutaciones características de las células clonales expandidas sería un precursor hematopoyético con capacidad de diferenciación multilineal; ello se debe a que en ambos grupos de enfermos se ven afectadas por la presencia de mutaciones de los genes PIGA y KIT diferentes líneas celulares hematopoyéticas mieloides y linfoides, respectivamente⁵⁸⁻⁶¹. De este modo, sus características fenotípicas se acercarían a las de un precursor hematopoyético fenotípicamente muy similar al precursor hematopoyético normal: expresión de CD34, CD133 y CD13, y negatividad para CD38. No obstante, cabe destacar que resultados recientes de nuestro grupo sugieren que, en pacientes con mastocitosis sistémica (MS) y afectación multilineal (linfoide y mieloides) por la mutación de KIT (p. ej.: la mutación D816V de KIT), las células mesenquimales CD105+ de muestras primarias de médula ósea muestran también afectación clonal (Jara *et al.*, datos no publicados).

Bibliografía

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70.
2. Hunter T. Oncoprotein networks. *Cell*. 1997 Feb 7;88(3):333-46.
3. Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*. 2002 Jan 25;108(2):153-64.

4. Lotem J, Sachs L. Control of apoptosis in hematopoiesis and leukemia by cytokines, tumor suppressor and oncogenes. *Leukemia*. 1996 Jun;10(6):925-31.
5. Rak J, Filmus J, Finkenzeller G, Grugel S, Marme D, Kerbel RS. Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev*. 1995 Dec;14(4):263-77.
6. Renan MJ. How many mutations are required for tumorigenesis. Implications from human cancer data. *Mol Carcinog*. 1993;7(3):139-46.
7. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. 1995 May 5;81(3):323-30.
8. Dick JE. Acute myeloid leukemia stem cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2005 Jun;1044:1-5.
9. Kvinlaug BT, Huntly BJ. Targeting cancer stem cells. *Expert Opin Ther Targets*. 2007 Jul;11(7):915-27.
10. Pan CX, Zhu W, Cheng L. Implications of cancer stem cells in the treatment of cancer. *Future Oncol*. 2006 Dec;2(6):723-31.
11. Guan Y, Gerhard B, Hogge DE. Detection, isolation, and stimulation of quiescent primitive leukemic progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2003 Apr 15;101(8):3142-9.
12. Guan Y, Hogge DE. Proliferative status of primitive hematopoietic progenitors from patients with acute myelogenous leukemia (AML). *Leukemia*. 2000 Dec;14(12):2135-41.
13. Ishikawa F, Yoshida S, Saito Y, Hijikata A, Kitamura H, Tanaka S, et al. Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nat Biotechnol*. 2007 Nov;25(11):1315-21.
14. Konopleva M, Zhao S, Hu W, Jiang S, Snell V, Weidner D, et al. The anti-apoptotic genes Bcl-X(L) and Bcl-2 are overexpressed and contribute to chemoresistance of non-proliferating leukaemic CD34+ cells. *Br J Haematol*. 2002 Aug;118(2):521-34.
15. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, et al. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*. 2006 Oct 1;66(19):9339-44.
16. Donnenberg AD, Donnenberg VS. Rare-event analysis in flow cytometry. *Clin Lab Med*. 2007 Sep;27(3):627-52, viii.
17. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997 Jul;3(7):730-7.
18. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994 Feb 17;367(6464):645-8.
19. Eyler CE, Rich JN. Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis. *J Clin Oncol*. 2008 Jun 10;26(17):2839-45.
20. Molofsky AV, Pardal R, Morrison SJ. Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. *Curr Opin Cell Biol*. 2004 Dec;16(6):700-7.
21. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001 Nov 1;414(6859):105-11.
22. Nicolis SK. Cancer stem cells and "stemness" genes in neuro-oncology. *Neurobiol Dis*. 2007 Feb;25(2):217-29.
23. Bissell MJ, Labarge MA. Context, tissue plasticity, and cancer: are tumor stem cells also regulated by the microenvironment? *Cancer Cell*. 2005 Jan;7(1):17-23.
24. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature*. 2001 May 17;411(6835):375-9.
25. Grimwade D, Enver T. Acute promyelocytic leukemia: where does it stem from? *Leukemia*. 2004 Mar;18(3):375-84.
26. Bergsagel PL, Masellis Smith A, Belch AR, Pilarski LM. The blood B-cells and bone marrow plasma cells in patients with multiple myeloma share identical IgH rearrangements. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1995;194:17-24.
27. O'Keefe C L, Sobecks RM, Wlodarski M, Rodriguez A, Bell K, Kuczowski E, et al. Molecular TCR diagnostics can be used to identify shared clonotypes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol*. 2004 Oct;32(10):1010-22.
28. Bergsagel PL, Smith AM, Szczeppek A, Mant MJ, Belch AR, Pilarski LM. In multiple myeloma, clonotypic B lymphocytes are detectable among CD19+ peripheral blood cells expressing CD38, CD56, and monotypic Ig light chain. *Blood*. 1995 Jan 15;85(2):436-47.
29. Garrido P, Ruiz-Cabello F, Barcena P, Sandberg Y, Canton J, Lima M, et al. Monoclonal TCR-Vbeta13.1+/CD4+/NKa+/CD8-/dim T-LGL lymphocytosis: evidence for an antigen-driven chronic T-cell stimulation origin. *Blood*. 2007 Jun 1;109(11):4890-8.
30. Rodriguez-Caballero A, Garcia-Montero AC, Barcena P, Almeida J, Ruiz-Cabello F, Taberero MD, et al. Expanded cells in monoclonal TCR-alpha beta+/CD4+/NKa+/CD8-/dim T-LGL lymphocytosis recognize hCMV antigens. *Blood*. 2008 Dec 1;112(12):4609-16.
31. Parsonnet J, Hansen S, Rodriguez L, Gelb AB, Warnke RA, Jellum E, et al. Helicobacter pylori infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med*. 1994 May 5;330(18):1267-71.
32. Berenson JR, Vescio RA, Hong CH, Cao J, Kim A, Lee CC, et al. Multiple myeloma clones are derived from a cell late in B lymphoid development. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1995;194:25-33.
33. Ortin X, Escoda L, Nomdedeu J, Llorente A, Cabezu-do E, Boixadera J, et al. Childhood T-acute lymphoblastic leukemia relapsed as minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML-M0). *Leuk Lymphoma*. 2003 Dec;44(12):2159-61.
34. Palomero T, McKenna K, J ON, Galinsky I, Stone R, Suzukawa K, et al. Activating mutations in NOTCH1 in acute myeloid leukemia and lineage switch leukemias. *Leukemia*. 2006 Nov;20(11):1963-6.
35. van Wering ER, Beishuizen A, Roeffen ET, van der Linden-Schrever BE, Verhoeven MA, Hahlen K, et al. Immunophenotypic changes between diagnosis and relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 1995 Sep;9(9):1523-33.
36. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*. 1995 Oct;9(10):1783-6.
37. Menendez P, Catalina P, Rodriguez R, Melen GJ, Bueno C, Arriero M, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells from infants with MLL-AF4+ acute leukemia harbor and express the MLL-AF4 fusion gene. *J Exp Med*. 2009 Dec 21;206(13):3131-41.
38. Primo D, Flores J, Quijano S, Sanchez ML, Sarasquete ME, del Pino-Montes J, et al. Impact of BCR/ABL gene expression on the proliferative rate of different subpopulations of hematopoietic cells in chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2006 Oct;135(1):43-51.
39. Matsui W, Wang Q, Barber JP, Brennan S, Smith BD, Borrello I, et al. Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cell properties, and drug resistance. *Cancer Res*. 2008 Jan 1;68(1):190-7.
40. Fabian A, Barok M, Vereb G, Szollosi J. Die hard: are cancer stem cells the Bruce Willis of tumor biology? *Cytometry A*. 2009 Jan;75(1):67-74.
41. Matsui W, Huff CA, Wang Q, Malehorn MT, Barber J, Tanheco Y, et al. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood*. 2004 Mar 15;103(6):2332-6.
42. Liesveld JL, Jordan CT, Phillips GL, 2nd. The hematopoietic stem cell in myelodysplasia. *Stem Cells*. 2004;22(4):590-9.
43. Lopez-Villar O, Garcia JL, Sanchez-Guijo FM, Robledo C,

- Villaron EM, Hernandez-Campo P, et al. Both expanded and uncultured mesenchymal stem cells from MDS patients are genomically abnormal, showing a specific genetic profile for the 5q- syndrome. *Leukemia*. 2009 Apr;23(4):664-72.
44. Kronenwett R, Butterweck U, Steidl U, Kliszewski S, Neumann F, Bork S, et al. Distinct molecular phenotype of malignant CD34(+) hematopoietic stem and progenitor cells in chronic myelogenous leukemia. *Oncogene*. 2005 Aug 11;24(34):5313-24.
 45. Guzman ML, Upchurch D, Grimes B, Howard DS, Rizzieri DA, Luger SM, et al. Expression of tumor-suppressor genes interferon regulatory factor 1 and death-associated protein kinase in primitive acute myelogenous leukemia cells. *Blood*. 2001 Apr 1;97(7):2177-9.
 46. Jordan CT. Unique molecular and cellular features of acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia*. 2002 Apr;16(4):559-62.
 47. Lichtman MA. The stem cell in the pathogenesis and treatment of myelogenous leukemia: a perspective. *Leukemia*. 2001 Oct;15(10):1489-94.
 48. Kong Y, Yoshida S, Saito Y, Doi T, Nagatoshi Y, Fukata M, et al. CD34+CD38+CD19+ as well as CD34+CD38-CD19+ cells are leukemia-initiating cells with self-renewal capacity in human B-precursor ALL. *Leukemia*. 2008 Jun;22(6):1207-13.
 49. Garcia-Castro J, Balas A, Ramirez M, Perez-Martinez A, Madero L, Gonzalez-Vicent M, et al. Mesenchymal stem cells are of recipient origin in pediatric transplantations using umbilical cord blood, peripheral blood, or bone marrow. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2007 Jun;29(6):388-92.
 50. Kersun LS, Wimmer RS, Hoot AC, Meadows AT. Secondary malignant neoplasms of the bladder after cyclophosphamide treatment for childhood acute lymphocytic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2004 Mar;42(3):289-91.
 51. Koc ON, Peters C, Aubourg P, Raghavan S, Dyhouse S, DeGasperi R, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells remain host-derived despite successful hematopoietic engraftment after allogeneic transplantation in patients with lysosomal and peroxisomal storage diseases. *Exp Hematol*. 1999 Nov;27(11):1675-81.
 52. Rieger K, Marinets O, Fietz T, Korper S, Sommer D, Mucke C, et al. Mesenchymal stem cells remain of host origin even a long time after allogeneic peripheral blood stem cell or bone marrow transplantation. *Exp Hematol*. 2005 May;33(5):605-11.
 53. Stute N, Fehse B, Schroder J, Arps S, Adamietz P, Held KR, et al. Human mesenchymal stem cells are not of donor origin in patients with severe aplastic anemia who underwent sex-mismatched allogeneic bone marrow transplant. *J Hematother Stem Cell Res*. 2002 Dec;11(6):977-84.
 54. Cox CV, Diamanti P, Evely RS, Kearns PR, Blair A. Expression of CD133 on leukemia-initiating cells in childhood ALL. *Blood*. 2009 Apr 2;113(14):3287-96.
 55. San Miguel JF, Vidriales MB, Ocio E, Mateo G, Sanchez-Guijo F, Sanchez ML, et al. Immunophenotypic analysis of Waldenstrom's macroglobulinemia. *Semin Oncol*. 2003 Apr;30(2):187-95.
 56. Basak GW, Carrier E. The search for multiple myeloma stem cells: the long and winding road. *Biol Blood Marrow Transplant*. May;16(5):587-94.
 57. Taylor BJ, Kriangkum J, Pittman JA, Mant MJ, Reiman T, Belch AR, et al. Analysis of clonotypic switch junctions reveals multiple myeloma originates from a single class switch event with ongoing mutation in the isotype-switched progeny. *Blood*. 2008 Sep 1;112(5):1894-903.
 58. Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sanchez ML, Nunez R, Prados A, et al. KIT mutation in mast cells and other bone marrow hematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood*. 2006 Oct 1;108(7):2366-72.
 59. Hernandez-Campo PM, Almeida J, Acevedo MJ, Sanchez ML, Alberca I, Vidriales B, et al. Detailed immunophenotypic characterization of different major and minor subsets of peripheral blood cells in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Transfusion*. 2008 Jul;48(7):1403-14.
 60. Hu R, Mukhina GL, Piantadosi S, Barber JP, Jones RJ, Brodsky RA. *PIG-A* mutations in normal hematopoiesis. *Blood*. 2005 May 15;105(10):3848-54.
 61. Orfao A, Garcia-Montero AC, Sanchez L, Escribano L. Recent advances in the understanding of mastocytosis: the role of KIT mutations. *Br J Haematol*. 2007 Jul;138(1):12-30.

Eritrocitosis secundarias y congénitas

COORDINADORES: A. REMACHA. *Toledo*

L. HERNÁNDEZ-NIETO. *Tenerife*

Resumen del simposio

Una de las causas frecuentes de consulta en hematología es el hallazgo de pacientes con elevación de la concentración de hemoglobina y/o del valor hematocrito, es decir, sospecha (que se confirmará o no) de eritrocitosis. Se trata de un capítulo importante de la patología de la serie roja que presenta sus dificultades diagnósticas. Por una parte, el diagnóstico de la policitemia vera (PV) no suele presentar serias dificultades por la existencia de criterios internacionales claramente definidos, pero además se ha facilitado considerablemente a partir de la descripción de la mutación V617F del gen *JAK2*. Por otra parte, especialmente el diagnóstico preciso de las eritrocitosis aisladas, no deja de ser problemático.

Primero debemos saber si existe o no una verdadera eritrocitosis –sinónimo de elevación de la masa eritrocitaria–, pues como se indica en la primera ponencia los parámetros hematológicos masa eritrocitaria, hematocrito y hemoglobina, no se corresponden totalmente entre sí. Es decir, la elevación del hematocrito o de la hemoglobina no siempre se acompañan de un incremento de la masa eritrocitaria: puede existir una disminución de la plasmemia o un número alto de hematíes microcíticos que no incrementa la masa total (policitemia espúrea, relativa, aparente, etc.). Después, una vez confirmada la verdadera eritrocitosis o eritrocitosis absoluta, debemos llegar a disponer de un diagnóstico lo más preciso posible. Todos estos aspectos son tratados en este simposio.

En la primera ponencia se trata de la clasificación y diagnóstico de estos procesos, se enfatiza en el valor de la masa eritrocitaria, cada día más difícil de poder realizar al ser una prueba isotópica, de la P50, de la Epo, etc.

Una vez sentadas las bases de la clasificación y diagnóstico de las eritrocitosis secundarias (ES) se centra la atención en algunos de sus tipos.

En primer lugar, se revisan las eritrocitosis congénitas por alteraciones de la vía del receptor de la Epo (primarias), por alteración en la vía del sensor de la oxígeno, por alteraciones de la afinidad de la hemoglobina o del enzima 2-3 DPGM (secundarias). Además, se sientan las bases del manejo de estos pacientes.

Otro capítulo interesante son las ES asociadas a tumores, un capítulo con múltiples interrogantes. No todos los carcinomas renales, hepatocarcinomas, hemangioblastomas cerebelosos, etc., presentan eritrocitosis. En este apartado se han puesto al día los conocimientos actuales en este tema, enfatizando el papel de algunas moléculas (VHL) ligadas al control de la producción de eritropoyetina y de algunas lesiones citogenéticas.

Por último, se abordan las eritrocitosis idiopáticas y las eritrocitosis secundarias de “causa desconocida”. Éste es uno de esos temas sobre los que realmente se pasa de puntillas, pero que no deja de ser una fuente de preguntas difíciles e incómodas para el hematólogo y sin una contestación clara y definida. Al tratar este capítulo, se ha concretado la terminología. Se pretende incorporar los conocimientos más recientes para reducir el “cajón de sastre” de las eritrocitosis idiopáticas. Asimismo, se presenta la experiencia del Grupo Español de Eritropatología, que recogió los datos de un número importante de casos con estas alteraciones.

Al final del simposio se ha de conseguir que este capítulo sea mejor entendido y que los conocimientos adquiridos supongan una mejora en el diagnóstico y tratamiento de este interesante grupo de enfermedades.

CLASIFICACIÓN Y DIAGNÓSTICO DE LAS ERITROCITOSIS

M.^ªC. FERNÁNDEZ JIMÉNEZ, M.^ªJ. MURGA, Á.F. REMACHA

Servicio de Hematología y Hemoterapia.
Complejo Hospitalario de Toledo

El término eritrocitosis se refiere a un aumento del volumen total de hematíes en sangre. Se define como una elevación de la masa eritrocitaria superior a dos veces la desviación estándar de la media prevista para esa edad, sexo y raza¹. Dado que los hematíes son las células más numerosas de la sangre, el término poliglobulia (muchas células sanguíneas) se utiliza como sinónimo.

Los parámetros hematológicos masa eritrocitaria, hematocrito y hemoglobina no se corresponden totalmente entre sí. Así, la elevación del hematocrito o de la hemoglobina no siempre se acompañan de un incremento de la masa eritrocitaria. El aumento del hematocrito sin elevación de la masa eritrocitaria se denomina *eritrocitosis aparente*, frente a la *eritrocitosis absoluta* o verdadera, en la que existe un aumento de la masa. Debido a que la distribución normal de los valores de hematocrito llega hasta el 55%, algunos de estos casos de eritrocitosis aparente son sólo sujetos sanos con un hematocrito en el límite alto. Por otra parte, como tanto la hemoglobina como el hematocrito son concentraciones, dependen del volumen plasmático. Y así, cuando hay una disminución del volumen plasmático, como ocurre en situación de deshidratación, se produce una elevación de la hemoglobina y del hematocrito sin que exista un aumento de la masa eritrocitaria. Este aumento del hematocrito por disminución del volumen plasmático se conoce como *eritrocitosis relativa*.

La importancia clínica de la eritrocitosis radica en que los hematíes constituyen la mayor parte de las células sanguíneas y, por tanto, son responsables en gran medida de la viscosidad de la sangre, y un aumento de dicha viscosidad puede dar lugar a patología.

Fisiopatología de la eritrocitosis

Importancia de la hemoglobina en el transporte de oxígeno

El oxígeno es esencial para el metabolismo celular. Es transportado a los tejidos de dos maneras: en más de un 97% unido de forma reversible a la hemoglobina de los hematíes, y en un pequeño porcentaje disuelto en el plasma.

La relación existente entre la presión parcial de oxígeno (PO₂) y el porcentaje de hemoglobina que está saturada por el oxígeno se expresa a través de la curva de disociación de la hemoglobina (Figura 1), que muestra que para pO₂ bajas, como las existentes en los tejidos, la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno es baja, permitiendo su cesión a los tejidos, y cuando la pO₂ se eleva, como ocurre a nivel pulmonar, su afinidad es mayor, favoreciendo la captación de oxígeno.

La afinidad de la hemoglobina por el oxígeno es modificada por varios factores incluyendo el pH sanguíneo, la pCO₂, la temperatura y los niveles de 2,3-bifosfoglicerato (2,3-BPG). El 2,3-BPG se sintetiza en los hematíes mediante la acción de la enzima bifosfoglicerato mutasa (BPGM), en respuesta al ejercicio, la anemia y la hipoxia crónica. Se une a la hemoglobina y convierte la molécula a un estado de baja afinidad por el oxígeno, facilitando la liberación del mismo a los tejidos. El infrecuente déficit de 2,3-BPG (generalmente secundario a una mutación de la enzima BPGM) produce el efecto opuesto, lo que da lugar a una eritrocitosis compensadora². Por otro lado, hemoglobinopatías que afecten a las zonas clave para la captación de oxígeno o a las zonas de unión de 2,3-BPG, CO₂ e iones H⁺ pueden determinar un aumento de la afinidad por el oxígeno, produciendo una peor cesión a los tejidos, hipoxia tisular y eritrocitosis.

Todos estos factores que modifican la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno dan lugar a desplazamientos de la curva de disociación a la derecha (dis-

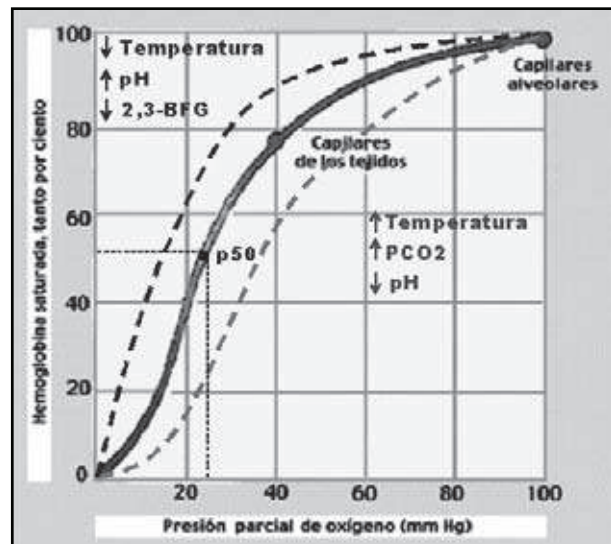


Figura 1. Curva de disociación oxígeno-hemoglobina. Los factores que aumentan la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno desplazan la curva a la izquierda (punteado más oscuro). Los factores que disminuyen la afinidad la desplazan a la derecha (punteado más claro). La p50 es la presión de oxígeno a la que el 50% de la hemoglobina está saturada por el oxígeno. Las desviaciones de la curva a la izquierda disminuyen la p50, y las desviaciones a la derecha la aumentan.

minución de la afinidad) o a la izquierda (aumento de la afinidad). Estas variaciones de la curva son detectadas mediante la p50, que es la presión de oxígeno a la que el 50% de la hemoglobina está saturada por el oxígeno⁴. Su aplicación práctica consiste en que, cuanto menor sea su valor, mayor será la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno y, por tanto, peor su liberación a los tejidos.

**Eritropoyesis y su regulación:
papel de la eritropoyetina**

El proceso de producción de hematíes o eritropoyesis, se inicia con una pequeña población de células progenitoras pluripotenciales que son comprometidas a progenitores eritroides. Los primeros progenitores eritroides identificables son las BFU-E (*burst forming units-erythroid*) y las CFU-E (*colony forming units-erythroid*). Las CFU-E originan los progenitores eritroides morfológicamente reconocibles y finalmente los hematíes.

Este proceso está estrechamente regulado por el equilibrio entre señales positivas y negativas, entre las que destaca la eritropoyetina (Epo), una hormona glicoproteica, esencial para la supervivencia, proliferación y diferenciación de los progenitores eritroides a partir de las BFU-E más tardías.

La Epo es por tanto la principal reguladora de la eritropoyesis, de modo que cambios en los niveles de Epo o en su acción sobre las células diana pueden conducir a importantes variaciones en el número de hematíes.

El receptor de la eritropoyetina

La unión de la Epo a su receptor (EpoR) en la superficie de las células progenitoras eritroides activa tres vías de transducción de señales implicadas en la proliferación, diferenciación e inhibición de apoptosis: JAK-STAT, PI3K-Akt y Ras-MAPK. Se trata de un mecanismo complejo en el que el primer acontecimiento es la dimerización del EpoR tras la adhesión de la Epo y la autofosforilación del JAK2 (*Janus kinase 2*) asociado al receptor⁵.

Para evitar una proliferación eritroide sostenida, la señalización de la Epo vuelve a su nivel basal a los 30-60 minutos después de la estimulación. Esto tiene lugar por distintos mecanismos que, o bien eliminan físicamente el EpoR de la superficie celular, o bien bloquean su fosforilación⁶. En estos mecanismos de regulación negativa juega un papel fundamental la región citoplásmica C-terminal del receptor, por lo que mutaciones que afecten a esta zona producirán

una prolongación de la activación del receptor dando lugar a eritrocitosis con niveles de Epo bajos⁷.

**Control de la síntesis de eritropoyetina:
vía del sensor de oxígeno**

La Epo en los adultos es producida fundamentalmente en el riñón, en respuesta a la hipoxia. Esta hipoxia puede ser el resultado de una disminución de la concentración de hemoglobina (anemia), una saturación de oxígeno reducida (hipoxemia), una reducción de la llegada de sangre al riñón (estenosis de la arteria renal) o una disminución de la liberación de oxígeno al tejido por parte de la hemoglobina (aumento de su afinidad por el oxígeno). Un mecanismo de retroalimentación negativo regula a la baja la producción de Epo cuando se incrementa el aporte renal de oxígeno (Figura 2).

El gen de la Epo presenta en su región 3' un elemento de respuesta a la hipoxia (HRE). En situación de hipoxia, este elemento es ocupado por el factor inducido por la hipoxia (HIF), activándose la transcripción del gen. El HIF es un heterodímero constituido por una subunidad α y una β . Mientras que la subunidad β (HIF β) se expresa independientemente del nivel de oxígeno, la subunidad α (HIF α) sólo se detecta en condiciones de hipoxia, debido a que en presencia de una oxigenación celular adecuada es rápidamente degradada. Esto ocurre de la siguiente manera: por encima de un nivel crítico de oxígeno el HIF α es hidroxilado por una enzima proil hidroxilasa (PHD) en una reacción dependiente de oxígeno. Este HIF α hidroxilado se une entonces a la proteína supresora de tumores von Hippel-Lindau (VHL), originando un complejo que funciona como una ubi-

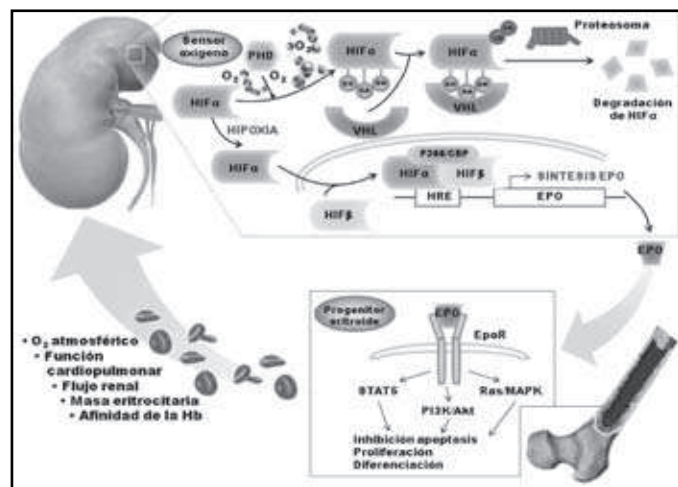


Figura 2. Control de la producción de eritropoyetina (EPO) en respuesta a la hipoxia renal. La eritropoyetina promueve la viabilidad, proliferación y diferenciación de las células progenitoras eritroides a través de señales mediadas por su receptor (EpoR).

Tabla 1. Clasificación de las eritrocitosis

<i>Eritrocitosis primaria</i>	
Congénita:	Mutaciones del receptor de la eritropoyetina
Adquirida:	Clonal: policitemia vera
<i>Eritrocitosis secundaria</i>	
Congénita:	Defectos en la vía del sensor de oxígeno:
	<ul style="list-style-type: none"> · Mutaciones de VHL · Mutaciones de PHD2 · Mutaciones de HIF2α
	Otros defectos congénitos:
	<ul style="list-style-type: none"> · Hemoglobinopatías con alta afinidad por el oxígeno · Déficit de 2,3-BPG · Metahemoglobinemia congénita
Adquirida:	Secundaria a hipoxia:
	<ul style="list-style-type: none"> · Enfermedad pulmonar crónica · Comunicaciones cardiopulmonares derecha-izquierda · Hábitat en lugares de altitud elevada · Tabaco/intoxicación por monóxido de carbono · Apnea del sueño/Síndrome de hipoventilación
	Secundaria a trastorno renal:
	<ul style="list-style-type: none"> · Estenosis de la arteria renal · Post-trasplante renal · Enfermedad poliquística
	Producción patológica de EPO por tumores
	Administración de EPO/andrógenos
<i>Eritrocitosis idiopática</i>	

quitina ligasa E3, dando lugar a la ubiquitinización y degradación de HIF α por el proteosoma. En situación de hipoxia, el oxígeno se convierte en un factor limitante para la hidroxilación de HIF α mediada por PHD, lo que hace que se enlentezca la degradación proteosómica de HIF α , dando lugar a su acumulación citoplásmica y posterior desplazamiento al núcleo, donde se une a HIF β , activando la transcripción de diversos genes, entre ellos el de la Epo⁹.

Por tanto, mutaciones de los componentes de esta vía del sensor de oxígeno (VHL, PHD2 y HIF2 α) pueden alterar el control de la síntesis de Epo, originando eritrocitosis con niveles de Epo elevados o inadecuadamente normales para el nivel de hematocrito.

Clasificación

Las eritrocitosis se pueden clasificar en *congénitas* y *adquiridas* (Tabla 1). También se las puede dividir en

eritrocitosis primarias, en las que existe un defecto intrínseco de la célula progenitora eritroide, y en *eritrocitosis secundarias*, donde la alteración no reside en la célula eritroide, sino en factores externos que producen una estimulación de la eritropoyesis. Las eritrocitosis en las que no se puede identificar una causa subyacente se denominan eritrocitosis idiopáticas.

Eritrocitosis congénitas

Los pacientes con eritrocitosis hereditaria presentan un aumento de la masa eritrocitaria en ausencia de elevación de la cifra plaquetaria o leucocitaria. Aunque el defecto molecular subyacente se ha identificado sólo en un grupo de pacientes, cada vez se avanza más en su conocimiento. Los casos de eritrocitosis familiares han sido clasificados por la OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) en cuatro grupos: ECVT1 (Mutaciones de EpoR), ECVT2 (Mutaciones de VHL, incluyendo la policitemia de Chuvash), ECVT3 (Mutaciones de PHD2) y ECVT4 (Mutaciones de HIF-2 α). Sin embargo, esta clasificación no considera otras causas de eritrocitosis congénitas como las hemoglobinopatías de alta afinidad por el oxígeno, el déficit de 2,3-BPG y la metahemoglobinemia congénita.

Eritrocitosis adquiridas

No clonales

- **Hipoxia:** La causa más frecuente de eritrocitosis es la hipoxia resultante de una variedad de trastornos (enfermedad pulmonar crónica, comunicaciones cardiopulmonares derecha-izquierda, tabaquismo, intoxicación por monóxido de carbono, apnea del sueño, estenosis de la arteria renal). El aumento de la masa eritrocitaria mediado por Epo trata de compensar la baja concentración de oxígeno disponible a nivel tisular.

- **Trastorno renal:** Al producirse la Epo en el riñón, la patología renal puede causar eritrocitosis como resultado de diferentes patologías (quistes renales múltiples, estenosis de la arteria renal, carcinoma renal, eritrocitosis post-trasplante renal). En el caso de los quistes renales, la razón de la eritrocitosis no se conoce totalmente pero podría estar relacionada con isquemia renal intersticial o con producción de Epo por los quistes. Por su parte, la estenosis de la arteria renal origina una hipoxia a nivel renal con un aumento compensador de Epo. Un 10-15% de los pacientes sometidos a un trasplante renal desarrollan a los 8-24 meses una eritrocitosis, conocida como eritrocitosis post-trasplante renal. Su patogenia se cree que es multifactorial, habiéndose implicado entre otros factores un aumento de la producción de Epo por los riñones nativos⁹.

- **Producción patológica de Epo por tumores:** La eritrocitosis puede ser un síndrome paraneoplásico, secundario a la producción de Epo por parte de las células tumorales, en un amplio número de tumores tanto malignos como benignos.

- **Fármacos:** La administración exógena de Epo o de andrógenos para mejorar el rendimiento deportivo también se ha asociado con eritrocitosis. Hay comunicaciones recientes de casos de eritrocitosis secundaria en pacientes con carcinoma renal, melanoma o carcinoma hepatocelular tratados con inhibidores de tirosina cinasa¹⁰.

Clonales: policitemia vera

Es la causa principal de eritrocitosis primaria. Se trata de una enfermedad clonal causada por una o más alteraciones genéticas en un progenitor hemopoyético, que conducen a un incremento en la producción de hematíes y a un aumento variable de la cifra de plaquetas y leucocitos. Estas células progenitoras son capaces de formar colonias eritroides *in vitro* sin adición de Epo.

En más del 95% de los pacientes con PV se detecta una mutación V617F en el exón 14 de JAK2, y en un 1-2% adicional, mutaciones en el exón 12. Todas estas mutaciones conducen a una ganancia de función de JAK2¹¹, presentando los pacientes frecuentemente niveles bajos de EPO. La mutación JAK2V617F también se ha encontrado en el 50% de los pacientes con trombocitemia esencial (TE) y mielofibrosis primaria (MFP), pero no en pacientes con eritrocitosis de otra causa.

Para distinguir la PV de otras causas de eritrocitosis se han elaborado diferentes grupos de criterios diagnósticos, que tras el descubrimiento de la mutación JAK2V617F se han simplificado considerablemente^{12,13}.

Orientación diagnóstica

Los pacientes con un hematocrito persistentemente elevado (> 52% en hombres o > 48% en mujeres durante más de 2 meses) deberían ser estudiados. La aproximación inicial debe incluir una historia clínica y una exploración física cuidadosas y una revisión de las analíticas previas.

Historia clínica

En la historia clínica se debe indagar especialmente sobre sintomatología pulmonar o cardíaca, somnolencia diurna, consumo de tabaco, ingesta de medicamentos como andrógenos y esteroides, exposición a fuentes de monóxido de carbono (CO) (ocupacionales o calderas en mal estado), historia familiar de aumento de hema-

tocrito o hemoglobina, etc. Además, hay que preguntar por síntomas relacionados con PV como prurito, eritromelalgia o historia de trombosis previas.

Es importante revisar los análisis previos para conocer los niveles basales del paciente. Si la eritrocitosis está presente desde la infancia o es de duración desconocida, sobre todo en pacientes jóvenes, se debe considerar la posibilidad de una eritrocitosis congénita¹⁴.

Exploración física

La presencia de hepatomegalia o esplenomegalia puede indicar una PV o un hepatocarcinoma. Se debe realizar además una detallada auscultación pulmonar y cardíaca. El empleo de un pulsioxímetro nos dará una estimación de la saturación arterial de oxígeno, que si es < 92% sugiere una enfermedad cardiopulmonar.

Estudios básicos de laboratorio

Los estudios de laboratorio comienzan por pruebas simples, como la repetición del recuento celular. Un aumento del recuento leucocitario y/o plaquetario deben hacer pensar en una PV. Los niveles de ferritina bajos se ven más frecuentemente en la PV que en las eritrocitosis secundarias, pudiendo existir en la PV también un aumento de la B12. El estudio de la función hepática y renal también son de ayuda en el estudio diagnóstico.

La extensión y dirección del resto de pruebas deberían estar orientadas por el contexto clínico y los resultados iniciales.

Puede ser útil la realización de un análisis de gases arteriales, y en fumadores y en pacientes expuestos a CO, determinar el nivel de carboxihemoglobina, que si es mayor del 5% apunta al exceso de CO como causa de la eritrocitosis.

Mutación JAK2 y niveles de Epo sérica

La clave del diagnóstico es establecer si la eritrocitosis es clonal o no. Por este motivo, en la actualidad, en los pacientes que no tienen una causa evidente de eritrocitosis, es razonable iniciar la evaluación diagnóstica con el estudio de la mutación JAK2V617F en sangre periférica (detectable en el 97% de los pacientes con PV) y con una medición de los niveles séricos de Epo (Figura 3)¹⁴. La medición concomitante de la Epo sérica y de la mutación JAK2V617F permite minimizar las consecuencias de los resultados falsos positivos o negativos, así como detectar los casos de PV JAK2V617F negativos.

La medición de los niveles de Epo proporciona una importante ayuda en la orientación diagnóstica de una eritrocitosis. Un nivel de Epo repetidamente bajo en un paciente con eritrocitosis orienta hacia una PV, aunque también puede verse en los infrecuentes casos de eritrocitosis congénita por mutaciones de EpoR. En el resto de casos de eritrocitosis encontraremos una Epo inadecuadamente normal para el nivel de hematocrito o una Epo elevada.

Los niveles bajos de Epo son muy específicos de PV (especificidad > 90%), pero los métodos de medida no son siempre adecuadamente sensibles en valores bajos y además existe cierto grado de solapamiento¹⁵, por lo que un valor de Epo normal no descarta el diagnóstico de PV.

La elevación de los niveles de Epo es muy específica (especificidad 98%) de eritrocitosis secundaria y hace muy improbable el diagnóstico de PV. Sin embargo, su sensibilidad para detectar una eritrocitosis secundaria es sólo del 47%. Esto ocurre porque en la eritrocitosis secundaria puede existir un aumento intermitente de los niveles de Epo. Hay que tener en cuenta que en situación de hipoxia tisular se estimula la producción de Epo y se produce un aumento de la masa eritrocitaria, lo que puede ser capaz de compensar la hipoxia, haciendo que el valor de Epo se normalice. Por tanto, en los pacientes con una única determinación normal de Epo, se debería repetir el estudio. Tras la repetición, un 25% de los pacientes con PV presentarán una Epo baja¹⁶ y pacientes con eritrocitosis secundaria pueden mostrar una Epo elevada.

Masa eritrocitaria

Desde un punto de vista conceptual, una vez que se ha descartado la PV, en los pacientes con una eritrocitosis de causa no evidente y un hematocrito < 60% (56% en la mujer) se debería realizar una medición de la masa eritrocitaria, para confirmar que existe una eritrocitosis absoluta antes de continuar con más estudios. Sin embargo, éste es un tema controvertido^{17,18}.

La medición de la masa eritrocitaria se realiza mediante técnica de dilución de isótopos y es una prueba costosa, laboriosa y que no está disponible en muchos centros. Por este motivo, la hemoglobina y el hematocrito se han tratado de usar como sustitutos, habiéndose mostrado más fiable el valor de hematocrito que el de hemoglobina. La inciden-

cia de eritrocitosis absoluta aumenta a medida que se eleva el hematocrito. Un hematocrito ≥ 60% (56% en la mujer) se asocia siempre a eritrocitosis verdadera¹⁷.

Desde un punto de vista práctico y dadas las dificultades para su realización, la masa eritrocitaria se podría reservar, una vez descartada la PV, para:

- Los pacientes con un hematocrito elevado (pero < 60% en hombres o 56% en mujeres) no explicado y una Epo repetidamente normal.

- Los pacientes con un hematocrito en el límite alto que se presentan con trombocitosis aislada y mutación JAK2V617F, sobre todo si existe esplenomegalia. Hasta un 64% de estos pacientes, que muchas veces se diagnostican de TE, tienen en realidad una PV⁽¹⁹⁾. Esto se debe a que en la PV no se produce la reducción del volumen plasmático que suele acompañar al incremento de la masa eritrocitaria, sino que incluso puede aumentar, sobre todo en mujeres y cuando existe esplenomegalia, lo que puede originar un hematocrito falsamente normal (es lo que algunos autores denominan eritrocitosis inaparente)¹¹.

Otros estudios

Estudios como las pruebas de función respiratoria, la radiografía de tórax, el ecocardiograma, el estudio del sueño, la ecografía abdominal, el eco-Doppler renal, la medición de lactato sérico, etc., pueden ser útiles para identificar causas de hipoxia central o renal.

La secreción inadecuada de Epo se sospecha en presencia de niveles marcadamente elevados de Epo. La ecografía y la tomografía computarizada facilitan la detección de estos tumores.

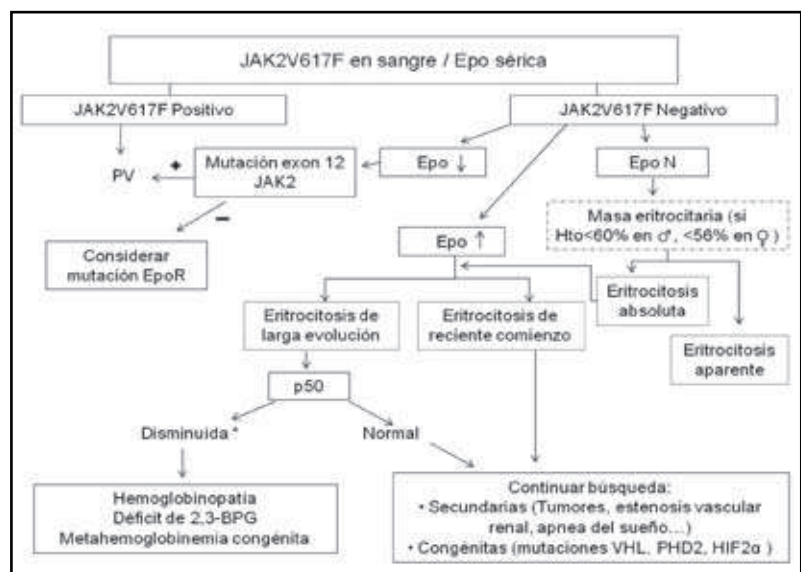


Figura 3. Propuesta de algoritmo diagnóstico en eritrocitosis de causa no evidente.

* En fumadores la p50 puede estar disminuida.

Eritrocitosis congénitas: P50, estudio de mutaciones

Por lo que se refiere a las eritrocitosis congénitas, pacientes con eritrocitosis no explicada y Epo baja deben ser considerados para estudio de mutaciones de EpoR. En los pacientes con Epo normal o aumentada, es conveniente comenzar el estudio con una medición de la p50. Se trata de una técnica poco costosa que se determina automáticamente por un analizador de gases o se calcula mediante una fórmula matemática⁴. La disminución de la p50 sugiere la presencia de una hemoglobinopatía con alta afinidad por el oxígeno, un déficit de 2,3-BPG o, en presencia de cianosis con una PO₂ normal, una metahemoglobinemia. Hay que tener en cuenta que en los fumadores puede existir un descenso de la p50, ya que la hemoglobina tiene mayor afinidad por el CO que por el oxígeno. La p50 es el estudio inicial más apropiado en las sospechas de hemoglobinopatías de alta afinidad, ya que las técnicas convencionales de electroforesis no detectan muchas de estas variantes. Pueden ser necesarios estudios adicionales como la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa o la secuenciación de los genes de las globinas para caracterizarlas³. Por lo que se refiere al déficit de 2,3-BPG, el diagnóstico se establece demostrando un descenso de 2,3-BPG o de la actividad de la BPGM²⁰.

Si la P50 es normal, se deberían estudiar las mutaciones de la vía del sensor del oxígeno, las más frecuentes de las cuales son las mutaciones de VHL.

Conclusiones

Los avances en el conocimiento de los mecanismos que regulan la eritropoyesis han permitido una mejor comprensión de la fisiopatología de la eritrocitosis. A la hora de evaluar a un paciente con eritrocitosis, el paso diagnóstico más importante es descartar la presencia de un trastorno clonal (PV). El descubrimiento de la mutación JAK2V617F, presente en la mayoría de los pacientes con PV, ha cambiado nuestra aproximación diagnóstica. Sin embargo, no hay que olvidar que la mayor parte de los casos de eritrocitosis son secundarios. En pacientes jóvenes y en eritrocitosis de larga evolución, hay que considerar las eritrocitosis congénitas.

Bibliografía

1. Lorberboym M, Rahimi-Levene N, Lipszyc H, Kim CK. Analysis of red cell mass and plasma volume in patients with polycythemia. *Arch Pathol Lab Med* 2005;129:89-91.

2. Johansson PL, Safai-Kutti S, Kutti J. An elevated venous haemoglobin concentration cannot be used as a surrogate marker for absolute erythrocytosis: a study of patients with polycythaemia vera and apparent polycythaemia. *Br J Haematol* 2005;129:701-5.
3. Gonzalez Fernandez FA, Villegas A, Roperio P, Carreno MD, Anguita E, Polo M et al. Haemoglobinopathies with high oxygen affinity. Experience of Erythropathology Cooperative Spanish Group. *Ann Hematol* 2009;88:235-8.
4. Rumi E, Passamonti F, Pagano L, Ammirabile M, Arcaini L, Elena C et al. Blood p50 evaluation enhances diagnostic definition of isolated erythrocytosis. *J Intern Med* 2009;265:266-74.
5. Hodges VM, Rainey S, Lappin TR, Maxwell AP. Pathophysiology of anemia and erythrocytosis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007;64:139-58.
6. Walrafen P, Verdier F, Kadri Z, Chretien S, Lacombe C, Maeyoux P. Both proteasomes and lysosomes degrade the activated erythropoietin receptor. *Blood* 2005;105:600-8.
7. Huang LJ, Shen YM, Bulut GB. Advances in understanding the pathogenesis of primary familial and congenital polycythemia. *Br J Haematol* 2010;148:844-52.
8. Semenza, GL. Involvement of oxygen-sensing pathways in physiologic and pathologic erythropoiesis. *Blood* 2009;114:2015-9.
9. Vlahakos DV, Marathias KP, Agroyannis B, Madias NE. Post transplant erythrocytosis. *Kidney Int* 2003;63:1187-94.
10. Alexandrescu DT, McClure R, Farzanmehr H, Dasanu CA. Secondary erythrocytosis produced by the tyrosine kinase inhibitors sunitinib and sorafenib. *J Clin Oncol* 2008;26:4047-8.
11. Spivak JL. Narrative review: Thrombocytosis, polycythemia vera, and JAK2 mutations: The phenotypic mimicry of chronic myeloproliferation. *Ann Intern Med* 2010;152:300-6.
12. McMullin MF, Reilly JT, Campbell P, et al. Amendment to the guideline for the diagnosis and investigation of polycythaemia/erythrocytosis. *Br J Haematol* 2007;138:821-2.
13. Thiele J, Kvasnicka HM, Orazi A, et al. Polycythaemia vera. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al, eds. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon: IARC Press;2008:40-3.
14. Patnaik MM, Tefferi A. The complete evaluation of erythrocytosis: congenital and acquired. *Leukemia* May 2009; 23:834-44.
15. Remacha AF, Montserrat I, Santamaria A, Oliver A, Barcelo MJ, Parellada M. Serum erythropoietin in the diagnosis of polycythemia vera. A follow-up study. *Haematologica* 1997;82:406-10.
16. Messinezy M, Westwood NB, El-Hemaidi I, Marsden JT, Sherwood RS, Pearson TC. Serum erythropoietin values in erythrocytoses and in primary thrombocythaemia. *Br J Haematol* 2002;117:47-53.
17. Johansson PL, Safai-Kutti S, Kutti J. An elevated venous haemoglobin concentration cannot be used as a surrogate marker for absolute erythrocytosis: a study of patients with polycythaemia vera and apparent polycythaemia. *Br J Haematol* 2005;129:701-5.
18. Spivak JL, Silver RT. The revised World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocytosis, and primary myelofibrosis: an alternative proposal. *Blood* 2008;112: 231-9.
19. Cassinat B, Laguillier C, Gardin C, de Beco V, Burcheri S, Fenaux P, et al. Classification of myeloproliferative disorders in the JAK2 era: is there a role for red cell mass?. *Leukemia* 2008; 22:452-3.
20. Hoyer JD, Allen SL, Beutler E, Kubik K, West C, Fairbanks VF. Erythrocytosis due to bisphosphoglycerate mutase deficiency with concurrent glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) deficiency. *Am J Hematol* 2004;75:205-8.

CONGENITAL ERYTHROCYTOSIS

M.F. McMULLIN

*Department of Haematology, Belfast City Hospital.
Queen's University Belfast, Ireland*

An erythrocytosis is present when the red cell mass is greater than or equal to 125% of the predicted value for an individual's body mass and sex¹. The erythrocytosis is reflected by the fact that the haemoglobin and haematocrit are also usually raised. By definition the erythrocytosis is congenital if it is present from birth. In such persons the erythrocytosis is usually detected at a young age. There is frequently a family history in keeping with the inherited nature of the defect.

Congenital erythrocytoses can be primary or secondary. A primary erythrocytosis occurs when there is an intrinsic defect in the erythroid cells in the bone marrow. A secondary erythrocytosis is present when erythropoietin (EPO) is produced from some source and then drives red cell production resulting in an erythrocytosis.

Primary congenital erythrocytosis

The main causes of primary congenital erythrocytosis are mutations of the erythropoietin receptor. These mutations result in truncations of the receptor. In the cell EPO docks with its receptor. Phosphorylation of downstream kinases then occurs and a cascade of further processes ultimately resulting in red cell production. This process stops when the protein SHP1, the phosphatase which stops signalling from the receptor, attaches to the receptor. The receptor is then switched off². However, in those with truncating mutations of the EPO receptor, the docking site for SHP1 is lost and thus the receptor is left in an 'switched-on' situation and continues to signal to produce red cells.

The first such mutation was described in an Olympic gold medal winning cross country skier. In his family there were a number of individuals with erythrocytosis. This individual was discovered to have a mutation which resulted in dominantly inherited erythrocytosis and a truncated EPO receptor³. This same mutation has arisen at least once subsequently independently⁴. At least 14 mutations have now been described in the literature resulting in a primary congenital erythrocytosis although these remain very rare events⁵.

Secondary congenital erythrocytosis

The oxygen sensing pathway

The oxygen sensing pathway in the cell comprises a number of proteins that are sensitive to oxygen tension. In states of normal oxygen tension, the hypoxia inducible factor (HIF) α protein is synthesised. HIF α , in one of the three isoforms in which it can exist, HIF-1 α , HIF-2 α or HIF-3 α , is then hydroxylated by the oxygenases prolyl hydroxylase domain (PHD)s which also exist in three isoforms PHD1, PHD2 and PHD3. The hydroxylated HIF α then associates with the von Hippel-Lindau (VHL) protein and is ubiquitinated in the proteasome and the proteins are then degraded. In conditions of reduced oxygen tension hydroxylation does not occur⁶. Protein then accumulates rather than being destroyed. HIF α levels then rise and HIF α associates with the stable HIF β , forming a heterodimer. This heterodimer then binds to a variety of promoters and enhancers of genes and leads to transcription of genes and production of a large variety of proteins. EPO is one of the proteins produced which then drives red cell production. Mutations in a number of genes in this pathway could result in abnormal proteins which are functionally defective. HIF α would not be ubiquitinated allowing HIF α accumulation and eventually in an erythrocytosis.

Von Hippel-Lindau gene mutations

A defect in the proteins in the oxygen sensing pathway was first described in the VHL protein. This was described in a large group of individuals with known erythrocytosis who resided in the Chuvash area of Russia which is in the upper Volga region⁷. The affected individuals were discovered to be homozygotes for a C598T mutation. This resulted in an Arg200Trp change in the amino acid sequence of the protein. The mutant protein was found to have abnormal function and resulted in reduced ubiquitination of HIF α . This same mutation was then discovered in a number of families with erythrocytosis who were of mainly of Asian origin⁸. A study looking at cases from all these groups suggested that they may all have arisen from a single founder 14,000 to 62,000 years ago⁹.

Another cohort homozygous for the same mutation has been seen in the Italian island of Ischia¹⁰. A few other *VHL* mutations both homozygotes and compound heterozygotes have been associated with congenital erythrocytosis. A few enigmatic individuals with erythrocytosis who are heterozygotes for a *VHL* mutation but no defect can be detected in the

other allele have been observed. These are tabled in the review by McMullin¹¹.

Homozygotes with Chuvash polycythaemia have a shortened life expectancy compared to controls because of an excess mortality from thromboembolic events¹². No increase in malignancies was seen in these patients in contrast to classical VHL disease which is associated with a different set of mutations of the *VHL* gene.

Prolyl hydroxylase domain 2 gene mutations

A family with a mutation in one of the PHD genes was the first abnormality in this gene group to be described in man¹³. Three affected family members (two siblings and a parent) had a mild erythrocytosis. They were all found to be heterozygous for a mutation in the *PHD2* gene, C950G which lead to the amino acid change Pro317Arg. This was found in the two siblings and in tissue from the deceased parent and thus had an autosomal dominant inheritance. The mutated protein was demonstrated to have a marked loss of normal function in all *in vitro* tests. Currently ten further mutations of *PHD2* have now been described. These are all listed by McMullin¹¹. Many presented in young individuals as would be expected with a congenital event. A number of serious thromboembolic events have been reported in some of these individuals.

It is of note that a patient with a *PHD2* mutation, has been reported with a recurrent paraganglioma, presenting 13 years after the erythrocytosis was first documented. Loss of heterozygosity of the wild-type *PHD2* was seen in the tumour tissue suggesting that *PHD2* can act as a tumour-suppressor gene in at least this instance¹⁴.

Hypoxia Inducible Factor2A gene mutations

Three generations of a family known to have erythrocytosis in which all affected individuals were heterozygous for a mutation of the *HIF2A* gene, G1609T, which resulted in an amino acid change, Gly537Trp has been described. Again the inheritance was autosomal dominant. The resultant mutant protein behaved abnormally *in vitro*. Differing function included less hydroxylation than controls and nondegradation as would be expected in normoxic conditions¹⁵. A further four mutations in the *HIF2A* gene have so far been described¹¹. These have been reported frequently in young individuals, often with other family members similarly affected. A number of major thromboembolic events presenting at young ages have been described in these individuals.

High oxygen affinity haemoglobins

Oxygen is released to the tissues from haemoglobin. Oxygen release to the tissues depends on the specific haemoglobin and how it binds to oxygen. The shape of the haemoglobin-oxygen dissociation curve demonstrates the capacity of an haemoglobin to deliver oxygen to the tissues. The more this curve is shifted to the left, the higher the affinity of particular haemoglobin for oxygen, and therefore the less readily oxygen is released to the tissues. A number of variant haemoglobins have been described which have higher than normal affinity for haemoglobin. Such haemoglobins give up oxygen less readily than normal to the tissues. To compensate for lack of oxygen in the tissues the homeostatic response is increased EPO production, increased red cell production, and thus erythrocytosis. Over 90 such variants have been described with defects of both α and β globin genes occurring¹⁶.

Bisphosphoglycerate mutase deficiency

Oxygen delivery to tissues is also affected by the presence of 2, 3 bisphosphoglycerate (BPG) levels. This protein binds to haemoglobin and converts the molecule to a lower oxygen affinity state. 2, 3BPG is produced from 1, 3 BPG and this reaction is catalysed by the enzyme bisphosphoglycerate mutase. A deficiency of the enzyme would result in a reduced 2, 3BPG levels and a resulting shift in the haemoglobin-oxygen dissociation curve to the left. This would result in decreased oxygen release to the tissues and a compensatory erythrocytosis. Very rare cases of deficiency of 2, 3 BPG have been described in some families. The erythrocytosis was inherited in both autosomal dominant and autosomal recessive patterns¹⁷.

Management of a congenital erythrocytosis

There is little evidence to guide the management of a congenital erythrocytosis. Sparse clinical data from the Chuvash polycythaemia cohort and individual cases with other oxygen sensing pathway defects suggest that there may be increased thromboembolic events some of a serious or life threatening may occur in those with congenital erythrocytosis.

Low dose aspirin has been shown to be of benefit in prophylaxis of thromboembolic events in polycythaemia vera¹⁸. This should be considered in congenital erythrocytosis in those without a specific contra-indication as it may be of benefit.

It is tempting to reduce the haematocrit by venesection particularly in those with very high levels. Proof of a link between reduction of the haemato-

Table 1. Causes of a congenital erythrocytosis

<i>Primary congenital erythrocytosis</i>
Erythropoietin receptor mutations
<i>Secondary erythrocytosis</i>
Defects of the oxygen sensing pathway:
<ul style="list-style-type: none"> • VHL gene mutation (Chuvash erythrocytosis) • PHD2 mutations • HIF-2α mutations
Other congenital defects:
<ul style="list-style-type: none"> • High oxygen-affinity haemoglobin • Bisphosphoglycerate mutase deficiency

crit and improvement in outcome is lacking, however it may be considered a suitable management strategy to an achievable level. A haematocrit of 0.50 may be a reasonable target. If the patient is symptomatic response can be assessed. Vigorous prophylaxis of any other risk factors for thromboembolism should be undertaken.

Management of high oxygen affinity haemoglobins

Symptoms: dizziness, dyspnoea, or angina, in those with high oxygen affinity haemoglobins, may be improved with reduction of the haematocrit and therefore this should be considered in such individuals. Venesection should be adopted in those with one or more previous thrombotic episodes. In asymptomatic individuals, in whom a family member with a high oxygen affinity haemoglobin has developed thrombotic problems, it should also be undertaken¹⁹.

Conclusion

Congenital erythrocytosis is a rare cause of an elevated haemoglobin. There is a need for data collection of treatments and events and outcomes in these patients to gain knowledge on best management and outcomes.

References

1. Johansson PL, Soodabeh S-K, Kutti J. An elevated venous haemoglobin concentration cannot be used as a surrogate marker for absolute erythrocytosis: a study of patients with polycythaemia vera and apparent polycythaemia. *Br J Haematol* 2005; 129: 701-705.
2. Walrafen P, Verdier F, Kadri Z et al. Both proteasomes and lysosomes degrade the activated erythropoietin receptor. *Blood* 2005; 105: 600-608.

3. De La Chapelle A, Traskelin A-L, Juvonen E. Truncated erythropoietin receptor causes dominantly inherited human erythrocytosis. *Proc Natl Acad. Sci.* 1993; 90: 4495-4499.
4. Percy MJ, McMullin MF, Roques AW et al. Erythrocytosis due to a mutation in the erythropoietin receptor gene. *Br J Haematol* 1998; 100: 407-410.
5. Percy MJ. Genetically heterogeneous origins of idiopathic erythrocytosis *Hematology* 2007; 12: 131-139.
6. Tanimoto K, Makino Y, Periera T, Poellinger L. Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 α by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *EMBO* 19, 4298-4309 (2000).
7. Ang SO, Chen H, Gordeuk VR, et al. Endemic polycythaemia in Russia: mutation in the VHL gene. *Blood cells Molecular Diseases* 2002; 28: 57-62.
8. Percy MJ, McMullin MF, Jowitt SN, et al. Chuvash-type congenital polycythemia in 4 families of Asian and Western European ancestry. *Blood* 2003; 102: 1097-1099.
9. Liu E, Percy MJ, Amos CI, et al. (2004) The worldwide distribution of VHL 598C>T mutation indicated a single founding event. *Blood* 2004; 103: 1937-1940.
10. Perrota S, Novili B, Ferraro M, et al. Von Hippel-Lindau-dependent polycythemia is endemic on the island of Ischia: identification of a novel cluster. *Blood* 2006; 107: 514-519.
11. McMullin MF. HIF pathway mutations and erythrocytosis. *Expert Rev.Hematol.* 2010; 3: 93-101.
12. Sergeeva A, Gordeuk VR, Tokarev YN, Sokol L, Prchal JF, Prchal JT. Congenital polycythaemia in Chuvashia *Blood* 89, 2148-2154 (1997).
13. Percy MJ, Zhao Q, Flores A, et al. A family with erythrocytosis establishes a role for prolyl hydroxylase domain protein 2 in oxygen homeostasis. *Proc Natl Acad. Sci* 2006; 103: 654-659.
14. Ladrone C, Carcenac R, Leporrier M et al. PHD2 mutation and congenital erythrocytosis and paangloima. *N Engl J Med* 2008; 359: 2685-2692.
15. Percy MJ, Furlow PW, Lucas GS, et al. A Gain-of-Function mutation in the HIF2A gene in familial erythrocytosis. *N Engl J Med* 2008; 335: 52-58.
16. Percy MJ, Butt NN, Crotty GM et al. Identification of high affinity haemoglobin variants in the investigation of patients with erythrocytosis *Haematologica* 2009; 94: 1321-1322.
17. 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: 907-915.
18. Landolfi R, Marchioli R, Kutti J, et al. Efficacy and safety of low-dose aspirin in polycythemia vera. *N Engl J Med* 2004; 350: 114-124.
19. McMullin MF, Bareford D, Campbell P, et al. Guidelines for the diagnosis, investigation and management of polycythaemia/erythrocytosis *Br. J. Haematol.* 2005; 130: 174-195.

ERITROCITOSIS ASOCIADAS A PROCESOS TUMORALES

B. ARRIZABALAGA

Hospital Universitario de Cruces. Baracaldo (Vizcaya)

Introducción

Algunos tumores malignos y no malignos han demostrado ser productores de eritropoyetina (Epo) y

conducir a una eritrocitosis en el paciente como síndrome paraneoplásico asociado. La relación causal entre eritrocitosis y tumor se basa en:

a) Confirmación de la producción de Epo por las células tumorales.

b) La corrección de la eritrocitosis con descenso de los niveles de Epo sérica cuando el tumor se extirpa.

Se consideran eritrocitosis secundarias e inapropiadas porque no se relacionan con hipoxemia y además es "inapropiado" el lugar de síntesis en las diferentes células tumorales fuera de los fibroblastos peritubulares del riñón.

Los tumores más descritos incluyen: hemangioblastoma del SNC, carcinoma renal, carcinoma hepatocelular, mioma uterino y feocromocitoma.

En el tema de la eritrocitosis asociada a tumores, el gen von Hippel-Lindau (VHL) ocupa una posición central que implica al factor inducible por hipoxia (FIH). El protagonismo del FIH en el desarrollo del tumor es un tema pendiente de definir.

Teniendo en cuenta el posible papel del gen VHL en la patogénesis de la eritrocitosis tumoral vamos a exponer los conocimientos actuales de la patología asociada a este gen antes de revisar específicamente los distintos tumores que cursan con eritrocitosis y el controvertido papel de Epo en cáncer.

Patología asociada al gen VHL

El gen VHL está situado en el brazo corto del cromosoma 3 (3p25) identificado y clonado por un equipo internacional en 1993. Su producto es la proteína VHL (213 aminoácidos) que funciona como una proteína supresora de tumores a través de sus dominios α y β .

Enfermedad de von Hippel-Lindau

(Online Mendelian Inheritance in Man. OMIM 193300). La mutación heterocigota en línea germinal del gen VHL es una condición autosómica dominante que predispone a múltiples tumores vascularizados.

La enfermedad VHL₂ es un desorden multisistémico de marcada variabilidad fenotípica con una edad media de inicio de manifestaciones clínicas a los 26 años.

En la enfermedad VHL se hereda una mutación del gen en línea germinal, y cuando se desarrolla un tumor existe en la célula tumoral una pérdida de expresión del otro gen que era normal por una nueva mutación o delección o una hipermetilación de su promotor. Se han descrito más de 500 mutaciones diferentes.

Los tumores que se observan en esta enfermedad aparecen en edad más temprana y con frecuencia son

múltiples respecto a los mismos tumores que se manifiestan esporádicos (sin enfermedad VHL). Por orden de frecuencia son:

1) Hemangioblastomas en SNC/angiomas retina (60-84%). 2) Carcinomas renales de células claras (28-66%) como primera causa de muerte. 3) Feocromocitomas (7-20%).

Menos frecuentes son los tumores del saco endolinfático del oído medio (14%), tumores/quistes pancreáticos (cistoadenomas 9%) y más aisladamente cistoadenomas papilares en el epidídimo y en el ligamento ancho.

Se clasifica en tipo I (no desarrollan feocromocitoma) y tipo II (desarrollan feocromocitoma): IIA.- Poca probabilidad de carcinoma renal. IIB.- Mucha probabilidad de carcinoma renal. IIC.- Sólo feocromocitoma.

Se considera que hasta un 20% de los pacientes con síndrome VHL son mutaciones espontáneas. En estos pacientes el diagnóstico se retarda porque no existe una historia familiar positiva. Actualmente el pronóstico de esta enfermedad ha mejorado debido a los protocolos de vigilancia desde la infancia.

En la enfermedad VHL muy ocasionalmente se puede observar eritrocitosis y siempre como una manifestación paraneoplásica del tumor y no como una manifestación propia de la enfermedad, ya que la eritrocitosis desaparece cuando el tumor se extirpa.

Eritrocitosis de Chuvash

Se trata de una infrecuente eritrocitosis congénita, autosómica recesiva, descrita por primera vez en la región de Chuvash (Rusia). Los pacientes afectados son homocigotos en línea germinal para la mutación 598 C>T del gen VHL. Esta mutación conduce a una proteína anormal R200W (arginina por triptófano), que no se puede combinar con el FIH α para que se destruya. Posteriormente se han descrito eritrocitosis similares en otras áreas geográficas con diferentes mutaciones en el gen VHL. En todas ellas la mutación queda fuera de los dominios α y β de la proteína VHL, lo que implica que no se pierde la función de molécula supresora de tumores³.

Mutación del gen VHL en diversos tumores "esporádicos" (no asociados a enfermedad VHL)

Se han observado en el 50% de los hemangioblastomas⁴ y el 50% de los carcinomas renales de células claras⁵ y más infrecuente en feocromocitomas. En la mayoría de estos tumores coincide una pérdida del otro alelo que portaba el otro gen VHL. Las mutaciones VHL son raras en otros cánceres esporádicos

como pulmón, mama, ovario, testículo que no están asociadas a la enfermedad VHL y muestran frecuentes pérdidas del alelo 3p.

Las distribución intragénica de las mutaciones somáticas del gen VHL son en general similares a las mutaciones en línea germinal, aunque más frecuentes en el exón 2.

Tumores y eritrocitosis

Se van a considerar exclusivamente aquellos tumores que tienen síntesis propia de Epo, no aquellos que también pueden cursar con eritrocitosis porque su tamaño o localización puedan inducir a isquemia en el parénquima renal adyacente o interferir en la ventilación pulmonar. Los datos recogidos en la bibliografía son los siguientes:

Hemangioblastomas

Son tumores benignos, infrecuentes y de lento crecimiento en el SNC que se desarrollan en el cerebelo, tronco cerebral o cordón espinal, siendo la localización supratentorial más rara. Se pueden presentar de forma esporádica o dentro de la enfermedad VHL. De los pacientes que presentan hemangioblastoma un 25% tienen la enfermedad VHL incluyendo angiomas en retina.

Los síntomas dependerán del tamaño y localización por la compresión local de estructuras nerviosas (ataxia, disfunción óculo-motor, dolor...), o por sangrado (hemorragia intracerebral, tetraplejia...). Un 15% presentan eritrocitosis paraneoplásica⁶.

La técnica de imagen aconsejada para su diagnóstico es la Resonancia magnética y el tratamiento de elección quirúrgico, aunque muchas veces es complejo por ser tumores altamente vascularizados, de difícil localización y ocasionalmente múltiples.

La presentación de los hemangioblastomas es diferente si son esporádicos o por enfermedad VHL, donde aparece a una edad más joven, pueden ser múltiples y además se localizan preferentemente en cordón espinal. Los hemangioblastomas esporádicos aparecen más tarde (40-50 años), son únicos y más frecuentes en el cerebelo. No hay datos que sean diferentes en la frecuencia de asociar eritrocitosis.

Se ha demostrado en pacientes con eritrocitosis la producción de Epo en las células estromales del tumor, por análisis del fluido, por inmunohistoquímica y por detección del RNA-m, aunque la expresión y síntesis de Epo por las células tumorales no siempre coincide con presencia de eritrocitosis en el enfermo⁷⁻⁹.

Cuando se demuestran cambios genéticos (inactivación bialélica del gen VHL) se encuentran siempre

en las células neoplásicas del estroma no en las células vasculares, lo que sugiere que la gran proliferación vascular podría producirse por citocinas de las células neoplásicas como Epo y VEGF (*vascular endothelial growth factor*)¹⁰.

Carcinoma renal

Una eritrocitosis paraneoplásica se observa en el 1-5% de los carcinomas renales, lo que determina que sea la más frecuente en la práctica asistencial y también es la patología tumoral donde más estudios se han publicado respecto al posible mecanismo patogénico de la relación eritrocitosis y tumor.

La incidencia de este carcinoma varía ampliamente según países, con los niveles más altos en Escandinavia y Norteamérica. La mayoría de los pacientes son asintomáticos, siendo frecuente el diagnóstico a raíz de una exploración de imagen abdominal por otros motivos. La supervivencia ha mejorado en relación con el diagnóstico y tratamiento quirúrgico temprano.

Existen 5 subtipos histológicos, siendo el de células claras el más frecuente (75-80%).

El análisis molecular de carcinoma renal de células claras a menudo revela pérdidas cromosómicas de 3p14 a 3p26 y recordando que en el síndrome de VHL el defecto está en el área 3 p25 a p 26, estos datos sugieren una anomalía genética común en la patogénesis de ambos desórdenes.

La eritrocitosis ocurre en el 1-5% de los carcinomas, aunque se observa con mayor frecuencia una elevación de Epo sérica sin asociarse a incremento de hematocrito¹¹. Se ha confirmado la síntesis de Epo en las células tumorales renales por hibridación *in situ*¹² por cultivos celulares¹³ e incluso por confirmación del aumento del Htco y de la concentración de Epo en ratones en los que se trasplantó el carcinoma renal¹⁴.

El trabajo más amplio¹⁵ recoge el estudio de 70 carcinomas renales donde se demuestra un incremento de expresión del FIH en el 70% de las células tumorales que sólo coincide en un 34% con aumento de RNA-m de Epo, aunque sólo 1 paciente presentaba eritrocitosis. La cadena de acontecimientos comenzando con una alteración bialélica del gen VHL implicaría una expresión de los múltiples genes que el FIH transcribe como VEG, GLUT 1, CA9, que están siempre sobreexpresados en la mayoría de los carcinomas renales, en contraste con el gen Epo, que tiene una restricción a células específicas. Una posible hipótesis sería que sólo mutaciones determinadas del gen VHL podrían producir, además de la activación FIH, una desrepresión de gen Epo en la célula carcinomatosa proveniente del epitelio renal que normalmente no expresa gen Epo.

Muchos autores sugieren que al tener el tumor receptores para muchas de estas citocinas (por ejemplo, R-Epo, R-VEGF) esta estimulación autocrina podría suponer un beneficio en la proliferación del tumor.

En otras patologías renales se han descrito eritrocitosis asociada como en hidronefrosis, poliquistosis, T. Wilms o nefroblastoma pero en ellos no se habla de producción propia de Epo, por lo que queda la duda de que la causa sea la isquemia renal del tejido adyacente.

Hepatocarcinoma

Es un tumor primario maligno de hígado que normalmente se desarrolla sobre una hepatopatía crónica particularmente de origen vírico. Frecuentemente se diagnostica tarde por la ausencia de síntomas patognomónicos y por la gran reserva funcional del hígado. Su asociación con eritrocitosis fue descrita por primera vez en 1958 por Mc Fadzean y después de la hipercolesterolemia y la hipoglucemia es el síndrome paraneoplásico más común en este tumor¹⁶.

En trabajos^{17,18} con amplio número de pacientes, se observa una incidencia de eritrocitosis del 2,5-6%, aunque la frecuencia de Epo sérica alta llega al 23%. Se discute en estos casos si la proteína Epo puede no ser biológicamente activa o bien coincidir con otras causas de anemia relacionada con el hepatocarcinoma.

Los pacientes que cursan con eritrocitosis presentan un tumor de gran tamaño (valor medio 50% del volumen hepático) que en general afecta a ambos lóbulos hepáticos. Además las cifras séricas de Epo y alfafetoproteína son significativamente más altas.

Se ha demostrado por inmunohistoquímica y por presencia de m-RNA de Epo la síntesis de Epo por el tejido tumoral^{19,20}.

No hay datos que expliquen la patogénesis de la eritrocitosis en este tumor. Es posible que algún mecanismo biológico se encargue de desregular la expresión específica del gen Epo bloqueado al finalizar del periodo fetal.

De forma muy esporádica se ha descrito eritrocitosis por producción demostrada de Epo por inmunohistoquímica en otros tipos de patología hepática como hiperplasia nodular focal, adenoma, hemanangioma y angiosarcoma.

Mioma uterino

La eritrocitosis asociada a mioma se conoce como MES (*myomatous erythrocytosis syndrome*). Responde a miomas de gran tamaño y en un principio se implicaron varias posibilidades patogénicas: 1.º Un gran volumen de tumor abdominal que lograba disminuir la ventilación

pulmonar con la hipoxia consecuente. 2.º Un gran volumen de tumor que ejercía cierta compresión e isquemia renal. 3.º Presencia de shunts arteriovenosos dentro del tumor. 4.º Producción propia de Epo²¹. La frecuencia de MES se estima muy baja teniendo en cuenta que aproximadamente un 30% de las mujeres en edad reproductiva tienen un mioma, aunque probablemente esté muy falseada por la metrorragia habitual.

Posteriormente²² se comprobó repetidamente por inmunohistoquímica y por expresión de RNA-m de Epo la producción propia por las células miomatosas e incluso con evidencia directa por la tasa sérica elevada de Epo en la vena uterina respecto a la arteria²³. La producción de Epo en un amplio porcentaje de miomas no coincide con la presencia de eritrocitosis en el enfermo.

La presencia de receptores para Epo en las propias células del mioma ha hecho especular, teniendo en cuenta su capacidad mitogénica y de inhibición de la apoptosis, su relación con los grandes tamaños de los miomas con eritrocitosis²⁴.

El mioma es un tumor benigno, pero el 40-50% tiene anomalías cromosómicas (no relacionadas con el gen VHL); por ejemplo, la delección 7q (q22-q32) es bastante específica y ocurre en el 17% de los miomas²⁵ y no podemos olvidar que el gen que codifica la Epo está en 7q22. Para aclarar la patogénesis de la eritrocitosis se necesitan más estudios para valorar si el incremento de Epo se produce por una desregulación local fortuita o por una aberración citogenética que implica a 7q22.

Se han descrito eritrocitosis asociadas a leiomiomas cutáneos múltiples.

Feocromocitoma

Los feocromocitomas/paragangliomas son tumores de células cromafines que se manifiestan en un 40-60% de los casos por liberación episódica de catecolaminas. Los paragangliomas proceden de los cuerpos paragangliómicos del SN autónomo (c. carotideo, globo yugular, globo timpánico...); cuando procede de la médula suprarrenal se denomina feocromocitoma.

La incidencia según diversos estudios alcanza a menos de un 0,2% de los pacientes con hipertensión arterial. Un 25% de los feocromocitomas son hereditarios asociados a mutaciones en línea germinal de diferentes genes localizados en diferentes cromosomas: protooncogén RET (Cr 10), Gen VHL (Cr3), succinato dehidrogenasa (Cr 11.SDHB, SDHD), neurofibromatosis de tipo 1 (Cr17).

En un estudio²⁶ de 271 feocromocitomas esporádicos (sin historia familiar) del Registro Alemán, donde se testaron los 4 genes, se identificó una mutación en 66 pacientes (24%): 30 VHL, 13 RET, 12 SDHB, 11 SDHD.

Los episodios sintomáticos se caracterizan por HTA, cefalea, sudoración y palpitaciones, pero pueden cursar de forma silente en un 40-50% de los casos. Para su diagnóstico la determinación de catecolaminas y sus metabolitos tiene su limitación, resultando más sensible la determinación de metanefrina y normetanefrina.

La localización del tumor (adrenal y extraadrenal) se realiza mediante pruebas de imagen como TAC y/o R. magnética.

Se ha descrito de forma infrecuente (1/131 feocromocitomas) eritrocitosis asociada y se ha probado la producción de Epo por inmunohistoquímica en el propio tumor²⁷.

Otros tumores

Se han publicado de forma mucho más esporádica eritrocitosis con síntesis de Epo en meningiomas, carcinoma gástrico y adenoma metanéfrico.

Eritropoyetina en cáncer

A raíz de los resultados de Ensayos Clínicos que reflejaban una peor supervivencia en pacientes con cáncer de mama y cabeza-cuello tratados con Epo-rh, el papel de la biología de Epo y su interacción con receptores de Epo (Epo-R) en las células tumorales es un tema de investigación actual. Los datos recogidos en la bibliografía aportan^{28,29}:

a) Existen numerosas líneas celulares malignas (pulmón, próstata...) con expresión de RNA-Epo local y presencia de mRNA-Epo-R, donde nunca se han descrito eritrocitosis. Es cuestionable si ese mRNA implica verdadera proteína Epo-R sobre la superficie celular y su funcionalidad como receptor.

b) Epo es una citocina pleiotrópica con efectos biológicos diversos (angiogénesis, proliferación...) sobre otras células que los eritroblastos.

c) Se han descrito variantes de Epo que retienen funciones protectoras sobre tejidos no hematológicos (cerebro, corazón) y no estimulan la eritropoyesis como la asialo-Epo y Epo-carbamida.

d) La presencia de producción local en el tumor de Epo y una estimulación autocrina-paracrina con la presencia de Epo-R en las células tumorales está en estudio.

Conclusiones

1. Tumores concretos, en muy baja frecuencia cursan con eritrocitosis. La síntesis de Epo por las células tumorales es condición necesaria pero no suficiente.

Se desconoce el mecanismo patogénico pero mutaciones específicas en el gen VHL podrían estar implicadas en algunos tumores.

2. Eritrocitosis como síndrome paraneoplásico puede ser el dato de presentación en un paciente asintomático. Aunque no exista historia familiar, se debe valorar la enfermedad de von Hippel-Lindau.

3. La baja frecuencia de eritrocitosis puede estar artefactada por la coexistencia de diversas causas de anemia tumoral.

Bibliografía

- Kim WY, Kaelin WG. Role of VHL gene mutation in human cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 4991-5004.
- Lonser RR, Glenn GM, Walter M, et al. Von Hippel-Lindau disease. *Lancet* 2003; 361: 2059-2067.
- Gordeuk VR, Sergueeva AI, Miasnikova GY et al. Congenital disorder of oxygen sensing: association of the homozygous Chuvash polycythemia VHL mutation with thrombosis and vascular abnormalities but not tumors. *Blood* 2004; 103: 3924-3932.
- Lee JY, Dong SM, Park WS et al. Loss of heterozygosity and somatic mutations of the VHL tumor suppressor gene in sporadic cerebellar hemangioblastomas. *Cancer Res* 1998; 58(3): 504-508.
- Foster K, Prowse A, Van den Berg A et al. Somatic mutations of the Von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene in non-familial clear cell renal carcinoma. *Hum Mol Gen* 1994; 3: 2169-2173.
- Kuhne M, Sidler D, Hofner S et al. Challenging manifestations of malignancies. Case 1. Polycythemia and high serum erythropoietin level as a result of hemangioblastoma. *J Clin Oncol* 2004; 22: 3639-3640.
- Trimble M, Caro J, Talalla A et al. Secondary erythrocytosis due to a cerebellar hemangioblastoma: demonstration of erythropoietin mRNA in the tumor. *Blood* 1991; 78 (3): 599-601.
- Horton JC, Harsh GR, Fisher JW et al. Von Hippel-Lindau disease and erythrocytosis: radioimmunoassay of erythropoietin in cyst fluid from a brainstem hemangioblastoma. *Neurology* 1991; 41(5): 753-754.
- Tachibana O, Yamashita T, Yamashita J. Immunohistochemical study of erythropoietin in cerebellar hemangioblastomas associated with secondary polycythemia. *Neurosurgery* 1991; 28(1): 24-26.
- Krieg M, Marti HH, Plate KH. Coexpression of erythropoietin and vascular endothelial growth factor in nervous system tumors associated with von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss of function. *Blood* 1998; 92(9): 3388-3393.
- Ljungberg B, Rasmuson T, Grankvist K. Erythropoietin in renal cell carcinoma: evaluation of its usefulness as a tumor marker. *Eur Urol* 1992; 21: 160-163.
- De Silva JL, Lacombe C, Bruneval P et al. Tumor cells are the site of erythropoietin synthesis in human renal cancers associated with polycythemia. *Blood* 1990; 75(3): 577-582.
- Hagiwara M, Chen IL, Mc Gonigle R. Erythropoietin production in a primary culture of human renal carcinoma cells maintained in nude mice. *Blood* 1984; 63: 828-835.
- Shiramizu M, Katsuoka Y, Grodber J et al. Constitutive secretion of Erythropoietin by Human Renal adenocarcinoma Cells in Vivo and in Vitro. *Experimental Cell Research* 1994; 215: 249-256.
- Wiesener MS, Munchenhagen P, Glaser M et al. Erythropoietin gene expression in renal carcinoma is considerably mo-

- re frequent than paraneoplastic polycythemia. *Int J Cancer* 2007; 121: 2434-2442.
16. Luo JC, Hwang SJ, Wu JC et al. Paraneoplastic syndromes in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1999; 86: 799-804.
 17. Hwang SJ, Lee SD, Wu JC et al. Clinical evaluation of erythrocytosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 1994; 53(5): 262-269.
 18. Kew MC, Fisher JW. Serum erythropoietin concentrations in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1986; 58(11): 2485-2488.
 19. Muta H, Funakoshi A, Baba T et al. Gene expression of Erythropoietin in Hepatocellular Carcinoma. *Internal Medicine* 1994; 33: 427-431.
 20. Sakisaka S, Watanabe M, Tateishi H et al. Erythropoietin production in hepatocellular carcinoma cells associated with polycythemia: immunohistochemical evidence. *Hepatology* 1993; 18(6): 1357-1362.
 21. LevGur M, Levie MD.- The myomatous erythrocytosis syndrome: a review. *Obstet Gynecol* 1995; 86(6): 1026-1030.
 22. Suzuki M, Takamizaya S, Nomaguchi K et al. Erythropoietin synthesis by tumour tissues in a patient with uterine myoma and erythrocytosis. *British Journal of Haematology* 2001; 113: 49-51.
 23. Vlasveld LT, De Wit CWM, Verweij RA et al. Myomatous erythrocytosis syndrome: further proof for the pathogenic role of erythropoietin. *Neth J Med* 2008; 66(7): 283-285.
 24. Pollio F, Staibano S, Mansueto G et al. Erythropoietin and erythropoietin receptor system in a large uterine myoma of a patient with myomatous erythrocytosis syndrome: possible relationship with the pathogenesis of unusual tumor size. *Hum Pathol* 2005; 36(1): 120-127.
 25. Xing YP, Powell WL, Morton CC. The del(7q) subgroup in uterine leiomyomata: genetic and biologic characteristics. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 98: 69-74.
 26. Neumann HP, Bausch B, McWhinney SR et al. Germ-line mutations in nonsyndromic pheochromocytoma. *N Engl J Med* 2002; 346: 1459-1466.
 27. Drenou B, Le Tulzo Y, Caulet-Maugendre S et al. Pheochromocytoma and secondary erythrocytosis: role of tumour erythropoietin secretion. *Nouv Rev Fr Hematol* 1995; 37(3): 197-199.
 28. Hardee ME, Arcasoy MO, Blackwell KL et al. Erythropoietin Biology in Cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12(2): 332-339.
 29. Fandrey J, Dicato M- Examining the involvement of Erythropoiesis-Stimulating Agents in Tumor Proliferation (Erythropoietin Receptors, Receptor Binding, Signal Transduction), Angiogenesis, and Venous Thromboembolic Events. *The Oncologist* 2009; 14(suppl 1): 34-42.

ERITROCITOSIS PRIMARIAS Y SECUNDARIAS DE CAUSA "DESCONOCIDA"

L. HERNÁNDEZ NIETO, J.M.^a RAYA SÁNCHEZ

*Hospital Universitario de Canarias.
La Laguna (Santa Cruz de Tenerife)*

Introducción y motivos

El proceso diagnóstico de las eritrocitosis es uno de los más estimulantes en medicina. En nuestra opinión no es difícil, puesto que los mecanismos reguladores

de la eritropoyesis, cuyo fallo conduce a eritrocitosis, se concretan principalmente en un fenómeno de retroalimentación negativa en el que la cantidad de eritrocitos en la sangre está finamente condicionada por las necesidades derivadas de la oxigenación celular. Sin embargo, es un hecho sentido por muchos que en la práctica clínica no siempre resulta sencillo llegar a conocer la causa real o el mecanismo patogénico de la eritrocitosis. En nuestra experiencia, es posible que aproximadamente un 40% de los pacientes con eritrocitosis que vemos en nuestras consultas permanezcan sin diagnóstico etiológico o patogénico; para tal situación acuñamos hace algunos años el incómodo término de eritrocitosis de causa "desconocida" (ECD). El entrecomillado quiere decir que la causa es desconocida para el médico concreto, pero no siempre para la comunidad científica. Creemos que el motivo principal es que un buen número de casos están relacionados con mutaciones de genes congénitas o adquiridas, de detección no asequible a todos los laboratorios; por otra parte, el hecho de que muchas de estas eritrocitosis sólo tengan un tratamiento sintomático (flebotomía), y el consejo genético, podría frenar el impulso diagnóstico de los hematólogos. Creemos que un conocimiento mejor de las distintas formas de eritrocitosis, sus causas y mecanismos –objetivo de este simposio– puede contribuir al logro de más diagnósticos y lo mismo el interés cooperativo entre especialistas, mediante la disponibilidad de centros diagnósticos de referencia. El objetivo final sería que el número de eritrocitosis de causa "desconocida" fuera disminuyendo, y limitándose a las verdaderas eritrocitosis idiopáticas, es decir, a aquellas para las que el conocimiento científico actual no ha logrado identificar su etiología y/o patogenia.

Definiciones

a) **Pseudoeritrocitosis o eritrocitosis relativa:** se da en tres situaciones: 1. El sujeto tiene cifras elevadas de hemoglobina o hematocrito, suficientes para sospechar eritrocitosis, pero la masa eritrocitaria es normal y el volumen plasmático está disminuido (hemoconcentración o deshidratación). 2. La masa eritrocitaria está aumentada sin alcanzar más del 125% de la correspondiente a un sujeto de la misma edad, sexo y superficie corporal (que define la eritrocitosis), con un volumen plasmático algo descendido (síndrome de Gaisböck). 3. Microcitosis intensa, como en la beta-talasemia menor, en la que la cifra de hematíes es muy elevada, pero al ser éstos muy pequeños no se incrementa la masa eritrocitaria (Figura 1).

b) **Eritrocitosis (eritrocitosis absoluta):** se entiende por tal la existencia de una masa eritrocitaria > 125% de la correspondiente a un sujeto del mismo sexo,

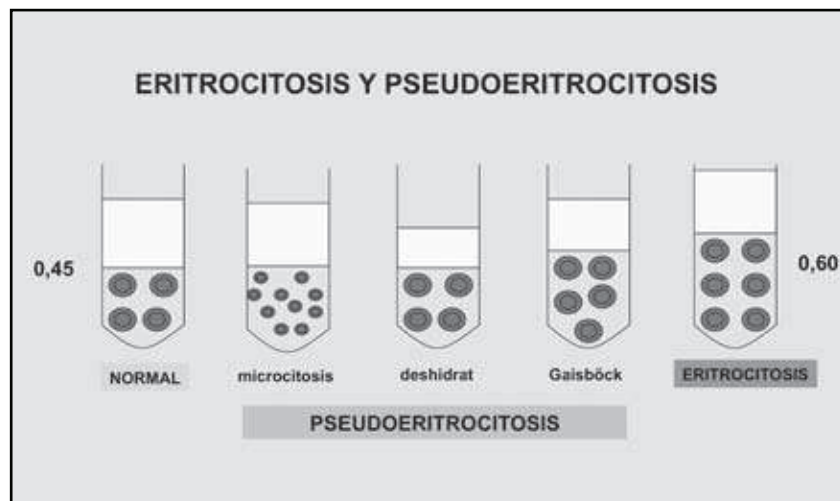


Figura 1. Esquema que intenta explicar los conceptos de eritrocitosis absoluta y pseudoeritrocitosis, y las principales formas de éstas.

edad y superficie corporal, o bien cuando la cifra de hemoglobina es $> 16,5$ g/dL en la mujer o $> 18,5$ g/dL en el hombre¹⁻⁴.

c) **Eritrocitosis primarias:** eritrocitosis debidas a una mutación hereditaria o adquirida en los progenitores hematopoyéticos habitualmente con ganancia de función que se traduce en proliferación eritroide excesiva sin el concurso de factores estimulantes externos como la eritropoyetina (EPO), andrógenos, corticosteroides u otros¹.

d) **Eritrocitosis secundarias:** eritrocitosis debidas a un estímulo de la proliferación eritroide por factores externos a los propios progenitores hematopoyéticos (EPO), andrógenos, corticosteroides u otros.

e) **Eritrocitosis idiopáticas (EI):** eritrocitosis que no responden a los mecanismos patogénicos o causas implicadas en las eritrocitosis primarias o secundarias. El calificativo de idiopática para una eritrocitosis debe utilizarse de forma restringida y reservarse para aquellos casos en los que actualmente no se conocen dichos mecanismos o causas; su número debe descender a medida que avanzan nuestros conocimientos⁵.

f) **Eritrocitosis de causa “desconocida” (ECD):** en nuestra opinión⁶, puede aplicarse esta calificación (respetando el entrecomillado) para aquellos casos en los que no se ha dado con el mecanismo patogénico o la causa determinante, sin que estemos seguros de haber aplicado aún toda la metodología disponible para tal fin. Señala Cazzola⁷, en un espléndido editorial en *Haematologica*, que “enfermedad idiopática significa una enfermedad por sí misma, es decir, el adjetivo define la falta de conocimiento de los médicos”. En este sentido, está justificado diferenciar entre eritrocitosis idiopáticas y de causa “desconocida”. Esta última calificación acepta que en estos casos no estamos seguros de haber hecho un trabajo diagnóstico completo.

Principales eritrocitosis primarias y secundarias, susceptibles de aparecer como ECD

En nuestra opinión, las principales formas de eritrocitosis de difícil diagnóstico (otra forma de llamar *a priori* y provisionalmente a las de causa “desconocida”) son las siguientes:

a) Entre las primarias: sólo excluimos la policitemia vera (PV), habitualmente fácil de diagnosticar por los hechos clínicos, hematológicos y moleculares característicos y por los criterios diagnósticos actuales (OMS 2008). Por tanto, proponemos la inclusión de las

eritrocitosis primarias siguientes:

- Eritrocitosis primaria por mutación de JAK2 en el exón 14 (V617F).

- Eritrocitosis primaria por mutaciones de JAK2 en el exón 12.

- Eritrocitosis primaria familiar y congénita por mutaciones en el receptor de eritropoyetina (R-EPO).

b) Entre las secundarias, incluiríamos:

- Eritrocitosis por síndromes de hipoxia/hipoventilación relacionados con el sueño.

- Eritrocitosis por hemoglobinas con alta afinidad por el O₂ o por déficit de 2-3BFGM.

- Eritrocitosis por mutaciones en el sensor de O₂.

Analizaremos a continuación estas entidades:

Eritrocitosis aislada primaria por mutaciones de JAK2 en el exón 14 (V617F)

La eritrocitosis aislada no suele asociarse a esta mutación. Rossi *et al.* en 2007 no encontraron ninguna entre 11 casos estudiados⁸. Percy⁹ *et al.* encontraron un 1,6% (1 de 63, que, observada durante 9 años, no cambió a PV). Esta última autora sugiere, sin embargo, que se continúe haciendo el cribado para V617F en las eritrocitosis de causa desconocida para detectar casos de posible PV, aunque es muy raro que una de estas eritrocitosis asociadas a mutación de JAK2 en el exón 14 pueda evolucionar a PV.

Eritrocitosis primaria asociada a mutaciones de JAK2 en el exón 12

Se han descrito varias mutaciones con ganancia de función en el exón 12 de JAK2 tanto en raros ca-

Tabla 1. Principales eritrocitosis primarias y secundarias susceptibles de aparecer como ECD

Primarias:
· Mutación de JAK2 en el exón 14
· Mutaciones de JAK2 en el exón 12
· Mutaciones en el receptor de EPO (R-EPO)
Secundarias:
· A síndromes de hipoxia/hipoventilación nocturna
· A hemoglobinas con alta afinidad por el O ₂
· Por mutaciones en la vía del sensor de O ₂

sos de PV como en EI. Scoot *et al.*¹⁰ detectan 4 mutaciones diferentes en 10 casos de PV negativos para JAK2V617F (F537-K539 delinsL, H538QK539L, K539L y N542-E543del). Los pacientes presentaban fenotipo de eritrocitosis con EPO baja y colonias eritroides endógenas y BMO con sólo proliferación eritroide, no panmielosis como en PV, y megacariocitos indemnes; 5 de los 10 pacientes presentaban esplenomegalia (32 clínica, y 3 ecográfica). Percy *et al.*¹¹ encontraron esta mutación en el 27% de sus pacientes con eritrocitosis aislada y EPO sérica baja. Algunos de los pacientes de este último estudio mostraron moderada atipia de megacariocitos.

En un estudio reciente de Pietra *et al.*¹², algún paciente con PV y mutación en el exón 12 debutó con sólo eritrocitosis.

Entre nosotros, Martínez Avilés *et al.*¹³ encontraron mutación de JAK2 exón 12 en 4 de 20 PV y EI V617F negativas. Esta situación ha sido propuesta como una nueva enfermedad mieloproliferativa. Relacionado con el hecho de que en estos casos la expresión no suele ser pancitósica, estas mutaciones se detectan mejor en precursores eritroides de médula ósea o en células procedentes de colonias *in vitro* que de SP. En la experiencia de Scoot¹⁰, estas mutaciones otorgan mayor independencia del ligando que la V617F, con mayores niveles de fosforilización.

Schnittger *et al.*¹⁴ estudian 409 pacientes con PV o eritrocitosis de difícil diagnóstico: 15,9% en PV y 1,4% en EI. La homocigosidad fue menos frecuente que con V617F, hubo más mujeres que hombres, y la edad fue menor que en los portadores de V617F.

Eritrocitosis por hemoglobinas con alta afinidad por el O₂ (HAAO₂) y déficit de 2,3-bisfosfogliceromutasa (BFGM)

La existencia de una hemoglobina mutante con alta afinidad por el oxígeno es sugerida por la desviación a la izquierda de la curva de disociación y disminución de la P₅₀O₂ (en las abscisas de la curva, presión parcial de oxígeno, en la que la hemoglobina está saturada al 50%). Ello implica una peor liberación del

O₂ a las células (al contrario que en las situaciones fisiopatológicas de acidosis o alta temperatura), con la consiguiente compensación a través de eritrocitosis. Una P₅₀O₂ baja puede indicar tanto una HAAO₂ como un déficit de 2-3 BFGM^{15,16}.

Existen más de 100 variantes de HAAO₂ que superan eritrocitosis familiar. La EPO sérica puede estar alta o “inapropiadamente normal” en relación con los niveles de hematocrito. Esta “inapropiada normalidad” se debería a la supresión eficaz mediante el *feedback* negativo de la EPO por la eritrocitosis. Pueden estar afectados tanto los genes de globina alfa como beta. En el proceso diagnóstico, debemos pensar en HAAO₂ ante eritrocitosis con EPO alta o normal y de carácter familiar. Es en este grupo de pacientes en los que se debe medir la P₅₀O₂. Tras la constatación por oximetría de que ésta es baja, la electroforesis de hemoglobinas y el isoelectroenfoque en poliácridamida pueden detectar un buen número de variantes de alta afinidad, pero otras requerirán secuenciación de los genes de globina para su exacto diagnóstico¹⁷.

Si ante una P₅₀O₂ baja, y mediante las técnicas adecuadas no se detecta una variante hemoglobínica anormal, ha de buscarse un déficit de 2-3 BFGM. La herencia mendeliana es autosómica dominante en el caso de las hemoglobinas anormales, y autosómica recesiva en el déficit de esta enzima^{15,17}.

Eritrocitosis pura familiar y congénita, asociada a mutación del R-EPO

Se conoce también como eritrocitosis familiar benigna (EFB).

Son formas de eritrocitosis familiar y congénitas raras, pero más frecuentes que las debidas a hemoglobinas con alta afinidad o déficit de 2-3 BFGM¹⁵. Las debidas a mutaciones en el receptor de EPO (R-EPO) constituyen sólo un limitado número de casos dentro de este tipo hereditario de eritrocitosis (sólo 9 en un grupo no relacionado de 53 sujetos). También pueden existir casos esporádicos.

Dichas mutaciones se sitúan en el exón 8 del gen R-EPO y resultan en un truncamiento de 59 a 84 aminoácidos. Tal truncamiento ocasiona la pérdida del dominio de regulación negativa C terminal del receptor. Así ocasiona una ganancia de función, con activación de la señal proliferativa independiente de la Epo, de forma similar a las mutaciones de JAK2.

Por tanto, cursan con niveles bajos de EPO e hipersensibilidad de los progenitores eritropoyéticos a EPO¹⁸⁻²⁰. En su proceso diagnóstico debería descartarse la existencia de una hemoglobina de alta afinidad o déficit de 2-3 difosfogliceromutasa.

Se ha podido generar un modelo murino de eritrocitosis congénita reemplazando el R-EPO murino ori-

ginal por un gen R-EPO mutante humano descrito en una familia con EPFC ²¹.

Recientemente se ha conocido el papel de las mutaciones en el R-EPO en la internalización por endocitosis del receptor, cuyo fallo contribuye a la prolongada señalización desde estos receptores truncados. La endocitosis de receptores es un mecanismo fundamental por el que las células controlan la magnitud y duración de la señalización inducida por ligandos extracelulares. En el caso del R-EPO el proceso también controla la sensibilidad a la EPO y las concentraciones de EPO circulante. En parte, esto es debido a la pérdida en dicho truncamiento de importantes fosfotirosinas que contribuyen a dicha internalización²².

La eritrocitosis asociada a síndromes de hipoxia/hipoventilación relacionados con el sueño

Es una de las formas de eritrocitosis por hipoxia sistémica cuya etiología puede fácilmente pasar desapercibida. Por diversas causas, en condiciones basales diurnas, la SaO₂ es normal, pero las más o menos frecuentes desaturaciones nocturnas, estimulan el sensor de O₂, lo que origina picos de EPO capaces de desencadenar eritrocitosis. Por tanto, ante eritrocitosis de causa inaparente, es uno de los diagnósticos a descartar. En su variedad de apnea obstructiva del sueño, por lo general este síndrome se da en sujetos de hábito mesomórfico o pícnicos, que, en caso de síndrome metabólico asociado, pueden presentar un componente adicional de pseudoeritrocitosis. En el interrogatorio se tendrá en cuenta la noción de profundos ronquidos nocturnos (la pareja suele ser de ayuda en esta pregunta), así como sueño intranquilo y somnolencia diurna inadecuada. El estudio polisomnográfico revelará este síndrome, que debe ser tratado con adelgazamiento en caso de obesidad y presión positiva en vías aéreas (PAP) nocturna en sus distintas variantes. Por desgracia, en algunos centros de nuestro entorno existen largas listas de espera para este estudio, lo que dilata el diagnóstico a veces exageradamente. Otras entidades con hipoventilación como el síndrome de Picwick o la hiperventilación primaria pueden comportarse de forma similar^{23,24}.

Eritrocitosis por mutaciones en el sensor de O₂

La estimulación por la hipoxia del sensor de oxígeno resulta en un aumento de la producción del factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1),

el mayor agente estimulante responsable de la activación transcripcional del gen de EPO. El gen y la proteína HIF-1α son inducidos por la hipoxia, y sus niveles descienden rápidamente en normoxia. La proteína no sólo estimula la producción de EPO sino también de otras moléculas que facilitan la eritropoyesis y perfusión tisular adecuada, como el factor de crecimiento de endotelios y vasos (VEGF), el transportador de glucosa y enzimas glicolíticas. HIF-1α es rápidamente destruido mediante ubiquitinización a través del gen supresor de tumores von Hippel Lindau (VHL) unido a ligasa E3. En el proceso de degradación del HIF-1 también interviene la prolinhidroxilasa dominio 2 proteína (PHD2)¹⁵.

a) Mutaciones en el gen VHL. Eritrocitosis de Chuvashia.

A diferencia de las eritrocitosis familiares primarias, que suelen ser esporádicas, esta eritrocitosis familiar y secundaria (con EPO alta o inapropiadamente normal para el alto hematocrito) es endémica. Fue descubierta por primera vez en esta región autónoma de Rusia central. Se conocen 183 casos de 81 familias con carácter autosómico recesivo. La mutación responsable afecta al gen VHL en el cromosoma 3p, en ambos alelos en el caso de los paciente y sólo en uno en los portadores. En la actualidad se ha descrito de forma esporádica en diversas partes del mundo, incluida la isla de Ischia al sur de Italia, por lo que no debe descartarse

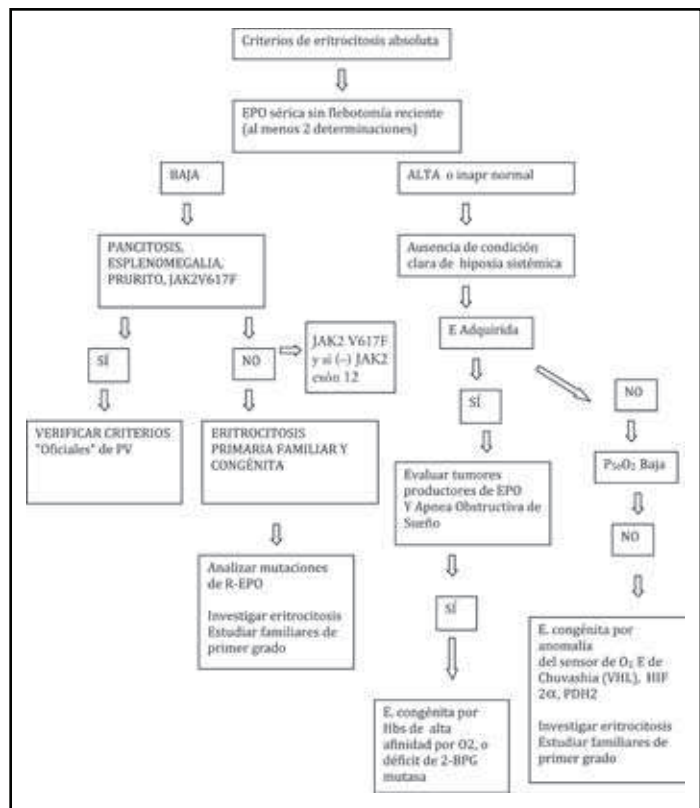


Figura 2. Algoritmo orientativo ante una eritrocitosis de "causa desconocida". Fuente: modificado de J.T. Prchal¹⁵.

a priori en cualquier área geográfica. La eritrocitosis de Chuvashia origina fenómenos trombóticos y hemorrágicos con mortalidad precoz (antes de los 40 años) y suele presentarse con ectasias venosas en las piernas. La mutación regula a la alta principalmente la proteína HIF-2 α . Se han desarrollado modelos animales en ratones utilizando la mutación²⁵⁻²⁷.

b) Mutaciones en el gen HIF-2 α

Se han descrito eritrocitosis hereditarias autosómicas dominantes por mutaciones del gen HIF-2 α con ganancia de función, lo que hace a la proteína HIF-2 α menos susceptible de hidroxilarse por la PHD2²⁸. Como la anterior, cursan con EPO alta como si el estímulo hipóxico no cesara.

c) Mutaciones en el gen PHD2

Se ha descrito una familia con eritrocitosis autosómica dominante por una mutación en una de las prolina hidroxilasas (prolina hidroxilasa dominio proteína 2 (PHD2), implicada en la degradación de HIF-1 α en estado normóxico²⁹. Existen observaciones en animales que relacionan la inhibición o inactivación de PHD2 con eritrocitosis.

Propuesta de un algoritmo diagnóstico de las eritrocitosis conducente a la minimización del diagnóstico provisional ECD

Antes de asegurar la eritrocitosis absoluta, habremos valorado cuidadosamente el hemograma, y en

su caso habremos o no detectado pancitosis, o al menos bicitosis, lo que nos habría puesto en la pista de una PV. Si, por el contrario, la eritrocitosis es aislada, es el momento de iniciar el proceso diagnóstico de las más frecuentes y tributarias de las exploraciones generalmente asequibles (determinación de EPO, oximetría, Rx de tórax, ecografía abdominal, estudio ginecológico). Si ello no nos muestra la causa o la naturaleza del proceso, debe implementarse el proceso con pruebas menos habituales, dirigidas a demostrar: a) causas conocidas y poco comunes de las formas secundarias, y b) en su caso, las claves patogénicas de las primarias (ambos procesos pueden ser hasta cierto punto simultáneos). El algoritmo de la Figura 2 (imperfecto, como la mayoría de los algoritmos) puede ser una guía útil en esta difícil situación, que sin duda en muchos casos sólo se resolverá con la colaboración de laboratorios de referencia.

Experiencia del Registro Español de Eritrocitosis de causa "desconocida" (REECD)

En 2003, se puso en marcha en el Grupo Español de Eritropatología de la SEHH un Registro nacional (REECD) con los siguientes objetivos: 1) conocer la frecuencia de las ECD, sus manifestaciones, gravedad y requerimientos terapéuticos, y 2) valorar la evolución de los pacientes en relación con un posible hallazgo ulterior de la causa o transformación a PV u otra EMPC.

Tabla 2. Registro Español de Eritrocitosis de Causa "Desconocida" (REECD) 2005. Tabla descriptiva de 40 pacientes

Número de centros	11
Número de pacientes	40 (31 V; 9 M)
Edad al diagnóstico:	43,8 años
· No familiares	50 (10-77) P < 0,01
· Familiares	17 (5-51)
Tiempo de observación	100 meses (8-343)
Síntomas al diagnóstico:	
· Cefalalgia	16
· Acúfenos	5
· Vértigo	4
· Parestesias	4
· Prurito	4
Episodios trombóticos:	8 (20%)
· IAM	3
· Angor	2
· T vena esplénica	1
· Tromboflebitis MI	1
· T arteria oftálmica	1
Otros FR cardiovasculares	Con trombosis: 5/6 Sin trombosis: 19/34 P < 0,01

Tabla 3. Registro Español de Eritrocitosis de Causa Desconocida. Características generales de 40 casos (2005)

· La mayor parte de los casos fueron esporádicos (dos familias)
· No hubo diferencias entre las cifras de serie roja entre V y H, ni entre pacientes sintomáticos y asintomáticos
· Discreto predominio de casos sintomáticos sin diferencia V/H
· Se registró algún accidente trombótico (AT) en el 20%
· La edad y las cifras de serie roja no fueron diferentes entre los que presentaron AT y los que no
· Los pacientes con AT tuvieron otros FRCV convencionales con más frecuencia que los que no los presentaron
· Se dispuso de seguimiento a los 12 meses en el 70% de los casos. En dicho periodo no se demostró el origen etiopatogénico ni hubo transformación a PV
· El grupo debería implementar un estudio prospectivo, con intención de profundizar en la naturaleza, etiología y etiopatogenia que conduzca a la identificación etiológica o patogénica de al menos algunos de estos casos

Se recogieron 40 casos procedentes de 11 centros. Las Tablas 2 y 3 muestran los principales datos y características generales descriptivos de este grupo de pacientes. 8 de 20 pacientes sufrieron eventos trombóticos; la edad y las cifras de Hb no fueron diferentes en ambos grupos, con y sin trombosis. 5 de 6 pacientes con trombosis presentaban uno o más factores de riesgo cardiovascular, mientras que no los presentaron 19 de 34 sin trombosis ($p < 0,01$). Se dispuso de datos observacionales a los 12 meses en 28 pacientes (70%), en los cuales no se obtuvo ningún diagnóstico etiológico ni patogénico; ningún caso mostró datos de policitemia vera. La Tabla 3 muestra las principales conclusiones a partir de estos 40 pacientes registrados⁶. Esta experiencia española, que no ha tenido continuidad por razones logísticas, no está cerrada. Nos proponemos recabar datos evolutivos actuales, así como tratar de establecer una sistemática común para el estudio etiopatogénico de los casos difíciles, estableciendo centros de referencia para estudios no disponibles en la mayoría de centros hospitalarios.

Bibliografía

1. Tefferi A. Diagnostica approach to the patient with polycythemia. Uptodate on-line. 2010.
2. Pearson TC, Guthrie DL, Simpson J et al. Interpretation of measured red cell mass and plasma volume in adults: Expert Panel on Radionuclides of the International Council for Standardization in Haematology. *Brit J Haematol* 1995; 89: 748-56.
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. Patnaik MM y Tefferi A. The complete evaluation of erythrocytosis: congenital and acquired. *Leukemia* 2009; 23:834-44.
5. McMullin MF. Idiopathic erythrocytosis: a disappearing entity. *Hematology* 2009;629-35.
6. Hernandez Nieto L, Villegas A, Muñoz JA, Arrizabalaga B, Remacha, Del Rio J, Rodriguez Sánchez R. Registro español de eritrocitosis de causa desconocida (REECD). Estudio descriptivo de 39 casos. *Haematologica* 2005 (Ed. Esp.); 90 (suppl 2): 61 (abstract).
7. Cazzola M. Somatic mutations of JAK2 exon 12 as a molecular basis of erythrocytosis. *Haematologica* 2007;92:1585-9.
8. Rossi, D, Cortini, F, Deambroggi, C, Barbieri, C, Cerri, M, Franceschetti, S. et al. Usefulness of JAK2V617F mutation in distinguishing idiopathic erythrocytosis from polycythemia vera. *Leuk Res* 2007; 31:97-101.
9. Percy M J, Jones FCG, Green AR, Reilly JT, McMullin MF. The incidence of the JAK2V617F mutation in patients with idiopathic erythrocytosis. *Haematologica* 2006; 91:413-14.
10. Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med* 2007;356:459- 68.
11. Percy MJ, Scott LM, Erber WN, Harrison CN, Reilly JT, Jones FG, Green AR, McMullin MF. The frequency of JAK2 exon 12 mutations in idiopathic erythrocytosis patients with low serum erythropoietin levels. *Haematologica* 2007;92:1607-14.
12. Pietra D, Sai L, Brisci A, Passamonti F, Rumi E, Theoharides A, et al. Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. *Blood* 2008;111:1686-9.
13. Martínez-Avilés L, Besses C, Álvarez-Larrán A, Cervantes F, Hernández-Boluda JC, Vellosillo B JAK2exon 12 mutations in polycythemia vera or idiopathic erythrocytosis *Haematologica/the hematology* 2007; 92. 1717.
14. Schnittger S, Bacher U, Haferlach C, Geer T, Müller P, Mittermüller J. Et al. Detection of JAK2 exon 12 mutations in 15 patients with JAK2V617F negative polycythemia vera. *Haematologica* 2009; 94: 414-18.
15. Prchal JT. Molecular patogénesis of congenital polycythemic disorders and polycythemia vera. Uptodate on-line 2010.
16. McMullin MF, Bareford D, Campbell P, Green AR, Harrison C, Hunt B, et al. Guidelines for the diagnosis, investigation and management of polycythaemia/erythrocytosis. *Br J Haematol* 2005;130:174-95.
17. Percy MJ, Butt NN, Crotty GM, Drummond, MW, Harrison C, Jones GL, Turner M, Wallis J, McMullin MF. Identification of high oxygen affinity hemoglobin variants in the investigation of patients with erythrocytosis. *Hematológica*. 2009;94: 1321-2.
18. Junoven E, Ikkala E, Fyhrquist F, Ruutu T. Autosomal dominant erythrocytosis caused by increased sensitivity to erythropoietin. *Blood* 1991; 78:3066-69.
19. Kralovics R, Indrak K, Stopka T, Berman BW, Prchal JF, PrchalT. Two new EPO receptor mutations truncated EPO receptors are most frequently associated with primary familial and congenital erythrocytosis. *Blood* 1997; 90: 2057-61.
20. Murat O, Arcasoy, Aysen E, Karayal, Harvey M, Segal, Joseph G. Sinning, and Bernard G. Forget. A novel mutation in the erythropoietin receptor gene is associated with familial erythrocytosis. *Blood*. 2002;99:3066-3069.
21. Divoky V, Liu Z, Ryan TM, Prchal JF, Townes TM, Prchal JT. Mouse model of congenital polycythemia: homologous replacement of murine gene by mutant human erythropoietin receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:986-91.
22. Sulahian R, Cleaver O, Jun-shen Huang L. Ligand-induced EpoR internalization is mediated by JAK2 and p85 and is impaired by mutations responsible for primary familial and congenital polycythemia. *Blood*. 2009 May 21; 113: 5287-529.
23. Kenneth R. Casey, Kathia Ortiz Cantillo and Lee K. Brown. Sleep-Related Hypoventilation/Hypoxemic syndromes *Chest* 2007;131;1936-1948.
24. Abad VC, Guilleminault C. Treatment options for obstructive sleep apnea. *Curr Treta Options Neurol*.2009; 11:358-67.
25. Sergeyeva A, Gordeuk VR, Tokarev YN, Sokol L, Prchal JF. Prchal JT Congenital polycythemia in Chuvashia (1997). *Blood* 1997; 89:2148-54.
26. Gordeuk VR, Stockton DW, David W. Prchal J T. Congenital polycythemia /erythrocytoses. *Haematologica* 2005; 90:109-116.
27. Pastore Y, Jedlickova K, Guan Y, Liu E, Fahner J, Hasle H, Prchal JF, and Josef T. Prchal JT. Mutations of von Hippel-Lindau Tumor-Suppressor Gene and Congenital Polycythemia. *Am. J. Hum. Genet.* 2003;73:412-19.
28. Gale DP, Harten SK, Reid CDL, Edward GD, Tuddenham EGD, Maxwell PH. Autosomal dominant erythrocytosis and pulmonary arterial hypertension associated with an activating HIF2 gene mutation. *Blood* 2008; 112:919-21.
29. Percy M, Furlow PW, Beer PA, Lappin TR, McMullin RF, Lee FS. A novel erythrocytosis-associated PHD2 mutation suggests the location of a HIF binding groove. *Blood* 2007;110:2193-96.

Aterotrombosis

COORDINADORES: F. VELASCO. *Córdoba*
JESÚS M. CESAR. *Madrid*

AVANCES EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA ATROSCLEROSIS: PAPEL EMERGENTE DE LAS METALOPROTEASAS

J.A. PÁRAMO^{1,2}, J. ORBE², J.A. RODRÍGUEZ²

¹ Servicio de Hematología. Clínica Universidad de Navarra. Pamplona. ² Laboratorio de Aterosclerosis. CIMA. Universidad de Navarra. Pamplona

Introducción

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica difusa de las arterias de mediano y gran calibre responsable de las enfermedades cardiovasculares, como infarto de miocardio (IAM) e ictus, que constituyen la principal causa de mortalidad en los países occidentales. El proceso aterosclerótico se inicia con la entrada de lipoproteínas en el subendotelio; la activación endotelial facilita la penetración y el acúmulo de monocitos que se diferencian a macrófagos y retienen las lipoproteínas modificadas, con formación de células espumosas. En el transcurso del tiempo, la respuesta inflamatoria se amplifica, la placa de ateroma crece, pero se mantiene el diámetro de la luz vascular, como consecuencia del remodelado positivo de la pared del vaso. Sin embargo, algunas lesiones se transforman en vulnerables, susceptibles de ruptura y trombosis, como consecuencia del adelgazamiento de la pared arterial^{1,2}. Por consiguiente, la inflamación contribuye a todas las fases de la aterosclerosis, desde las etapas iniciales hasta la complicación trombótica (aterotrombosis).

Placa aterosclerótica vulnerable

Las lesiones vulnerables (placas de alto riesgo) se caracterizan por un amplio núcleo necrótico, una capa fibrosa fina (fibroateroma) y un infiltrado inflamatorio (monocitos/macrófagos, linfocitos T, mastocitos). La ruptura de la placa fibrosa es la causa principal de trombosis intraluminal en los síndromes coronarios agudos y la responsable del 75% de la mortalidad tras IAM, si bien también se han observado trombosis en placas con erosión y calcificación³.

Metaloproteasas e inhibidores: papel en la degradación de la matriz extracelular

La ruptura de la placa de ateroma se relaciona con alteraciones del remodelado de la matriz extracelular (MEC), el cual está regulado por el equilibrio entre proteasas que favorecen la degradación (MMP) y sus inhibidores (TIMPs) (Figura 1). Las MMP son una familia de endopeptidasas dependientes de zinc, producidas por diversos tipos celulares (endotelio, músculo liso y monocitos), que degradan numerosos componentes de la MEC. Se clasifican en subgrupos basados en su estructura, especificidad por el sustrato y unión a membranas (Tabla 1): colagenasas (MMP-1,-8,-13), estromalinas (MMP-3,-10,-11), gelatinasas (MMP-2,-9), tipo membrana (MT-MMP) y otras (matrilisina, metaloelastasa, etc.). La actividad de las MMP está regulada intra y extracelularmente a tres niveles: transcripcional, postranslacional y a través de interacción con inhibidores específicos. Diversos factores de crecimiento, citocinas, la trombina y hormonas aumentan su expresión a nivel transcripcional, mientras que la heparina, el factor transformante β (TGF- β) y los corticoides la inhiben. Otras enzimas, como la trombina, el factor Xa y las propias MMP también poseen la capacidad de activar MMP. Finalmente, existe un control de la actividad de MMP mediado por inhibidores específicos (TIMP), de los que se han descrito cuatro miembros (TIMP-1, -2, -3, y -4). En resumen, el balance proteolítico dependerá de la concentración relativa de activadores e inhibidores⁴⁻⁶ (Figura 1).

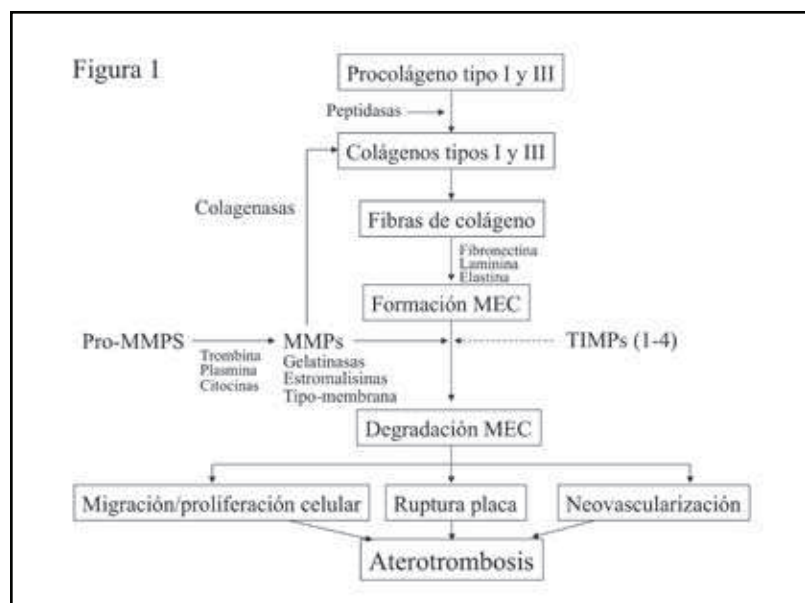


Figura 1. Remodelado vascular en la aterosclerosis: síntesis y degradación de la MEC mediado por el balance entre MMP y TIMP.

Tabla 1. Características y especificidad de las principales MMP

Tipo de MMP	Denominación	Sustrato MEC
Colagenasas: · MMP-1 · MMP-8 · MMP-13	· Colagenasa-1 · Colagenasa-2 · Colagenasa-3	· Colágenos I, II, III, VII, VIII y X, gelatina, proteoglicanos, tenascina, entactina · Colágenos I, II, III, V, VIII y X, gelatina, agrecan · Colágenos I, II, III, IV, IX, X y XIV, gelatina, tenascina, fibronectina, agrecan, osteonectina
Gelatinasas: · MMP-2 · MMP-9	· Gelatinasa A · Gelatinasa B	· Colágenos I, IV, V, VII, X, XI y XIV, gelatina, elastina, fibronectina, laminina, agrecan, versican, osteonectina, proteoglicanos · Colágenos IV, V, VII, X, XIV, gelatina, elastina, agrecan, versican, proteoglicanos, osteonectina
Estromalinas: · MMP-3 · MMP-10 · MMP-11	· Estromalinas-1 · Estromalinas-2 · Estromalinas-3	· Colágenos III, IV, V y IX, gelatina, agrecan, versican, proteoglicanos, tenascina, fibronectina, laminina, osteonectina · Colágenos III, IV, V, gelatina, caseína, agrecan, elastina, proteoglicanos · Caseína, laminina, fibronectina, gelatina, colágeno IV, transferrina
De tipo membrana: · MMP-14 · MMP-15 · MMP-16 · MMP-17 · MMP-24 · MMP-25	· MT1-MMP · MT2-MMP · MT3-MMP · MT4-MMP · MT5-MMP · MT6-MMP	· Colágenos I, II y III, caseína, elastina, fibronectina, vitronectina, tenascina, proteoglicanos, laminina, entactina · Tenascina, fibronectina, laminina · Colágeno III, gelatina, caseína, fibronectina · ND · ND · ND
Otras: · MMP-7 · MMP-12 · MMP-20 · MMP-23A · MMP-23B · MMP-26 · MMP-27 · MMP-28	· Matrilisina · Metaloelastasa · Enamelisina · MMP-21 · MMP-22 · Matrilisina 2 · ND · Epilisina	· Colágenos IV y X, gelatina, agrecan, proteoglicanos, fibronectina, laminina, entactina, tenascina, caseína, transferrina, integrina β_1 , osteonectina, elastina · Colágeno IV, gelatina, elastina, caseína, laminina, proteoglicanos, fibronectina, vitronectina, entactina · Amelogenina · ND · ND · Colágeno IV, fibrinógeno, fibronectina, caseína · ND · Caseína

MEC: matriz extracelular; MMP: metaloproteasas; ND: no determinado.

Papel de las metaloproteasas en la fisiopatología de la aterosclerosis

El balance entre síntesis y degradación de la MEC es crucial para la estabilidad de la placa de ateroma. Se ha constatado la participación de las MMP en el remodelado vascular y en distintos mecanismos fundamentales en la progresión aterotrombótica⁷⁻¹⁰ (Figura 2):

- Las MMP favorecen el proceso inflamatorio al estimular la infiltración monocitaria de la pared vascular, de forma que un aumento en la expresión de determinadas MMP conlleva una mayor infiltración macrofágica, con ruptura de la lámina elástica interna y la aceleración del proceso ateroesclerótico¹¹.

- La inducción y activación de las MMP favorece la invasión de las células de músculo liso vascular y fibroblastos, un proceso importante en el desarrollo de la hiperplasia intimal, al facilitar la migración y proliferación de estos tipos celulares⁸.

- La actividad de las MMP resulta indispensable para la neovascularización de la placa ateroesclerótica, un pro-

ceso asociado a la vulnerabilidad de las lesiones avanzadas, inducido por estímulos proangiogénicos e inflamatorios, y que parece necesario para su crecimiento⁸.

- Experimentos en ratones modificados genéticamente han demostrado que niveles elevados de MMP promueven la inestabilidad de las placas ateroescleróticas en situaciones de hipercolesterolemia¹².

- Existen evidencias de interacciones moleculares entre las MMP con enzimas, sustratos e inhibidores del sistema fibrinolítico, que sugieren un papel importante en la regulación de este sistema⁸. Finalmente, el propio trombo puede constituir una fuente de actividad proteolítica, con relevancia en el proceso aterotrombótico¹³.

- Se ha observado un incremento de MMP en las regiones vulnerables ("hombro") de placas ateroescleróticas humanas, lo que se relaciona con una mayor inestabilidad y propensión a la ruptura y trombosis. También se detectado aumento del TIMP-1 en placas humanas ateroescleróticas, en áreas con mayor grado de calcificación⁷⁻¹⁰.

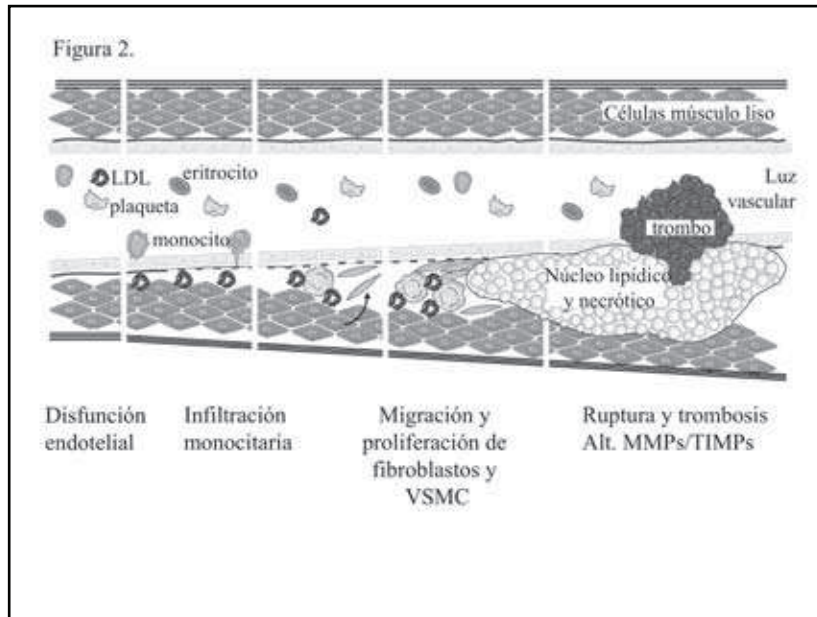


Figura 2. Mecanismos implicados en la aterogénesis, desde el inicio a la ruptura de la placa.

la MMP-10 puede asociarse con el proceso ateroesclerótico, ya que se ha observado correlación entre su concentración en plasma y el espesor íntima-media de la arteria carótida, un marcador de aterosclerosis subclínica, en una amplia serie de pacientes sin historia cardiovascular previa¹⁷.

La MMP-10 también podría jugar un papel en la trombosis. En un trabajo reciente, hemos observado que la trombina induce la expresión y secreción endotelial de esta MMP, a través de un mecanismo dependiente del receptor de trombina PAR-1, y que sus niveles están elevados en situaciones caracterizadas por aumento de la generación de trombina, tales como IAM y coagulación intravascular diseminada (CID)¹⁸.

Metaloproteasas y factores de riesgo ateroesclerótico

La mayoría de los factores “clásicos” de riesgo ateroesclerótico, tales como dislipemia, obesidad y síndrome metabólico, hipertensión arterial y tabaquismo, se han relacionado con cambios en las concentraciones de MMP o TIMP. También se ha observado correlación entre diversas MMP y la estimación del riesgo vascular global medido con la escala Framingham^{14,15}. Es posible que los factores de riesgo modulen la estructura vascular y la estabilidad de la placa influenciando los niveles de MMP y TIMP, o a través de una regulación de la producción de colágeno. Tampoco puede descartarse que las alteraciones en los biomarcadores de MEC sean un epifenómeno o una respuesta adaptativa al propio proceso ateroesclerótico^{8,15}.

Papel de MMP-10 en aterosclerosis y trombosis

En un estudio reciente de nuestro grupo, hemos demostrado que la proteína C-reactiva (CRP), un marcador inflamatorio asociado con el riesgo cardiovascular, induce la expresión de MMP-10 (estromalisina-2) por células endoteliales humanas. Además, sujetos asintomáticos desde el punto de vista vascular, pero con un perfil proinflamatorio, muestran niveles elevados de esta MMP. Finalmente, la MMP-10 se expresó en las regiones vulnerables de placas ateroescleróticas avanzadas¹⁶. Nuestro grupo también ha demostrado que

Valor pronóstico de las metaloproteasas

Varios estudios han asociado MMP y TIMP con un pronóstico adverso en un amplio grupo de enfermedades cardiovasculares. Los biomarcadores circulantes más prometedores de degradación de la MEC son las MMP-8, -9 y -10^{8,19,20}. Se ha demostrado que el aumento de MMP-9 predice el estrechamiento de la luz arterial, la restenosis post-*stent* y la muerte cardiovascular en pacientes con enfermedad coronaria, y también contribuye a la expansión y ruptura de aneurismas aórticos²¹⁻²⁵. Como se ha señalado anteriormente, nuestros resultados indican que la MMP-10 podría constituir, asimismo, un marcador de inflamación y aterosclerosis subclínica y favorecer la inestabilidad de la placa de ateroma¹⁶⁻¹⁹.

Las metaloproteasas como diana terapéutica en la aterosclerosis

La modulación de la proteólisis pericelular puede constituir una diana para intervención terapéutica en el contexto de la aterosclerosis. Se ha observado que la inhibición de MMP en fases avanzadas puede proteger contra el desarrollo de placas ateroescleróticas inestables, la formación de aneurismas y la insuficiencia cardíaca²⁶.

Se sabe que las estatinas, así como los antagonistas del receptor de tipo 1 de la angiotensina II, reducen la concentración de MMP-9 y de otras MMP, mientras que otros fármacos con acción cardiovascular, como el carvedilol, tiazolidindionas y antioxidantes,

disminuyen la concentración de MMP-1^{15,27}. Algunos antibióticos, como la doxiciclina y las tetraciclinas, también reducen la expresión vascular y sistémica de diversas MMP²⁸.

Varias compañías farmacéuticas están, asimismo, interesadas en el desarrollo de inhibidores sintéticos de MMP, si bien no están disponibles para uso clínico. Estudios experimentales demuestran que la inhibición de las MMP con alguno de estos agentes puede tener un efecto beneficioso reduciendo la progresión de la placa aterosclerótica²⁹.

Conclusiones

Numerosos estudios demuestran que el remodelado de la MEC a nivel vascular es el resultado de un delicado balance entre MMP y TIMP, de forma que alteraciones de este equilibrio, con predominio de MMP, pueden contribuir a la progresión de la aterosclerosis y favorecer la ruptura de la placa de ateroma responsable de los síndromes clínicos aterotrombóticos. Algunas de estas moléculas, como MMP-1, 2, -8, -9 y -10, podrían considerarse biomarcadores con utilidad pronóstica en la recurrencia de cardiopatía isquémica, desarrollo de insuficiencia cardíaca y la formación de aneurismas, pero también en sujetos asintomáticos con factores de riesgo y en aquellos con aterosclerosis subclínica. Estudios prospectivos en curso permitirán clarificar el papel diagnóstico y pronóstico de estos biomarcadores en las enfermedades vasculares y si pueden constituir nuevas dianas terapéuticas en la aterosclerosis.

Agradecimientos

Trabajo parcialmente financiado con Becas del Departamento de Salud Gobierno de Navarra (ref 15/2008) y Ministerio de Ciencia e Innovación (ref. SAF 2009-12039).

Bibliografía

- Páramo JA, Orbe J, Rodríguez JA. Estabilización de la placa de ateroma: un nuevo concepto basado en la biología dinámica de la aterosclerosis. *Med Clin (Barc)*. 2003;121:583-7.
- Páramo JA, Rodríguez JA, Orbe J. Aterosclerosis en las enfermedades inflamatorias. *Med Clin (Barc)*. 2007;128:749-56.
- Kramer MCA, Rittersma SZH, de Winter RJ, Ladich E, Fowler DR, Liang Y-H, et al. Relationship of thrombus healing to underlying plaque morphology in sudden coronary death. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:122-32.
- Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res*. 2002;90:251-62.
- Jones CB, Sane DC, Herrington DM. Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in acute coronary syndrome. *Cardiovasc Res*. 2003;59:812-23.
- Dollery CM, Libby P. Atherosclerosis and proteinase activation. *Cardiovasc Res*. 2006;69:625-35.
- Orbe J, Fernandez L, Rodríguez JA, Rabago G, Belzunce M, Monasterio A, et al. Different expression of MMPs/TIMP-1 in human atherosclerotic lesions. Relation to plaque features and vascular bed. *Atherosclerosis*. 2003;170:269-76.
- Rodríguez JA, Orbe J, Páramo JA. Metaloproteasas, remodelado vascular y síndromes aterotrombóticos. *Rev Esp Cardiol*. 2007;60:959-67.
- Raffetto JD, Khalil RA. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol*. 2008;75:346-59.
- Newby AC, George SH, Ismail Y, Johnson JL, Sala-Newby GB, Thomas AC. Vulnerable atherosclerotic plaque metalloproteinases and foam cell phenotypes. *Thromb Haemost* 2009;101:1006-11.
- Newby AC. Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:2108-14.
- Newby AC. Metalloproteinases and vulnerable atherosclerotic plaques. *Trends Cardiovasc Med* 2007;17:253-8
- Swedenborg J, Eriksson P. The intraluminal thrombus as a source of proteolytic activity. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1085:133-8.
- Sundstrom J, Evans JC, Benjamin EJ, Levy D, Larson MG, Sawyer DB, et al. Relations of plasma matrix metalloproteinase-9 to clinical cardiovascular risk factors and echocardiographic left ventricular measures: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2004;109:2850-6.
- Paramo JA, Montero I, Rodríguez JA, Orbe J. Metaloproteasas en aterosclerosis: implicaciones fisiopatológicas y terapéuticas. *Clin Invest Arterios*. 2005;17:133-141.
- Montero I, Orbe J, Varo N, Beloqui O, Monreal JI, Rodríguez JA, et al. C-reactive protein induces matrix metalloproteinase-1 and -10 in human endothelial cells: implications for clinical and subclinical atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47:1369-78.
- Orbe J, Montero I, Rodríguez JA, Beloqui O, Roncal C, Paramo JA. Independent association of matrix metalloproteinase-10, cardiovascular risk factors and subclinical atherosclerosis. *J Thromb Haemost*. 2007;5:91-7.
- Orbe J, Rodríguez JA, Calvayrac O, Rodríguez-Calvo R, Rodríguez C, Roncal C, et al. Matrix metalloproteinase-10 is upregulated by thrombin in endothelial cells and increased in patients with enhanced thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:2109-16.
- Rodríguez JA, Orbe J, Martínez de Lizarrondo S, Calvayrac O, Rodríguez C, Martínez-González J, et al. Metalloproteinases and atherothrombosis: MMP-10 mediates vascular remodeling promoted by inflammatory stimuli. *Front Biosci*. 2008;13:2916-21
- Laxton RC, Duchene J, Zhang F, Leung KY, Xiao Q, Scotland RS, et al. A role of matrix metalloproteinase-8 in atherosclerosis. *Circ Res* 2009;105:921-9
- Ferroni P, Basili S, Martini F, Cardarelli CM, Ceci F, Di Franco M, et al. Serum metalloproteinase 9 levels in patients with coronary artery disease: a novel marker of inflammation. *J Invest Med*. 2003;51:295-300.
- Longo GM, Xiong W, Greiner TC, Zhao Y, Fiotti N, Baxter BT. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest*. 2002;110:625-32.
- Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, et al. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation*. 2003;107:1579-85.
- Tayejee MH, Tan KT, MacFadyen RJ, Lip GY. Abnormal circulating levels of metalloproteinase 9 and its tissue inhibitor 1 in angiographically proven peripheral arterial disease: relationship to disease severity. *J Intern Med*. 2005;257:110-6.

25. Lim HS, Lip GY. Circulating matrix metalloproteinase-9 levels in atherosclerotic vascular disease: a possible measurement of systemic or specific disease pathophysiology? *J Intern Med.* 2008;263:620-2.
26. Bendeck MP. Targeting pericellular proteolysis in vascular disease. *Circ Res.* 2002;91:861-2.
27. Orbe J, Rodriguez JA, Arias R, Belzunce M, Nespereira B, Perez-Illzarbe M, et al. Antioxidant vitamins increase the collagen content and reduce MMP-1 in a porcine model of atherosclerosis: implications for plaque stabilization. *Atherosclerosis.* 2003;167:45-53.
28. Axisa B, Loftus IM, Naylor AR, Goodall S, Jones L, Bell PR, Thompson MM. Prospective, randomized, double-blind trial investigating the effect of doxycycline on matrix metalloproteinase expression within atherosclerotic carotid plaques. *Stroke.* 2002;33:2858-64.
29. Hu J, van den Steen PE, Sang Q-X, Opdenaker G. Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. *Nature Rev* 2007;6:480-98.

MARCADORES BIOLÓGICOS EN ATEROTROMBOSIS

V. ROLDÁN, E. JOVER, F. MARÍN

Servicio de Hematología y Oncología Médica. Hospital Universitario Morales Meseguer. Servicio de Cardiología. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. Universidad de Murcia

Introducción

La enfermedad arteriosclerótica es una patología vascular proliferativa, severa y crónica, cuya afectación se extiende a arterias de mediano y gran calibre. Esta enfermedad cursa largo tiempo asintomática, hasta que tras un estímulo puede presentar un cuadro de desestabilización y ruptura de la placa aterosclerótica. Sus principales manifestaciones clínicas son: el síndrome coronario agudo (SCA) con y sin elevación del segmento ST, la arteriopatía periférica y el ictus isquémico. La arteriosclerosis se asocia con una elevada morbimortalidad en todo el mundo, siendo la primera causa de muerte en los países desarrollados. En este sentido, el estudio *Cardiovascular Health Study*¹ mostró una asociación significativa entre la severidad de la enfermedad vascular y el riesgo relativo de padecer eventos aterotrombóticos, siendo entre 4 y 5 veces mayor la probabilidad de sufrir un ictus u otro tipo de evento isquémico. Según los resultados del *TASC II*² entre el 40 y el 60% de los pacientes con un proceso arteriosclerótico acaba desarrollando, de forma paralela, otras manifestaciones arterioscleróticas, con lo que la severidad y el riesgo de los procesos tromboticos se ven aumentados. Debido al elevado riesgo trombotico asociado a la enfermedad arteriosclerótica, es esencial la búsqueda de biomarcadores implicados en la fisiopatología subyacente que

permitan: 1) monitorizar la progresión y el grado de severidad de la enfermedad, y 2) optimizar la elección del tratamiento en cada caso o estado de la enfermedad. La idoneidad de estos biomarcadores radicarán, entre otras cosas, en la sencillez de determinación para su ulterior uso en exámenes de rutina y cribado.

Fisiopatología de la enfermedad arteriosclerótica

La fisiopatología arteriosclerótica es el resultado de un proceso complejo y dinámico donde convergen e interactúan diferentes rutas tales como: inflamación, disfunción endotelial, estado protrombótico, remodelado vascular, angiogénesis y estrés oxidativo³.

La inflamación parece jugar un papel fundamental en el desarrollo, progresión, desestabilización y ruptura de placas ateroscleróticas, llevando a la cronificación de la enfermedad⁴. Sin embargo, el daño endotelial, resultante de la crónica y repetida agresión ejercida por diferentes factores de riesgo contemplados en las guías, parece ser el realmente implicado en el desarrollo y progresión de la enfermedad³. Finalmente, la erosión endotelial, la disrupción de la placa o el desprendimiento del nódulo cálcico dejan expuesto el subendotelio y el material ateromatoso al torrente sanguíneo. Por ello, las plaquetas, en un intento fisiológico por reparar la lesión se activan, desempeñando un papel fundamental en el proceso trombogénico, que resulta deletéreo en la enfermedad arteriosclerótica. Esta hiperactividad plaquetaria, junto a la estasia producida por la estenosis del vaso, precipita el desarrollo de isquemia miocárdica y justifica el uso combinado de antiplaquetarios orales como actual elección *gold standard* para el tratamiento y la prevención de la enfermedad isquémica. Sin embargo, en algunos casos se produce heterogeneidad de respuesta al tratamiento, por lo que están actualmente bajo estudio nuevas dianas terapéuticas. Además, se produce una activación de la cascada de la coagulación, lo que apoya el beneficio clínico obtenido del uso asociado de fármacos anticoagulantes.

Búsqueda de biomarcadores aterotrombóticos

El valor pronóstico de los biomarcadores actualmente incluidos en las guías⁵ es indudable (Tabla 1). Hoy por hoy, el único marcador biológico incluido en escalas de estratificación de riesgo son las troponinas, tanto la T como la I. Aunque el riesgo absoluto a corto plazo de pacientes troponina-negativos es significativamente menor que el de los pacientes troponina-positivos, sigue habiendo un gran número de pacientes sin elevación de troponina que escapan a esta predicción.

Por ello, muchos otros posibles biomarcadores han sido estudiados en la enfermedad vascular³, dado que predicen la recurrencia de eventos tanto o más que los factores de riesgo convencionales. Así pues, encontramos en la bibliografía un amplio abanico de moléculas implicadas en el desarrollo y la progresión de la enfermedad a nivel de: inflamación, función endotelial, fibrosis y fibrinólisis, remodelado, activación plaquetaria, angiogénesis, apoptosis y estrés oxidativo^{1,3}.

Marcadores de inflamación

Se prestó mucha atención a la proteína C reactiva (PCR) como marcador plasmático de inflamación, llegando a ser recomendada su determinación en pacientes asintomáticos con riesgo intermedio a modo de prever futuros eventos coronarios y demostrándose unas frecuencias de incidencia de evento trombotico en pacientes con cardiopatía isquémica que oscilaban entre el 17 y el 33%⁶. Sin embargo, el proceso inflamatorio subyacente a la enfermedad aterosclerótica está mediado por gran multitud de citocinas y es poco probable que sólo los niveles de PCR sean capaces de reflejar dicho proceso. Así pues, pese a la asociación de

niveles elevados de PCR con riesgo cardiovascular⁶, diferentes estudios han demostrado la poca mejora en la predicción y pronóstico tras su inclusión en las escalas de riesgo⁷.

Las plaquetas son el primer tipo celular que llega a la lesión arteriosclerótica, de manera que su unión al endotelio debe activarlo, empezando a expresar múltiples moléculas de adhesión celular, citocinas y quimioatrayentes. De hecho, VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) está sobreexpresado en respuesta a la hipercolesterolemia, de manera que su inhibición reduce el riesgo aterogénico⁸. Por otro lado, el proceso inflamatorio arteriosclerótico debe promover en los leucocitos activados la producción de más citocinas y reactantes de fase aguda. De este modo, la secreción de interferón- γ (activador de macrófagos), por parte de los linfocitos T *helper* 1, se traduce en el incremento de los niveles del factor de necrosis tisular α (TNF- α) e interleucina 1 (IL-1)⁹. Ambas citocinas actúan de forma sinérgica induciendo la producción de más moléculas inflamatorias y citotóxicas por parte de macrófagos y células endoteliales, lo cual aumenta las lesiones ateroscleróticas. De hecho, en ratones *knockout* para apolipoproteína E carentes de interferón- γ o su receptor, se inhibe la aterosclerosis, hecho que ocurre de forma

Tabla 1. Biomarcadores de enfermedad arteriosclerótica actualmente en uso bajo las recomendaciones de la guía NACB (*National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines*)⁵

Biomarcador	Indica	Ventajas	Inconvenientes	Comentarios
Troponina T (TnT)	Necrosis miocárdica	Diagnóstico de IAM, signos evidentes de SCA entre las 6-9 h posteriores al inicio del infarto, estratificación de riesgo, elevada especificidad cardiaca	Marcador tardío de IAM, falta de discriminación de reinfartos, poco útil si las probabilidades clínicas de SCA son bajas	Suelen acompañarse las determinaciones de biomarcador con un ECG
CK-MB	Necrosis miocárdica	Signos evidentes de SCA entre las 6-9 h posteriores al inicio del infarto, posibilidad de detectar reinfartos	Alternativa de la TnT, poco útil si las probabilidades clínicas de SCA son bajas	Debe evitarse si se puede hacer troponina T
Mioglobina	Necrosis miocárdica	Gran sensibilidad, marcador temprano de infarto de miocardio	Poca especificidad cardiaca, rápido aclaramiento después de la necrosis, poco útil si las probabilidades clínicas de SCA son bajas	
Troponina I (TnI)	Necrosis miocárdica	Gran especificidad cardiaca, permite detectar IAM 7 días después de producirse. Estratificación de riesgo	Marcador tardío de necrosis miocárdica, falta de estándares analíticos, poco útil si las probabilidades clínicas de SCA son bajas	
NT-pro BNP	Marcador estrés hemodinámico	Puede ser útil combinado con troponina T en pacientes diagnosticados de SCA	Beneficio incierto	
PCR ultrasensible	Inflamación	Puede ser útil combinado con troponina T en pacientes diagnosticados de SCA	Beneficio incierto	
Estrategias multimarcador		Mayor predictibilidad que con marcadores simples		

ECG: electrocardiograma; IAM: infarto agudo de miocardio; PCR: proteína C reactiva; SCA: síndrome coronario agudo.

similar cuando se inhiben los linfocitos T *helper* 1 de forma farmacológica⁹.

Se ha visto que ratones carentes de PPAR α (*peroxisome proliferators-activated receptors alpha isotype*) mostraban una respuesta inflamatoria más prolongada y exacerbada, conduciendo a un incremento de expresión de VCAM-1 y amiloide A sérico¹⁰. En este sentido, los agonistas del PPAR α inhiben la producción de reactantes de fase aguda hepáticos (tales como la PCR, TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-1). Consecuentemente se reduce la amplificación de la respuesta inflamatoria y la producción de moléculas de adhesión celular. Además, la activación de PPAR α inhibe la inducción de endotelina-1 (ET-1) mediada por trombina, inhibiendo así la proliferación de las células musculares lisas dependientes de ET-1¹¹ y el daño endotelial¹². Asimismo, se ha visto implicado en la regulación a nivel transcripcional de procesos de remodelado de la matriz extracelular, trombogenicidad y dislipidemia¹⁰.

Marcadores de daño/disfunción endotelial

El estudio en ratones deficientes para factor von Willebrand mostró una reducción de las lesiones respecto de linajes no deficientes, sugiriendo su importante participación en la arteriosclerosis¹³. Y recientemente ha aparecido como uno de los marcadores significativamente elevados en pacientes de enfermedad aterosclerótica⁷.

La cuantificación de células endoteliales circulantes en sangre periférica ha sido descrita como un método rápido de medida del daño endotelial, ya que éstas son los únicos marcadores directos del mismo, porque se supone que son células maduras desprendidas de la capa endotelial en respuesta al daño. Se ha comparado su uso con otros marcadores de daño endotelial como son el factor von Willebrand en pacientes con SCA, y se ha visto que su presencia en sangre periférica es predictor de eventos adversos¹⁴.

Las conexinas son muy importantes dentro de fisiopatología celular, ya que juegan un papel fundamental en las conexiones célula a célula dentro de la pared celular. La observación de significantes variaciones en los patrones de expresión de las conexinas en las lesiones ateroscleróticas ha promovido su estudio como biomarcadores de la progresión de enfermedad. Por ello, las diferentes conexinas podrían ser susceptibles de mayor investigación con tal de emplearse como marcadores y/o dianas terapéuticas futuras¹⁵.

Marcadores de remodelado

Según lo descrito, la aterosclerosis se caracteriza tanto por procesos de generación como de destrucción tisular. En consecuencia, existe un desequilibrio o

actuación defectuosa de las rutas implicadas en la producción/destrucción de la matriz extracelular, donde juegan un papel fundamental los procesos de apoptosis, fibrosis, angiogénesis y calcificación.

El péptido cerebral natriurético (NT-pro BNP) es una neurohormona sintetizada y liberada por el corazón en respuesta al aumento de la tensión de la pared ventricular, de tal forma que está elevado en pacientes con insuficiencia cardiaca correlacionando directamente con el grado de disfunción sistólica. También se ha comprobado que es un marcador pronóstico en pacientes con SCA, incluso al año del evento¹⁶.

Los leucocitos activados, además de producir citocinas inflamatorias, producen proteasas implicadas en la desestabilización de la placa. Aunque se han implicados dos tipos de proteasas, metaloproteasas de matriz (MMP) y cisteinoproteasas, los resultados obtenidos, tanto *in vitro* como *in vivo*, han hecho especialmente atractivas en su estudio a las MMP¹⁷. Recientemente, el estudio *the Atherosclerosis Risk in Communities Carotid MRI Study* ha evaluado diferentes MMP circulantes y su inhibidor TIMP-1, demostrando una implicación de MMP específicas y de TIMP-1 en la progresión de placa¹⁸.

La creación de nuevo tejido en el proceso fibroproliferativo de la aterosclerosis implica el desarrollo de procesos angiogénicos. De hecho, se han encontrado niveles elevados de factor de crecimiento vasculo-endotelial (VEGF) en pacientes con cardiopatía isquémica respecto de pacientes control, lo que sugiere la anormal angiogénesis de los procesos ateroscleróticos¹⁹. Sin embargo, recientemente se ha sugerido una pobre implicación de VEGF y de la forma soluble de su receptor, sFlt-1, en el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica²⁰.

Por último, dentro de los marcadores de apoptosis, la anexina V constituye un buen marcador de muerte celular y desestabilización de placa; también se ha descrito como posible marcador de estrés celular e inflamación cuando se internaliza mediante un mecanismo específico²¹. Además, debe jugar un papel importante en la hipercoagulabilidad arteriosclerótica, limitando la actividad procoagulante fosfolípido-dependiente, en las micropartículas plaquetarias que expresan fosfatidilserina²².

Marcadores de estrés oxidativo

La producción incrementada de radicales libres de oxígeno se traduce en la alteración del contenido genético, proteico y lipídico de las células endoteliales y las células musculares lisas, como muchos estudios sobre estrés oxidativo y producción de radicales libres de oxígeno han demostrado⁹. Consecuentemente, la influencia de los radicales libres de oxígeno acaba, finalmente, conduciendo a cambios estructurales, fun-

cionales e incluso en muerte celular (bien por necrosis o por apoptosis).

Dado que la acumulación de lípidos en la pared vascular dispara un estrés oxidativo, jugando un papel crucial en la disfunción endotelial y la alteración producida sobre la producción de óxido nítrico⁹, es frecuente el estudio de fosfolípidos y LDL oxidadas como marcadores de estrés oxidativo. Sin embargo, últimamente se ha enfatizado aún más su estudio a causa de las posibles implicaciones en la activación de MMP y mieloperoxidasas²². Particularmente, son los compuestos tóxicos generados durante la oxidación de las LDL los que parecen estar más implicados en el desarrollo de apoptosis, diferenciación de células espumosas y promoción de migración y proliferación de células musculares lisas⁹. Además, la apoptosis inducida por las LDL oxidadas parece implicar la activación, tanto de la vía mitocondrial como de la ruta del receptor de muerte celular Fas/Fas ligando. La ocurrencia de procesos de apoptosis y necrosis en las zonas colindantes a la placa parece contribuir a su debilitación y desestabilización²³.

Marcadores protrombóticos

Dentro de los marcadores de activación plaquetaria estudiados, cabe mencionar al ligando soluble CD40. Este ligando se libera activamente después de la estimulación plaquetaria, aunque otras muchas células son capaces de producirlo (células musculares lisas, monocitos/macrófagos, mastocitos, células endoteliales, epiteliales y dendríticas, linfocitos). Este ligando CD40 circulante puede activar CD40 en las células endoteliales y producir una cascada proinflamatoria en la pared del vaso, así como activar CD40 expresado en las células inflamatorias, tales como monocitos y células T. El ligando soluble CD40 ha demostrado ser un marcador bioquímico potente de la activación inflamatoria trombótica en pacientes con SCA, apoyando la estrecha relación entre inflamación, activación trombótica y SCA²⁴.

El fibrinógeno no sólo tiene un papel fundamental en la hemostasia sino que, además, es un reactante de fase aguda de síntesis hepática bajo condiciones de inflamación. Por ello, ha demostrado ser un adecuado marcador de aterosclerosis^{3,25}, aunque se desconoce si es realmente un marcador independiente de los tradicionales factores de riesgo³. Igualmente, el dímero D de fibrina parece ser un consistente marcador de riesgo y complicación cardiovascular, así como de severidad en la aterosclerosis. Así, se ha descrito un aumento de hasta dos veces de la expresión de 27 genes relacionados, entre otros, con la producción de MMP-9, ICAM-1, oxLDL y VEGF; y el papel aterogénico del dímero D en la diferenciación de macrófagos a célu-

las espumosas²⁶. Todo ello corroboraría observaciones previas que lo relacionaban con respuesta inflamatoria y respuesta trombótica asociada a niveles altos de fibrinógeno.

El reciente estudio de Kim *et al.*⁷ evaluaba el valor predictivo de 18 posibles biomarcadores hemostáticos y de inflamación en mujeres posmenopáusicas diagnosticadas de cardiopatía isquémica estable, concluyendo que sólo 5 de ellos eran significativos: IL-6, dímero D, factor VII, factor von Willebrand y homocisteína. Su inclusión en la escala de riesgo *Framingham score* y en una escala con factores de riesgo tradicionales independientes de cardiopatía isquémica (presión sistólica, lípidos, tabaquismo, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular, así como tratamientos con estatinas u hormonas) mejoraba modestamente la clasificación de riesgo según los *c*-estadísticos obtenidos con unas reclasificaciones de los pacientes del 6,42% y 6,45%, respectivamente.

Tendencias actuales

La quinta generación de troponinas cardíacas, las llamadas troponinas ultrasensibles, están suscitando gran interés, ya que se han demostrado concentraciones elevadas en pacientes con sospecha de cardiopatía isquémica estable que no han sufrido un síndrome coronario agudo²⁷.

Últimamente han generado gran interés los estudios "multimarcador"^{9,28} en los que la determinación simultánea de diferentes marcadores debe tener un efecto predictivo mayor que el que tienen individualmente, permitiendo una mejora sustancial de las clasificaciones de riesgo²⁹, aunque otros resultados sólo muestren una modesta mejoría⁷.

Con tal de detectar posibles nuevos biomarcadores de entre todas las proteínas plasmáticas se están llevando a cabo estudios de proteómica que permitan la determinación múltiple de biomarcadores, de un modo más eficaz y rápido³⁰.

Conclusiones

La intención de esta revisión es la de dar una visión general de la situación actual en este campo. Por ello, hacemos especial hincapié en aquellos que pudieran tener un mayor sentido biológico en base a los actuales conocimientos sobre la fisiopatología de la enfermedad, quedando otros tantos recopilados en la Tabla 1. Sin embargo, es necesaria la inversión de un mayor esfuerzo tanto en la búsqueda de nuevos biomarcadores como en la comprensión de los mecanismos moleculares implicados, ya que la bibliografía está llena de incongruencias en resultados, así como de supues-

tos biomarcadores finalmente no significativos. Además, la elevada morbimortalidad asociada a la enfermedad arteriosclerótica hace necesaria la insistencia en la búsqueda de biomarcadores. De momento, estudios recientes muestran la capacidad predictiva de eventos trombóticos de muchos de ellos. Sin embargo, la mayoría de estos marcadores no aparecen en las guías disponibles, pese a que combinaciones de algunos de ellos con determinadas variantes genéticas podrían arrojar luces a la fisiopatología subyacente en las diferentes fases de la enfermedad como muestran los valores predictivos (estadístico c de hasta 0,97) últimamente obtenidos en ensayos “multimarcador”. El beneficio es evidente: 1) reclasificación de pacientes, 2) comprensión de la patología y etiología, 3) elección de adecuadas estrategias terapéuticas para cada caso, 4) e incluso búsqueda de nuevas dianas para la prevención y tratamiento de esta difusa enfermedad.

Bibliografía

- Cushman M, Lemaitre RN, Kuller LH, Psaty BM, Macy EM, Sharrett AR, et al. Fibrinolytic activation markers predict myocardial infarction in the elderly. The Cardiovascular Health Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:493–8.
- Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG; TASC II Working Group. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2007; 33 (Suppl 1): S1-75.
- Kampoli A, Tousoulis D, Antoniadis C, Siasos G, Stefanadis C. Biomarkers of premature atherosclerosis. *Trends Mol Med* 2009; 15: 323-332
- Viles-Gonzalez JF, Fuster V, Badimon JJ. Links between inflammation and thrombogenicity in atherosclerosis. *Curr Mol Med* 2006; 6: 489-499.
- NACB Writing Group Members. NACB Committee Members. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes. *Clin Chem* 2007; 53: 552-574.
- Cushman M, Arnold AM, Psaty BM, Manolio TA, Kuller LH, Burke GL, et al. C-reactive protein and the 10-year incidence of coronary heart disease in older men and women: the cardiovascular health study. *Circulation* 2005; 112:25-31.
- Kim HC, Greenland P, Rossouw JE, Manson JE, Cochrane BB, Lasser NL et al. Multimarker prediction of coronary heart disease risk: the Women's Health Initiative. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55:2080-2091.
- Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991; 251:788-791.
- Hansson GK. Inflammation, Atherosclerosis and Coronary Artery Disease. *N Engl J Med* 2005; 352:1685-1695.
- Zandbergen F, Plutzky J. PPAR α in atherosclerosis and inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1771: 972-982.
- Delerive P, Martin-Nizard F, Chinetti G, Trottein F, Fruchart JC, Najib J, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway. *Circ Res* 1999; 85:394-402.
- Félétou M, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291:H985-1002.
- Methia N, André P, Denis CV, Economopoulos M, Wagner DD. Localized reduction of atherosclerosis in von Willebrand factor-deficient mice. *Blood* 2001; 98:1424-1428.
- Boos CJ, Balakrishnan B, Blann AD, Lip GY. The relationship of circulating endothelial cells to plasma indices of endothelial damage/dysfunction and apoptosis in acute coronary syndromes: implications for prognosis. *J Thromb Haemost* 2008; 6:1841-1850.
- Morel S, Burnier L, Kwak BR. Connexins participate in the initiation and progression of atherosclerosis. *Semin Immunopathol* 2009; 31: 49-61.
- James SK, Lindahl B, Siegbahn A, Stridsberg M, Venge P, Armstrong P, et al. N-terminal pro-brain natriuretic peptide and other risk markers for the separate prediction of mortality and subsequent myocardial infarction in patients with unstable coronary artery disease: a Global Utilization of Strategies To Open occluded arteries (GUSTO)-IV substudy. *Circulation* 2003; 108:275-281.
- Bäck M, Ketelhuth DF, Agewall S. Matrix metalloproteinases in atherothrombosis. *Prog Cardiovasc Dis* 2010; 52:410-428.
- Gaubatz JW, Ballantyne CM, Wasserman BA, He M, Chambless LE, Boerwinkle E, et al. Association of circulating matrix metalloproteinases with carotid artery characteristics: the Atherosclerosis Risk in Communities Carotid MRI Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30:1034-1042.
- Makin AJ, Chung NAY, Silverman et al. Vascular Endothelial Growth Factor and Tissue Factor in patients with established Peripheral Artery Disease: a link between angiogenesis and thrombogenesis? *Clin Sci* 2003; 104: 397-404.
- Sandhofer A, Tatarczyk T, Kirchmair R, Iglseider B, Paulweber B, Patsch JR, et al. Are plasma VEGF and its soluble receptor sFlt-1 atherogenic risk factors? Cross-sectional data from the SAPHIR study. *Atherosclerosis* 2009; 206:265-269.
- Laufer EM, Reutelingsperger CPM, Narula J, Hofstra L. Annexin A5: an imaging biomarker of cardiovascular risk. *Basic Res Cardiol* 2008; 103:95-104.
- Canet-Soulas E, Letourneur D. Biomarkers of atherosclerosis and the potential of MRI for the diagnosis of vulnerable plaque. *Magn Reson Mater Phy* 2007; 20:129-42.
- Salvayre R, Auge N, Benoist H, Negre-Salvayre A. Oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1585:213-21.
- Davi G, Patrono C. Mechanism of disease: Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med* 2007; 357: 2482-2494.
- Rizzo M, Corrado E, Coppola G, Muratori I, Novo G, Novo S. Markers of inflammation are strong predictors of subclinical and clinical atherosclerosis in women with hypertension. *Coron Artery Dis* 2009; 20:15-20.
- Zhou D, Yang P, Zhou B, Rui Y. Fibrin D-dimer fragments enhance inflammatory responses in macrophages: role in advancing atherosclerosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007 Mar; 34:185-190.
- Wang TJ, Larson MG, Vasani RS. Biomarkers for prediction of cardiovascular events. *N Engl J Med* 2007; 356:1472-1475.
- Laufer EM, Mingels AM, Winkens MH, Joosen IA, Schellings MW, Leiner T, et al. The Extent of Coronary Atherosclerosis Is Associated With Increasing Circulating Levels of High Sensitive Cardiac Troponin T. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010 Mar 18. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20299689.
- Zethelius B, Berglund L, Sundstrom J, Ingelsson E, Basu S, Larsson A et al. Use of multiple biomarkers to improve the prediction of death from cardiovascular causes. *N Engl J Med* 2008; 358:2107-2116.
- Tuñón J, Martín-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Lorenzo O, López JA, Egido J. Proteomic strategies in the Search of new biomarkers in atherothrombosis. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55: 2009-2016.

TRATAMIENTO DE LA ATEROTROMBOSIS

J. MATEO

Unidad de Hemostasia y Trombosis.

Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona

Tratamiento de la aterotrombosis

La enfermedad cardiovascular (ECV) es un problema de salud pública fundamental¹. A pesar de los progresos en el diagnóstico y el tratamiento en los últimos 25 años, la ECV representa la causa más frecuente de morbilidad y mortalidad en los países desarrollados (28% de las muertes anuales). En Europa, es responsable de aproximadamente la mitad (49%) de todas las muertes. En Europa, es responsable de 1,95 millones de muertes anuales (23% de las mujeres y 21% de los hombres) y de un elevado gasto (en la Unión Europea es de unos 160.000 millones de euros)².

La aterotrombosis, que implica la interacción directa entre la placa aterosclerótica y la trombosis arterial, subyace en la mayoría de los eventos cardiovasculares, independientemente del lecho vascular en los que ocurra.

La erosión o ruptura de una placa vulnerable, rica en lípidos, desencadena la formación de un trombo rico en plaquetas que ocluye parcial o totalmente la arteria. El 15,9% de los pacientes con aterotrombosis sintomática presentan enfermedad polivascular sintomática³. Al cabo de 1 año, 1 entre 6 pacientes manifiestan síntomas en otros territorios diferentes del inicial⁴. Por ello la aterotrombosis debe tratarse como una enfermedad sistémica.

En los próximos años, se producirá un marcado incremento en EVC debido al incremento de población con más de 60 años, la mejora del manejo clínico que hace que más pacientes sobrevivan al evento inicial. Las guías actuales remarcan la importancia del manejo global de los factores de riesgo en estos pacientes. Probablemente uno de los factores más relevantes sea la dislipemia, como se ha demostrado en el estudio INTERHEART, realizado en 52 países, en el que se comparaba un grupo de 15.152 pacientes con infarto de miocardio con un grupo control de 14.820 individuos sanos⁵. En este estudio se identificó la ratio de apolipoproteína B/apolipoproteína A-1 (apoB/apoA-1, como marcador sustituto de la ratio de lipoproteínas aterogénicas [LDL, IDL, VLDL] y lipoproteínas ateroprotectoras [HDL]) como el factor de riesgo más importante de infarto de miocardio en todas las regiones.

El estudio EUROASPIRE-II suministra información importante sobre el manejo de factores de riesgo y el uso de fármacos en 5.556 pacientes coronarios⁶. En estos pacientes los antiagregantes se utilizaban en el

47% en el ingreso y en el 90% al alta. Aunque en el estudio existía una alta prevalencia de factores modificables como la hiperlipidemia (70,3%), sólo el 43% de los pacientes recibieron tratamiento hipolipemiente.

Los escenarios clínicos de la aterotrombosis abarcan la enfermedad arterial coronaria, en forma de angina inestable, estable, o infarto agudo de miocardio, la enfermedad vascular cerebral y la enfermedad arterial periférica. El tratamiento de los eventos agudos es muy variable y depende de cada situación. En general se basa en una revascularización precoz, sea quirúrgica, intervencionista o farmacológica y posteriormente un tratamiento encaminado al mantenimiento de la permeabilidad, bien por procedimientos mecánicos (*stents*) o con tratamientos antitrombóticos, antiagregantes en general. Pero probablemente el camino a seguir en el futuro sea investigar en terapias que consigan disminuir el tamaño y aumentar la estabilidad de la placa. Estudios recientes muestran que la inflamación juega un importante papel en este aspecto.

Las plaquetas participan en todas las fases de la aterotrombosis, incluyendo los pasos iniciales de la aterogénesis, la progresión de las estrías grasas hacia las lesiones ateroscleróticas y las complicaciones trombóticas resultantes⁷. Es por ello por lo que el tratamiento “antiplaquetar” juega un papel importante en la prevención primaria y secundaria con nuevos antiagregantes cada vez más potentes y específicos, en la prevención de la trombosis asociada a la inestabilidad o rotura de la placa, aunque es también muy importante buscar estrategias que impidan que se lleguen a producir los mecanismos que desencadenan la trombosis.

Papel de las estatinas

Las estatinas (inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A) se consideran hoy en día la piedra angular del manejo de la dislipemia en prevención secundaria debido a su eficacia en la reducción del colesterol LDL². La eficacia de las estatinas en la reducción del colesterol LDL está mediada de manera predominante porque aumentan la actividad del receptor de las LDL produciendo un incremento en la captación hepática de lipoproteínas aterogénicas que contienen apoB (VLDL, IDL y LDL) además de inhibiendo parcialmente la síntesis hepática de VLDL. Adicionalmente produce un ligero incremento del colesterol HDL. Así, el tratamiento con estatinas puede restaurar el equilibrio entre lipoproteínas aterogénicas y antiaterogénicas, llevando a cambios beneficiosos en la composición, estructura y estabilidad de la placa aterosclerótica.

La evidencia clínica indica que este efecto reductor de las concentraciones de lípidos aterogénicos detie-

ne la progresión de la aterosclerosis y en condiciones de tratamiento intensivo con estatinas puede reducir la placa de ateroma².

Adicionalmente, las estatinas estabilizan la placa de ateroma, modifican su morfología y atenúan la inflamación. En el estudio PLAC I se observó que el tratamiento con pravastatina 40 mg/día producía una atenuación de la progresión documentada por angiografía. Esto se asociaba a una disminución del 60% del riesgo de infarto de miocardio⁸. En el estudio PLAC II el tratamiento con pravastatina en pacientes con enfermedad coronaria y carotídea, se asociaba a una disminución de la progresión del índice íntima/media de la arteria carótida. Esto se asociaba a una disminución de la mortalidad global y de infarto. En el estudio REGRESS se observó que el tratamiento con pravastatina (40 mg/d) producía una menor progresión de la aterosclerosis coronaria y menores eventos isquémicos⁹. También en los estudios REVERSAL y ASTEROID se observó que la rosuvastatina producía una reducción del volumen total de ateroma coronario evaluado por ultrasonografía intravascular.

El tratamiento con estatinas se ha asociado a una disminución del contenido lipídico, linfocitos T y macrófagos y metaloproteasas-2 de la matriz (MMP-2) de las placas. Además se ha observado en modelos animales hipercolesterolémicos familiares que el tratamiento con cerivastatina reducía el contenido y la activación de los macrófagos en la placa. En otros estudios experimentales, la estatinas también promovían la acumulación de las células musculares y de colágeno en la íntima, produciendo un incremento en la fortaleza de la placa.

Dado que la inflamación crónica juega un papel clave en la progresión de la aterosclerosis, los efectos antiinflamatorios de las estatinas pueden ser particularmente importantes¹⁰. El tratamiento con estatinas se asocia a una reducción de la proteína C reactiva ultrasensible (PCR), marcador clave de inflamación. En el estudio CARE, la pravastatina se asoció a una reducción de los niveles de PCR del 37,8%¹¹. Este efecto antiinflamatorio parecería depender de los efectos en los niveles de lípidos, pero también de efectos que no dependen de los niveles de lípidos, por efectos atenuantes de la respuesta inflamatoria.

Los efectos antiinflamatorios de las estatinas son de inicio rápido, ya que producen descenso de PCR sólo un mes después del tratamiento con atorvastatina, con disminución de la actividad proinflamatoria de células periféricas, de la infiltración macrofágica y de la expresión de factor nuclear kappa B y MCP-1 en las placas carotídeas¹². El cese rápido del tratamiento crónico con estatinas se ha asociado a un rápido incremento de PCR e IL-6.

Aunque de manera indirecta, se ha observado que las estatinas reducen la agregabilidad plaquetaria me-

dante cambios en los lípidos de las membranas. También se ha visto que las estatinas reducen la expresión de TF en macrófagos de las placas de ateroma y que en sujetos hipercolesterolémicos, el TF disminuye la generación de trombina dependiente de TF¹³.

Papel del ácido acetilsalicílico

El ácido acetilsalicílico tiene un papel establecido en la prevención de las complicaciones aterotrombóticas de la enfermedad cardiovascular y su administración debería ser rutinaria en pacientes con enfermedad vascular arterial.

El mecanismo de acción del ácido acetilsalicílico deriva de la inhibición de las ciclooxigenasas COX1 y COX2¹⁴. Estas enzimas catalizan la conversión del ácido araquidónico a eicosanoides fundamentales en la interacción entre la plaqueta y la pared vascular. Después de la ruptura de la placa de ateroma, el factor von Willebrand y el colágeno subendotelial se exponen a la sangre. La adhesión de las plaquetas estimula a activación plaquetaria, la unión del fibrinógeno a la glicoproteína IIb/IIIa en las plaquetas activadas y también se promueve la producción de ácido araquidónico vía fosfolipasa A2. LA COX1 cataliza la síntesis de tromboxano A2, que causa activación plaquetaria, vasoconstricción y proliferación de células musculares lisas. La COX2 controla la síntesis de prostaciclina, de efectos contrarios al tromboxano A2. Las plaquetas maduras expresan COX1, y las células endoteliales vasculares expresan COX1 y COX2. El tromboxano A2 se sintetiza y libera por las plaquetas en respuesta a diversos estímulos entre los que se encuentran el colágeno y el trombo e induce una agregación irreversible de las plaquetas.

El ácido acetilsalicílico reduce la activación y agregación de las plaquetas inhibiendo la COX1 y la formación de tromboxano A2, sin inhibir la prostaciclina. Además, la inhibición de la activación plaquetaria en los lugares de lesión vascular puede tener otras acciones indirectas, como la reducción de liberación de citocinas proinflamatorias¹⁴.

El ácido acetilsalicílico y las estatinas pueden sinérgicamente disminuir la activación de las plaquetas.

Combinación de estatinas más ácido acetilsalicílico en prevención secundaria

La combinación de estatinas y ácido acetilsalicílico puede reducir el riesgo de aterotrombosis (Figura 1). Los beneficios de las estatinas en los ensayos clínicos de prevención secundaria se observan sobre todo a partir del año de tratamiento². En cambio, los efectos del ácido acetilsalicílico son más precoces.

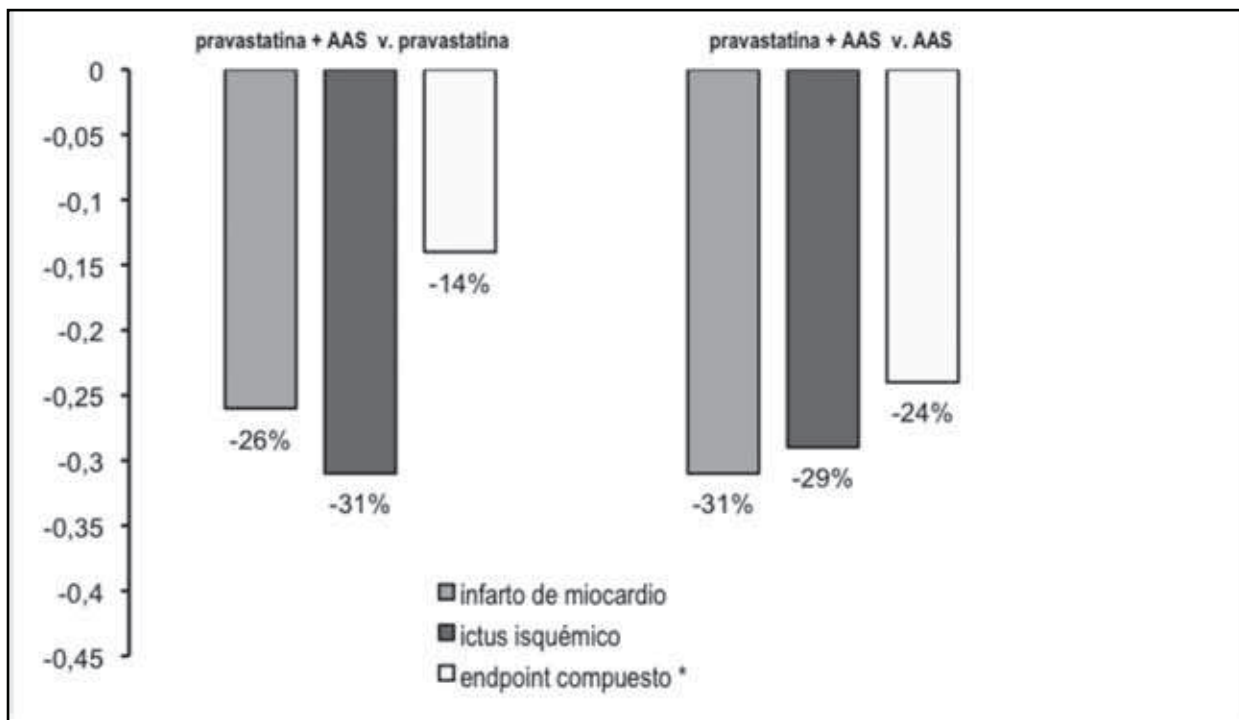


Figura 1. La combinación de la pravastatina + ácido acetilsalicílico produce mayor reducción del riesgo relativo de los endpoints cardiovasculares que la monoterapia. * Suma de muerte por enfermedad coronaria, infarto de miocardio, *bypass* coronario, angioplastia percutánea e ictus isquémico.

En un estudio realizado en prevención secundaria de todas las causas de mortalidad en pacientes con enfermedad cardiovascular isquémica, se mostró que la combinación de estatinas y ácido acetilsalicílico se asoció a una mayor reducción de la mortalidad¹⁵.

En un análisis a partir de datos de varios estudios en los que se incluyeron 73.900 pacientes se demostraron los beneficios de la asociación. Teniendo en cuenta los factores de riesgo basales como edad, sexo, infarto previo, tabaquismo, hipertensión y niveles lipídicos, la combinación de ácido acetilsalicílico y pravastatina mostró más eficacia que cualquiera de los 2 fármacos aislados en todos los endpoints cardiovasculares. Se observó una disminución de infarto fatal y no fatal del 31% sobre el ácido acetilsalicílico solo, y del 26% sobre la pravastatina sola.

Papel del cilostazol

El cilostazol es un fármaco inhibidor de la fosfodiesterasa III y tiene diversos efectos. Es antiagregante, vasodilatador, inhibe la proliferación y el crecimiento de las células musculares lisas vasculares, previene la trombosis y mejora el flujo arterial. También se han observado efectos beneficiosos en el perfil lipídico. Ha mostrado eficacia en la enfermedad arterial peri-

férica, con mejoría de la claudicación intermitente, y en la actualidad tiene indicación en este ámbito.

En un metaanálisis reciente, se ha evaluado la eficacia del cilostazol en 5.674 pacientes con aterotrombosis, 3.782 con enfermedad arterial periférica, 1.187 con enfermedad vascular cerebral y 705 con cardiopatía isquémica¹⁶. La incidencia de eventos vasculares se redujo (RR = 0,86; IC 95% 0,74-0,99) comparado con placebo, especialmente por la reducción de eventos cerebrovasculares (RR = 0,58; IC 95% 0,43-0,78) en los grupos que recibía cilostazol. Esto sin incremento de eventos adversos ni hemorragias graves.

También se ha evaluado el cilostazol en la prevención de la reestenosis después de intervenciones percutáneas coronarias, ya que, además de antiplaquetario, el cilostazol posee efectos inhibitorios de la hiperplasia de la neointima. En un metaanálisis de 23 ensayos (5.428 pacientes), el cilostazol se asociaba a una reducción en reestenosis (RR = 0,60 [0,49-0,73], $P < .001$) y a la necesidad de repetir revascularización (RR = 0,69 [0,55-0,86], $P = .001$). El cilostazol no incrementó el riesgo de trombosis de los *stents* ni de hemorragia¹⁷.

A falta de ensayos clínicos a gran escala, parece que el cilostazol tiene futuro en la prevención y en el tratamiento de la aterotrombosis.

Tabla 1. Resultados del estudio JUPITER¹⁹ según grupo de tratamiento

Endpoint	Rosuvastatina (n = 8.901)		Placebo (n = 8.901)		Riesgo (IC 95%)	p
	N.º pacs.	Tasa por 100 pacs./año	N.º pacs.	Tasa por 100 pacs./año		
Endpoint primario	142	0,77	251	1,36	0,56 (0,46-0,69)	< 0,00001
Infarto de miocardio	31	0,17	68	0,37	0,46 (0,30-0,70)	0,0002
Ictus isquémico	33	0,18	64	0,34	0,52 (0,34-0,79)	0,002
Revascularización coronaria + angor inestable	76	0,41	143	0,77	0,53 (0,40-0,70)	< 0,00001
Infarto, ictus o muerte cardiovascular	83	0,45	157	0,85	0,53 (0,40-0,69)	< 0,00001
Muerte por cualquier causa	198	1,00	247	1,25	0,80 (0,67-0,97)	0,02

La inflamación en la aterotrombosis

Existen evidencias de que la inflamación desempeña un papel relevante en todos los estadios del la aterotrombosis, incluyendo la ruptura súbita de placas aparentemente estables¹⁰. Componentes de la inmunidad innata y adquirida son relevantes en la progresión, y la interacción de la acumulación lipídica y la función inmune parecen promover la aterosclerosis prematura y la fisuración de las placas.

Al mismo tiempo, la evidencia acumulada de más de 20 estudios demuestra que la PCR ultrasensible (PCR) predice el riesgo de eventos cardiovasculares iniciales o recurrentes¹⁸. Los tratamientos y cambios en los estilos de vida que reducen el riesgo cardiovascular (abandonar tabaquismo, reducción de peso, ejercicio, estatinas) disminuyen la PCR, mientras que los fármacos que reducen el colesterol LDL pero no la PCR no han demostrado disminución en el riesgo cardiovascular (tratamiento hormonal sustitutivo, torcetrapib).

En la actualidad se desconoce si la inhibición de la inflamación *per se* es suficiente en la prevención de la aterotrombosis, ya que en los estudios con estatinas no es posible discriminar claramente el efecto antiinflamatorio del hipolipemiante, aunque existen evidencias experimentales que apoyan que la disminución de la inflamación puede ser muy relevante. Hasta el momento no existe un estudio dirigido a este punto, aunque hay datos en el estudio JUPITER interesantes en línea con estas ideas^{19,20}.

El estudio JUPITER se diseñó para ver si rosuvastatina 20 mg/d comparada con placebo era eficaz en prevención primaria en población con niveles bajos de LDL pero que mostraban aumento de la PCR (> 2 mg/L). Este grupo está fuera de las guías de prevención primaria con estatinas. Aproximadamente la mitad de los eventos isquémicos suceden en individuos con niveles de colesterol normales, y el 20% en individuos sin factores de riesgo mayores¹⁸. Por otra parte,

las estatinas, además de hipolipemiantes, muestran efectos antiinflamatorios, ya que reducen la adhesión celular, el reclutamiento monocítico en la pared endotelial, alteran la migración de las células musculares lisas en las placas en desarrollo, estabilizan la placa y reducen la producción de PCR inducida por IL-6 en hepatocitos^{18,21}. Finalmente existen evidencias de que las estatinas reducen la PCR de manera independiente de la reducción de la LDL en pacientes dislipémicos. En el ensayo AFCAPS/TexCAPS¹⁸, no se observaron beneficios de las estatinas en los pacientes con niveles bajos de LDL y PCR, aunque su redujeran los niveles de LDL con el tratamiento. Por el contrario, las estatinas fueron muy eficaces reduciendo eventos vasculares entre los que mostraron niveles normales o bajos de LDL, pero elevados de PCR. El efecto era independiente de la reducción de LDL.

El estudio JUPITER tuvo que ser detenido prematuramente ya que en el grupo tratado se produjo una disminución del 44% en la variable de eficacia primaria (infarto de miocardio, ictus, hospitalización, angor inestable, revascularización coronaria, o muerte cardiovascular) (Tabla 1). Además, la tasa de eventos en el grupo placebo fue incluso superior, ya que en otros ensayos de prevención se incluían individuos con hiperlipidemia, y en el estudio JUPITER eran individuos con PCR elevada. Esto apoya el hecho de que la inflamación pueda representar un papel más relevante que la propia hiperlipidemia. Además, se detectó una reducción en cada uno de los componentes de las variables primarias: reducción de infarto (54%), reducción de ictus (48%), reducción de necesidad de revascularización (46%) y reducción de mortalidad global (20%). El número de pacientes tratados con estatinas precisado para 1 caso de variable principal de eficacia (NNT: *number needed to treat*) en 5 años fue NNT = 32 para la variable principal de eficacia, incluso menor que el que se encontró en pacientes con hiperlipidemia (NNT = 50) o el encontrado en pacientes con hipertensión (NNT = 80-160)¹⁸.

Desde el punto de vista inflamatorio, el subgrupo más interesante en el estudio JUPITER fue el de aquellos pacientes que presentaban cifras elevadas de PCR, pero sin otros factores de riesgo principales. En este grupo con LDL bajas, HDL elevadas, sin diabetes, hipertensión, ni tabaquismo, el beneficio era similar al observado en todos los pacientes (HR 0,63, IC 95% 0,44-0,92). En consecuencia, el estudio JUPITER confirma los datos previos de los estudios PROVE IT-TIMI 22, A-Z y REVERSAL, que apoyan el concepto de “doble diana”: reducción del colesterol LDL y de la inflamación para maximizar los beneficios de las estatinas¹⁸.

En los próximos años, a pesar de la disminución importante de la incidencia de enfermedad cardiovascular, el coste de la aterotrombosis se incrementará sustancialmente debido a cambios demográficos y a las mejoras del manejo que prolongan la supervivencia tras un primer evento. Esto hace que deban plantearse estrategias que sean coste-efectivas en la profilaxis secundaria, como la combinación de estatinas y ácido acetilsalicílico u otros fármacos como el cilostazol.

Bibliografía

- Organización Mundial de la Salud. Informe sobre la salud en el mundo, 2002. <http://www.who.int/whr/2002/es/index.html>.
- Chapman MJ. From pathophysiology to targeted therapy for atherothrombosis: a role for the combination of statin and aspirin in secondary prevention. *Pharmacol Ther* 2007; 113: 184-96.
- Steg PG, Bhatt DL, Wilson PW, et al; REACH Registry Investigators. One-year cardiovascular event rates in outpatients with atherothrombosis. *JAMA* 2007; 297: 1197-206.
- Bhatt DL, Steg PG, Ohman EM, et al; REACH Registry Investigators. International prevalence, recognition, and treatment of cardiovascular risk factors in outpatients with atherothrombosis. *JAMA* 2006; 295: 180-9.
- Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, et al; INTERHEART Study Investigators. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*. 2004; 364: 937-52.
- EUROASPIRE II Study Group. Lifestyle and risk factor management and use of drug therapies in coronary patients from 15 countries; principal results from EUROASPIRE II Euro Heart Survey Programme. *Eur Heart J* 2001; 22: 554-72.
- Steinhubl SR, Moliterno DJ. The role of the platelet in the pathogenesis of atherothrombosis. *Am J Cardiovasc Drugs* 2005; 5: 399-408.
- Pitt B, Mancini GB, Ellis SG, Rosman HS, Park JS, McGovern ME. Pravastatin limitation of atherosclerosis in the coronary arteries (PLAC I): reduction in atherosclerosis progression and clinical events. PLAC I investigation. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26: 1133-9.
- Jukema JW, Bruschke AV, van Boven AJ, et al. Effects of lipid lowering by pravastatin on progression and regression of coronary artery disease in symptomatic men with normal to moderately elevated serum cholesterol levels. The Regression Growth Evaluation Statin Study (REGRESS). *Circulation* 1995; 91: 2528-40.
- Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1685-95.
- Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks F, Braunwald E. Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. The Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation* 1999; 100: 230-5.
- Martín-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Gómez-Hernández A, et al. Intensive treatment with atorvastatin reduces inflammation in mononuclear cells and human atherosclerotic lesions in one month. *Stroke* 2005; 36: 1796-800.
- Ferro D, Basili S, Alessandri C, Cara D, Violi F. Inhibition of tissue-factor-mediated thrombin generation by simvastatin. *Atherosclerosis* 2000; 149: 111-6.
- Patrono C, García Rodríguez LA, Landolfi R, Baigent C. Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis. *N Engl J Med* 2005; 353: 2373-83.
- Hippisley-Cox J, Coupland C. Effect of combinations of drugs on all cause mortality in patients with ischaemic heart disease: nested case-control analysis. *BMJ* 2005; 330: 1059-63.
- Uchiyama S, Demaerschalk BM, Goto S, et al. Stroke prevention by cilostazol in patients with atherothrombosis: meta-analysis of placebo-controlled randomized trials. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2009; 18: 482-90.
- Biondi-Zoccai GG, Lotrionte M, Anselmino M, et al. Systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials appraising the impact of cilostazol after percutaneous coronary intervention. *Am Heart J* 2008; 155: 1081-9.
- Ridker PM. Testing the inflammatory hypothesis of atherothrombosis: scientific rationale for the cardiovascular inflammation reduction trial (CIRT). *J Thromb Haemost* 2009; 7 Suppl 1:332-9.
- Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, et al; JUPITER Trial Study Group. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med* 2008; 359: 2195-207.
- Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, et al; JUPITER Trial Study Group. Reduction in C-reactive protein and LDL cholesterol and cardiovascular event rates after initiation of rosuvastatin: a prospective study of the JUPITER trial. *Lancet* 2009; 373: 1175-82.
- Davignon J. Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. *Circulation* 2004; 109 (23 Suppl 1): III39-43.

CASOS CLÍNICO-CITOLÓGICOS

COORDINADORES: A. LEMES. *Las Palmas de Gran Canaria*
L. GARCÍA. *Madrid*

CASO 1

LEUCEMIA AGUDA MIELOBLÁSTICA CON TROMBOCITOSIS E HIPERCALCEMIA

A. BERMEJO¹, A. CASTAÑEDA¹, D. LÓPEZ¹,
R. FLORES¹, M.T. PALOMO¹, A. RODRÍGUEZ¹,
P. MASSÓ¹, J.C. TARDÍO², S. ÁLVAREZ³

¹ Servicio de Hematología y Hemoterapia; ² Servicio de Anatomía Patológica; ³ CNIO. Hospital Universitario de Fuenlabrada (Madrid)

Motivo de consulta: Mujer de 49 años que acudió al servicio de urgencias por artralgias generalizadas y dolor en la columna vertebral irradiado a miembros inferiores, de 7 días de evolución, sin mejoría con analgésicos. Presentaba fiebre (38 °C), astenia y anorexia. Refería poliaquiuria, sin nicturia ni disuria. Ausencia de síntomas abdominales y hemorrágicos. En el servicio de urgencias se objetivó insuficiencia renal (creatinina: 3,44 mg/dL) y anemia normocítica (Hb: 59 g/L), junto con bacteriuria, que sugirió un probable foco genitourinario.

Antecedentes personales: La paciente era originaria de Guinea Ecuatorial y residía desde hacía 28 años en España, sin haber realizado viajes a su país desde entonces. Cesárea 10 años atrás. Miomas uterinos. No tomaba medicamentos de forma habitual. Fue diagnosticada de un cuadro de pielonefritis aguda 5 meses antes. En el hemograma de entonces presentaba: Hb: 91 g/L; VCM: 89,9 fL; Plt: 349 × 10⁹/L y leucocitos 7,2 × 10⁹/L (neutrófilos: 81,8%; linfocitos: 9,2%; monocitos: 8,6%), sin alarmas morfológicas.

Exploración física: Ta: 37,7 °C. TA: 157/88. Consciente y orientada. Sequedad de mucosas. Auscultación cardíaca y pulmonar sin alteraciones. Abdomen blando, depresible, no doloroso a la palpación y sin objetivarse visceromegalias; ruidos hidroaéreos conservados. Puñopercusión renal negativa. No se palpaban adenopatías. Sin edemas en extremidades inferiores; pulsos pedios presentes. Aparato locomotor: dolor a la palpación de la musculatura paravertebral sin apofisalgia. Fuerza, tono y sensibilidad conservadas de forma simétrica.

Pruebas complementarias: Bioquímica urgente: urea: 113 mg/dL; glucosa: 108 mg/dL; creatinina: 3,44 mg/dL; bilirrubina total: 0,30 mg/dL; sodio: 138,0 mEq/L; potasio: 2,9 mEq/L; ALT (GPT): 33 U/L; LDH: 447 U/L (normal < 190 U/L) y gammaglutamiltransferasa (GGT): 136 U/L.

Orina: densidad: 1015; pH: 7,5; glucosa semicuantitativo: negativo; cuerpos cetónicos: negativo; proteí-

nas: positivo (+1); bilirrubina: negativo; urobilinógeno: indicios; hemoglobina: positivo (+3); leucocitos en orina: indicios; nitritos: negativo. Sedimento urinario: fosfatos abundantes; leucocitos: 5-10/c; hematíes: 10-15/c. Presencia de bacterias y células descamativas.

Hemograma: leucocitos: 12,5 × 10⁹/L (neutrófilos: 21,7%; linfocitos: 66,3%; monocitos: 6,0%; eosinófilos: 1,6%; basófilos: 4,5%). Hematíes: 1,80 × 10¹²/L; hemoglobina: 59 g/L; hematocrito: 17,5%; VCM: 97,4 fL; HCM: 32,8 pg; CHCM: 337 g/L; ADE: 18,2%. Reticulocitos: 1,33%; reticulocitos absolutos: 24 × 10⁹/L. Recuento de plaquetas: 663 × 10⁹/L. Alarma de células inmaduras, blastos linfoides y linfocitos variantes (analyzer LH750 de Beckmann-Coulter®).

Estudio de coagulación: tiempo de protrombina: 14,9 s; actividad de protrombina: 77%; INR: 1,20; fibrinógeno calculado: 4,72 g/L; APTT 28,4 s.

Coombs directo: negativo.

Revisión morfológica de la sangre y fórmula manual: neutrófilos: 34%; cayados: 3%; linfocitos: 33%; monocitos: 4%; blastos: 26%. Células blásticas de tamaño intermedio, redondeadas, con escaso citoplasma y amplio núcleo de cromatina laxa con uno o varios nucleolos. Neutrófilos displásicos (pseudo-Pelger). Serie roja con *rouleaux* y anisopoiquilocitosis, con presencia de dianocitos, esquistocitos, dacriocitos y eliptocitos. Trombocitosis con anisotrombia y plaquetas dismórficas (gigantes e hipogranulares, algunas con pseudonúcleo y otras con finas prolongaciones) Figura 1.

Bioquímica completa: estimación de filtrado glomerular: 17,6 ml/min/1,73 m². Urato: 7,9 mg/dL. Colesterol total: 184 mg/dL. Triglicéridos: 162 mg/dL. Proteínas totales: 6,8 g/dL. Albúmina: 3,1 g/dL. Calcio: 15,8 mg/dL. Calcio corregido con albúmina: 16,5 mg/dL. Fosfatasa alcalina: 433 U/L. PTH int: 15,13 pg/mL (N = 15-65). 25-(OH) vitamina D: 14 ng/mL (N = 20-32).

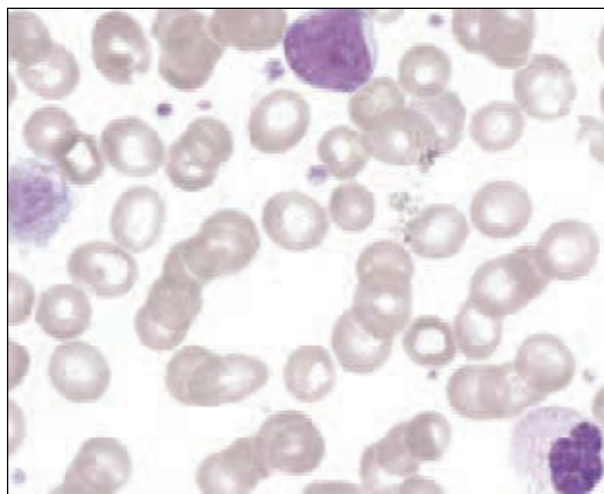


Figura 1. Sangre periférica con blasto, neutrófilo hiposegmentado y plaqueta gigante (Wright × 1.000).

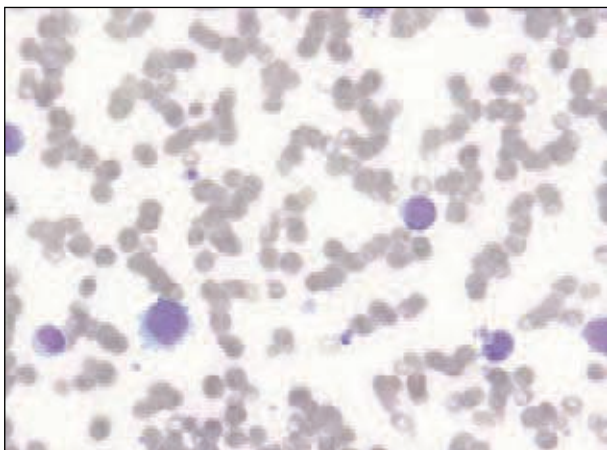


Figura 2. Médula ósea con blastos, en algunos casos con mamelones citoplasmáticos (Wright × 400).

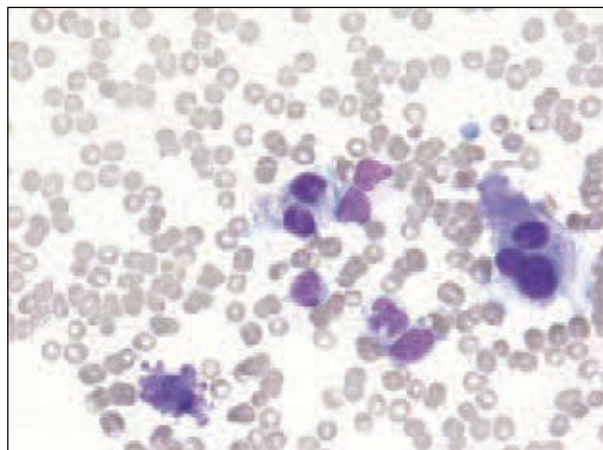


Figura 3. Médula ósea con blastos, acúmulos de plaquetas y megacariocitos displásicos (Wright × 400).

Proteína C reactiva (PCR): 4,3 mg/dL (N < 0,5). Marcadores tumorales negativos.

Proteinograma: hipoalbuminemia con patrón electroforético normal.

Serologías víricas: VHB, VHC y VIH negativos.

Serie ósea: no se observan lesiones líticas.

Aspirado de médula ósea: destacaba un grumo en el que no podíamos cuantificar correctamente el grado de celularidad. *Descripción microscópica:* masivos acúmulos de plaquetas muy dismórficas; escasa celularidad constituida mayoritariamente por serie mieloide madura y displásica, y por células blásticas de tamaño variable, con frecuencia de tamaño pequeño, y de morfología regular, redondeada o ligeramente poligonal; el citoplasma era escaso, en general agranular y ocasionalmente con chichones (*blebs*); núcleo grande y en general redondeado con uno o varios nucléolos (Figura 2). Megacariocitos muy disminuidos, pero no ausentes, displásicos (Figura 3); se observaban micromegacariocitos y un megacarioblasto binucleado. *Mielograma:* serie mieloide: 43%; serie linfoide: 5%; serie roja: 1%; blastos: 46%; monocitos: 3%; micromegacariocitos: 2%. *Tinciones citoquímicas:* Perls no valorable. Peroxidasas: blastos positivos con punteado grueso; plaquetas positivas. NASDCL (cloroacetato esterasa): blastos con fino punteado muy débil. PAS: blastos negativos; plaquetas con mazacotes positivos. Fosfatasa ácida: 17% de blastos positivos, de forma difusa y débil. *Conclusión:* muestra sin grumo y con numerosos acúmulos plaquetarios, con presencia de blastos peroxidasa negativos y PAS negativos: *leucemia aguda peroxidasa negativa, probablemente MO de la clasificación FAB.*

Biopsia de médula ósea (BMO): las secciones histológicas mostraban una médula ósea hiper celular y compacta, con una ocupación masiva por blastos de tamaño mediano con un núcleo redondo y con nu-

cléolos marcados (Figura 4). Los blastos eran mayoritariamente positivos con el CD34 y algunos marcaban MPO (Figura 5). Entre las células neoplásicas había elementos de otras series hematopoyéticas: destaca el aumento de serie megacariocítica, con presencia de megacariocitos pequeños e hipobulados (Figura 6). Fibrosis reticulínica de grado III y fibrosis colágena incipiente. Diagnóstico: cilindro de BMO con un proceso mieloblástico histológicamente compatible con el diagnóstico de leucemia mieloblástica aguda.

Citometría de flujo: en la celularidad global de la muestra recibida altamente contaminada con sangre periférica identificábamos un 31% de células CD45+ intermedias: con expresión de CD34, patrón heterogéneo con pérdida de intensidad para CD38, negatividad para CD19, CD10, CD2, CD7, CD4, CD8, CD3 de mem-

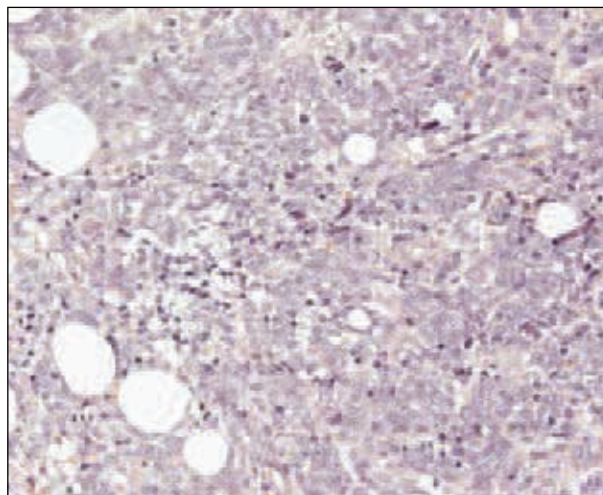


Figura 4. Histopatología de médula ósea con proliferación blástica (HE × 100).

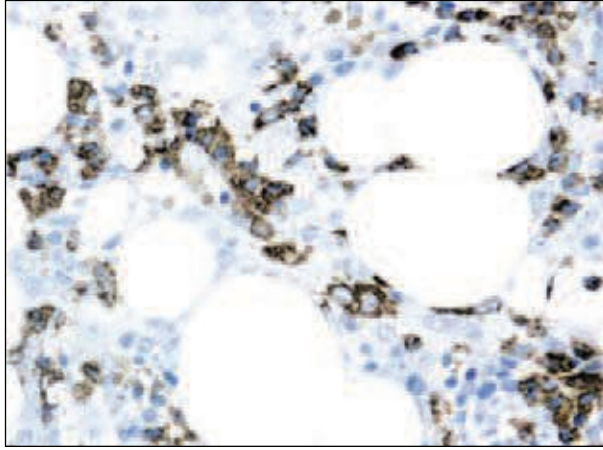


Figura 5. Inmunohistoquímica de médula ósea, con presencia de blastos, algunos de los cuales marcan mieloperoxidasa (MPO \times 100).

brana, CD79 alfa; un 3% expresaban MPO, con expresión un 14% de HLA-DR, expresión de CD13, CD33 y negatividad para CD7, CD61, CD11b, CD14, CD56, CD117 y CD65. Como conclusión, en esta muestra se identificaban un 31% de blastos CD34+ con expresión de CD13 y CD33 y con un 3% de MPO, siendo compatible con leucemia aguda mieloblástica (LAM).

Citogenética: cariotipo por bandas GTG: se analizaron 6 metafases con la siguiente fórmula cromosómica (Figura 7):

- 46,XX(1)
- 46,XX, t(3;3)(q21;q26),del(22)(q11)(3)
- 47,XX,t(3;3)(q21;q26),del(22)(q11),+22(2)

Se detectaba, además de una célula normal, la presencia de dos clones celulares, con 46 y 47 cromosomas respectivamente, con la translocación que impli-

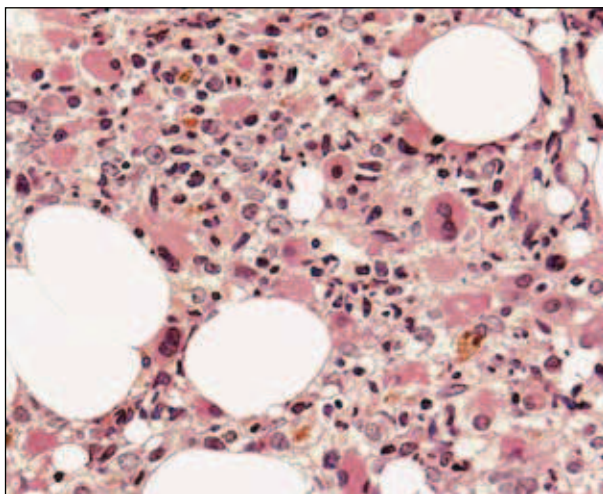


Figura 6. Histopatología de médula ósea con numerosos megacariocitos displásicos (PAS \times 100).

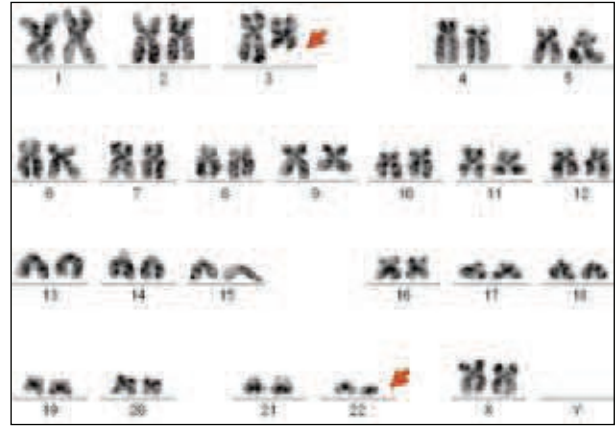


Figura 7. Cariotipo de bandas GTG: 46,XX,t(3;3)(q21;q26),del(22)(q11).

ca a los brazos largos de ambos cromosomas 3 y una delección del brazo largo del cromosoma 22. Además, el segundo clon presentaba un cromosoma 22 extra. Estas alteraciones son compatibles con el diagnóstico de LAM.

FISH: sonda de doble fusión para la translocación t(9;22)(q34;q11.2) con reordenamiento de los genes BCR/ABL: muestra negativa para la translocación, pero compatible con la presencia de una copia extra del cromosoma 22 en el 60% de los núcleos analizados.

Biología molecular: estudio de translocaciones específicas mediante retrotranscripción y PCR en tiempo real: negatividad de PML/RAR α característicos de la translocación t(15;17), negatividad de AML1/ETO característico de la t(8;21), BCR/ABL p210 característico de la t(9;22) no detectable y CBF/MYH11 característico de la inv(16) negativo. Expresión de RNA mediante retrotranscripción y PCR en tiempo real de la proteína del sarcoma de Wilms WT1 positivo. Estudio de las duplicaciones en tándem de FLT3 no detectadas. Estudio de las mutaciones del exón 12 del gen NPM1 mediante PCR en tiempo real y sondas de hibridación no detectadas.

Diagnóstico: leucemia aguda mieloblástica con inv(3)(q21;q26.3) o t(3;3)(q21;q26.2), nuevo subgrupo de la clasificación WHO de 2008, dentro del epígrafe de las leucemias agudas mieloides con anomalías genéticas recurrentes (código 9869/3).

Evolución médica: La paciente ingresó con los diagnósticos de leucosis aguda, fracaso renal agudo, hipercalcemia severa y sospecha de sepsis de origen urinario. Se trasladó a la UCI para estabilizar su situación clínica y la hipercalcemia con hidratación y calcitonina. Inició un ciclo de inducción 3 + 7 con daunomicina-Ara-C. Se consiguió corregir la hipercalcemia severa. Entró en fase de aplasia, con fiebre, que requirió antibioterapia empírica de amplio espectro; precisó transfusiones de plaquetas casi a diario, sin manifestaciones hemorrágicas.

Tras la primera inducción, se realizó una reevaluación diagnóstica, encontrando falta de respuesta, por lo que recibió ciclo de reinducción con FLAG-Ida, que provocó una aplasia muy severa y prolongada. En el aspirado de reevaluación, realizado a los 2 meses del ingreso, se observaba escasa celularidad, contándose entre el 1 y el 5% de células blásticas, con frecuencia de tipo II. La citometría era compatible con una médula en regeneración, con aumento de monocitos, en la que se identificaba una población blástica residual (2%) de su proceso de base. La biología molecular mostró expresión de WT1 del 8%.

Comenzó entonces intensificación con Ara-C a altas dosis (2 ciclos). En los aspirados de reevaluación no se obtuvo grumo y había poca celularidad, con un 2-3% de blastos. Tras el primer ciclo, la EMR era del 1% por citometría, con citogenética normal. Tras el segundo ciclo, se detectó expresión de WT1 del 2,7%, y en la citogenética reapareció 1/16 metafases con t(3;3).

Se planteó como consolidación un Alo-TMO de DNE. Mientras se realizaba la búsqueda se administró un nuevo ciclo de FLAG-Ida, constatándose refractariedad en la reevaluación, con el 40% de blastos.

Recibió entonces clofarabina-Ara-C como uso pasivo. Durante la aplasia de este ciclo la paciente desarrolló complicaciones de aspergillosis pulmonar invasiva y sepsis por *Pseudomonas aeruginosa*, deteriorándose su situación clínica hasta producirse el exitus, en situación de refractariedad, a los 11 meses del diagnóstico.

Discusión: Presentamos este caso por la coincidencia llamativa de 2 formas inusuales de presentación de la leucemia aguda mieloblástica: la asociación con trombocitosis y el desarrollo de hipercalcemia.

Además, esta LAM conlleva una alteración genética y molecular concomitante, la t(3;3) (q21;q26), recogida en la nueva clasificación WHO de 2008 de las neoplasias hematológicas dentro del epígrafe "leucemias mieloides agudas con anomalías genéticas recurrentes", con unas características biológicas y clínicas particulares.

Finalmente, en esta leucemia también puede discutirse si estaba precedida o no de mielodisplasia, ya que presentaba anemia 5 meses antes. La alteración citogenética detectada en nuestra paciente también puede observarse en los síndromes mielodisplásicos y mieloproliferativos. Las alteraciones adquiridas del brazo largo del cromosoma 3 en las bandas q21 y q26 se han descrito en el 2-6% de los pacientes con neoplasias mieloides⁷.

La leucemia aguda con t(3;3) se encuadra en un nuevo grupo de la clasificación de la OMS, dentro de las leucemias agudas mieloides con anomalías genéticas recurrentes⁶: leucemia aguda mieloides con inv(3) (q21;q26.3) o t(3;3) (q21;q26.2); RNP1-EVI1 (cod: 9869/3). Estas alteraciones consisten bien en una inversión paracéntrica de 3q o bien en una translocación entre los 2 brazos largos de ambos cromosomas

3 homólogos. Estas leucemias son raras: se han descrito estas anomalías cromosómicas en el 0,5-2% de las LAM⁴.

Este tipo de leucemia se presenta en muchas ocasiones con un recuento normal de plaquetas en sangre, e incluso con trombocitosis, mientras que en la médula ósea se observan megacariocitos atípicos con núcleo mono o bilobulado, más una displasia multilinea asociada.

Entre las características biológicas de la LAM asociada a t(3;3) concretamos los siguientes datos:

- Anemia y con frecuencia cifra de plaquetas normal o elevada (alrededor de un 50% presentan cifras de plaquetas $> 150 \times 10^9/L$)⁴.

- Puede presentarse *de novo* (en el 40% de los casos) o estar precedida de una fase de mielodisplasia, muchas veces breve⁴.

- Morfología en la que destaca en sangre periférica la presencia de neutrófilos hipogranulares y/o con pseudo-Pelger, con o sin blastos, hematíes con escasas anomalías, y plaquetas gigantes e hipogranulares⁶. En la médula ósea, los blastos presentan características morfológicas y citoquímicas que pueden corresponder a LAM sin maduración, leucemia aguda mielomonocítica o leucemia aguda megacarioblástica. El único subtipo de la FAB con el que no se ha relacionado es la M3⁴. Destaca la displasia multilinea, especialmente megacariocítica, con número de megacariocitos normal o aumentado, y con predominio de formas pequeñas, mono o bilobuladas⁶.

- Celularidad y fibrosis medulares en grado variable⁶.

- Inmunofenotipo donde los blastos expresan CD13, CD33, HLA-DR, CD34 y CD38⁶. En una revisión reciente de 27 pacientes⁸ se indica que en más del 80% de los pacientes el inmunofenotipo predominante incluye los antígenos panmieloides CD33, CD13 y CD117, así como también los marcadores inmaduros CD34 y HLA-DR; el CD38 sólo se expresaba en el 28% de los casos. En esta serie se detectó también expresión en un 35-50% de los casos de CD11c, CD7, CD56 y MPO. Todos estos datos sugieren que los casos de leucemia aguda mieloides con inv(3) (q21;q26.3) o t(3;3) (q21;q26.2) derivan de precursores hematopoyéticos relativamente indiferenciados.

Desde el punto de vista genético están implicados el oncogén EVI1 (3q26.2) y RNP1 (3q21), que intensificaría la expresión de EVI1 (*ecotropic virus integration site 1*), ocasionando proliferación celular y alteración de la diferenciación. Se suelen asociar otras alteraciones citogenéticas secundarias como la monosomía 7, del 5q y cariotipos complejos. Puede también adquirirse la translocación en la fase acelerada o crisis blástica de una LMC, y también se ha descrito en policitemia vera y mielofibrosis con metaplasia mieloides⁴.

Desde el punto de vista clínico, se considera una leucemia agresiva, con mal pronóstico y escasa supervivencia

cia (5,5 meses de media). La respuesta a los tratamientos convencionales es muy escasa o nula. En la serie de Testoni⁴, el 90% de los pacientes fueron resistentes a la primera línea de quimioterapia convencional, y los casos que consiguieron remisión completa precisaron más de una línea de tratamiento o trasplante alogénico. Se han postulado combinaciones terapéuticas que incluyen trióxido de arsénico, fármaco que ha obtenido respuestas en síndromes mielodisplásicos con expresión de la oncoproteína EVI1^{5,3}.

La otra característica llamativa de este caso es la presentación inicial con hipercalcemia. La hipercalcemia asociada a la LAM es un fenómeno raro, con una prevalencia aproximada de un 2% de todas las leucemias para algunos autores¹. Ha sido descrito en los subtipos de la FAB M4, M5, M6 y M7, así como también en la LMC en crisis blástica^{1,2}.

No siempre se asocia a lesiones osteolíticas. Puede haber afectación ósea difusa, mielofibrosis asociada y reacción perióstica.

El mecanismo de la hipercalcemia no está claramente definido, y no es el mismo en los diferentes casos descritos. En muchos casos se considera una etiología multifactorial. Al igual que en otras neoplasias hematológicas, se han constatado y/o postulado los siguientes mecanismos fisiopatológicos^{1,2}:

- Producción anormal de PTH por las células mieloides.
- Producción de péptido relacionado con PTH.
- Elevación de 1,25(OH)₂ vitamina D.
- Actividad osteolítica local secundaria a destrucción ósea por la infiltración leucémica, mediada por citocinas.

El tratamiento de la hipercalcemia conlleva hidratación, uso de bifosfonatos como el pamidronato o de hormonas como la calcitonina y, por supuesto, el tratamiento quimioterápico específico de la enfermedad del paciente, LAM en el caso que nos ocupa.

Para recordar

- Se debe considerar la posibilidad de una leucemia aguda mieloides con inv(3) o t(3;3) ante una leucemia aguda que se presenta con trombocitosis e intensa displasia. Esta alteración está recogida en la nueva clasificación de la OMS de 2008, dentro de las leucemias agudas mieloides con anomalías genéticas recurrentes.
- Los pacientes afectados por leucemia aguda mieloides con inv(3) o t(3;3) deben ser considerados de muy alto riesgo.
- Casos como el que presentamos refuerzan la importancia de la integración de los estudios citomorfológicos, las técnicas citoquímicas, el inmunofenotipo, la citogenética y la biología molecular a la hora de tipificar correctamente las leucemias agudas.

Bibliografía

1. Gewirtz AM, Stewart AF, Vignery A, Hoffman R. Hypercalcemia complicating acute myeloid leukemia: a syndrome of multiples aetiologies. *Br J Haematol.* 1983; 54: 133-141.
2. Qayed M, Ahmed I, Valentini RP, Cushing B, Rajpurkar M. Hypercalcemia in Pediatric Acute Megacaryocytic Leukemia. Case report and review of the literature. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2009; 31: 373-376.
3. Shackelford D, Kenific C, Blusztajn A, Waxman, Ren R. Targeted degradation of the AML1/MDS/EVI1 oncoprotein by Arsenic Trioxide. *Cancer Res* 2006; 66: 11360-9.
4. Testoni N, Borsaru G, Martinelli G, Carboni C, Ruggeri D, Ottaviani E et al. 3q21 and 3q26 cytogenetic abnormalities in acute myeloblastic leukemia: biological and clinical features. *Haematologica.* 1999; 84: 690-694.
5. Raza A, Buonamici S, Lisak L, Tahir S, Li D, Imran M et al. Arsenic trioxide and thalidomide combination produces multi-lineage hematological responses in myelodysplastic syndromes patients, particularly in those with high pretherapy EVI1 expression. *Leukemia Research* 2004; 28: 791-803.
6. Arber DA, Bruning RD, Le Beau MM, Falini B, Cardiman JW, Porwit A et al. Acute myeloid leukemia with recurrent genetic abnormalities. En Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, eds. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, 4th ed. WHO Press; 2008: 116-117.
7. Granada I, Luño E, Ribera JM, Sanzo C, Sancho JM, Muñiz SG, Millá F. Translocation (3;10)(q26;q22): a new nonrandom abnormality in three patients with 3q26 involvement. *Cancer Genet Cytogenet.* 2000; 121: 99-100.
8. Medeiros BC, Kohrt HE, Arber DA, Bangs CD, Cherry AM, Majeti R, et al. Immunophenotypic features of acute myeloid leukemia with inv(3)(q21;q26.3) / t(3;3)(q21;q26.2). *Leukemia research* 2010; 34: 594-597.

CASO 2

CÉLULAS ATÍPICAS DE SERIE MIELOIDE NEUTRÓFILA CON BASTONES DE AUER Y ASTILLAS EN SANGRE PERIFÉRICA Y MÉDULA ÓSEA DE PACIENTE CON INFECCIÓN POR VIH

M.M. OSMA, B. MUIÑA, A. JEREZ, M.L. AMIGO, F.J. ORTUÑO, V. VICENTE
Servicios de Hematología y Oncología Médica. Hospital Universitario Morales Meseguer y Hospital Reina Sofía. Murcia

Motivo de consulta: Paciente de 29 años portador del VIH en tratamiento antirretroviral y diagnosticado de linfoma Hodgkin (LH), que consulta por fiebre y dolor abdominal.

Antecedentes personales: Sin interés hasta julio de 2007, cuando ingresa en nuestro centro por fiebre prolongada, poliadenopatías, esplenomegalia y pancitopenia, siendo diagnosticado de infección VIH avanzada (CD4: 108/ μ L; carga viral: 225.000 copias/mL), por lo que inició tratamiento con triple terapia antirretroviral (efavirenz, emtricitabina y tenofovir). Además, presentó: a) sífilis latente (TPHA positivo RPR positivo), por lo que fue tratado con penicilina G benzatina; b) tuberculosis (Mantoux +) tratado con antituberculosos de forma empírica, y c) IgG anti-Leishmania positivo. Otras serologías fueron: anti-VHC negativo, HBsAg negativo, IgG anti-HBs positivo y anti-HBc positivo. Un aspirado medular mostró hiperplasia de series eritroide y megacariocítica, rasgos megaloblásticos y diseritropoyéticos, y ausencia de parásitos. En noviembre de 2007 reingresa por deterioro de su estado general, objetivándose adenopatías cervicales bilaterales, hepato-esplenomegalia gigante y pancitopenia, siendo diagnosticado tras biopsia de adenopatía cervical de un LH de tipo esclerosis nodular en estadio IV-B sin afectación medular. Inició tratamiento con ABVD hasta completar 6 ciclos en abril de 2008. Desde entonces ha permanecido en respuesta completa con normalización del hemograma. El paciente ha tenido un cumplimiento persistentemente irregular del tratamiento antirretroviral.

Enfermedad actual: Remitido desde otro centro hospitalario ante la sospecha de leucemia aguda tras consultar por síndrome febril con focalidad digestiva (síndrome diarreico, náuseas, vómitos y dolor abdominal) de 2 semanas de evolución, trombocitopenia severa y leucocitosis con presencia de células atípicas en sangre periférica.

Exploración física: Consciente y orientado; buen estado general. Normohidratado y discreta palidez

mucocutánea. No se palpaban adenopatías significativas. ORL: hipertrofia amigdalар bilateral con placas pultáceas y lesiones hemorrágicas, lesiones herpetiformes en el techo del paladar. ACP: normal. Abdomen: hepatomegalia de 2 cm y esplenomegalia de 6 cm bajo el reborde costal. Exploración neurológica normal.

Pruebas complementarias: *Bioquímica plasmática:* glucosa: 149 mg/dL; ácido úrico: 4,5 mg/dL; pruebas de función renal y hepática en límites normales salvo LDH: 906 u.int/L (N < 378). Asimismo, destacaban un déficit sérico severo de ácido fólico (0,15 mUI/L), descenso de T4 con TSH normal y PCR elevada (36,8 mg/L). El proteinograma mostró unas PT 66 g/L, hipoalbuminemia 29 g/L e hipergammaglobulinemia policlonal IgG, IgA e IgM. En la bioquímica urinaria se constató proteinuria de 0,72 g/L. En el hemograma se objetivó: leucocitos: $67,4 \times 10^9/L$ (neutrófilos: 23%; linfocitos 5%; monocitos: 72%; eosinófilos: 0%; basófilos: 0%), hematíes: $2,59 \times 10^6/\mu L$; Hb: 8,5 g/dL; VCM: 92,8 fL; Plt $10 \times 10^9/L$. La cifra de reticulocitos era del 0,62% ($16 \times 10^3/\mu L$) y la VSG: 46 mm/1.^a h. El estudio básico de coagulación: actividad PT: 66%; INR: 1,26; TTPA: 1,13; fibrinógeno: 2,8 g/L y DD: 0,316 mg/L.

En el frotis de sangre periférica (SP) se evidenció la presencia de blastos indiferenciados (8%), blastos de tipo II (2%), y monocitosis absoluta a expensas de monocitos (55%) y promonocitos atípicos (25%) y de aislados elementos de serie mieloide semimadura y madura en los que esporádicamente se observaban bastones de Auer o astillas, que en ocasiones eran múltiples (Figuras 1 y 2).

El estudio de LCR objetivó: leucocitos: 20/ μL ; hematíes 0/ μL ; glucosa: 121 mg/dL; proteínas: 0,25 mg/dL y citología negativa para células neoplásicas.

Las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica mostraron una marcada inmunodepresión: células

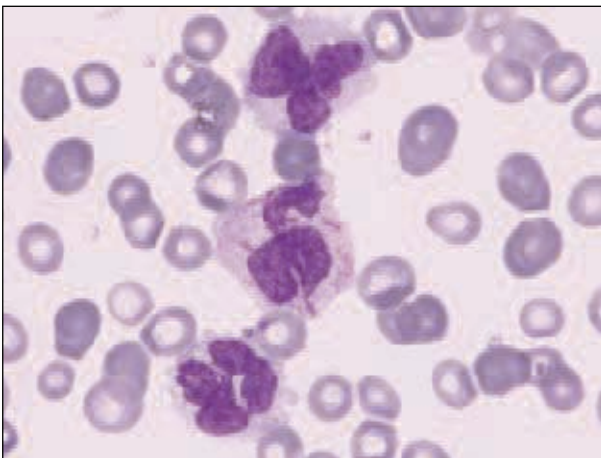


Figura 1. Frotis de sangre periférica: se observa un PMN-neutrófilo que contiene varios bastones de Auer (May-Grünwald-Giemsa).

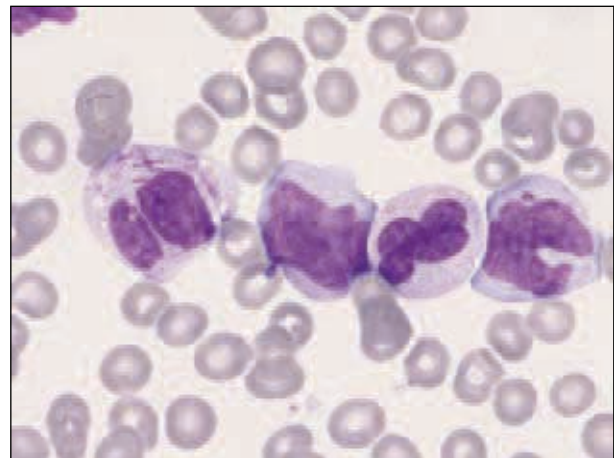


Figura 2. Frotis de sangre periférica: se aprecia un elemento de serie mieloide, con núcleo hendido, que contiene bastones de Auer formando empalizadas (May-Grünwald-Giemsa).

CD3+: 2,58% (1.008/ μ L); CD3+/CD4+: 0,78% (304/ μ L); CD3+/CD8+: 1,52% (594/ μ L); CD19+: 0,90 (351/ μ L); y la carga viral fue 282.810 copias/mL.

Las pruebas de imagen (ecografía abdominal y TAC) confirmaron la existencia de hepatoesplenomegalia homogénea de 22 cm. Una TAC cervical destacaba la presencia de bocio difuso y proliferación de tejido linfóide tanto en la amígdala faríngea como en la palatina, además de pequeñas adenopatías cervicales menores de 1 cm. Una TAC torácica objetivaba pequeños nódulos calcificados en el segmento apical del lóbulo inferior derecho, compatibles con granulomas.

El estudio medular mostró celularidad aumentada, a expensas de blastos atípicos con las siguientes características: a) Aproximadamente el 40% correspondía a blastos indiferenciados, de talla grande, alta relación N/C, cromatina finamente reticulada con contorno redondeado o irregular y uno o varios nucléolos de tamaño medio/grande; citoplasma basófilo, con frecuente vacuolización y fenómenos de clasmatisis. Algunos presentaban una fina granulación azurófila y ocasionalmente en otros se observaban aislados bastones de Auer. b) Otro 16% a expensas de blastos de talla grande, menor relación N/C, núcleo de cromatina finamente reticulada y contorno arriñonado en el que se apreciaban nucléolos de tamaño medio o grande. c) El 13% eran promonocitos y monocitos atípicos. d) Un 1% de blastos de tipo II. Asimismo destacaba una pequeña proporción de elementos de serie granulocítica semimadura y madura con rasgos megaloblásticos y bastones de Auer, aislados o bien formando empalizadas (Figuras 3 y 4). Los eosinófilos constituían el 5% de la celularidad global y presentaban alteraciones en la segmentación y en la granulación. El estudio

citoquímico mostró positividad para peroxidasa en aproximadamente el 20% de los blastos y para alfa-naftil-butirato-esterasas en otro 20%. Las cloroacetato-esterasas fueron positivas en el 58% de los elementos (incluyendo blastos y serie mieloide semimadura) así como en eosinófilos. Los gránulos de estos últimos mostraron además PAS positividad. El estudio inmunofenotípico de médula ósea demostró infiltración por dos poblaciones atípicas. Una con marcadores mieloides CD34+ que representaba el 15%, y coexpresaba CD33+, CD13++, CD15 \pm , HLA-DR, CD45My y citMPO+. La segunda, que suponía el 60%, constituía a expensas de elementos CD34-, CD13+, CD15+, Ia+, CD11b+, CD14+, CD64+, CD36+, CD45+Mo, citMPO+ y lisozima+.

El estudio con técnica de FISH objetivó negatividad para PML-RAR α y positividad para inversión 16(p13q22). Fue negativo el reordenamiento MLL, y se descartaron deleciones de los brazos largos de los cromosomas 5 y 7. La citogenética convencional confirmó los hallazgos del FISH y al mismo tiempo identificó una alteración adicional: el cariotipo fue 47,XY, +8, inv(16)(q13q22) en las 20 metafases analizadas. El estudio molecular cuantificó el número de copias de inv16 (4.240,00 copias) siendo la ratio inv16/abl 12,47%, y se descartó la mutación D816 en c-kit. Además, el estudio molecular confirmó negatividad para los transcritos bcr1, bcr2 y bcr3 del gen de fusión PML-RAR α . Adicionalmente, se descartaron duplicaciones internas en tándem o la mutación D835 en el gen FLT3, mutaciones en CEBPA o NPM1, y los niveles de BAALC fueron normales.

Diagnóstico: Leucemia aguda mielomonocítica M4 con eosinofilia de la clasificación FAB y leucemia

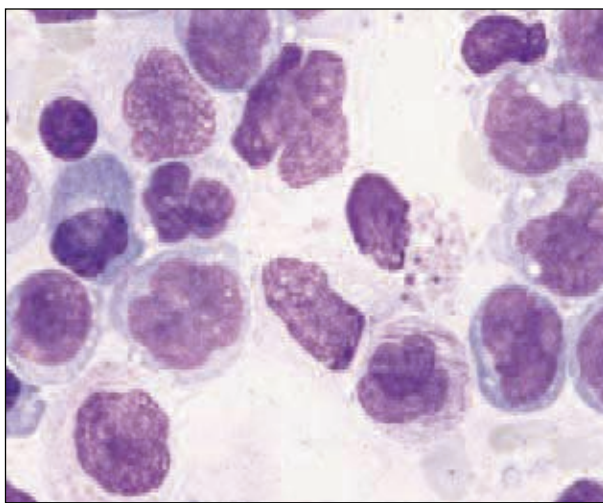


Figura 3. Frotis de médula ósea: blastos de aspecto monocitoide, mielocito eosinófilo en fase de desintegración y elemento de serie mieloide semimadura con bastones de Auer en empalizadas (May-Grünwald-Giemsa).

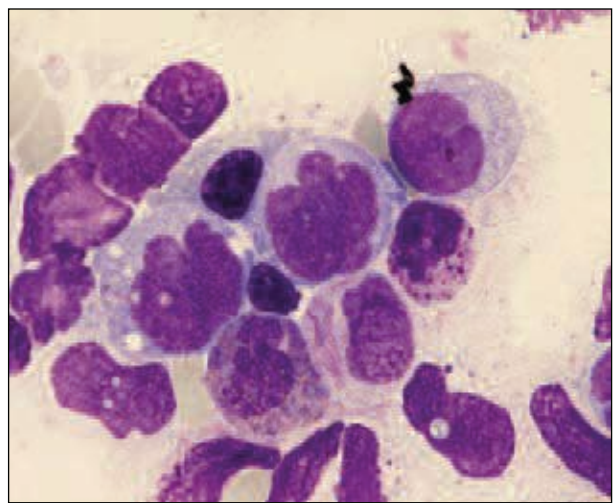


Figura 4. Frotis de médula ósea: blastos, eosinófilos patológicos con granulación preeosinófila y elemento de serie mieloide semimadura con bastones de Auer en empalizadas (May-Grünwald-Giemsa).

aguda mieloide relacionada con la terapéutica (código OMS 9920/3) con inversión 16 y trisomía 8.

Evolución: El paciente fue tratado según esquema de inducción IDICE del protocolo CETLAM consistente en: idarrubicina: 12 mg/m², días 1, 3, 5; Ara-C: 500 mg/m²/12 horas, días 1, 3, 5 y 7; y etopósido: 100 mg/m², días 1 a 3; con buena tolerancia. Como complicación más relevante, durante el periodo de aplasia presentó un cuadro de bronquiolitis por VRS que se resolvió con tratamiento.

Discusión: En la era TARGA la mortalidad por infecciones oportunistas es menos frecuente y cada vez un mayor número de infectados por el VIH mueren de cáncer no relacionado con SIDA, incluyendo LH y leucemia mieloide aguda (LMA)¹. A medida que más pacientes con infección por VIH sobreviven al tratamiento de las neoplasias, los efectos a largo plazo adquieren mayor importancia. La cronicidad de la infección por el VIH, el posible papel oncogénico del VIH en sí mismo y de otros virus como el VEB, el estilo de vida de tales pacientes y el propio envejecimiento de la población infectada por el VIH también contribuyen a incrementar el riesgo de segundas neoplasias. En este sentido, cabe recordar que la incidencia actual de LMA en pacientes VIH es el doble del de la población general.

En relación con nuestro caso, es bien conocido que los inhibidores de la topoisomerasa II empleados en el tratamiento del LH inducen leucemias secundarias y en pacientes VIH el periodo de latencia parece ser menor, asociándose además con un recuento de blastos alto y un fenotipo mielomonocítico o monocítico (M4 o M5). Las alteraciones cromosómicas y mutaciones en los genes encontrados en LMA relacionadas con terapia con inhibidores de la topoisomerasa II son generalmente aberraciones equilibradas que afectan a genes transcripcionales como el gen CBFβ en 16q22, y el tratamiento de consolidación con citarabina a dosis altas consigue remisiones prolongadas. El hallazgo citogenético de una trisomía 8 adicional, detectado en un 10-15% en este tipo de leucemias, no parece conferir peor pronóstico².

En 1906, el médico norteamericano John Auer describió la existencia de inclusiones intracitoplasmáticas, en forma de aguja o varilla, en una fracción de las células sanguíneas de un paciente diagnosticado de leucemia³. En la actualidad se acepta que los bastones de Auer se pueden ver en leucemias agudas mieloblásticas y monoblásticas⁴ y síndromes mielodisplásicos (SMD) con porcentajes elevados de blastos, pero nunca en condiciones normales o en estados reactivos no neoplásicos.

Se cree que los bastones de Auer resultan de la cristalización o ensamblaje de los gránulos de mieloperoxidasa en el citoplasma del mieloblasto leucé-

mico⁵. Los estudios de microscopía electrónica han mostrado similitudes estructurales entre los bastones de Auer y los gránulos citoplasmáticos. Citoquímicamente, los bastones de Auer son positivos para la peroxidasa, Sudán negro, cloroacetatoesterasa y fosfatasa ácida, pero son negativos para la lipasa, el glucógeno o los ácidos nucleicos. Estos hallazgos ultraestructurales y citoquímicos también apoyan el origen de los cuerpos de Auer a partir de los gránulos azurófilos. Se desconoce por qué los bastones de Auer nunca se ven en células no neoplásicas. De las diferentes hipótesis que se han propuesto en cuanto a la génesis de los bastones, destaca la que hace referencia a que la alteración del pH citoplasmático en determinadas células leucémicas permitiría la fusión de los gránulos, aunque se desconocen las condiciones que conducen a dicha alteración del pH.

Se ha descrito asimismo la existencia de bastones de Auer en células mieloides semimaduras y maduras (p. ej.: metamielocitos y polimorfonucleares neutrófilos), pero esta presentación es poco frecuente, habiéndose observado principalmente en pacientes con leucemia promielocítica aguda (LPA), sobre todo tras el inicio del tratamiento con ácido trans-retinoico (ATRA)⁶, y en leucemias mieloides con translocación t(8;21)(q22;q22). También se han encontrado PMN con bastones de Auer en LMA M2, M3, M4, M5, M6 e incluso en LMA sin maduración (M1)^{7,8}. Es concebible que el hallazgo de estas inclusiones en neutrófilos maduros sea más frecuente en leucemias de tipo M2, M3 o M4, porque los mieloblastos de estos tipos de leucemia son ricos en gránulos primarios. De hecho, es comúnmente aceptado que el hallazgo de astillas en empalizada se asocia al diagnóstico de leucemia aguda promielocítica, tanto en el momento del diagnóstico como en células más diferenciadas en pacientes que han iniciado terapia con ATRA⁶. Lo excepcional del presente caso es que, en el contexto de una LMA de nuevo diagnóstico con negatividad citogenética y molecular para reordenamientos de PML-RARα y con confirmación por las mismas técnicas para inv16, el estudio citológico tanto en la SP como en la medula ósea (MO) constatará la aparición de bastones y/o astillas, siendo en ocasiones tan numerosas que se disponían en empalizada en elementos de línea neutrófila con diferente grado de maduración. En este sentido, y hasta donde alcanza nuestro conocimiento, la presencia de bastones de Auer conspicuos o astillas en empalizada en LMA M4Eo o LMA con inv16 no había sido descrita previamente. Además, este hallazgo resulta particularmente inusual, ya que en las publicaciones consultadas^{4,5} y en relación con LMA no M3, se describe la presencia de un único bastón, excepcionalmente la existencia de múltiples bastones o más raramente aún de imágenes en empalizada^{8,9}.

Incluso en la era de la biología molecular, la presencia de esta peculiaridad morfológica puede aportar información pronóstica, pues diferentes estudios han demostrado que la presencia de bastones de Auer se asocia generalmente con buen pronóstico en la LMA⁷ y este pronóstico favorable parece ser independiente de la citogenética¹⁰. De igual modo, en la LMA infantil M1 la presencia de bastones de Auer es de valor pronóstico en términos de remisión y duración de la misma. Estos hallazgos pueden estar relacionados con el origen de los bastones de Auer en los gránulos azurofílicos, lo que sugiere que estas leucemias tienen una tendencia a mostrar diferenciación. Adicionalmente, esto podría explicar por qué en las células inmaduras de la práctica totalidad de LMA M0 o en las de las crisis blásticas de la leucemia mieloide crónica (LMC) no se observa este fenómeno.

Persisten las controversias sobre el lugar que ocupan los bastones de Auer en la clasificación de los SMD. Así, la FAB proponía el diagnóstico de anemia refractaria con exceso de blastos en transformación (AREB-t) tanto para aquellos casos de SMD con blastos que contienen bastones de Auer como para los que cumplen con el 21-29% de blastos en MO y/o $\geq 5\%$ de blastos en SP. Por otra parte, en la reciente clasificación de los SMD de la Organización Mundial de la Salud (OMS) la categoría de AREB-t ha sido eliminada al incluirse en el grupo de LMA; sin embargo, la presencia de bastones de Auer persiste como uno de los criterios que definen la AREB-2 y la leucemia mielomonocítica crónica de tipo 2 (LMMC-2). En este sentido, los actuales sistemas de puntuación en SMD señalan el porcentaje de células blásticas en MO como el más influyente de los factores pronósticos y la presencia o ausencia de bastones no parece alterarlo. La cuestión aún no resuelta se centra en aquellos casos con blastosis menores de 10% en MO o 5% en SP y si en tales casos la presencia de bastones de Auer implica una categoría aparte por conferir un pronóstico diferente¹¹, de forma similar a la situación descrita previamente en la AREB-t en el contexto de la clasificación FAB¹⁰.

En conclusión, se describe por primera vez un caso de LMA-t con inv16 y presencia de bastones de Auer conspicuos y astillas en empalizada en elementos de serie mieloide neutrófila, una morfología que es característica en la leucemia promielocítica. Los bastones de Auer representan una característica citológica única de las células leucémicas con diferenciación mieloide, independientemente de que éstas alcancen cierto grado de diferenciación. Es concebible que la mera presencia de bastones de Auer confiera una biología diferente a este tipo de neoplasias, y tal vez justifique su mención de forma específica.

Para recordar

- El hallazgo de bastones de Auer y, sobre todo, de astillas es característico aunque no patognomónico de la leucemia aguda promielocítica.
- Su aparición siempre indica un estado “neoplásico”.
- En leucemias agudas su presencia parece conferir buen pronóstico.

Bibliografía

1. Mani D, Dorer RK, Aboulafia DM. Therapy-related acute myeloid leukemia following HIV-associated lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma* 2009; 9 (4): 316-319.
2. Delaunay J, Vey N, Leblanc T, Fenaux P, Rigal-Huguet F, Witz F et al. Prognosis of inv16/t(16;16) acute myeloid leukemia (AML): a survey of 110 cases from the French AML Intergroup. *Blood* 2003; 102 (2): 462-469.
3. Auer J. Some hitherto undescribed structures found in the large lymphocytes of a case of acute leukemia. *Am J Med Sci* 1906; 131: 1002-1015.
4. Bainton DF, Friedlander LW, Shohet SM. Abnormalities in granule formation in acute myelogenous leukemia. *Blood* 1977; 49: 693-704.
5. Ackerman GA. Microscopic and histochemical studies on the Auer bodies in leukemic cells. *Blood* 1950; 5: 847-863.
6. Castaigne S, Chomienne C, Daniel MT, Ballerini P, Berger R, Fenaux P et al. All-trans retinoic acid as a differentiation therapy for acute promyelocytic leukemia. I. Clinical results. *Blood* 1990; 76 (9): 1704-1709.
7. Mertelsmann R, Tzvi Thaler H, To L, Gee TS, McKenzie S, Schauer P et al. Morphological classification, response to therapy, and survival in 263 adult patients with acute non-lymphoblastic leukemia. *Blood* 1980; 56 (5) 773-781.
8. Ohnishi H, Yoshino H, Yoneyama R, Ishii M, Watanabe T, Bessho F et al. Faggot formation in mature neutrophils and metamyelocytes in acute myeloid leukemia without maturation. *Pediatr Hematol Oncol* 2008; 25:165-170.
9. Guérin E, Mahon FX, Lippert E. Bundles of Auer rods in blast cells and mature neutrophils in a non-promyelocytic acute myeloblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 2008; 141(6): 749.
10. Seymour JF, Estey EH. The prognostic significance of Auer rods in myelodysplasia. *Br J Haematol.* 1993; 85: 67-76.
11. Willis MS, McKenna RW, Peterson LC, Coad JE, Kroft SH. Low blast count myeloid disorders with Auer rods; a clinicopathologic analysis of 9 cases. *Am J Clin Pathol* 2005; 124(2): 191-198.

CASO 3

UN PROBLEMA POLIFACÉTICO

M.^aP. RICARD¹, S. ÁLVAREZ²,
K. ARRIBALZAGA¹, M.^aJ. GARCÍA¹,
P. MARTÍNEZ¹, F.J. PEÑALVER PÁRRAGA¹,
L. VILLALÓN¹

¹ Servicio de Hematología. Hospital Universitario Fundación Alcorcón (Madrid).

² Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas Carlos III (CNIO). Madrid

Motivo de consulta: Varón de 69 años que acudió al servicio de urgencias por sangrado hemorroidal y cuya analítica mostró pancitopenia grave (leucocitos: $2,2 \times 10^9/L$; hemoglobina [Hb]: 55 g/L; plaquetas: $64,0 \times 10^9/L$) y que, tras ser transfundido, se remitió al servicio de hematología para estudio.

Antecedentes personales:

- HTA de larga evolución en tratamiento con lacidipino.
- Dislipemia en tratamiento con sinvastatina.
- Sangrado hemorroidal de varios años de evolución.
- Ex fumador desde hace mes y medio de 1-2 cigarrillos/día.
- Profesión: tapicero. Nunca utilizó productos tóxicos.

No presentaba pérdida de peso ni anorexia, pero sí astenia de 2-3 semanas de evolución y aumento de rectorragias, autolimitadas.

Exploración física: Coloración pajiza y palidez intensa de mucosas, leves edemas en tercio distal de miembros inferiores. Hemorroides externas inflamadas; no internas ni restos de sangre.

Exploraciones complementarias:

Hemograma (transfundido en urgencias): leucocitos: $2,25 \times 10^9/L$; neutrófilos: $0,8 \times 10^9/L$; linfocitos: $1,3 \times 10^9/L$; monocitos: $0,1 \times 10^9/L$; hematíes: $2,21 \times 10^{12}/L$; Hb: 77 g/L; hematocrito: 0,212; VCM: 95,8 fL; HCM: 34,9 pg; plaquetas: $135 \times 10^9/L$. Reticulocitos: $23,5 \times 10^9/L$.

Morfología en sangre periférica (SP): disgranulopoyesis (formas hipogranulares y rasgos megaloblastoides); serie roja con anisocitosis, esferocitos y dacriocitos; agregados plaquetarios y anisotrombia discreta con presencia de formas grises (desgranuladas).

Hemostasia: actividad de protrombina: 127% (80-120); INR: 0,80; APTT: 20 segundos (25-35); fibrinógeno: 2,73 g/L (1,5-4,0).

Bioquímica: todos los parámetros normales. Vitamina B₁₂ > 2.000 pg/mL (179-1.100); ácido fólico: 8,4 ng/mL (2,3-18,4). Hierro: 250 µg/dL (60-160); ferritina: 630 ng/mL (20-300); transferrina: 197 mg/dL (200-360). Serologías VHB-VHC-VIH: negativas. TSH: 2,11 µU/mL (0,47-4,68); T4 libre: 1,20 ng/dL (0,78-2,19).

Estudio de médula ósea (MO):

• Aspirado (Figura 1): hiper celular con rasgos displásicos, 24% blastos y marcada hipoplasia de la serie eritroide (1%). Diagnóstico: leucemia mieloide aguda (LMA) con cambios relacionados con mielodisplasia (OMS 2008).

• Inmunofenotipo: marcadores mieloides: CD117+, CD13+, CD33+, resto negativo. Perfil de diferenciación mieloide anómalo, intensa hipogranulación, incorrecta distribución de CD45, expresión anómala de CD5. El 20% eran células mieloides CD34+, CD117+, CD45+d, HLA-DR+, CD13+, CD33+, CD5+, CD38+ y MPO+ (sólo el 8%). Marcadores linfoides T CD5+, resto negativos. Marcadores linfoides B todos negativos.

• Citogenética (Figura 2): fórmula cromosómica: 47,XY,+11[20].

• FISH (Figura 2) (gen estudiado: MLL. Sonda utilizada: DAKO Cat# Y5401, tipo de sonda: separación de señales *-breakapart-*): tres señales de hibridación del gen MLL que confirmó la trisomía 11 observada por técnicas convencionales.

• Biología molecular:

– PML/RAR t (15;17), AML1/ETO t (8;21) y CBF/MYH11 (inv16): no detectados.

– RNA proteína del sarcoma de Wilms WT1: positivo.

– Duplicaciones en tándem del gen FLT-3 y mutaciones del exón 12 del gen NPM1: no detectadas.

Diagnóstico: Leucemia mieloide aguda con cambios relacionados con mielodisplasia (OMS 2008).

Tratamiento y evolución: Se realizó inducción con idarrubicina + arabinósido de citosina (I/A) 3/7. El estudio de MO en el día +14 mostraba los siguientes datos:

• Aspirado de MO: 45% de blastos de hábito mieloide sin bastones de Auer y 35% de serie mieloide con intensa displasia, serie roja < 1%. Diagnóstico: LMA refractaria.

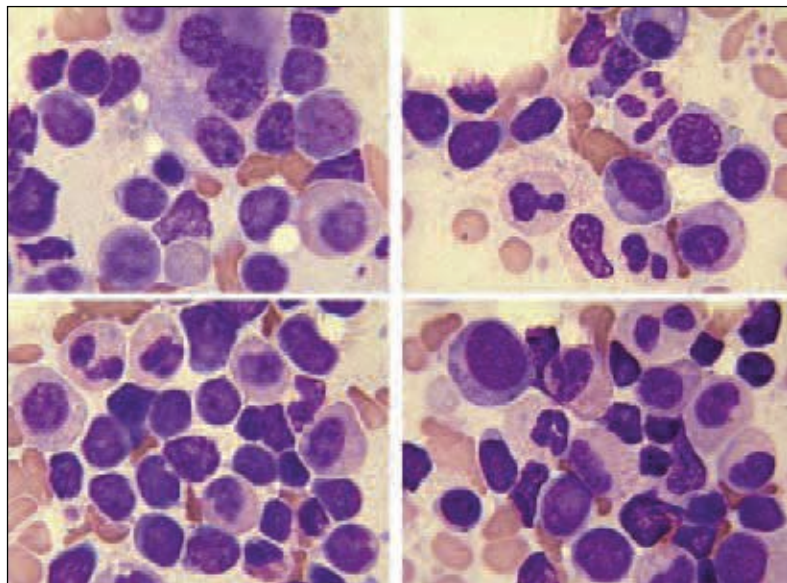


Figura 1. Aspirado de MO. LMA con cambios asociados a mielodisplasia (OMS 08). Displasia trilineal con un 24% de blastos e hipoplasia roja.

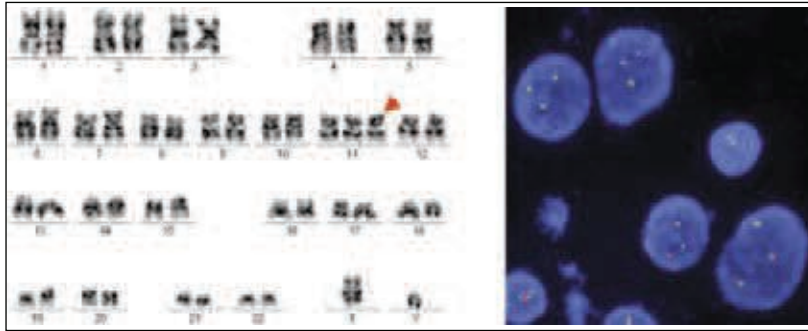


Figura 2. Leucemia mieloide aguda (LMA) con cambios asociados a mielodisplasia (OMS 08). Citogenética de MO (izda.). Fórmula cromosómica: 47,XY,+11. FISH MO (dcha.). Tres señales de hibridación del gen MLL por trisomía 11.

- **Inmunofenotipo de MO:** blastos mieloides 54%. De ellos, el 29% era una subpoblación de igual inmunofenotipo que al diagnóstico, y el 25% era una subpoblación más compleja, con menor intensidad de CD34, HLA-DR y CD117, con CD5- (que podría indicar cierto grado de diferenciación celular).

- **Cariotipo:** 47,XY,+11[20].

- **Biología molecular:** igual que al diagnóstico, con WT1 positivo.

Se procedió a reinducción con un segundo ciclo de (I/A) 3/7. El estudio de MO a los 14 días de la misma (día +28) mostró hipoplasia severa con 37% de blastos + promielocitos (30% de población blástica por inmunofenotipo), cariotipo con trisomía 11 (47,XY,+11[6]) y WT1 positivo por biología molecular. Pese a la situación descrita, el paciente alcanzó en la

salida de la reinducción una remisión óptica, con ausencia de blastos y citogenética con cariotipo normal en MO.

Evolución post-remisión: Tras un primer ciclo de consolidación con fludarabina + arabinósido de citosina (Ara-C) + idarubicina con filgrastim (FLAG-IDA), con buena tolerancia, se administró un segundo ciclo de consolidación con Ara-C a altas dosis. Posteriormente recibió mantenimiento con etopósido mensual hasta un total de 8 dosis.

Catorce meses tras el diagnóstico, el paciente acudió a control rutinario estando asintomático, con excelente estado general, llevando una vida muy activa y con la analítica siguiente:

- **Hemograma:** leucocitos: $22,95 \times 10^9/L$; Hb: 143 g/L; plaquetas: $63,0 \times 10^9/L$. La fórmula leucocitaria mostraba un 54% de células blásticas (Figuras 3A y 3B).

- **Bioquímica:** LDH: 944 U/L (240-480); resto normal.

- **Estudio de MO:**

- **Aspirado** (Figuras 3C y 3D): proliferación blástica del 87% de la celularidad, compatible con leucemia linfoblástica (LLA) de morfología L2. Los blastos no mostraban mieloperoxidasa (MPO) pero el 93% eran PAS positivos en grano fino y en mazacotes (Figura 4).

- **Inmunofenotipo:** marcadores mieloides CD15+: 35%; resto negativo. Marcadores linfoides T: todos negativos. Marcadores linfoides B: CD19+,

CD79 α +, TdT+ débil, cadena pesada μ c+ bimodal. El 84% eran células de pequeño tamaño CD19+, CD45+(d), HLA DR+, CD79 α +, TdT+ débil, cadena pesada μ c+ 67%, CD15+d 35%, CD34- (7%), CD10-, CD22s-, CD22ic-, CD24-, cadenas ligeras κ y λ -, CD117-, CD16-, CD56-, CD14-, CD61-, GlyA-. **Conclusión:** leucemia linfoblástica pre-B (B3 de la clasificación EGIL). No se apreciaron blastos mieloides con el inmunofenotipo de la LMA descrita previamente.

- **Citogenética** (Figura 5): con menos del 5% de células normales y presencia de varios clones con múltiples alteraciones cromosómicas estructurales, todos aparentemente derivados de un clon t(4;11)(q21;q23) inicial que implica los genes MLL y AF4 (ver fórmula cromosómica en Figura 5).

- **FISH** (Figura 6B): reordenamiento positivo para el gen MLL.

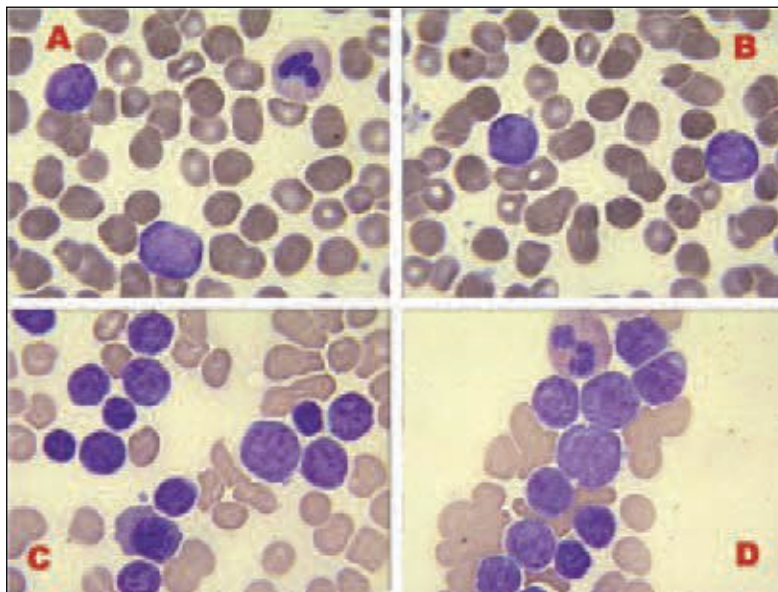


Figura 3. Diagnóstico de leucemia linfoblástica (LLA) morfología L2. Sangre periférica (A y B). 54% de blastos linfoides. Aspirado de MO (C y D). Celularidad hemopoyética desplazada por proliferación blástica del 87%.

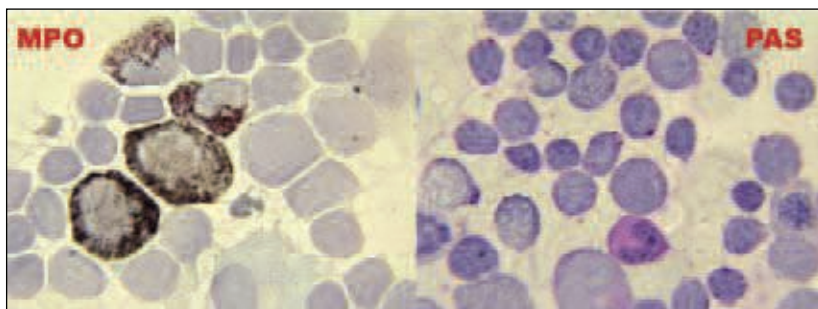


Figura 4. Aspirado de MO. LLA morfología L2. MPO: 100% de blastos negativos. PAS: 93% de blastos positivos en collarete (36% mazacotes).

– Biología molecular: BCR/ABL (p210 y p 190): negativo.

Diagnóstico: Leucemia linfoblástica B secundaria a tratamiento con t(4;11)(q21;q23) y MLL reordenado.

Tratamiento y evolución: Se pautó quimioterapia de inducción según protocolo de LLA-B de alto riesgo en adultos (PETHEMA LAL-AR 2003). El estudio de MO el día +14 mostró hipocelularidad con respuesta citológica (2% de blastos) y con enfermedad residual mínima menor de 0,001%. Posteriormente, el paciente desarrolló lesión peneana denudada, que progresó con edema escrotal y de piel prepucial sin crepitación clara, sugestivo de gangrena de Fournier, con *exitus letalis* a los 27 días del diagnóstico de LLA.

Discusión: Nuestro paciente sufrió inicialmente una LMA con cambios asociados a mielodisplasia (Figura 1) y trisomía 11 con ganancia funcional MLL (Figura 2). El paciente se comportó con refractariedad a la inducción, aunque logró remisión completa tras la reinducción (ambas con idarubicina y Ara-C), por lo que se decidió consolidar con fludarabina y mantener la respuesta con etopósido mensual.

Transcurridos 14 meses de este diagnóstico, presentó una LLA pre-B (Figuras 3 y 4) secundaria a tratamiento con t(4;11)(q21;q23), MLL reordenado (Figura 6) con AF4 en el contexto de un cariotipo complejo (Figura 5).

El gen MLL, situado en 11q23, codifica una proteína cuya función normal es la de un regulador transcripcional¹ con actividad histona metiltransferasa. Coordina tres mecanismos principales de modificación de la cromatina: metilación, acetilación y remodelado del nucleosoma². Parece que la amplificación del gen MLL sería el mecanismo citogenético de activación causante de carcinogénesis³, de forma que se bloquearía la diferenciación y se crea-

ría un *pool* de precursores preleucémicos rápidamente proliferativos, sobre los que se han de dar mutaciones secundarias para que este estado latente evolucione a una leucemia aguda (LA)². De hecho, las fusiones MLL aumentan la susceptibilidad a la influencia mutagénica² y las proteínas de fusión MLL son factores de transcripción aberrantes que activan la expresión génica².

La ganancia de cromosomas completos supone sobreexpresión de sus genes⁴, con un efecto dosis para los genes localizados en las regiones cromosómicas de ganancia asociadas con leucemogénesis⁵, pudiendo exhibir diferentes mecanismos de sobreexpresión, como duplicación cromosómica, amplificación génica o diferencias en la regulación transcripcional⁵.

Un 3,8% de las LMA tienen trisomía 11, y sus características más comunes son⁶:

- Menos de 60 años al diagnóstico.
- Anemia, y frecuentemente trombopenia.
- MO con un 26-91% de blastos y frecuente displasia; la mitad de los casos se clasifican como LMA con displasia multilínea (posibles todos los tipos FAB-OMS), y la tercera parte de los casos tenía síndrome mielodisplásico (SMD) previo.
- LDH aumentada en el 75% de los pacientes.
- Perfil inmunofenotípico de progenitor mieloide inmaduro CD34+, CD117+ y HLA-DR+, con CD34 en

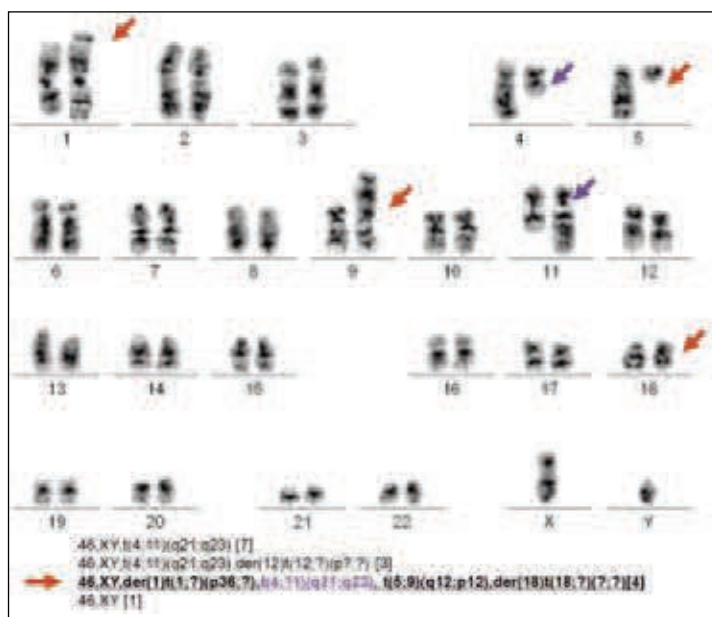


Figura 5. Citogenética de MO. LLA - Pre-B (B3-EGIL). Cariotipo complejo. Fórmula cromosómica. Metafase del clon indicado con flechas de color rojo. t(4;11)(q21;q23) destacada con flechas de color azul.

el 62% y CD117 en el 83% (coexpresados en el 33% de los casos) y CD15 en la tercera parte de los pacientes, datos que sugieren la afección de un precursor mieloide temprano.

- La trisomía 11 suele observarse en el contexto de cariotipos complejos (con frecuencia junto a otras anomalías citogenéticas habituales de SMD) y sólo es aislada en el 20% de casos.

- Mal pronóstico: remisiones completas: 43%, con supervivencia media de 2 meses.

Por estas características, se ha sugerido considerar la LMA *de novo* con trisomía 11 como una entidad específica asociada a mala evolución⁶, como muestran las curvas de supervivencia publicadas³. Nuestro paciente se presentó con trisomía 11 aislada y reunía inicialmente estas características, incluida la mala respuesta al tratamiento.

La LLA secundaria es infrecuente (2,3% de las LLA y 5-10% de las leucemias secundarias⁷) y muestra mayor frecuencia de alteraciones 11q23 que las LLA *de novo*⁸. El pronóstico de la LLA con t(4;11)(q21;q23) es muy grave. Ningún paciente con LLA secundaria con anomalía 11q23 ha sobrevivido a los 5 años en comparación con el 24% y 33% de supervivencia a los 5 años de los pacientes con LLA *de novo* con t(4;11) y con otras anomalías 11q23, respectivamente. Esta mala evolución es similar a la publicada en los pacientes con LMA secundaria^{7,8}.

Las epipodofilotoxinas son los agentes más frecuentemente asociados a las leucemias secundarias. El etopósido inhibe la topoisomerasa II y, en consecuencia, causa roturas en ambas cadenas de DNA. El *locus* 11q23 es particularmente susceptible a este tipo de daño en células tratadas con inhibidores de topoisomerasa II, de forma que las roturas se dan preferentemente en 11q23 en células en apoptosis temprana².

Para recordar

- Las translocaciones MLL son frecuentes en oncohematología y confieren a las células afectadas ventaja proliferativa y de supervivencia.
- Las anomalías MLL son interpretadas como mutaciones de ganancia funcional y son de pronóstico adverso. A menudo se asocian con antecedentes de uso de inhibidores de la topoisomerasa II y aumentan la susceptibilidad a la influencia mutagénica².
- La trisomía 11 se ha descrito en LMA y SMD tanto *de novo* como secundarios y es la tercera trisomía aislada más común en la LMA *de novo*, con una incidencia del 3,8% de las LMA⁶. La mitad de los casos se clasifican como LMA con displasia multilínea, y su perfil inmunofenotípico sugiere afectación de un progenitor mieloide temprano. Podría considerarse la LMA *de novo* con trisomía 11 como una entidad específica asociada a mala evolución⁶.
- La clasificación de la OMS 2008 reconoce las LLA secundarias a tratamiento, habitualmente asociadas a t(4;11)(q21;q23). El factor de riesgo terapéutico más ampliamente reconocido en las LA secundarias a tratamiento es la exposición previa del paciente a alquilantes e inhibidores de la topoisomerasa II (epipodofilotoxinas y antraciclina). La LLA secundaria es rara (estimada en el 2,3% de las LLA) y se asocia con edades avanzadas y predominio del inmunofenotipo pre-B⁷. Sólo el 5-10% de todas las LA secundarias son LLA⁸.

Agradecimientos

Deseamos expresar nuestro agradecimiento a la Dra. Cristina Serrano (Hematología, Fundación Jiménez Díaz, Madrid), por los estudios inmunofenotípicos.

Nuestro agradecimiento a la Dra. Teresa Vallespí (Hematología, Hospital General Vall d'Hebron, Barcelona), por su inestimable ayuda en la elaboración del manuscrito, y al Dr. Luis García Alonso (Hematología, Hospital de Getafe, Madrid) por su incondicional apoyo en las gestiones, figuras y texto.

Bibliografía

1. Aplan PD. Chromosomal translocations involving the MLL gene: molecular mechanisms. *DNA Repair* 2006; 5: 1265-1272.
2. Slany RK. The molecular biology of mixed lineage leukaemia. *Haematologica* 2009; 94: 984-993.

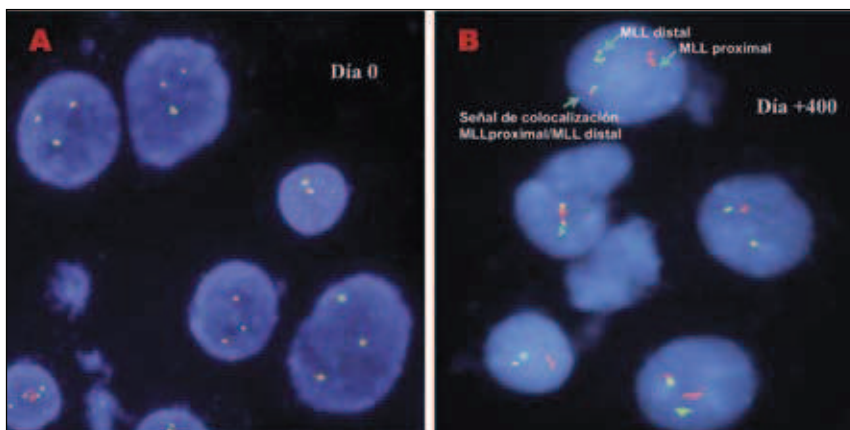


Figura 6. FISH de MO comparativo a los diagnósticos de LMA versus LLA. Gen estudiado: MLL. Sonda utilizada: DAKO Cat# Y5401. Tipo de sonda: separación de señales (*breakapart*).

3. Rege-Cambrin G, Giugliano E, Michaux L, Stul M, Scaravaglio P, Serra A, et al. Trisomy 11 in myeloid malignancy is associated with internal tandem duplication or both MLL and FLT3 genes. *Haematologica* 2005; 90: 262-4.
4. Schoch C, Kohlmann A, Dugas M, Kern W, Hiddemann W, Schnittger S, et al. Genomic gains and losses influence expression levels of genes located within the affected regions: a study on acute myeloid leukemias with trisomy 8, 11 or 13, monosomy 7, or delecion 5q. *Leukemia* 2005; 19: 1224-8.
5. Alvarez S, Cigudosa JC. Gains, losses and complex karyotypes in myeloid disorders: a light at the end of the tunnel. *Hematol Oncol* 2005; 23: 18-25
6. Sierra M, Hernández JM, García JL, Gutierrez NC, Pérez JJ, Vidriales MB, et al. Hematological, immunophenotypic, and cytogenetic characteristics of acute myeloblastic leukaemia with trisomy 11. *Cancer Gen Cytogenet* 2005; 160: 68-72.
7. Hijiya N, Ness KK, Ribeiro RC, Hudson MM. Acute leukemia as a secondary malignancy in children and adolescents: current findings and issues. *Cancer* 2009; 115 (1): 23-35.
8. Shivakumar R, Tan W, Wilding GE, Wang ES, Wetzler M. Biologic features and treatment outcome of secondary acute lymphoblastic leukaemia-a review of 101 cases. *Ann Oncol* 2008; 19: 1634-1638.

CASO 4

ANEMIA HEMOLÍTICA Y FIEBRE

M. GÓMEZ CALAFAT¹, B. NAVARRO¹,
M. TORMO¹, I. BENET¹, I. MARUGÁN¹,
A. FERRÁNDEZ², C. SOLANO¹

¹ Servicio de Hematología; ² Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Clínico Universitario de Valencia. Club Citológico de Valencia y Murcia

Motivo de consulta: Mujer de 76 años que consulta por síndrome febril de 10 días de evolución, acompañado de escalofríos y sudoración profusa, precedido de un cuadro de vómitos autolimitados. Asocia en los 3 días previos al ingreso astenia progresiva sin disnea ni dolor torácico. Niega cualquier tipo de sangrado. Como único antecedente de interés presentó 3 meses antes un cuadro de anemia ferropénica del que se recuperó con la administración de hierro por vía oral. No refiere medicación habitual, excepto paracetamol por el cuadro febril la semana previa.

Exploración física: Presentaba buen estado general con palidez mucocutánea, temperatura de 38,5 °C, hemodinámicamente estable y con saturación de oxígeno del 98% basal. El resto de la exploración física fue anodina, sin palparse hepatoesplenomegalia ni adenopatías periféricas.

Pruebas complementarias:

Hemograma: hemoglobina: 62 g/L; hematíes: 2,22 × 10¹²/L; VCM: 82 fL; leucocitos: 5 × 10⁹/L (80%

neutrófilos); plaquetas: 162 × 10⁹/L; reticulocitos: 5,9%; reticulocitos absolutos: 149,6 × 10⁹/L.

Morfología de sangre periférica: marcada anisocitosis con ovalocitos y abundantes esferocitos.

Bioquímica: PCR: 183,9 mg/L (0-5); Br T: 2,1 mg/dL (0,1-1); Br D: 0,9 mg/dL (0,1-0,2); AST: 109 UI/L (1-31); ALT: 65 UI/L (1-31); LDH: 2.120 UI/L (240-480); haptoglobina: 7,38 mg/dL (60-270). Las cifras de vitamina B₁₂, ácido fólico y homocisteína fueron normales. Dosificación de inmunoglobulinas: IgA: 277 mg/dL (70-400); IgG: 727 mg/dL (700-1.200); IgM: 32 mg/dL (40-230).

Coagulación: índice de Quick: 65%; INR: 1,32; TP: 14,8 s; TTPA: 30 s (23-32); fibrinógeno: 4,2 g/L (1,55-5,55); dímero D: 173 ng/mL (0-250).

Test de Coombs directo: negativo.

TAC tóraco-abdominal: no se observan adenopatías axilares ni mediastínicas de tamaño significativo. Bazo de diámetros en el límite alto de la normalidad (12 cm) con lesiones hipodensas subcapsulares sugestivas de infartos esplénicos. Hígado sin alteraciones.

Evolución: Ante una paciente con una anemia hemolítica y síndrome febril, se decidió ingreso en el servicio de hematología para estudio.

La paciente precisó la transfusión de dos concentrados de hematíes por anemia sintomática y se inició tratamiento antibiótico empírico de amplio espectro.

A las 24 horas se comprobó en el control analítico una cifra de hemoglobina de 82 g/L postransfusional, con un descenso de las plaquetas de 109 × 10⁹/L. La bioquímica mostró aumento de la bilirrubina total (3,9 mg/dL) a expensas de la indirecta, de la LDH de 2.659 UI/L, y de la ferritina de 5.830 ng/mL. La beta-2 microglobulina estaba ligeramente aumentada (5 mg/L). Colesterol: 84 mg/dL (140-200), y triglicéridos: 249 mg/dL (40-160).

Ante una anemia regenerativa con cifras elevadas de LDH y bilirrubina, se inició el estudio de una anemia hemolítica en principio no autoinmune debido a que el Coombs directo era negativo. Para ello se realizó un estudio microbiológico completo con serología vírica (VHB, VHC, VIH, sífilis, parvovirus, VEB y CMV), que resultó negativa. El estudio de *Leishmania*, *Salmonella*, *Borrelia*, *Chlamydia* y los cultivos microbiológicos estándar de orina y sangre fueron negativos.

El estudio de los defectos del hematíe también resultó negativo, siendo el test de HPN, G-6PDH, piruvato-cinasa, así como la resistencia osmótica inmediata y la incubada normales.

A las 72 horas de ingreso, se objetivó un Coombs directo positivo débil con especificidad para el complemento (C3d) que no justificaba el cuadro hemolítico de la paciente.

En el TAC realizado se descartó la presencia de adenopatías y de hepatoesplenomegalia. Se amplió el estudio con marcadores tumorales, hormonas tiroideas

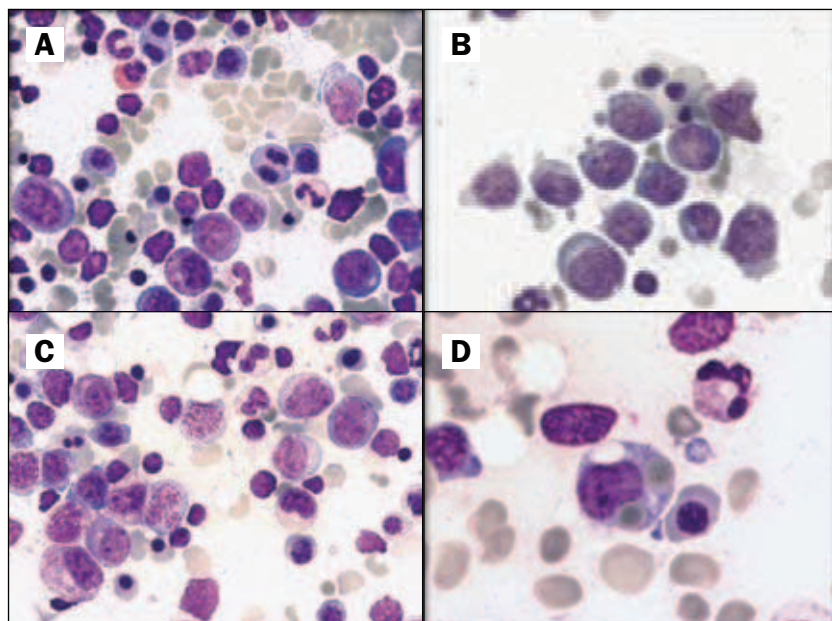


Figura 1. En la médula ósea se observa hiperplasia de la serie eritroide. En la imagen A se observan abundantes elementos eritroides en distintos estadios madurativos con displasia. La imagen B muestra nidos de células grandes con citoplasma basófilo, irregularidad nuclear, cromatina laxa y nucléolos prominentes. En la imagen C se aprecia la displasia de la serie eritroide junto con células grandes con núcleo irregular de cromatina laxa. En la imagen D vemos eritrofagocitosis.

y estudio de autoinmunidad, siendo todos ellos normales.

En el aspirado de médula ósea (Figura 1) se evidenciaba una médula ósea normocelular con grumo medular adecuado, con hiperplasia eritroide, en distintos estadios madurativos, con tendencia a formar nidos y con rasgos displásicos (atipias nucleares). La serie mieloide estaba porcentualmente conservada y sin displasia. Se observaban fenómenos aislados de eritrofagocitosis.

La paciente presentó un cuadro de anemia sin rendimiento transfusional, con trombocitopenia progresiva hasta $18 \times 10^9/L$, hiperbilirrubinemia (12,7 mg/dL), ascenso progresivo de LDH (alcanzando cifras de 7.900 U/L) y de ferritina. En la morfología de sangre periférica destacaba una marcada anisocitosis con abundantes esferocitos, apareciendo eritroblastos displásicos. Hasta este momento los hallazgos analíticos y morfológicos orientaban a una anemia hemolítica intensa o un síndrome hemofagocítico con presencia de 5 de los 8 criterios diagnósticos (fiebre, bicitopenia, hipertrigliceridemia, hemofagocitosis e hiperferritinemia), por lo que inició tratamiento empírico con corticoides (dexametasona).

A los 5 días de ingreso, en el frotis de sangre periférica se objetiva un 10% de células inmaduras de tamaño grande, citoplasma intensamente basófilo con núcleo irregular, cromatina inmadura y nucleolos frecuentes (Figura 2).

El fenotipo inmunológico en sangre periférica demostró que estas células eran positivas para CD20 y CD19 con clonalidad kappa y que por la intensidad de expresión de CD45 se sitúan en la región inmediatamente anterior a los linfocitos maduros (Figura 3). Nos encontramos entonces ante un proceso linfoproliferativo B clonal.

Se revisó el aspirado de médula ósea realizado previamente identificando estas células grandes de citoplasma basófilo, núcleo irregular, con cromatina laxa y nucleolo evidente con distribución heterogénea y tendencia a formar nidos, que inicialmente se interpretaron como serie eritroide displásica. Porcentualmente esta población no superaba el 10%.

El diagnóstico de síndrome linfoproliferativo B se completó con un estudio citogenético, mediante M-FISH que evidenció un cariotipo complejo de 49 cromosomas, XXX, t(6;19), der(19), +9, +18, t(20;21), der(20) (Figura 4).

La paciente empeoró rápidamente, con anemia progresiva sin respuesta al tratamiento empírico con corticoides que se habían iniciado el 4.º día del ingreso, hipoalbuminemia, anasarca e insuficiencia respiratoria. Presentó un deterioro cognitivo y del estado general con anuria, no respondiendo a las medidas soporte, falleciendo a los 7 días del ingreso.

En la autopsia clínica, el estudio microscópico por órganos describió, a nivel de capilares y vasos de mediano calibre, la presencia de células atípicas grandes de hábito linfocítico en médula ósea (MO), bazo, hígado, corazón, ri-

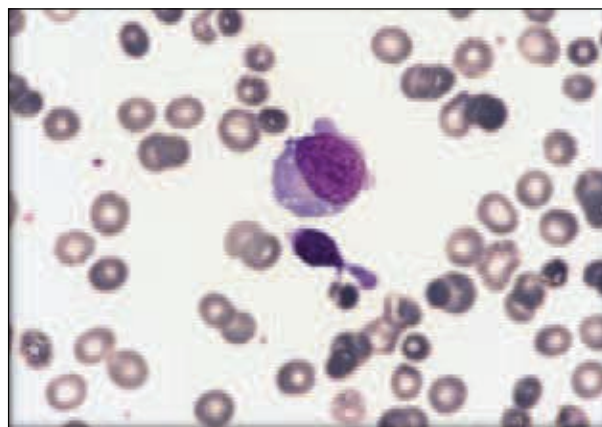


Figura 2. Presencia en sangre periférica de células inmaduras.

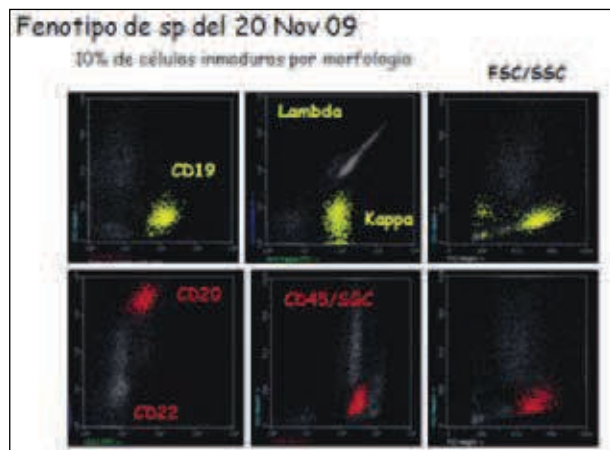


Figura 3. Fenotipo CD19, CD20 positivo con clonalidad Kappa.

ñones, pulmones, glándulas suprarrenales, tiroides, útero, ovarios y mamas (Figura 5). Dichas células expresaban CD20, CD79a y MUM-1, presentando negatividad a la expresión de mieloperoxidasa, CD10, bcl-6 y marcadores linfoides de extirpe T, con un Ki-67 del 60%. También se objetivó la presencia de fenómenos de hemofagocitosis en bazo, MO e hígado. Con todos estos datos se llegó al diagnóstico de linfoma intravascular.

Diagnóstico: Linfoma intravascular.

Discusión: El linfoma intravascular fue descrito por primera vez en 1959 por Pflieger y Tappeiner como una neoplasia endotelial denominada *angioendotheliomatosis proliferans systemisata*. Fue en 1982 cuando Ansell sugirió el origen linfoide, al mostrar inmunoglobulinas de superficie en las células neoplásicas. Desde entonces ha recibido varios nombres; entre ellos, *malignant angioendotheliomatosis*, *neoplas-*

tic angioendotheliosis, *intravascular lymphomatosis*, *angioendotheliotropic lymphoma*, *angiotropic large-cell lymphoma*¹. La última clasificación de la OMS lo incluye como un subtipo poco frecuente de linfoma difuso de células grandes B.

Se caracteriza por la proliferación de las células del linfoma en la luz de vasos sanguíneos de pequeño tamaño, fundamentalmente capilares y vénulas poscapilares, con ausencia de una masa tumoral extravascular evidente².

Su verdadera incidencia es desconocida, ya que presenta un curso agresivo y la mayoría de los diagnósticos se realizan en la autopsia.

La edad de presentación está en torno a los 60-70 años, sin predilección por sexos¹.

Lo más característico de su expresión clínica es que es extremadamente variable, ya que la mayoría de los signos y síntomas se encuentran en relación con los órganos afectados^{2,3}. Un 55-85% de los pacientes presentan síntomas B al diagnóstico. Se han definido diferencias clínicas según el origen geográfico (Tabla 1). La variante occidental se caracteriza fundamentalmente por afectación del SNC, con alteraciones de conciencia, déficits motores y sensoriales, convulsiones, demencia, temblor y desorientación, y lesiones cutáneas, mientras que en la variante asiática se afecta fundamentalmente la médula ósea y el bazo, siendo característico el fallo multiorgánico con hepatoesplenomegalia, hemofagocitosis y la pancitopenia.

Una peculiaridad de este linfoma es que no suele cursar con adenopatías⁴.

No existen estudios de laboratorio específicos, pero se han descrito niveles aumentados de LDH y β -2 microglobulina en un 80-90% de los casos, anemia en un 65%, elevación de la VSG en un 43%, un 15-20% presentan alteración de la función hepática, renal o tiroidea, y hasta un 14% de los pacientes presentan proteína monoclonal en suero².

En cuanto a las alteraciones histológicas características, un aspecto importante es que afecta a vasos de pequeño tamaño, especialmente capilares y vénulas poscapilares. Microscópicamente la celularidad típica se caracteriza por ser células de gran tamaño de núcleos irregulares, nucleolos prominentes y frecuentes figuras mitóticas⁴. El Ki-67 puede ser útil para confirmar la casi constante actividad proliferativa². Hasta en un 5-9% de los casos se describe expresión en sangre periférica.

La lesión orgánica es típicamente intrasinusoidal, pudiendo en ocasiones afectar al parénquima, y ha sido bien descrito en el riñón, hígado y en la médula ósea. Son frecuentes los fenómenos de hemofagocitosis^{2,4}.

En el bazo, se objetiva la infiltración de la pulpa roja como los linfomas difusos de célula grande, pero para el diagnóstico de linfoma intravascular en muestra esplénica se precisa la demostración del linfoma en otra localización^{2,4}.

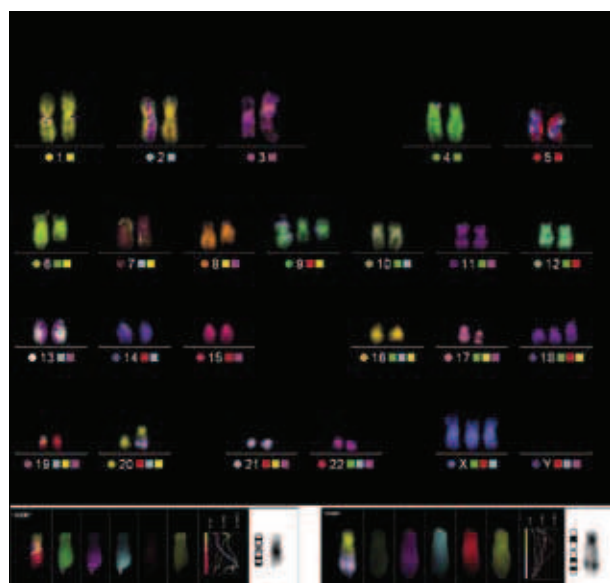


Figura 4. M-FISH. Cariotipo complejo: 49,XXX,t(6;19),der(19),+9,+18,t(20;21),der(20).

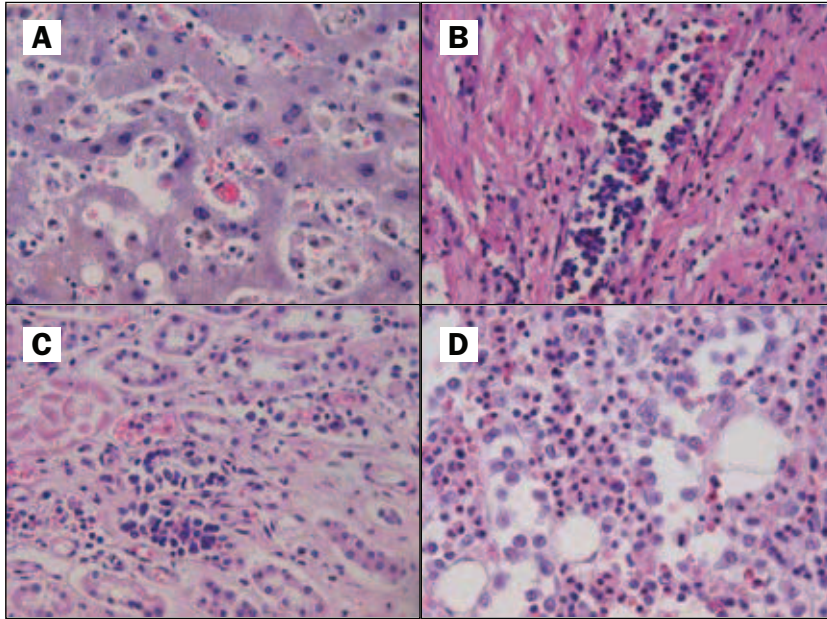


Figura 5. Distintos tejidos teñidos con hematoxilina eosina a 40 aumentos. A: hígado, donde se pueden ver células atípicas en los sinusoides así como una imagen de eritrofagocitosis; B: miometrio, capilar miometrial con abundantes células atípicas en su interior; C: riñón, células atípicas en capilares renales; D: médula ósea con celularidad atípica en el interior de los sinusoides.

La mayoría de los casos presentan una expresión inmunofenotípica de células B, siendo la mayor parte positivos para CD19, CD20, CD22 y CD79a. Series de casos han demostrado una positividad del CD5 del 38%, y del 13% para el CD10^{1,4}.

La expresión intravascular del linfoma ha llevado a postular como mecanismo patogénico la asociación con anomalías en las moléculas de adhesión o en los receptores necesarios para la migración hacia las regiones extravasculares como son pérdida de CD29 (β 1 integrina) y CD54 (ICAM-1)⁴.

No se han descrito alteraciones citogenéticas patogénicas, pero una serie de casos describe alteraciones en los cromosomas 1, 6 y 18⁴.

El pronóstico de la enfermedad es desfavorable, siendo el principal factor independiente de mal pronóstico el tratamiento con un régimen quimioterápico no basado en antraciclinas, según publica un estudio reciente¹. De este

modo, los pacientes que no reciben tratamiento basado en antraciclinas presentan una media de supervivencia de 1,5 meses frente a 13 meses en los pacientes que sí lo reciben.

Nuestra paciente debutó con una anemia hemolítica intensa, debido a la ausencia de sintomatología previa, adenopatías y hepatoesplenomegalia palpable. En la TAC realizada se descartó, en principio, el síndrome linfoproliferativo como causa más frecuente de AHAI. Paralelamente fueron descartadas las causas tóxicas, infecciosas y autoinmunes.

El desarrollo de trombocitopenia y la aparición de eritrofagocitosis en el aspirado de médula ósea incluyeron en el diagnóstico diferencial las causas de síndrome hemofagocítico. En el aspirado de médula ósea se observó una importante hiperplasia eritroide, atribuible a la respuesta medular a la hemólisis periférica, sin desplazamiento de la hematopoyesis normal pero

con importantes rasgos displásicos. Las células atípicas mostraban una distribución heterogénea, tendían a formar nidos, eran basófilas e inicialmente se encuadraron como serie eritroide displásica, si bien es cierto que los núcleos eran demasiado irregulares. Por citometría de flujo la expresión de CD45 no permitió detectar una población de localización anormal en la médula.

En los frotis de sangre periférica iniciales, se observaban eritroblastos, más o menos displásicos, pero en el quinto día se detectan células atípicas intensamente basófilas con núcleos irregulares y nucléolo frecuente. Morfológicamente recordaban al síndrome mononucleósico o a la expresión periférica de linfomas difusos de células grandes que, aunque infrecuente, alguna vez hemos visto. En ese momento la citometría de flujo permitió la definición de la población como B clonal. Simultáneamente obtuvimos el resultado de la citogenética, que aunque no fue característico sí corroboraba la hipótesis tumoral.

Ahora bien, no había adenopatías, masas ni visceromegalias, únicamente teníamos una anemia hemolítica y un linfoma B con infiltración en médula ósea y expresión en sangre periférica que sugería LDCCG.

En el diagnóstico diferencial había que considerar el linfoma intravascular, aunque la paciente no tenía sintomatología neurológica, que es lo más frecuente en la variante occidental. El estudio anatomopatológico de la biopsia de médula ósea y de la autopsia así lo demostró.

Las características clínicas del caso lo situarían dentro de la variante asiática, debido al predominio de las

Tabla 1. Características clínicas según el origen geográfico²

Variante occidental	Variante asiática
SNC (39%)	Médula ósea (75%)
Piel (39%)	Bazo (67%)
Médula ósea (32%)	Hígado (55%)
Bazo (26%)	SNC (27%)
Hígado (26%)	Piel (15%)
	Síndrome hemofagocítico (61%)

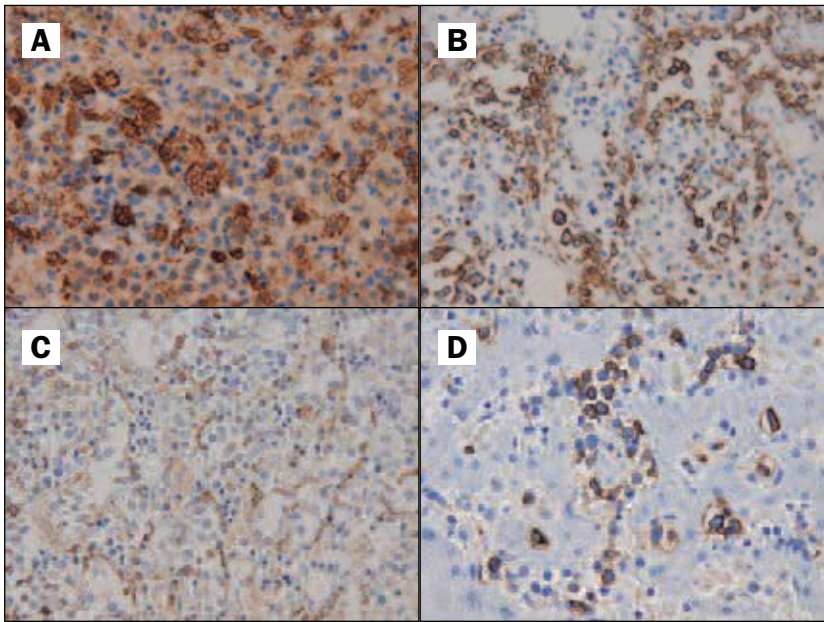


Figura 6. A: bazo marcado con CD20; B: hígado marcado con CD20; C: médula ósea marcada con CD31 marcador de célula endotelial, con las células atípicas en el interior de los capilares; D: hígado marcado con CD20.

manifestaciones hematológicas, incluyendo la hemofagocitosis, con ausencia de alteraciones neurológicas y cutáneas.

La positividad del test de Coombs directo específico para el complemento puede atribuirse a la hipergammaglobulinemia asociada a este tipo de linfomas. Las cifras de IgM iniciales normales asociadas a un Coombs negativo y su positivación paulatina nos hacen sospechar que éste pudiera estar asociado a un incremento de IgM, a pesar de que en la paciente no se llegó a determinar, debido a la evolución tórpida.

Este caso es un ejemplo más de la dificultad diagnóstica de este tipo de linfomas en los que la ausencia de adenopatías y visceromegalias y su expresión clínica variable según la localización de la infiltración puede hacer que no se piense en ellos. En este caso la expresión periférica permitió sospecharlo, aunque la agresividad del linfoma y su rápida evolución impidió el tratamiento específico.

Para recordar

- El linfoma intravascular es un subtipo infrecuente de linfoma difuso de célula grande de difícil diagnóstico y curso agresivo.
- La dificultad diagnóstica está determinada por la heterogeneidad de las manifestaciones clínicas y la ausencia de adenopatías y organomegalias.
- El diagnóstico se basa en la detección de células de gran tamaño, núcleos irregulares, nucleolos prominentes y mitosis frecuentes en vasos de pequeño calibre.

Bibliografía

1. Tamaru J, Masaru K, Ikuo M, Naoyoshi M, Tadashi Y, Shigeo N, et al. Intravascular large B-cell lymphoma (IVLBCL): a clinicopathologic study of 96 cases with special reference to the immunophenotypic heterogeneity of CD5. *Blood* 2007; 109: 478-485.
2. Ponzoni M, Ferreri A, Campo E, Facchetti F, Mazzucchelli L, Yoshino T, et al. Definition, Diagnosis, and Management of Intravascular Large B-Cell Lymphoma: Proposals and Perspectives From an International Consensus Meeting. *J Clin Oncol* 2007; 25:3168-3173.
3. Weisel K, Brugger W, Krober S, Kaiserling E, Kanz L. Intravascular lymphoma – a rare cause of hemolytic anemia and neurologic disorders. *The Hematology Journal* 2004; 5, 444-446.
4. Shimada K, Kinoshita T, Naoe T, Nakamura S. Presentation and management of intravascular large B-cell lymphoma. *The Lancet*. September 2009; 10; 895-902.

CASO 5

VARÓN CON ADENOPATÍAS Y LINFOCITOS ATÍPICOS EN SANGRE

M. MORADO, C. LARROCHA, P. PÉREZ PIÑO, M.A. CANALES, A. RODRÍGUEZ DE LA RÚA

Servicio de Hematología y Hemoterapia.

Hospital Universitario La Paz. Madrid

Motivo de consulta: Presencia de adenopatías inguinales,

Historia clínica: Varón de 28 años, con alergia a contrastes yodados, que consulta por dolor y adenopatía dolorosa inguinal izquierda. Se acompaña de pérdida de 2-3 kg de peso en los últimos 3 meses que relaciona con dieta, sensación distérmica no termometrada y sudación nocturna en las 2 últimas semanas.

Exploración física: ECOG: 0. TA: 120/60. Ta: 36,7 °C. Buena coloración de piel y mucosas, bien perfundido. Adenopatías cervicales izquierdas de 2 cm de diámetro de consistencia elástica, no dolorosas y rodaderas. AP: murmullo vesicular conservado. AC: rítmico sin soplos. Abdomen blando, depresible, doloroso a la palpación profunda en fosa iliaca izquierda. Esplenomegalia a 8 cm del reborde costal. Discreta hepatomegalia. Adenopatías inguinales izquierdas de 2 cm. EE: no edemas. Exploración neurológica normal.

Pruebas complementarias:

Hemograma: leucocitos: $16,23 \times 10^9/L$ con neutrófilos: $4,54 \times 10^9/L$; linfocitos: $9,74 \times 10^9/L$; monocitos: $0,65 \times 10^9/L$; hemoglobina: 15,2 g/dL, plaquetas: $193 \times 10^9/L$; VSG: 21 mm/h.

Extensión de sangre: 16% de linfocitos atípicos con núcleo de contorno irregular, cromatina en general densa, con nucleolos ocasionales, de citoplasma basófilo, agranular, no vacuolado, alguno de aspecto inmaduro. Serie eritroide y plaquetas sin alteraciones.

Bioquímica: creatinina: 0,9 mg/dL; proteínas totales: 5,6 g/dL; albúmina: 2,8 g/dL; LDH: 237 U/L; bilirrubina total: 0,9 mg/dL; GGT: 128 UI/L. Beta-2 microglobulina: 2,5 mg/L.

Coagulación: sin alteraciones significativas.

Serología: HCV, HBV, HIV negativos; Rickettsias y Brucela: negativos; PCR para VVZ, CMV, VHS 1 y 2, VEB y VH 6 negativos.

TC cervical, torácico, abdómino-pélvico: adenopatías laterocervicales menores de 1 cm, en espacio vascular, paratraqueales y axilares que forman conglomerado en región supraclavicular izquierda. Esplenomegalia de 19,5 cm. Adenopatías mesentéricas menores de 1 cm. Conglomerado adenopático retroperitoneal paraaórtico izquierdo que se extiende hasta bifurcación aórtica de $3,5 \times 2,5$ cm. Conglomerado medial a la arteria iliaca externa izquierda de $4,5 \times 2$ cm. Adenopatías inguinales de 2 cm.

PEC-TC: incremento patológico del metabolismo de ^{18}F -FDG en adenopatías supraclaviculares, paratraqueales, mediastínicas, hiliares, retroperitoneales, iliacas e inguinocrurales. Esplenomegalia con incremento difuso.

Aspirado de médula ósea: médula ósea con grumo de celularidad aumentada en la que se observa infiltración

por células mononucleadas (23%) con tendencia a formar agregados, de tamaño grande, núcleo de cromatina reticulada, presencia de nucleolo y contorno nuclear generalmente lobulado con citoplasma basófilo. Junto a estas células existen otras más pequeñas con atipia nuclear sin nucleolo. Por inmunocitoquímica las células son CD7 y CD30 positivas y ocasionalmente CD5 positivas, con negatividad para CD3, CD4, CD8, CD2, CD19 y CD20. Compatible con infiltración por LNH CD7+ CD30+.

Inmunofenotipo por citometría de flujo: muestra con predominio granulocítico en la que se detecta un 22% de eventos con complejidad y tamaño bajos que expresan CD45+ fuerte con negatividad para marcadores pan-B/plasmática (CD19, CD20, CD79b, FMC7, CD10, Ig-sup, CD38, CD138) y para marcadores pan-T y NK (CD3, CD4, CD8, CD2, TCR, CD56, CD57) detectándose positividad para CD7, CD26 y negatividad para CD28 y CD25, compatible con LNH de fenotipo nulo/T posiblemente citotóxico.

Estudio de citogenética por FISH en médula ósea: t(2;5) ALK positivo en el 22% de las células.

Biopsia de médula ósea: infiltrada por LNH anaplásico ALK positivo.

Biopsia de ganglio linfático: linfoma no Hodgkin anaplásico ALK positivo.

Evolución: El paciente ingresa en medicina interna para estudio de cuadro poliadenopático. Durante dicho ingreso presenta deterioro clínico, empeoramiento del estado general, disminución de los niveles de hemoglobina de forma progresiva y presencia de células de aspecto atípico o inmaduro en sangre, por lo que es remitido al servicio de hematología para completar estudio. Se realiza aspirado-biopsia de médula ósea y biopsia ganglionar, con la sospecha de linfoma leucemizado.

En médula se observan células de tamaño grande con tendencia a formar acúmulos, núcleo de cromatina reticulada, presencia de nucleolo y contorno nuclear generalmente lobulado con citoplasma basófilo, junto a otros linfocitos atípicos sin nucleolo, ambos hallazgos similares a las células detectadas en sangre. El inmunofenotipo corresponde a linfocitos no B no T con fenotipo citotóxico, CD30+, por lo que se sospecha LNH anaplásico, que se confirma con la biopsia de la adenopatía inguinal. Por técnicas de FISH se demuestra la translocación t(2;5).

Con el diagnóstico de linfoma no Hodgkin anaplásico de célula grande ALK positivo en estadio IV-B se inicia tratamiento según protocolo Mega-CHOP y profilaxis del SNC con triple terapia intratecal. Previa a la adminis-

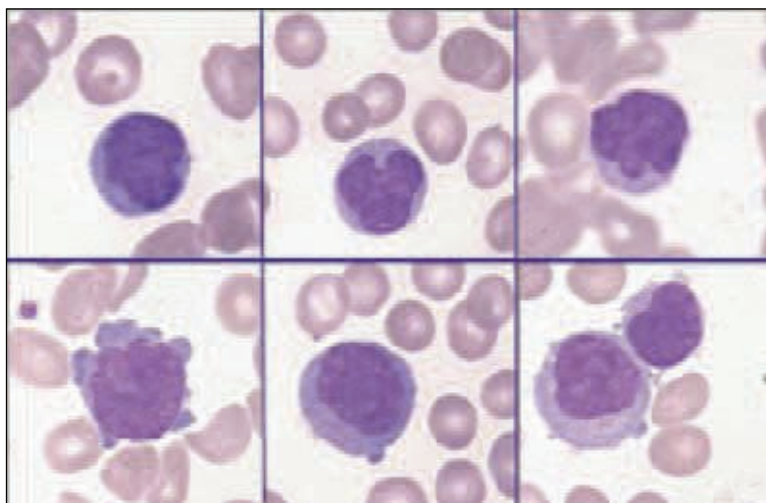


Figura 1. Linfocitos atípicos en sangre, con núcleo irregular, con nucleolos ocasionales, de citoplasma basófilo, avacuolado y agranular, alguno con morfología inmadura.

tración del cuarto ciclo de tratamiento se observa progresión de la enfermedad, sin respuesta al tratamiento de rescate con esquema ICE, por lo que se decide nuevo esquema de tratamiento de rescate y trasplante alogénico.

Diagnóstico: LNH anaplásico de célula grande AKL positivo (código ICD-O: 9714/3) en estadio IV-B con afectación de sangre periférica.

Discusión: El linfoma anaplásico de célula grande ALK positivo es un linfoma no hodgkiniano de origen T, con expresión de CD30 y de la proteína ALK (*anaplastic lymphoma kinase*). Supone el 3% de los LNH del adulto y el 10-20% de los LNH de la edad pediátrica, afectando de modo predominante a varones en la tercera década de la vida¹⁻³.

Su descripción y caracterización son relativamente recientes. En 1985 Stein describe la expresión del antígeno Ki-1 (CD30) en casos descritos como histiocitosis maligna. En 1989 se describe la translocación t(2;5) en linfomas anaplásicos⁴, y en 1994 Morris⁵ clona el gen de la proteína ALK implicada en dicha translocación, lo que permite identificar este linfoma con un marcador genético específico. La clasificación de la REAL (1994) y posteriormente la de la OMS (2001) incluyen estos linfomas en el grupo de los linfomas T o NK. En la tercera edición de la clasificación de la OMS se incluía bajo el mismo epígrafe a los LNH anaplásicos ALK positivos y negativos. Sin embargo, las características clínico-biológicas y pronósticas de los linfomas ALK negativos son claramente distintas, por lo que en la 4.^a edición aparecen como entidades distintas. De igual modo, se diferencia también de los linfomas de línea B que expresan la proteína ALK y de los linfomas cutáneos CD30⁺^{1,2}.

El linfoma anaplásico de célula grande ALK positivo deriva de linfocitos T citotóxicos maduros y activados de comportamiento agresivo. En el 70% de los casos se diagnostican en estados avanzados (III-IV) con afectación nodal y extranodal y síntomas B.

La morfología típica del ganglio linfático es la infiltración paracortical e intrasinusoidal por células grandes de aspecto abigarrado con núcleos en herradura o arriñonado y con un aparato de Golgi prominente que queda englobado por el núcleo. A veces muestran invaginaciones de la membrana nuclear adoptando aspecto de "donut". Dicha morfología es la más frecuente y se conoce como variante común (60% de los casos), pero están descritas otras tres variantes histológicas: linfocitoide (10% de los casos), de célula pequeña (5-10%) y tipo Hodgkin (3%)^{1,2}.

La afectación de MO se demuestra con frecuencia por técnicas de inmunohistoquímica (30%), pero es difícil de detectar por histología convencional (10%), ya que las células de esta enfermedad la infiltran de forma escasa e individual, y su morfología blástica las confunde con precursores hematopoyéticos normales. La

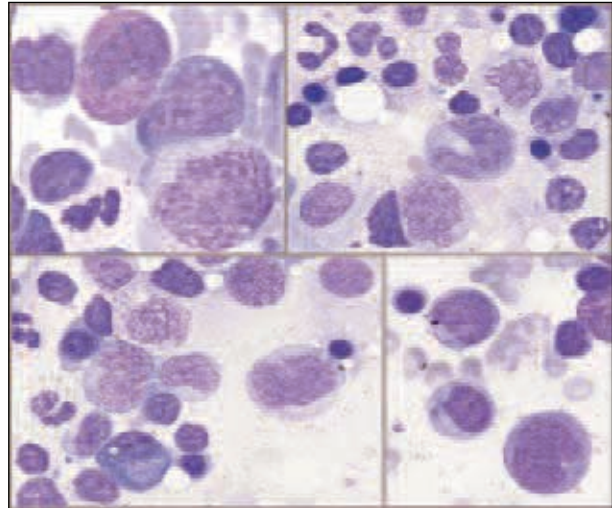


Figura 2. Aspirado de médula ósea: células mononucleadas grandes y basófilas, con tendencia a formar agregados, de núcleo irregular y reticulado con nucleolo, junto con células más pequeñas con atipias nucleares pero sin nucleolo.

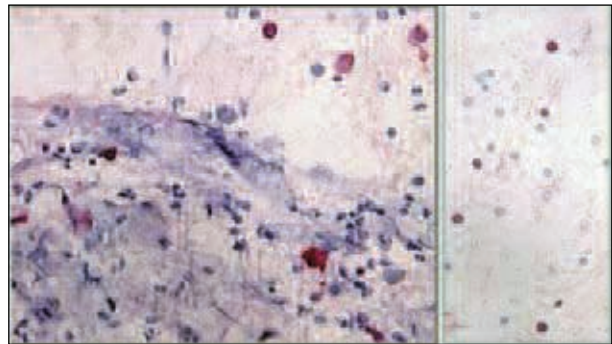


Figura 3. Positividad para el anticuerpo monoclonal CD30 por técnica de inmunocitoquímica.

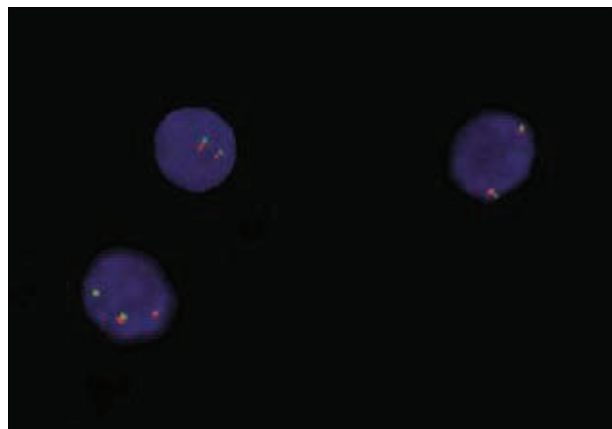


Figura 4. Positividad para la translocación t(2; 5) por técnica de FISH.

afectación de sangre periférica es excepcional, de forma que hasta el año 2009 se habían descrito sólo 20 casos de LNH anaplásico ALK positivo con leucemización. La infiltración sanguínea suele ser por células de núcleo irregular en forma de flor o cerebriformes, correspondiente a la variante de células pequeñas, aunque se pueden observar células típicas de núcleo arriñonado, de aspecto inmaduro y tamaño grande en algunos de los casos⁶⁻¹⁰.

El linfoma anaplásico ALK positivo pierde típicamente marcadores pan-T en el 90% de los casos, y de hecho el antígeno CD3, principal marcador de línea T, se pierde en el 75% de éstos, por lo que se denominó de fenotipo nulo. Los marcadores que se expresan de forma más constante son CD2, CD5 y CD4. Los linfocitos tumorales expresan marcadores de citotoxicidad (TIA-1, granzima y perforina) que se correlacionan con el patrón de linfocito citotóxico por citometría de flujo. La expresión de CD30, proteína perteneciente a la superfamilia del receptor de TNE, se observa típicamente en la membrana y en el aparato de Golgi. La positividad para CD30, pese a que caracteriza a este linfoma, es muy poco específica, ya que se expresa también en linfocitos activados T y B, centroblastos, linfocitos Th2, macrófagos alveolares, células NK activadas, células endoteliales, en la decidua y determinados carcinomas, en el linfoma de Hodgkin y otros LNH T no anaplásicos o LNH-B de célula grande^{1,2}.

La alteración genética específica que define a esta entidad es la expresión de la proteína ALK en su forma translocada. Esta proteína, en su forma original no translocada, es una tirosina-cinasa situada en la membrana citoplasmática, presente en el sistema nervioso central y periférico, cuyo gen se encuentra en el cromosoma 2p23. Para su activación precisa la dimerización de la zona citoplasmática tras la acción del ligando. Su expresión en cualquier tejido fuera del sistema nervioso es patológica; sin embargo, se ha detectado su presencia en la forma original no translocada en algunos neuroblastomas, rhabdomyosarcomas y en aislados linfomas B. En el 75-85% de los casos de LNH anaplásico la proteína ALK se transloca con la nucleofosmina (NPM), localizada en el cromosoma 5q35, originando la t(2;5) (p23;q35) como alteración específica^{4,5}. La proteína NPM original no translocada tiene como característica la capacidad de oligomerización. Al dimerizar la NPM, activa a la ALK en ausencia de ligando y, por otra parte, expone a la ALK a la acción del promotor de la NPM, aumentando la expresión de la ALK de forma patológica. La activación de la ALK hace que la propia cinasa se fosforile, actuando entonces como activadora de otros factores que inducen transformación celular. El gen de la ALK puede translocarse con otros genes, dando lugar a las múltiples variantes descritas. Dada la localización normal de la NPM en la célula, es típico de la

t(2;5) la presencia de la ALK en el núcleo y en el citoplasma, no detectable en las variantes¹⁻³.

No existe diferencia de comportamiento clínico ni de pronóstico entre los LNH anaplásicos que expresan la t(2;5) o cualquiera de sus variantes. La supervivencia global a 5 años de este tipo de linfoma es del 70% en adultos, con tasa de recaída del 30%. Sin embargo, están descritos múltiples factores que afectan al pronóstico de esta entidad. El IPI, válido en otros linfomas, tiene limitada utilidad en el linfoma anaplásico. La expresión de CD56 en las células tumorales constituye un factor pronóstico adverso, con supervivencia global a 5 años del 65% para los casos negativos frente al 30% en los positivos. La afectación de médula ósea se asocia con peor pronóstico, con 50% de riesgo de recaída en pacientes con PCR positiva frente a menos del 15% en aquellos con PCR negativa. La leucemización en este tipo de linfoma está asociada a peor pronóstico. En una revisión reciente, 13 de los 20 pacientes con afectación leucémica fallecieron o recayeron pocos meses después (9 fallecen durante el tratamiento con una mediana de 2 meses tras el diagnóstico, 2 recaen y otros 2 fallecen post-transplante). Incluso la demostración de afectación sanguínea por PCR supone supervivencia libre de enfermedad del 80% a los 5 años en los casos negativos frente al 46% de los casos positivos. En los casos refractarios y en recaída el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos es la única opción terapéutica¹¹⁻¹⁴.

En el caso que presentamos se observan ambos tipos celulares, predominando en sangre periférica las de núcleo irregular y siendo claramente evidentes las células típicas arriñonadas en la médula ósea. El diagnóstico diferencial debería descartar otros LNH-T con células cerebriformes en las que la afectación sanguínea es más frecuente (síndrome de Sèzary, LNH-T sin especificar, leucemia prolinfocítica T o leucemia linfoma T del adulto) o bien linfomas B o T agresivos de morfología más inmadura (linfoma linfoblástico o linfoma difuso de célula grande). En este caso el diagnóstico inicial fue complejo por la negatividad de marcadores pan-B y pan-T (negativo para CD3, CD4, CD2 y CD5), con la expresión inicial única de CD7. La expresión inmunofenotípica de linfocito citotóxico y la positividad de CD30 detectada por inmunocitoquímica orientaron el diagnóstico (en ausencia inicial de resultados histológicos) hacia este tipo de linfoma. El diagnóstico de sospecha se confirmó con la positividad de la translocación t(2;5) por FISH. La histología del ganglio y el cilindro óseo fueron compatibles, con positividad para la proteína ALK. La afectación sanguínea y medular es el dato más llamativo de este caso, dada su rareza (2 casos con infiltración medular de 52 linfomas anaplásicos de célula grande T/NK diagnosticados en nuestro centro) y su asociación con mal pronóstico. En nuestro caso, como corresponde a dicho pronóstico, el

paciente progresa tras varias líneas de tratamiento, por lo que se programa para trasplante alogénico, estando actualmente en tercera línea de quimioterapia de rescate, previa al trasplante.

Para recordar

- La afectación leucémica del LNH anaplásico ALK positivo es extraordinariamente infrecuente, generalmente a expensas de células pequeñas de núcleo irregular. La presencia de las células típicas arriñonadas en médula o sangre orienta el diagnóstico.
- La afectación leucémica y medular del LNH anaplásico ALK positivo, tanto a nivel citológico como a nivel molecular, señala a los pacientes de peor pronóstico, con mayor riesgo de recaída y mortalidad.

Bibliografía

1. Delsol G, Falini B, Müller-Hermelink HK, Campo E. Anaplastic large cell lymphoma (ALCL) ALK-positive. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al. WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 4th edn. IARC Press: Lyon 2008.
2. Medeiros LJ, Elenitoba-Johnson KSJ. Anaplastic large cell lymphoma. Am J Clin Pathol 2007; 127: 707-22.
3. Amin HM, Lai R. Pathobiology of ALK+ anaplastic large-cell lymphoma. Blood 2007; 110: 2259-67.
4. Kaneko Y, Frizzera G, Edamura S, Maseki N, Sakura M, Komada Y, et al. A novel translocation, t(2;5)(p23;q35), in childhood phagocytic large T-cell lymphoma mimicking malignant histiocytosis. Blood 1989; 73: 806-13.
5. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, et al. Fusion of kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. Science 1994; 263: 1281-4.
6. Villamor N, Rozman M, Esteve J, Aymerich M, Colomer D, Aguilar JL et al. Anaplastic large-cell lymphoma with rapid evolution to leukemic phase. Ann Hematol 1999; 78:478-82.
7. Takahashi D, Nagatoshi Y, Nagayama J, Inagaky J, Itonoaga N, Takeshita M, et al. Anaplastic large cell lymphoma in leukemic presentation: a case report and a review of the literature. J Pediatr Hematol Oncol 2008; 30: 696-700.
8. Nguyen JT, Codron MR, Nguyen ND, De J, Medeiros J, Padula A. Anaplastic large cell lymphoma in leukemic phase: extraordinarily high white blood cell count. Pathology International 2009; 59: 345-53.
9. Grewal JS, Smith LB, Winegarden JD, Krauss JC, Tworek JA, Schitzer B. Highly aggressive ALK-positive anaplastic large cell lymphoma with a leukemic phase and multi-organ involvement: a report of three cases and a review of the literature. Ann Haematol 2007; 86: 499-508.
10. Bayle C, Charpentier A, Duchayne E, Manel AM, Pages MP, Robert A et al. Leukaemic presentation of small cell variant anaplastic large cell lymphoma: report of four cases. Br J Haematol 1999; 104: 680-8.
11. Damm-Welk C, Busch K, Burkhardt B, Schieferstein J, Viehmann S, Oschlies I, et al. Prognostic significance of circulating tumor cells in bone marrow or peripheral blood as detected by qualitative and quantitative PCR in pediatric NPM-ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. Blood 2007; 110: 670-7.

12. Damm-Welk C, Schieferstein J, Schwalm S, Reiter A, Woessmann W. Flow cytometric detection of circulating tumor cells in nucleophosmin/anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large cell lymphoma: comparison with quantitative polymerase chain reaction. Br J Haematol 2007; 138: 459-66.
13. Oncui M, Behm FG, Raimondi SC, Moore S, Harwood EL, Pui Ch, et al. ALK-positive anaplastic large cell lymphoma with leukemic peripheral blood involvement is a clinicopathologic entity with an unfavorable prognosis. Am J Clin Pathol 2003; 120: 617-25.
14. Mussolin L, Pillon M, d'Amore ES, Santoro N, Lombardi A, Fagiolo F, et al. Prevalence and clinical implications of bone marrow involvement in pediatric anaplastic large cell lymphoma. Leukemia 2005; 19: 1643-7.

CASO 6

NEOPLASIA MIELOPROLIFERATIVA RELACIONADA CON TERAPIA (NMP-T), CON RASGOS DE LMMC-1 Y BCR/ABL P190 ASOCIADO A DELECCIÓN 5q

C. SANZO¹, M. MALLO², M. GONZÁLEZ¹, L. ARENILLAS², M. SALIDO², A.B. GALVÁN², J. FERNÁNDEZ¹, L. FLORENSA², F. SOLE², E. LUÑO¹

¹ Servicio de Hematología. Hospital Universitario Central de Asturias. Oviedo

² Laboratori de Citogenètica Molecular. Laboratori de Citologia Hematològica. Servei de Patologia. Hospital del Mar. Barcelona

Motivo de consulta: Paciente de 75 años de edad, remitida a nuestro centro en junio de 2009, por astenia de 2 años y medio de evolución y bicitopenia detectada en analítica realizada en su centro de salud. Tenía un hemograma normal 5 meses antes.

Historia clínica: Mujer, ama de casa, sin hábitos tóxicos, hipercolesterolemia en tratamiento con atorvastatina, HTA tratada con bisoprolol 5 mg, valsartan 160 mg e hidroclorotiazida 12,5 mg. Depresión reactiva tratada con antidepresivos y ansiolíticos. Mastectomía radical izquierda y radioterapia complementaria (50 Gy) por carcinoma de mama en 1984.

Exploración física: Afebril. ECOG 1. Discreta palidez cutáneo-mucosa. No adenopatías ni hepatomegalia palpables.

Pruebas complementarias:

Hemograma: Hb: 98 g/L; VCM. 91,2 fL; reticulocitos $103 \times 10^9/L$; leucocitos: $20,5 \times 10^9/L$ (blastos: 7%; promielocitos: 4%; mielocitos: 11%; metamielocitos:

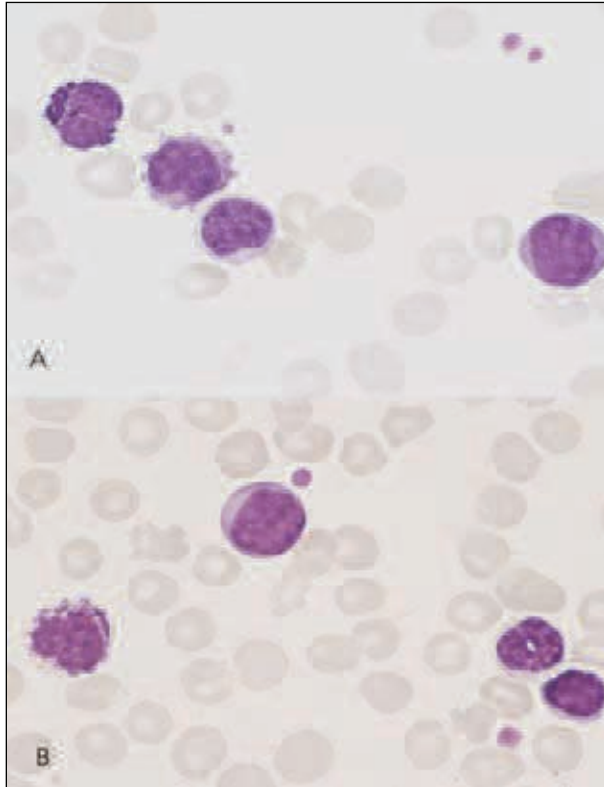


Figura 1, A y B: Sangre periférica, MGG \times 1.000. **Blastos, uno de ellos agranular, neutrófilo en anillo, basófilos displásicos y monocito. Poiquilocitosis.**

12%; cayados: 3%; segmentados: 38%; monocitos: 7%; basófilos: 5%; linfocitos: 13%), plaquetas: $106 \times 10^9/L$. En el frotis de sangre periférica, 1 eritroblastos%, anisopoiquilocitosis y punteado basófilo en la serie roja; marcada displasia (44%) en la serie blanca, con formas pseudo-Pelger, núcleos en anillo en los neutrófilos e hipogranularidad (Figura 1); 2% micromegacariocitos. *Estudio de coagulación*: fibrinógeno derivado: 868 mg/dL; resto normal. *Bioquímica general*: LDH: 595 U/L (normal: 230-460U/L); úrico: 5,5 mg/dL. Pruebas de función renal y hepática normales. Fe: 33 μ/L ; transferrina: 200 mg/dL; IST: 11,8%; ferritina: 231 ng/mL; folato: 28 ng/mL; vitamina B₁₂: 1.318 pg/mL; haptoglobina: 237 mg/dL. Proteínas totales: 75,9 g/L; albúmina: 36,5 g/L. Dosificación de eritropoyetina sérica: 174 mU/mL (normal: 2,6-34). Beta2-microglobulina: 2,40 mg/L. *Serología de virus*: VIH, parvovirus B19, HBs Ag, anti-HBC, anti-HBs y anti-VHC negativos. EBV, herpes simple, varicela-zóster y CMV IgG positivos. *Mielograma*: hiper celular, ratio M/E 2.9/1. Serie megacariocítica conservada con rasgos displásicos en el 40%,

destacando la presencia de megacariocitos monolobulados (Figura 2A), otros con núcleos dispersos y micromegacariocitos. La serie eritroblástica representaba 19,4% de la celularidad con discretos rasgos displásicos en el 11% con formas megaloblásticas, contorno nuclear irregular y defectos de hemoglobinización. Serie granulocítica hiperplasiada (58%) en todos los estadios madurativos, con marcados rasgos displásicos como hipogranularidad, condensación anómala de la cromatina, pseudo-Pelger y formas en anillo en el 53% de los elementos (Figura 2B y C). Presencia del 6,4% de blastos de tamaño variable mediano-grande, con elevada relación N/C, varios nucleolos, citoplasma basófilo, en general escaso, con débil granulación fina y sin bastones de Auer. El resto de la celularidad estaba constituida por 6,6% monocitos, 9,2% linfocitos y 0,4% macrófagos. *Citoquímica*: mieloperoxidasa positiva en blastos, PAS positividad eritroblástica y 16% sideroblastos anillados. *Inmunofenotipo MO*: serie eritroide: 20,9%. Serie granulocítica: 42,8% con bajo FSC/SSC, degranulada, que expresaba CD64-/++ , CD16+ (40%), CD15+d, CD11b+. Monocitos 27% que eran CD13-, HLADR-, CD4+, CD33++. Blastos 11%, CD34+, CD117+, CD45d, CD7-, CD3-, CD4-, CD8-, CD116-, CD13++, CD15-, CD14-, CD16-, CD64-. *Estudio ultraestructural*: 8% de blastos MOP positivos a nivel de aparato secretor y gránulos. El estudio confirmaba marcados rasgos displásicos en las 3 líneas mieloides, destacando sideroacrestia y PAS positividad eritroblástica (Figura 2D). *Cariotipo MO*: 46,XX,-3,del(5)(q13q33),+8,der(12),der(16)t(3;16)(q12;q24)[20]/

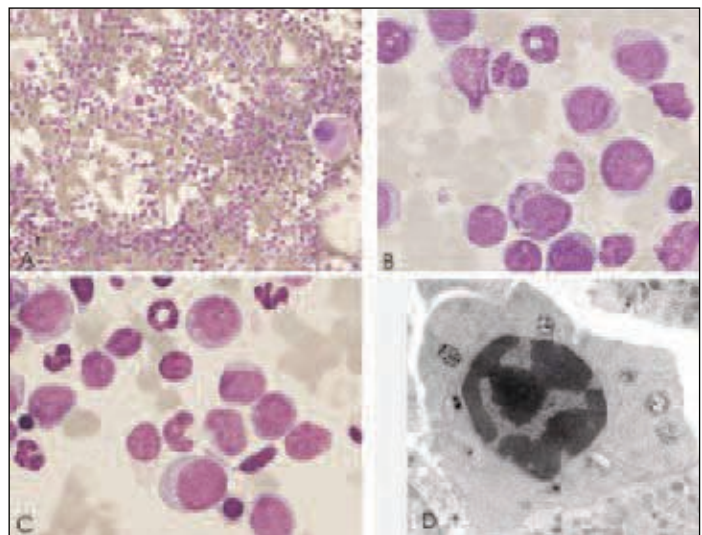


Figura 2. Aspirado de médula ósea. **A: MO hiper celular con megacariocitos monolobulados, MGG \times 200. B y C: Serie mieloide con maduración, cayados en anillo, neutrófilos degranulados y blastos. Serie eritroblástica con defectos de hemoglobinización. MGG \times 1.000. D: Imagen ultraestructural de eritroblasto con PAS positividad formando acúmulos alrededor del núcleo. Doble contraste \times 15 K.**

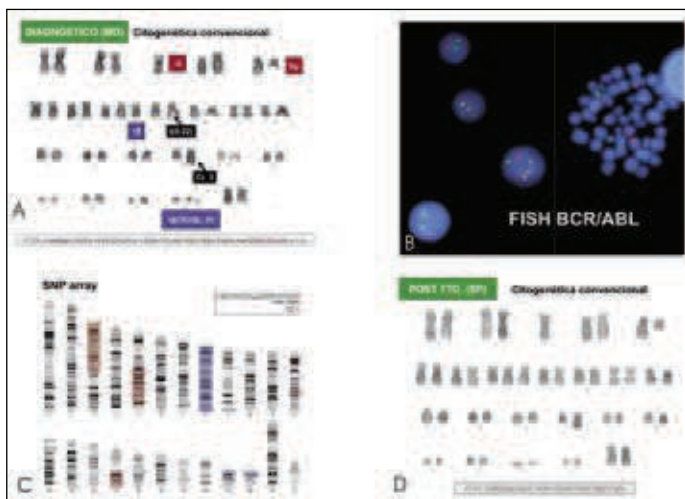


Figura 3. Estudio citogenético. A: Citogenética convencional en MO al diagnóstico. B: FISH sonda LSI BCR/ABL. C: SNPs arrays al diagnóstico: ganancias en azul y pérdidas en rojo. D: Citogenética convencional en SP post-tratamiento.

47,sl,t(9;22)(q34;q11.2),+der(22)t(9;22)(q34;q11.2)[4]/46,XX[5] (Figura 3A). *Hibridación in situ fluorescencia*: del(5q) en 96% de los núcleos, trisomía 8 en 90% y deleción del gen TEL en 96% (con 3 señales para el gen AML1 en 22%). Con sonda LSI BCR/ABL ES se detectó reordenamiento BCR/ABL patrón m-BCR con una señal extra de fusión correspondiente a +der(22)t(9;22)(q34;q11.2) en el 17% de las células (Figura 3B). *SNPs arrays* (SNP 6.0 Affimetrix): Ganancias +8, +9q34, +21q, +22q11. Pérdidas 3p-, 5q-, 12p-, 12q-, 16q- (Figura 3C). *Biología molecular*: reordenamiento BCR/ABL p190 (m-bcr) (e1-a2). *Radiografía de tórax*: lesiones pleuroparenquimatosas en lóbulo superior izquierdo secundarias a radioterapia previa. *Ecografía abdominal*: normal.

Diagnóstico: Neoplasia mieloproliferativa tipo LMC p190^{BCR/ABL}.

Evolución: Con la sospecha inicial de SMD/NMP-t con deleción 5q y otras anomalías asociadas, inició tratamiento con lenalidomida a dosis de 10 mg/día, pero a los pocos días la confirmación de BCR/ABL p190 aconsejó suspenderla e iniciar tratamiento con dasatinib 140 mg/día y soporte con EPO. Al mes y medio, el tratamiento fue suspendido temporalmente por trombocitopenia severa, se reinició a los 15 días a dosis de 50 mg/día, y 2 semanas más tarde, ante la falta de respuesta y en fase de progresión con leucocitosis $> 50,0 \times 10^9/L$, intensa monocitosis ($4,3 \times 10^9/L$), basofilia ($2,0 \times 10^9/L$) y anemia y trombocitopenia severas, se retiró definitivamente para intentar citorreducción con hidroxiurea. A las 48 horas, ingresó con rectorragias y síndrome febril de origen respiratorio sin documentación bacteriológica y, a pesar del tratamiento anti-

biótico de amplio espectro y las medidas de soporte, falleció por insuficiencia respiratoria 4 días más tarde. En fase terminal, los estudios citogenéticos mediante CC, FISH, SKY FISH y *SNPs arrays*, confirmaron la práctica desaparición de la t(9;22) y la persistencia del resto de anomalías citogenéticas (Figura 3D).

Discusión: Las neoplasias mieloides relacionadas con terapia incluyen leucemias agudas mieloides (LAM-t), síndromes mielodisplásicos (SMD-t) y síndromes mielodisplásicos/neoplasias mieloproliferativas (SMD/NMP-t), que aparecen como complicación de quimioterapia y/o radioterapia administradas por enfermedad previa neoplásica o no neoplásica. El periodo de latencia tras tratamiento con agentes alquilantes y/o radiación ionizante es de 5-10 años, y en la mayoría de los pacientes se presenta como SMD-t asociado a pérdidas genéticas no balanceadas que afectan principalmente a los cromosomas 5 y/o 7 formando parte de cariotipos complejos. En un pequeño porcentaje de casos, el diagnóstico es SMD/NMP-t o LAM-t. En los SMD-

t son características, en sangre periférica, la anemia macrocítica con poiquilocitosis, los rasgos displásicos en neutrófilos y la basofilia, y en médula ósea, la casi constante displasia de las tres líneas mieloides, destacando la presencia de sideroblastos anillados hasta en un 60% de los casos, excediendo en algunos el 15%, y la displasia megacariocítica. Sólo un 5% de los pacientes se presentan al diagnóstico como SMD/NMP-t tipo LMMC¹. El caso que presentamos, con rasgos morfológicos de SMD/NMP-t tipo LMMC-1, sideroblastos en anillo y anomalías genéticas múltiples que incluían del(5)(q13q33), presentaba además hiperplasia granulocítica con basofilia y un doble Ph en la clona minoritaria derivada. Esto obliga a plantear el diagnóstico diferencial con los raros casos ($< 1\%$) de LMC-p190^{BCR/ABL} que suelen cursar sin esplenomegalia, presentan hallazgos morfológicos intermedios entre LMC y LMMC^{2,3}, un curso clínico agresivo y mala respuesta a ITK^{4,5}. Aunque se han descrito excepcionalmente casos de SMD con reordenamiento BCR/ABL p190^{BCR/ABL} tanto al diagnóstico^{6,7} como en la evolución clonal en fase de leucemia aguda^{8,9}, según los criterios de la clasificación de la OMS (WHO, 2008), la detección de Ph es un criterio excluyente de SMD/NMP y otras neoplasias mieloproliferativas que no sean LMC¹. Aceptando este criterio mayor de clasificación, persisten en nuestro caso algunas incógnitas tanto desde el punto de vista del diagnóstico citogenético como de la respuesta al tratamiento. El doble Ph sólo estaba presente en una clona minoritaria derivada de la clona principal con anomalías citogenéticas características de SMD, lo que sugiere que se trata de una anomalía secunda-

ria adquirida en la evolución, aunque la existencia de un hemograma normal en analítica practicada 5 meses antes no permita confirmar esa hipótesis. Además, tras tratamiento con dasatinib, un inhibidor de tirosinasa de 2.^a generación, la enfermedad progresó a la vez que el porcentaje de Ph se redujo, mientras que el resto de anomalías citogenéticas permanecieron inalterables. Un posible tratamiento con un ITK asociado a lenalidomida fue desestimado por la falta de estudios sobre eficacia y seguridad de dicha asociación. En cuanto a la relación de la LMC con la radioterapia previa, ésta constituye un factor de riesgo reconocido para su desarrollo¹⁰. Concluimos que en el caso que presentamos, de difícil categorización tanto por sus características clínico-morfológicas como por las anomalías genéticas asociadas, el desarrollo de la t(9;22) con expresión de la proteína p190^{BCR/ABL} podría representar un evento genético tardío que implica una evolución más agresiva de la clona maligna.

Para recordar

- En pacientes con rasgos morfológicos intermedios entre LMC y SMD/NMP tipo LMMC, así como en LMMC, es necesario excluir la presencia de Ph, ya que su demostración, o la de su equivalente molecular, excluye el diagnóstico de SMD/NMP.
- Los raros casos de LMC con punto de rotura alternativo en el cromosoma 22 que produce un proteína de fusión p190^{BCR/ABL} se caracterizan por la ausencia de esplenomegalia, rasgos morfológicos intermedios entre LMC y LMMC, un curso clínico agresivo y mala respuesta a ITK.
- La radioterapia es un reconocido factor de riesgo para el desarrollo de LMC.
- En la categoría de neoplasias mieloides relacionadas con terapia se incluyen LAM-t, SMD-t y SMD/NMP-t, pero todas ellas deben ser consideradas el mismo síndrome clínico. Se asocian a displasia multilineal, basofilia y sideroblastos anillados, pero sólo el 5% presenta rasgos de SMD/NMP de tipo LMMC.
- En las neoplasias mieloides relacionadas con tratamiento previo con agentes alquilantes y/o radioterapia, son muy frecuentes las anomalías de los cromosomas 5 y/o 7 y los cariotipos complejos.

Bibliografía

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, vol. 2. Geneva (Switzerland) an Albany (NY, USA): WHO Press; 2008.
2. Ravandi F, Cortes J, Albitar M, Arlinghaus R, Guo JQ, Talpaz M et al. Chronic myelogenous leukaemia with p185BCR/ABL expression: characteristics and clinical significance. *Br J Haematol.* 1999;107: 581-586.
3. Melo JV. The Diversity of BCR-ABL Fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* 1996. 88(7);2375-2384
4. Verma D, Kantarjian HM, Luthra R, Borthakur G, Verstovsek S, Rios MB et al. Chronic myeloid leukemia (CML) with P190BCR-ABL: analysis of characteristics, outcomes, and prognostic significance. *Blood* 2009; 114(6): 2232-2235.
5. Pardanan A, Tefferi A, Litzow MR, Zent C, Hogan WJ, McClure RF et al. Chronic myeloid leukemia with p190BCR-ABL: prevalence, morphology, tyrosine kinase inhibitor response, and kinase domain mutation analysis. *Blood* 2009; 114(16):3502-3503.
6. Wakayama T, Maniwa Y, Ago H, Kakazu N, Abe T. A variant form of Myelodysplastic Syndrome with Ph- Minor-BCR/ABL transcript. *Int J Hematol.* 2001;74:58-63.
7. Lesesve JF, Troussard X, Bastard C, Hurst JP, Nouet D, Calat MP et al. P120BCR/ABL rearrangement in myelodysplastic syndromes: two reports and review of the literature. *Br J Haematol.* 1996; 95: 372-375.
8. Kohno T, Amenomori T, Atogami S, Sasagawa I, Nakamura H, Kuriyama K et al. Progression from myelodysplastic syndrome to acute lymphoblastic leukaemia with Philadelphia chromosome and p190 BCR-ABL transcript. *Br J Haematol.* 1996; 93(2):389-391.
9. Katsuno M, Yamashita S, Sadamura S, Umemura T, Hirata J, Nishimura J et al. Late-appearing Philadelphia chromosome in a patient with acute nonlymphocytic leukaemia derived from myelodysplastic syndrome: detection of P210- and P190-type bcr/abl fusion gene transcripts at the leukaemia stage. *Br J Haematol.* 1994; 87:51-56.
10. Deininger MWN, Goldman JM, and Melo JV The molecular biology of chronic myeloid leukemia *Blood* 2000; 96(10): 3343-3356.

