

2015

Valencia

LVII Congreso Nacional de la SEHH

XXXI Congreso Nacional de la SETH

LVII

Congreso Nacional
de la Sociedad Española de
Hematología y Hemoterapia

Valencia 2015

22-24 de octubre

www.sehhseth.com

ARÁN



Cómo acceder a la revista de ponencias y comunicaciones de la SEHH y la SETH

La Revista de Ponencias y Comunicaciones del LVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia y del XXXI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia está disponible únicamente *on line*. Esta modalidad ofrece muchas posibilidades, como hacer búsquedas por autor, o temas, etc. y la posibilidad de imprimir.



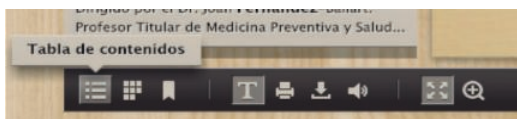
Buscador

La opción del buscador se encuentra en la parte superior derecha. Simplemente se escribe la palabra que se desee buscar y automáticamente se desplegará un menú en la parte lateral izquierda con las distintas páginas en las que se encuentra el término buscado. Si queremos acceder a dicha página basta con situar el cursor encima y hacer "click". Si no fuese la página que estamos buscando podemos continuar la búsqueda en el menú que nos ha aparecido anteriormente en el lateral izquierdo o iniciar una nueva búsqueda.

MENÚ PARTE INFERIOR IZQUIERDA

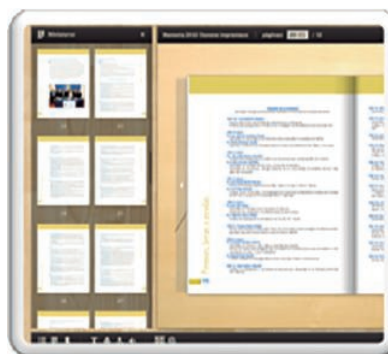
Tabla de contenidos

Aquí encontraremos el sumario. Podremos acceder directamente a las comunicaciones, ponencias o pósters.



Miniaturas

Desde esta opción del menú podremos visualizar toda la revista en miniatura y ver todas sus páginas.



Marcadores

Permite marcar las páginas en las que veamos algo interesante y guardarlas en esta opción. También se pueden guardar e imprimir todas las páginas que hemos marcado.



Seleccionar texto

Nos permite seleccionar el texto que deseamos para copiar en otro archivo o imprimir.

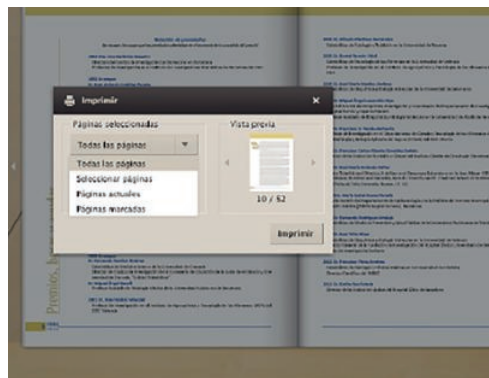


Impresión

Hay varias opciones de impresión. Desde el mismo menú de acceso se muestran todas las posibilidades:

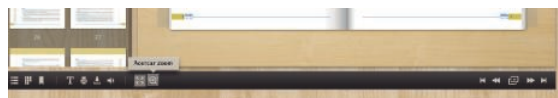
1. Imprimir toda la revista.
2. Imprimir las páginas marcadas.

3. Imprimir un intervalo. En esta opción tendríamos que señalar las páginas que deseamos. Por ejemplo, queremos imprimir nuestra comunicación que se encuentra entre las páginas 8-12. Marcaríamos: imprimir desde 8 hasta 12.
4. Imprimir página/s actual/es.



Zoom

Si queremos ampliar la página basta con hacer "doble click" en la página en la que estamos situados y automáticamente se ampliará. Si queremos minimizar, repetiremos el mismo proceso.



MENÚ PARTE INFERIOR DERECHA

Pasapáginas

Permite ir a la página siguiente o anterior, así como situarse en la primera o última página.

Pase con diapositivas

Las páginas pasan solas automáticamente en un intervalo de 3 o 4 segundos.

© Copyright 2015. ARÁN EDICIONES, S.L.

Reservados todos los derechos. Ninguna parte de esta publicación puede ser reproducida, transmitida en ninguna forma o medio alguno, electrónico o mecánico, incluyendo fotocopias, grabaciones o cualquier sistema de recuperación de almacenaje de información, sin la autorización por escrito del titular del Copyright.

La Editorial declina toda responsabilidad sobre el contenido de los artículos que aparezcan en esta publicación.

ARÁN EDICIONES, S.L.

28006 MADRID - Castelló, 128, 1.º - Telf.: 91 782 00 35 - Fax: 91 561 57 87
e-mail: edita@grupoaran.com - <http://www.grupoaran.com>



Comités

Comité Organizador

Presidente

Miguel Ángel Sanz Alonso

Vicepresidentes

María Ángeles Dasí Carpio

Vocales

Cristina Arbona Castaño
Santiago Bonanad Boix
Guillermo Cañigral Ferrando
Félix Carbonell
Nelly Carpio Martínez
Francisco España Furió
Federico Gomis Bernal
Enric Grau Segura
Luis Larrea González
Pascual Marco Vera
José Mayans
Roberto Roig
Javier de la Rubia Comos
Guillermo Sanz Santillana
Carlos Solano Vercet
María José Terol Casterá
Juana Vallés

Comité Científico

Presidente

Josep María Ribera Santasusana

Vicepresidente

José Antonio Páramo Fernández

Presidente del Comité Científico de la SEHH

Josep María Ribera Santasusana

Vocales de la SEHH

Francisco Cervantes Requena
Julio Delgado González
María Díez Campelo
Carmen Fernández Álvarez
J. Valentín García Gutiérrez
Ramón García Sanz
Montserrat López Rubio
Pau Montesinos Fernández
José Tomás Navarro Ferrando
Albert Oriol Rocafiguera
Carlos M. Panizo Santos
José Antonio Pérez Simón
(Programa Educativo)
Jaime Sanz Caballer
Guillermo Sanz Santillana
(Lección Antonio Raichs)
Jesús Villarrubia Espinosa

Junta Directiva de la SEHH

Presidente

José M.^a Moraleda Jiménez

Vicepresidente 1.º

Pascual Marco Vera

Vicepresidente 2.º

Antonio José Fernández Jurado

Secretario general

Carmen G.^a Insausti

Secretario adjunto

Domingo Borrego García

Tesorero

Rafael B. Martínez Martínez

Contador

José Rafael de la Cámara de Llanza

Vocales

Luis Javier García Frade

Ramón García Sanz

Carlos Solano Vercet

Joaquín Sánchez García

María Rozman Jurado

José Tomás Navarro Ferrando

Ana Battle López

Ángela Figuera Álvarez

Expresidentes

Agustín Aznar Gerner

Carmen Burgaleta Alonso de Ozalla

Ricardo Castillo Cofiño

Gonzalo Díaz de Iraola

Pedro Farreras Valentí

Evarist Feliu Frasnado

José M.^a Fernández Rañada

Jerónimo Forteza Bover

Manuel Giralt Raichs

Luis Hernández Nieto

Antonio López Borrasca

Juan Maldonado Eloy-García

Julio Outeriño Hernanz

Antonio Raichs Solé

Agustín Ríos González

Eduardo Rocha Hernando

Juan M. Rodríguez Fernández

Ciril Rozman Borstnar

Miquel Rutllant Banyeres

José Sánchez Fayos

Vicente Vicente García

Índice SEHH

Sociedad Española de Hematología y Hemostasia

XXVIII LECCIÓN CONMEMORATIVA ANTONIO RAICHS 1

- De ancianos y recién nacidos: de los síndromes mielodisplásicos al trasplante de sangre de cordón umbilical
G.F. Sanz 2

PONENCIAS..... 3

Trasplante. Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos de fuentes/donantes alternativos 4

- Perspectivas futuras en trasplante de sangre de cordón umbilical 5
- La depleción de células T en el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos de donante no emparentado 6

Diagnóstico biológico, citometría, genética y biología molecular. Nuevas metodologías de genética molecular en hematología..... 11

- Nuevas alternativas en el diagnóstico molecular en Hematología..... 12
- Aplicación de las tecnologías de microarrays y secuenciación en el diagnóstico y pronóstico de las neoplasias hematológicas de célula B..... 16
- Molecular characterization of hematological malignancies by high throughput sequencing: The example of Waldenstrom's macroglobulinemia 19

Eritropatología. Actualización en el metabolismo del hierro 21

- Pathophysiology of iron homeostasis and potential therapeutic targets 22
- Diagnóstico diferencial de las anemias microcíticas: más allá de la ferropenia 24
- Terapia parenteral del hierro y optimización de la hemoglobina preoperatoria..... 33
- Enfoque diagnóstico y terapéutico de las anemias ferropénicas refractarias 38

Mielodisplasia. Actualización en leucemia mielomonocítica crónica 50

- Clonal architecture of chronic myelomonocytic leukemias 51
- Identificación del monocito patológico: citología óptica y citometría de flujo como métodos de cribado inicial para el diagnóstico. Debate integrado: citología óptica..... 52
- Identificación del monocito patológico: citología óptica y citometría de flujo como métodos de cribado inicial para el diagnóstico. Debate integrado: citometría de flujo.... 55
- Estratificación del pronóstico en la LMMC. ¿Cómo lo hacemos?..... 59
- Tratamiento actual de la leucemia mielomonocítica crónica..... 64

Linfoproliferativos 1. Leucemia linfática crónica: de la genómica al tratamiento 70

- The genetics of chronic lymphocytic leukemia 71
- Leucemia linfática crónica: de la genómica al tratamiento. Tratamiento actual de la LLC 79

Gammopatías monoclonales 85

- Complejidad genómica en el mieloma múltiple 86

• Controversias en el tratamiento de primera línea en pacientes con mieloma múltiple candidatos a trasplante autólogo	91
• Nuevos fármacos y combinaciones para el tratamiento del MM refractario	99
• Controversia en el diagnóstico y en el tratamiento de la amiloidosis de cadenas ligeras (AL)	104
Leucemia mieloide crónica.....	108
• Papel de la inmunoterapia en la leucemia mieloide crónica (LMC): del interferón a las nuevas moléculas	109
• Discontinuation of tyrosine kinase inhibitors: Current situation	115
• Efectos a largo plazo de los inhibidores de tirosina cinasa: ¿qué sabemos?	116
Hemoterapia e inmunohematología. Simposio medicina transfusional.....	119
• La transfusión de componentes sanguíneos. ¿Conocemos el perfil de nuestros pacientes?	120
• Medicina transfusional y hematología clínica: una visión centrada en el paciente	123
• La transfusión de plaquetas en situaciones especiales: el paciente antiagregado, la cirugía sobre órganos críticos y la microangiopatía trombótica	128
Laboratorio de diagnóstico hematológico básico. Actualización en el laboratorio general de hematología.....	131
• Aportación de la hematimetría al estudio de talasemias y hemoglobinopatías estructurales.....	132
• Estudio de hipercoagulabilidad en el Laboratorio General de Hematología	136
• Rastreo diagnóstico de poblaciones clonales por citometría de flujo: distinción entre clonalidad y malignidad.....	141
• 10 años de acreditación de laboratorios clínicos con la norma ISO 15189.....	145
Citología. El linfocito T clonal maduro	147
• Leukaemic mature T-cell lymphoproliferative disorders. Cytology, molecular features and management.....	148
• Inmunofenotipo del linfocito T clonal y de su contrapartida normal.....	153
• Detección de clonalidad T como ayuda en el diagnóstico de las neoplasias linfoproliferativas de estirpe T.....	158
Síndromes linfoproliferativos crónicos (linfoma difuso de células B grandes)	165
• Cross talk between Hedgehog and NF-κB pathways: A novel finding in the pathobiology of diffuse large B cell lymphoma with potential therapeutic implications.....	167
• Nuevas aproximaciones inmunoterapéuticas en el LDCBG: anticuerpos biespecíficos, terapia celular mediada por linfocitos T con CAR.....	174
• Profilaxis del sistema nervioso central en el LBDCG: a qué pacientes, cuándo y cómo.....	179
Leucemias agudas. Progresos en el diagnóstico y tratamiento de la leucemia mieloblástica aguda	185
• Impacto de la caracterización biológica en la estratificación pronóstica y tratamiento de la leucemia mieloide aguda: tratamiento adaptado al riesgo.....	186
• Nuevos agentes terapéuticos en la leucemia mieloide aguda	192
• Advances in treatment of acute promyelocytic leukemia.....	198

Hematogeriatria	201
• La leucemia aguda mieloblástica en el paciente anciano.....	202
• Herramientas para la valoración geriátrica en Hematología	207
• Prevención del tromboembolismo en fibrilación auricular en el paciente anciano	208
Casos clínico-citológicos. Grupo español de citología hematológica (GECH).....	210
• Paciente diagnosticado de leucemia linfoblástica aguda T evolucionada a leucemia aguda de fenotipo mixto	211
• Neoplasia mieloproliferativa crónica con eosinofilia y basofilia	217
• Mujer de 79 años con pancitopenia y fiebre	222
• Gammapatía monoclonal de evolución atípica	227
• Mujer joven con hepatoesplenomegalia.....	231
• Lactante con bicitopenia, hepatoesplenomegalia, lesiones en piel e infiltrados pulmonares	241
Síndromes proliferativos Ph negativos. Síndromes mieloproliferativos crónicos Filadelfia negativos. Manejo integral del paciente y estrategias de futuro en SMPc Ph-	245
• ¿Deben las alteraciones moleculares guiarnos en la toma de decisiones en el tratamiento de las neoplasias mieloproliferativas Ph negativas?	246
• Clasificación y manejo de la mielofibrosis ajustado al riesgo	249
• Prevención de sangrados y eventos vasculares en policitemia vera y trombocitemia esencial.....	253
• JAK inhibitors and new treatment approaches coming for the management of myeloproliferative neoplasms	256
SIMPOSIO SEHH + EHA	259
Thrid Joint Symposium of the Spanish Society of Hematology and Hemotherapy (SEHH) and the European Hematology Association (EHA): “Education and Research”	260
• Education in Hematology in USA: The American model	261
• The EHA CV passport as a tool to harmonize the education in Hematology across Europe.....	263
• Formación especializada MIR en Hematología y Hemoterapia en España. Troncalidad y nuevo programa formativo	265
• The EHA Research Roadmap: A strategic development for coming years	276
• MPN pathogenesis: From JAK2 to CALR.....	277

XXVIII LECCIÓN CONMEMORATIVA
ANTONIO RAICHS

De ancianos y recién nacidos: de los síndromes mielodisplásicos al trasplante de sangre de cordón umbilical

G.F. SANZ

Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Universitario y Politécnico La Fe. Valencia

Cuando recibí y acepté con honor la invitación para impartir la Lección Conmemorativa Antonio Raichs del LVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH) y XXXI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hemostasia y Trombosis estuve dudando varios días acerca del contenido y, en consecuencia, del título de la Lección. Desde que me incorporé, allá por el año 1981, al Servicio de Hematología y Hemoterapia del ahora llamado Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia, primero como médico residente y después como facultativo especialista, he venido abordando en el plano asistencial, docente e investigador diversas áreas de la Hematología Clínica. En estos más de 30 años dos de ellas han concentrado fundamentalmente mi interés y dedicación: los síndromes mielodisplásicos (SMD) y el trasplante de células hematopoyéticas, especialmente el trasplante de sangre de cordón umbilical (TSCU). Como me resultaba imposible elegir una entre ellas, al final decidí no hacerlo y de ahí el título final de esta Lección. Dos edades de la vida y dos áreas de la Hematología

que parecen muy distintas pero que se entrelazan con fuerza.

El objetivo fundamental de esta Lección será resumir nuestros conocimientos actuales de los SMD y del TSCU, exponer las metas alcanzadas y los retos que plantean y, finalmente, tratar de adivinar lo que nos reserva el futuro. Y lo haré, siempre que me sea posible, desde el punto de vista de mi experiencia personal y empleando datos contrastados con la evidencia que, en muchas ocasiones, han sido fruto del esfuerzo y del excelente trabajo en común de un equipo humano difícil de reproducir, como es el de las personas que han conformado y conforman el Servicio de Hematología de nuestro centro, y de unos grupos ejemplares de trabajo de la SEHH como el Grupo Español de SMD (GESMD) y el Grupo Español de Trasplante Hematopoyético y Terapia Celular (GETH).

Finalmente, quiero pedir perdón a Chusa, Laura, Guille y Dani por los minutos, horas, días, semanas, meses y años de una vida no compartida que les he robado.

Ponencias

Trasplante. Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos de fuentes/donantes alternativos

COORDINADORES: **J. SANZ CABALLER.** *Servicio de Hematología. Hospital Universitario y Politécnico La Fe. Valencia*

J.L. PIÑANA SÁNCHEZ. *Servicio de Hematología. Fundación de Investigación INCLIVA. Hospital Clínico Universitario. Valencia*

Aproximadamente dos tercios de los pacientes con indicación de trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH) no disponen de donante familiar HLA idéntico o con una diferencia HLA. La probabilidad de encontrar un donante no emparentado (DNE) con compatibilidad HLA 8/8 (determinado por alta resolución en HLA-A, HLA-B, HLA-C y HLA-DRB1) varía entre 20% y 75% según la raza y el origen étnico. Si sumamos la disponibilidad de un DNE 7/8, estas cifras aumentarían entorno al 70%-90%. En cuanto a las unidades de cordón umbilical, > 90% de los pacientes, independientemente de su raza u origen étnico, dispondrán de unidades que cumplan los criterios mínimos establecidos de celularidad (células totales nucleadas pre-crioconservación de 2×10^7 /kg de peso del receptor, y/o un mínimo de CD34 de 1×10^7 /kg). Y si además tenemos en consideración los trasplantes de familiares haplo-idénticos, > 95% de los pacientes pueden disponer de un donante óptimo.

Aunque faltan estudios prospectivos randomizados bien diseñados, los resultados de los estudios retrospectivos sugieren una mayor morbilidad (por mayor incidencia de enfermedad de injerto contra receptor (EICR)) y mortalidad no relacionada con la recaída en aquellos pacientes que reciben un trasplante a partir de un DNE en comparación con un donante familiar HLA idéntico. También se ha observado que a mayor disparidad HLA mayor morbi-mortalidad. Sin embargo, las tasas de supervivencia global a los 3-5 años parecen similares entre los diferentes tipos de fuentes y/o donantes. Además el progresivo avance en la profilaxis de la EICR, los métodos de manipulación de la celularidad infundida (selección positiva o negativa de CD34+) junto con las numerosas modalidades de acondicionamientos hace que el trasplante pueda adaptarse a las características de cada paciente. Se sabe que más allá del grado de disparidad y de parentesco, tanto la enfermedad de base como las condiciones clínicas pretrasplante del paciente (número de comorbilidades) son los principales factores que afectan a los resultados del mismo. Por ello parece apropiado que la selección del mejor donante, mejor acondicionamiento y mejor profilaxis de la EICR se haga en base al riesgo de la enfermedad de base y al estado clínico pre-trasplante del paciente. De modo que un paciente con una enfermedad de alto riesgo de recaída post-trasplante y en buenas condiciones clínicas pueda ser preferible un donante con mayor disparidad HLA y viceversa. En condiciones óptimas, esta cuestión se abordaría mediante un estudio prospectivo aleatorizado, pero este tipo de estudios son difíciles de realizar. Además, sigue habiendo avances en áreas como la tipificación de HLA, la alorreactividad NK, la prevención de la EICR, el diseño de acondicionamientos y la manipulación del producto de infusión que podrían modificar a corto y largo plazo los resultados.

Actualmente la disponibilidad de donante es prácticamente universal, y el reto es encontrar el mejor donante y la mejor estrategia de trasplante para un paciente concreto teniendo en cuenta las características del paciente y de su enfermedad.

Perspectivas futuras en trasplante de sangre de cordón umbilical

G.F. SANZ

Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Universitario y Politécnico La Fe. Valencia

El trasplante de sangre de cordón umbilical (TSCU) aumenta de forma notable el acceso al trasplante de células hematopoyéticas (TCH). Diversos estudios comparativos en distintas neoplasias hematológicas incluyendo un elevado número de pacientes han demostrado que el TSCU ofrece resultados a largo plazo similares a los del TCH de donante no emparentado (DNE) adulto. Sin embargo, el TSCU continúa presentando serios problemas que condicionan una elevada mortalidad relacionada con el trasplante (MRT) y dificultan su mayor crecimiento en la práctica clínica. La primera de estas trabas es la mayor lentitud del injerto en relación al de DNE adulto o al TCH haploidéntico, condicionada por el menor número de células madre hematopoyéticas que contiene y que se traduce en una elevada MRT inicial secundaria a infecciones bacterianas (muchas veces por microorganismos multirresistentes) y fúngicas e ingreso hospitalario muy prolongado. La segunda es la lenta y, muchas veces incompleta, reconstitución inmunológica, lo que provoca una alta tasa de MRT secundaria

a infecciones oportunistas fundamentalmente virales (CMV, VEB y VH6 entre otros) y fúngicas. Esta última, como en otras modalidades de TCH alogénico, es todavía de abordaje imposible, aunque el notable desarrollo de formas de inmunoterapia celular adoptiva podría ayudar a solucionar algunas complicaciones infecciosas para las que carecemos de tratamientos suficientemente efectivos. En cambio, en estos últimos años estamos asistiendo a la aparición de diferentes técnicas que podrían recortar de forma efectiva el retraso del prendimiento, acercándolo al observado con otras fuentes celulares. Entre ellas se encuentran diversas plataformas de expansión *ex vivo* de progenitores hematopoyéticos, sistemas para facilitar el anidamiento de los progenitores en el nicho medular y la recolección celular en hipoxia o en presencia de ciclosporina. Esta ponencia revisará las diversas estrategias en desarrollo que, de tener éxito, conducirían a mejorar los resultados del TSCU y a su crecimiento como una alternativa curativa de extrema utilidad para distintas enfermedades hematológicas.

La depleción de células T en el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos de donante no emparentado

P. BARBA^{1,2}, M.-Á. PERALES^{1,3}

¹Adult Bone Marrow Transplantation Service. Memorial Sloan Kettering Cancer Center. Nueva York, EE. UU. ²Servicio de Hematología. Hospital Universitario Vall d'Hebron - Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España.

³Weill Cornell Medical College. Nueva York, EE. UU.

Introducción

La enfermedad de injerto contra el receptor (EICR) es uno de los principales causantes de la mortalidad relacionada con el trasplante (MRT) después de un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH). El riesgo de EICR aguda de grado II-IV se sitúa en un 35-50% en los receptores de un alo-TPH de familiar HLA histocompatible, mientras que en los trasplantes de donante no emparentado se incrementa hasta el 40-70%^{1,2}. Dado que se ha demostrado la importancia de las células T alorreactivas en el desarrollo de la EICR, se ha investigado el papel de la depleción de células T (DCT) como una estrategia para atenuar la EICR³⁻⁹. La DCT del injerto produce una disminución de la incidencia de EICR y disminuye la necesidad de los pacientes de recibir tratamiento de inmunosupresión después del procedimiento.

Aspectos técnicos de la depleción de células T

Las técnicas utilizadas para realizar la DCT han variado significativamente en los últimos años. Cada una de estas técnicas genera una selección con determinadas características en términos de tipo y cantidad de células deplecionadas. Este es un aspecto que se debe tener especialmente en cuenta cuando se analizan los datos de los diferentes estudios (Tabla 1). La DCT del injerto puede llevarse a cabo tanto por selección positiva como negativa de células CD34+. Históricamente, varios métodos de separación física han sido utilizados para la selección negativa de linfocitos del donante^{10,11}. Sin embargo, en la actualidad las técnicas más utilizadas para conseguir la DCT del producto se basan en la selección positiva, en especial a través de métodos electromagnéticos como Isolex 300i (Baxter, Deerfield, IL) y CliniMACS CD34 Reagent System (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) que permiten una reducción de células T de hasta 5 logaritmos en el producto final⁹. Por contra, las estrategias de selección negativa mantienen mayor número de linfocitos efectores en el producto, células NK entre otras, respecto a las que utilizan la selección positiva¹².

Implicaciones clínicas de la depleción T

Implante

Los estudios iniciales de la DCT mostraron un riesgo elevado de fallo del implante con impacto en la supervivencia de los pacientes. A partir de los estudios que demostraron los efectos favorecedores de la globulina antitimocítica (ATG, en inglés) sobre el injerto, su uso en los trasplantes con DCT disminuyó significativamente el riesgo de fallo del implante, que se situó en el mismo rango que en los alo-TPH sin modificar^{4,8}. Recientemente, nuevos acondicionamientos que incorporan fármacos con mayor capacidad inmunosupresora, como fludarabina y tiotepa, han permitido realizar alo-TPH con DCT prescindiendo de la ATG y de las complicaciones asociadas a su uso⁶, con un bajo riesgo de fallo del implante y menor riesgo de infecciones oportunistas.

Enfermedad de injerto contra el receptor y recaída de la enfermedad

El mayor beneficio de la DCT es, sin duda, la reducción del riesgo de EICR aguda y crónica comparada con los alo-TPH sin modificar. Sin embargo, esta disminución está estrechamente relacionada con el grado de depleción de células en el injerto. Así, mientras la depleción de 3-4 logaritmos de células T produce una reducción del riesgo de desarrollar EICR, la reducción de 1-2 logaritmos no produce una merma significativa de este riesgo e implica la necesidad de tratamientos inmunosupresores postrasplante en estos pacientes.

En el caso de las enfermedades malignas, el principal objetivo del alo-TPH es disminuir el riesgo de recaída mediante el efecto del injerto contra tumor. En el caso de la leucemia mieloide crónica (LMC), un estudio retrospectivo comparó los resultados de dos grupos de pacientes en fase crónica: 46 receptores de un alo-TPH con DCT y 40 de un alo-TPH sin manipular¹³. La probabilidad de recaída a 3 años del grupo de DCT fue 2,5 veces superior al grupo sin depleción (62% vs. 24%,

Tabla 1. Resultados de alo-TPH con DCT

Método	Número de pacientes	Tipo de donante	Grado de depleción	Profilaxis EICR	EICR aguda	Fallo del implante	SLP/SLE	SG	Referencia
CD34+	50	HLA-FAM	ND	Ciclosporina +/- esteroides	16%	0	SLE 65%	ND	(9)
CD34+E-	52	HLA-FAM	5 logs	No	8%	0	ND	17% a 1 año	(6)
CD34+E-	29	DNE	5 logs	No	9%	3%	57% a 4 años	59% a 4 años	(5)
CD34+	47	HLA-FAM	4.9 logs	No	22.7%	0	EFS 63% a 4 años	71% a 4 años	(17)
CD3/CD19 depleción	29	Haplo	4.4 logs	No	48%	0	35% a 1 año	31% a 241 d.	(30)
CD34+E- o CD34+	115	HLA-MUD o MRD	ND	No	5%		SLP 58% a 3 años	57% a 3 años	(15)

CD34+: selección de células CD34+; CD34+E-: selección de células CD34+ y E-rosetting; ND: no disponible; HLA-FAM: familiar HLA idéntico; SLP: supervivencia libre de progresión; SLE: supervivencia libre de evento; SG: supervivencia global.

$p = 0.0003$). Sin embargo, 17 de 20 pacientes del grupo de DCT y 2 de 3 pacientes en el grupo de no depleción alcanzaron una nueva respuesta completa tras la administración de infusión de linfocitos del donante (ILD), por lo que no se observaron diferencias en supervivencia global entre los dos grupos. Debido al riesgo elevado de recaídas en esta indicación, no se recomienda el uso de alo-TPH con DCT en la LMC.

En cambio, en pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) y leucemia linfoblástica aguda (LAL) el riesgo de recaída y la supervivencia son similares en pacientes que reciben injertos deplecionados o sin manipular¹⁴⁻¹⁶. El *Blood and Marrow Clinical Trials Network* (BMT CTN) ha presentado recientemente los resultados de un estudio multicéntrico fase II en el que 44 pacientes de hasta 65 años con LMA en primera remisión completa (RC1) o segunda RC (RC2) recibieron un alo-TPH con selección de células CD34 mediante el CliniMACS CD34 Reagent System (BMT CTN 0303)¹⁷. En pacientes con LMA en RC1 la probabilidad de recaída a los 36 meses fue del 17,4%. Más recientemente, un estudio centrado en pacientes con LMA en RC1 ha comparado los resultados clínicos de 115 alo-TPH con DCT realizados en el Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC) con 181 alo-TPH sin modificar practicados en el M.D. Anderson Cancer Center (MDACC)¹⁵. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la incidencia acumulada de recaída al año (17% vs. 21%, $p = 0.4$) ni a los 3 años (18% vs. 25%, $p = 0.9$) entre los dos grupos. Sin embargo, los pacientes que recibieron un alo-TPH con depleción T desarrollaron menos EICR aguda de grado 2-4 (5% vs. 18%, $p = 0.005$) y menos EICR crónica (13% vs. 53%, $p < 0.001$) que los del grupo de alo-TPH sin modificar. En la LAL, otro estudio retrospectivo que incluía 56 pacientes que recibieron un alo-TPH con DCT por esta indicación mostró una incidencia de recaída del 23% y una SG y SLP a los

3 y 5 años similares a los resultados publicados en la mayoría de estudios, con una incidencia de EICR aguda y crónica menor¹⁸.

Los pacientes que presentan EICR crónica tienen una calidad de vida peor que aquellos que no la desarrollan. Por ello, el uso de alo-TPH con DCT podría tener un beneficio adicional en términos de calidad de vida respecto a los alo-TPH sin modificar. Sin embargo, todavía no existe evidencia científica suficientemente sólida para apoyar esta afirmación. En este sentido, un estudio aleatorizado demostró que los receptores de un alo-TPH con DCT requirieron menos ingresos hospitalarios que los que recibieron un alo-TPH sin modificar¹⁹.

La reconstitución inmune

El alo-TPH con DCT se asocia a un retraso de la recuperación de células T CD4+ (absolutas y naïf) así como de la respuesta T mitógena. En el ámbito clínico también se ha observado un aumento del riesgo de desarrollar infecciones oportunistas y síndromes linfoproliferativos asociados al virus de Epstein-Barr, en los primeros 12 meses tras el procedimiento^{20,21}.

Los pacientes que reciben un alo-TPH con DCT presentan niveles más bajos de círculos de escisión del receptor de la célula T (TREC, en inglés) que los que reciben un alo-TPH sin modificar, aunque estas diferencias desaparecen a partir de los 9 meses del alo-TPH²². Los TREC son un marcador del funcionalismo tímico y niveles bajos de estos receptores se han asociado a mayor riesgo de desarrollar infecciones.

De modo similar, determinaciones cuantitativas del repertorio del receptor de células T (TCR, en inglés) han demostrado una recuperación más lenta en los pacientes que reciben un alo-TPH con DCT, respecto a los trasplantes sin modificar²³. A los 6 meses del TPH, los pacientes que recibían un alo-TPH de sangre de cordón

umbilical tenían un repertorio similar a los individuos sanos, mientras que el repertorio de CD4 y CD8 en los que recibían un alo-TPH con DCT era unas 14 y 28 veces menor, respectivamente. De nuevo estas diferencias se normalizaban a los 12 meses del TPH.

Para intentar mejorar la reconstitución inmune se han estudiado diferentes estrategias de terapia celular y farmacológica. La infusión postrasplante de dosis limitadas de linfocitos del donante, con el objetivo de mejorar la reconstitución inmune sin producir un aumento del riesgo de EICR, han sido analizadas en, al menos, un estudio²⁴. Se incluyeron 19 receptores de un alo-TPH de sangre periférica con DCT a partir de donantes no emparentados histocompatibles. En el periodo post-TPH se añadieron células T hasta alcanzar una dosis de $1,0-2,5 \times 10^5$ CD3+/kg, sin que se observaran complicaciones destacables. Otras modalidades con potencial capacidad para mejorar la reconstitución inmune incluyen el factor de crecimiento de los queratinocitos (KGF), la interleucina 7 (IL-7), la hormona de crecimiento y la alteración de los esteroides sexuales mediante agentes como el degarelix y el leuprolide. La IL-7 juega un papel determinante en el desarrollo y la supervivencia de las células T, y se ha demostrado su capacidad para mejorar la reconstitución inmune en modelos murinos de alo-TPH. En un estudio fase I en el MSKCC se administraron dosis semanales crecientes de IL-7 (CYT107, Cytheris Inc.) a 12 receptores de un alo-TPH de donante histocompatible con DCT²⁵. El estudio demostró que la IL-7 aumentaba el funcionalismo de las células T, así como la diversidad de TCR, sin producir un aumento de la EICR. Finalmente, existe en la actualidad un ensayo clínico en fase de inclusión en el que a pacientes que reciben un alo-TPH con DCT e irradiación corporal total se les administra KGF y leuprolide para determinar

si estos agentes producen una reconstitución inmune más rápida (NCT01746849).

Beneficios de la selección de células CD34+ en el alo-TPH

Como ya ha sido señalado, el principal beneficio de la DCT en el alo-TPH es la disminución de la incidencia de EICR aguda y crónica en comparación con los alo-TPH sin manipular^{14,17}. El impacto sobre el desarrollo de EICR crónica tiene también un beneficio en términos de morbilidad a largo plazo y, probablemente, en calidad de vida. Además, los pacientes no requieren profilaxis farmacológica de la EICR durante el periodo post-TPH, por lo que se evitan los efectos adversos de estos tratamientos usados en los alo-TPH sin modificar. En este sentido, se elimina la toxicidad renal de los inhibidores de calcineurina y se revierte la necesidad de posponer o contraindicar un trasplante en los pacientes con insuficiencia renal previa. Del mismo modo, esta modalidad de trasplante permite el uso de acondicionamientos mioablativos en pacientes de edad avanzada, al no existir la combinación tóxica del acondicionamiento y la profilaxis farmacológica de la EICR, lo que permite reducir la probabilidad de recaída en estos pacientes (Tabla 2).

Población diana para el uso de la DCT en el alo-TPH

En general, los pacientes que tengan mayor riesgo de desarrollar EICR, o aquellos que no se beneficien de un efecto del injerto contra tumor, son los mejores candidatos para recibir un alo-TPH con DCT. En este sentido, los pacientes que reciban un trasplante de un donante con una o más diferencias en el HLA deberían recibir

Tabla 2. Ventajas y desventajas de la DCT en el alo-TPH

Resultado	Ventajas	Desventajas
Implante		Aumento potencial del riesgo de fallo del implante
Toxicidad	Reducción de la mucositis por MTX Reducción de la toxicidad renal por ICN	
EICR	Disminución de la EICR aguda y crónica	
Reconstitución inmune		Retraso en la reconstitución inmune
Recaída	Comparable a los alo-TPH sin modificar en LAL, LMA, SMD y LNH	Aumento del riesgo de recaída en LMC
Pacientes de edad avanzada y/o comorbilidades	Evita la exposición de los pacientes a inmunosupresores post-TPH	
Calidad de vida	Mejoría esperada de la calidad de vida por la disminución de la EICR crónica	

MTX: metotrexato; ICN: inhibidor de calcineurina; EICR: enfermedad de injerto contra el receptor; alo-TPH: trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos; LAL: leucemia aguda linfoblástica; LMA: leucemia mieloblástica aguda; LNH: linfoma no Hodgkin; LMC: leucemia mieloide crónica.

un alo-TPH con DCT. Pacientes con enfermedades no malignas, como la anemia de células falciformes o la inmunodeficiencia combinada grave, también deberían recibir esta modalidad para disminuir el riesgo de EICR²⁶. Aunque los pacientes con LMC tienen un riesgo de recaída más alto si reciben un alo-TPH con DCT, existen muchas otras indicaciones en las que la DCT debería ser considerada. Pacientes con síndromes mielodisplásicos (SMD), LMA, LAL y linfomas de alto grado son candidatos óptimos para recibir un alo-TPH, ya que se ha demostrado que tienen una supervivencia y un riesgo de recaída similares a los que reciben un alo-TPH sin modificar^{4-6,15-18,27,28}. En resumen, la identificación del paciente óptimo para recibir un alo-TPH con DCT debe tener en consideración el riesgo de desarrollar EICR y la compatibilidad HLA.

Resultados de los estudios con selección negativa de células CD34+

En la actualidad, la mayoría de estudios clínicos en alo-TPH con DCT se focalizan en la selección positiva de células CD34+. Sin embargo, se puede obtener dicha selección mediante estrategias de depleción de CD3, CD3/CD19 y TCR $\alpha\beta$ (+)/CD19. Estudios recientes han investigado la depleción de TCR $\alpha\beta$ (+) y de células CD19+ mediante el sistema CliniMACs²⁹. El número de células CD34+ obtenidas mediante esta técnica es comparable al de la selección positiva y la depleción CD3/CD19 se aproxima. En un estudio reciente, 29 pacientes que recibieron un alo-TPH de donante haploideéntico con depleción de CD3/CD19 mostraron una rápida reconstitución inmune y alcanzaron un quimerismo completo del donante entre 2 y 4 semanas³⁰. Otro estudio multicéntrico prospectivo fase II, con 62 pacientes que recibieron un alo-TPH de donante haploideéntico con selección negativa de CD3/CD19 con acondicionamiento de intensidad reducida, mostró una recuperación de granulocitos ($> 0.5 \times 10^9/L$) en el día +12 (intervalo 9-50) y de plaquetas ($> 20 \times 10^9/L$) en el día +11 (intervalo 7-38)³¹. Finalmente, un ensayo clínico aleatorizado de alo-TPH de donante familiar y no emparentado HLA compatibles, en el que los pacientes recibían progenitores de sangre periférica con selección CD3/CD19 vs. selección positiva de células CD34+, mostró una recuperación más rápida de células NK en el grupo de CD3/CD19, lo que podría contribuir a una respuesta antitumoral temprana después del trasplante³².

Conclusiones

La DCT en el contexto del alo-TPH ha demostrado su capacidad para disminuir la mortalidad y morbilidad del procedimiento respecto las plataformas clásicas de alo-TPH. Ahora bien, la indicación de un alo-TPH con DCT

debe tener en cuenta varios factores, como la técnica de depleción de células T, la manipulación del producto y los riesgos derivados del uso de un acondicionamiento mieloablativo y de la reconstitución inmune ralentizada. Además, aquellos casos en los que se requiera un efecto de injerto contra tumor potente no serían de elección para esta modalidad de trasplante. Sin embargo, la potencial capacidad de los alo-TPH con DCT para disminuir la MRT, en especial la derivada de la EICR, hacen que sea una estrategia atractiva para determinados pacientes. En cualquier caso, se requieren más estudios aleatorizados que comparen los resultados de estas dos estrategias. En este sentido, existe un ensayo clínico fase III a punto de iniciarse en el que se van a comparar tres estrategias de trasplante en pacientes con SMD y leucemia aguda candidatos a recibir un alo-TPH de donante familiar o no emparentado histocompatible con acondicionamiento mieloablativo: DCT con el sistema CliniMACs CD34, infusión con ciclofosfamida post-TPH y un brazo control con tacrolimus y pauta corta de metotrexato (BMT CTN 1301, NCT00574496).

Bibliografía

1. Nash RA, Antin JH, Karanes C, Fay JW, Avalos BR, Yeager AM, et al. Phase 3 study comparing methotrexate and tacrolimus with methotrexate and cyclosporine for prophylaxis of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation from unrelated donors. *Blood* 2000;96(6):2062-8.
2. Inamoto Y, Flowers ME, Appelbaum FR, Carpenter PA, Deeg HJ, Furlong T, et al. A retrospective comparison of tacrolimus versus cyclosporine with methotrexate for immunosuppression after allogeneic hematopoietic cell transplantation with mobilized blood cells. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17(7):1088-92.
3. Alyea EP, Weller E, Fisher DC, Freedman AS, Gribben JG, Lee S, et al. Comparable outcome with T-cell-depleted unrelated-donor versus related-donor allogeneic bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002;8(11):601-7.
4. Papadopoulos EB, Carabasi MH, Castro-Malaspina H, Childs BH, Mackinnon S, Boulad F, et al. T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation as postremission therapy for acute myelogenous leukemia: freedom from relapse in the absence of graft-versus-host disease. *Blood* 1998;91(3):1083-90.
5. Jakubowski AA, Small TN, Kernan NA, Castro-Malaspina H, Collins N, Koehne G, et al. T cell-depleted unrelated donor stem cell transplantation provides favorable disease-free survival for adults with hematologic malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;17(9):1335-42.
6. Jakubowski AA, Small TN, Young JW, Kernan NA, Castro-Malaspina H, Hsu KC, et al. T cell depleted stem-cell transplantation for adults with hematologic malignancies: sustained engraftment of HLA-matched related donor grafts without the use of antithymocyte globulin. *Blood* 2007;110(13):4552-9.
7. Young JW, Papadopoulos EB, Cunningham I, Castro-Malaspina H, Flomenberg N, Carabasi MH, et al. T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation in adults with acute nonlymphocytic leukemia in first remission. *Blood* 1992;79(12):3380-7. Epub 1992/06/15.
8. Aversa F, Terenzi A, Carotti A, Felicini R, Jacucci R, Zei T, et al. Improved outcome with T-cell-depleted bone marrow trans-

- plantation for acute leukemia. *J Clin Oncol* 1999;17(5):1545-50.
9. Urbano-Ispizua A, Brunet S, Solano C, Moraleda JM, Rovira M, Zuazu J, et al. Allogeneic transplantation of CD34+ selected cells from peripheral blood in patients with myeloid malignancies in early phase: a case control comparison with unmodified peripheral blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001;28(4):349-54.
 10. Reisner Y, Kapoor N, Kirkpatrick D, Pollack MS, Dupont B, Good RA, et al. Transplantation for acute leukaemia with HLA-A and B nonidentical parental marrow cells fractionated with soybean agglutinin and sheep red blood cells. *Lancet* 1981;2(8242):327-31.
 11. De Witte T, Hoogenhout J, de Pauw B, Holdrinet R, Janssen J, Wessels J, et al. Depletion of donor lymphocytes by counterflow centrifugation successfully prevents acute graft-versus-host disease in matched allogeneic marrow transplantation. *Blood* 1986;67(5):1302-8.
 12. Handgretinger R. Negative depletion of CD3(+) and TcRalpha-beta(+) T cells. *Curr Opin Hematol* 2012;19(6):434-9.
 13. Sehn LH, Alyea EP, Weller E, Canning C, Lee S, Ritz J, et al. Comparative outcomes of T-cell-depleted and non-T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia: impact of donor lymphocyte infusion. *J Clin Oncol* 1999;17(2):561-8.
 14. Pasquini MC, Devine S, Mendizabal A, Baden LR, Wingard JR, Lazarus HM, et al. Comparative outcomes of donor graft CD34+ selection and immune suppressive therapy as graft-versus-host disease prophylaxis for patients with acute myeloid leukemia in complete remission undergoing HLA-matched sibling allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol* 2012;30(26):3194-201.
 15. Bayraktar UD, de Lima M, Saliba RM, Maloy M, Castro-Malaspina HR, Chen J, et al. Ex vivo T cell-depleted versus unmodified allografts in patients with acute myeloid leukemia in first complete remission. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;19(6):898-903.
 16. Hobbs G, Perales M-A. Effects of T-Cell Depletion on Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Outcomes in AML Patients. *Journal of Clinical Medicine* 2015;4(3):488-503.
 17. Devine SM, Carter S, Soiffer RJ, Pasquini MC, Hari PN, Stein A, et al. Low risk of chronic graft-versus-host disease and relapse associated with T cell-depleted peripheral blood stem cell transplantation for acute myelogenous leukemia in first remission: results of the blood and marrow transplant clinical trials network protocol 0303. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;17(9):1343-51.
 18. Goldberg JD, Linker A, Kuk D, Ratan R, Jurcic J, Barker JN, et al. T Cell-Depleted Stem Cell Transplantation for Adults with High-Risk Acute Lymphoblastic Leukemia: Long-Term Survival for Patients in First Complete Remission with a Decreased Risk of Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;19(2):208-13.
 19. Wagner JE, Thompson JS, Carter SL, Kernan NA. Effect of graft-versus-host disease prophylaxis on 3-year disease-free survival in recipients of unrelated donor bone marrow (T-cell Depletion Trial): a multi-centre, randomised phase II-III trial. *Lancet* 2005;366(9487):733-41.
 20. Small TN, Avigan D, Dupont B, Smith K, Black P, Heller G, et al. Immune reconstitution following T-cell depleted bone marrow transplantation: effect of age and posttransplant graft rejection prophylaxis. *Biol Blood Marrow Transplant* 1997;3(2):65-75.
 21. Small TN, Papadopoulos EB, Boulad F, Black P, Castro-Malaspina H, Childs BH, et al. Comparison of immune reconstitution after unrelated and related T-cell-depleted bone marrow transplantation: effect of patient age and donor leukocyte infusions. *Blood* 1999;93(2):467-80.
 22. Levin SD, Koelling RM, Friend SL, Isaksen DE, Ziegler SF, Perlmutter RM, et al. Thymic stromal lymphopoietin: a cytokine that promotes the development of IgM+ B cells in vitro and signals via a novel mechanism. *J Immunol* 1999;162(2):677-83.
 23. Van Heijst JW, Ceberio I, Lipuma LB, Samilo DW, Wasilewski GD, Gonzales AM, et al. Quantitative assessment of T cell repertoire recovery after hematopoietic stem cell transplantation. *Nat Med* 2013;19(3):372-7.
 24. Geyer MB, Ricci AM, Jacobson JS, Majzner R, Duffy D, van de Ven C, et al. T cell depletion utilizing CD34(+) stem cell selection and CD3(+) addback from unrelated adult donors in paediatric allogeneic stem cell transplantation recipients. *Br J Haematol* 2012;157(2):205-19.
 25. Perales MA, Goldberg JD, Yuan J, Koehne G, Lechner L, Papadopoulos EB, et al. Recombinant human interleukin-7 (CYT107) promotes T-cell recovery after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2012;120(24):4882-91.
 26. Reisner Y, Kapoor N, Kirkpatrick D, Pollack MS, Cunningham-Rundles S, Dupont B, et al. Transplantation for severe combined immunodeficiency with HLA-A,B,D,DR incompatible parental marrow cells fractionated by soybean agglutinin and sheep red blood cells. *Blood* 1983;61(2):341-8.
 27. Castro-Malaspina H, Jabubowski AA, Papadopoulos EB, Boulad F, Young JW, Kernan NA, et al. Transplantation in remission improves the disease-free survival of patients with advanced myelodysplastic syndromes treated with myeloablative T cell-depleted stem cell transplants from HLA-identical siblings. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14(4):458-68.
 28. Perales MA, Jenq R, Goldberg JD, Wilton AS, Lee SS, Castro-Malaspina HR, et al. Second-line age-adjusted International Prognostic Index in patients with advanced non-Hodgkin lymphoma after T-cell depleted allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2010;45(9):1408-16.
 29. Schumm M, Lang P, Bethge W, Faul C, Feuchtinger T, Pfeiffer M, et al. Depletion of T-cell receptor alpha/beta and CD19 positive cells from apheresis products with the CliniMACS device. *Cytotherapy* 2013;15(10):1253-8.
 30. Bethge WA, Faul C, Bornhauser M, Stuhler G, Beelen DW, Lang P, et al. Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults using CD3/CD19 depletion and reduced intensity conditioning: an update. *Blood Cells Mol Dis* 2008;40(1):13-9.
 31. Federmann B, Bornhauser M, Meisner C, Kordelas L, Beelen DW, Stuhler G, et al. Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults using CD3/CD19 depletion and reduced intensity conditioning: a phase II study. *Haematologica* 2012;97(10):1523-31.
 32. Eissens DN, Schaap NP, Preijers FW, Dolstra H, van Cranenbroek B, Schattenberg AV, et al. CD3+/CD19+-depleted grafts in HLA-matched allogeneic peripheral blood stem cell transplantation lead to early NK cell cytolytic responses and reduced inhibitory activity of NKG2A. *Leukemia* 2010;24(3):583-91.

Diagnóstico biológico, citometría, genética y biología molecular. Nuevas metodologías de genética molecular en hematología

COORDINADORES: **R. GARCÍA SANZ.** *Unidad de Biología Molecular. Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Universitario de Salamanca. IBSAL IBMCC (USAL-CSIC). Salamanca*

J. MARTÍNEZ LÓPEZ. *Servicio de Hematología. Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid*

En los últimos años, las tecnologías de alta capacidad o (traducción libre de *high throughput technologies*) han cambiado notablemente la forma de los hematólogos al mirar al laboratorio y a su oferta al diagnóstico y monitorización de los pacientes, así como las nuevas posibilidades que se abren en el desarrollo de los proyectos de investigación. El área molecular ha sido especialmente sensible a estos aspectos nuevas tecnologías y se presenta tanto al clínico como al investigador como un campo lleno de oportunidades.

No obstante, la complejidad que supone la utilización de estas técnicas supone un desafío notable para muchos hematólogos. En este simposio pretendemos acercar estas nuevas metodologías a los hematólogos, tanto clínicos como de laboratorio, que no están aún familiarizados con ellas. Es decir, ante una audiencia compleja (clínicos, investigadores, genetistas, especialistas en coagulación...) pretendemos explicar cómo podemos empezar a utilizar las técnicas moleculares de alta capacidad más conocidas como “Ningle Nucleotide Polymorphism” (SNP) *arrays* y “Next Generation Sequencing” (NGS). En la primera presentación, la Dra. Sarasquete abordará el estado actual de la cuestión y de cómo se prevé que las cosas puedan cambiar. Por ejemplo, cómo están los datos conocidos de cariotipaje convencional e hibridación *in situ* fluorescente (FISH), reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y discriminación alélica, PCR y análisis de fragmentos, PCR multi-tubo, etc. pueden mejorarse o no con técnicas de SNP y NGS. Posteriormente, la Dra. Beà nos comentará la experiencia con técnica de SNP *arrays* en “Genome Wide Association Studies” (GWAS) y en especial en “copy number variation” (CNV) en series pacientes, en especial en linfoma del manto, leucemia linfóide crónica, linfoma difuso de célula grande, etc. Además, también nos hablará de algunas posibilidades para el futuro con NGS. Finalmente, el Dr. Treon nos comentará cómo se puede aplicar la metodología de NGS en una enfermedad y serie particular de pacientes para descubrir mutaciones nuevas y centrarse en ellas. Para ello hablará de los recientes descubrimientos que se han hecho en la macroglobulinemia de Waldenström, que están cambiando por completo el diagnóstico y monitorización de la enfermedad, e incluso el tratamiento, ya que el descubrimiento de vías metabólicas alteradas puede ayudarnos a entender mejor la enfermedad y adoptar nuevas fórmulas de tratamiento basados en dianas terapéuticas abordables con fármacos específicos como los inhibidores de la tirosina quinasa de Bruton e incluso algunos otros como los inhibidores de CXCR4.

Estas tres presentaciones servirán para abrir un debate en el que sobre estos tres ejemplos podremos comprender mejor las nuevas metodologías de laboratorio aplicadas a nuestros pacientes y a la investigación sobre sus enfermedades.

Nuevas alternativas en el diagnóstico molecular en Hematología

M.E. SARASQUETE, M.C. CHILLÓN, C. JIMÉNEZ, M. GONZÁLEZ, R. GARCÍA-SANZ

Hospital Universitario de Salamanca-IBSAL, IBMCC (USAL-CSIC); Research Grant Support. Salamanca

Introducción

Las técnicas moleculares constituyen una herramienta básica en el estudio de las hemopatías malignas. Su uso se hace imprescindible para la confirmación diagnóstica, la estratificación pronóstica y la monitorización terapéutica de muchas neoplasias hematológicas. En el presente trabajo revisaremos las técnicas clásicas de citogenética y biología molecular empleadas en el diagnóstico de neoplasias hematológicas, sus ventajas e inconvenientes y cómo su aplicación ha permitido profundizar en el conocimiento de los procesos implicados en el desarrollo y la progresión tumoral.

En los últimos años, el campo del diagnóstico molecular ha experimentado una revolución sin precedentes debido al desarrollo de nuevas herramientas, tales como las técnicas de secuenciación masiva. Es por ello que discutiremos el impacto que han tenido sobre el diagnóstico molecular hematológico y plantaremos los nuevos retos para su implementación clínica.

Herramientas clásicas en el diagnóstico molecular

El diagnóstico molecular en hematología integra los datos obtenidos a través de diferentes metodologías, desde las técnicas citogenéticas clásicas de bandeo, pasando por la citogenética molecular (hibridación *in situ* fluorescente, HiSF, hibridación genómica comparada, HGC, SNP-arrays) hasta las técnicas de biología molecular (PCR, secuenciación, estudios de expresión de génica) para proporcionar un conocimiento global sobre la patología de la enfermedad en el ámbito molecular.

La citogenética convencional estudia las anomalías cromosómicas en metafases de las células neoplásicas tras el cultivo *in vitro*, lo que permite detectar en un solo experimento las alteraciones numéricas y estructurales presentes en todo el genoma, con un coste reducido, si bien tiene escasa sensibilidad y presenta inconvenientes asociados a la necesidad de obtener metafases. Por

el contrario, la HiSF, aunque no permite obtener una información global del genoma, es aplicable tanto en metafases como en núcleos interfásicos de forma rápida, sensible y objetiva. Por ello es la técnica más usada en el diagnóstico molecular de numerosas neoplasias hematológicas. No obstante, su limitada sensibilidad (5%) hace que no sea la técnica más adecuada para estudios de enfermedad mínima residual (EMR)¹.

Una variante más reciente de la HiSF es la HGC, basada en la hibridación competitiva de dos ADN (tumoral y control normal) marcados con distintos fluorocromos. Su principal ventaja radica en que no requiere células en división, y permite la detección de ganancias y pérdidas de regiones cromosómicas a lo largo de todo el genoma. No obstante, presenta ciertas limitaciones, ya que no detecta reordenamientos equilibrados, translocaciones e inversiones, ni otras alteraciones de tipo balanceado. Su principal inconveniente es la sensibilidad de la técnica, ya que requiere una infiltración tumoral superior al 30%. Ello obliga a que tanto para HiSF como para CGH haya que pasar por un proceso de selección o enriquecimiento celular, como la separación con métodos inmunomagnéticos o citometría de flujo.

Con el objetivo de mejorar la resolución de la CGH surgen los arrays de polimorfismos de nucleótido simple (SNP). Se trata de una combinación de CGH-arrays y genotipado de SNP sobre una misma plataforma, lo que permite el análisis simultáneo del número de copias de ADN y del genotipo con gran resolución, identificando además regiones cromosómicas que sufren pérdidas de heterocigosidad o disomías uniparentales. En la última década la aplicación de esta herramienta en el estudio de las neoplasias hematológicas ha revelado importantes hallazgos, como por ejemplo la identificación de *PAX5* como elemento clave para la inactivación genética de la leucemia aguda linfocítica, o de *TET2* como gen supresor tumoral en síndromes mielodisplásicos².

Para profundizar en los detalles de las anomalías genéticas, la biología molecular emplea la reacción en cadena de la polimerasa, o PCR, como fundamento para gran parte de sus aplicaciones, entre las que se encuen-

tran secuenciación, identificación de nuevos genes y polimorfismos, estudio de reordenamientos cromosómicos, y/o genes de fusión, estudio de mutaciones esporádicas y adquiridas, conocimiento de anomalías cromosómicas estructurales y epigenéticas, e incluso el análisis cuantitativo de la expresión de genes. Además de su aportación en el diagnóstico y en la clasificación de entidades clinicobiológicas y grupos de riesgo, su carácter cuantitativo permite monitorizar la respuesta al tratamiento y así la toma de decisiones terapéutica, gracias a su elevada sensibilidad.

Entre las aplicaciones más relevantes en el ámbito de la hematología están los estudios de EMR con técnicas de PCR *nested* y PCR cuantitativa en tiempo real (RQ-PCR), que combinan alta sensibilidad (hasta 10^{-6}), especificidad y aplicabilidad. Estas técnicas permiten la monitorización de todas aquellas leucemias y linfomas que dispongan de un marcador molecular característico. Entre estos se incluyen tanto estudios de genes de fusión y/o traslocaciones cromosómicas, ya sea una traslocación, t(15;17) en leucemia aguda promielocítica (LAP); t(14,18), en linfoma folicular (LF); t(9,22), en leucemia mieloide crónica (LMC) y en leucemia aguda linfoblástica (LAL) BCR-ABL1+, como el estudio de los reordenamientos clonales de los genes del receptor de células B (BCR) y T (TCR) en los síndromes linfoproliferativos, mutaciones cuantificables (por ejemplo, mutaciones de *NPM1* y *MLL-PTD*) y genes de expresión aberrante en hemopatías malignas (por ejemplo, hiperexpresión del gen *WT1* en leucemia aguda mieloblástica -LAM-)³.

La secuenciación clásica de Sanger constituye uno de los pilares en el diagnóstico molecular clásico, siendo la herramienta estándar para la detección de mutaciones. Son varias las entidades para las que la WHO establece entre sus criterios diagnósticos la determinación de su patrón de mutaciones, entre ellas las LAM con cariotipo normal que requiere determinar las mutaciones de los genes *FLT3*, *NPM1* y *CEBPA* para refinar el pronóstico establecido solo mediante citogenética (por ejemplo, LMA con mutaciones en *NPM1* y *FLT3* salvaje presentan pronóstico favorable). Por otra parte, los estudios de expresión génica a gran escala (arrays de expresión) o media-baja escala (arrays de baja densidad) han permitido profundizar en el conocimiento de numerosas neoplasias hematológicas, proporcionando información relevante en el plano diagnóstico⁴ y/o pronóstico-terapéutico⁵.

Importancia del diagnóstico molecular en hematología

Las diferentes herramientas moleculares juegan un papel muy importante en el manejo de los pacientes con neoplasias hematológicas en el ámbito diagnóstico, pronóstico-terapéutico y en la monitorización de

la enfermedad. Desde el punto de vista diagnóstico, hoy día se conocen numerosas anomalías cromosómicas y moleculares que son clave para la clasificación de neoplasias hematológicas. Alguno de los ejemplos más conocidos son la determinación del cromosoma Philadelphia, originado por la t(9;22)^{BCR-ABL1}, para la confirmación de LMC, y la presencia del la t(15;17)^{PML-RAR α} , que confirma el diagnóstico de la LAP. Más aún, la presencia de determinada anomalía cromosómica puede ser diana de un fármaco, lo que permite una terapia más personalizada, como en el caso de pacientes que presentan el transcrito de fusión *BCR/ABL1* en LMC que deben recibir tratamiento con imatinib la presencia de mutaciones de ABL en estos pacientes, que deben recibir otros inhibidores tirosina cinasa (dasatinib, nilotinib, ponatinib), y pacientes con *PML-RAR α* , en los que hay que utilizar ácido transretinoico (ATRA) y posiblemente trióxido de arsénico.

Por otra parte, los estudios moleculares han permitido clasificar los pacientes en diferentes grupos de riesgo, lo que en ocasiones conlleva implicaciones terapéuticas. En el caso de la leucemia linfática crónica (LLC), mediante estudios de HiSF y secuenciación del gen *VH* de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IGH), podemos establecer un perfil molecular con impacto pronóstico de la enfermedad. Así, se considera de pronóstico favorable cuando presenta deleciones en el ámbito de la región cromosómica 13q14.3 (locus D13S25), intermedio, trisomía 12, pérdidas de 6q o ausencia de alteraciones cromosómicas, y de pronóstico adverso cuando presenta deleciones en 17p13.1 (*TP53*) o en 11q22.3 (*ATM*). Por su parte, la presencia de mutaciones somáticas (> 2%) en el gen *VH* de IGH se correlaciona con un mejor pronóstico. Ambas aproximaciones proporcionan información pronóstica independiente que, si bien suele correlacionarse (alteraciones cromosómicas de mal pronóstico detectadas por HiSF tienden a asociarse con el gen *VH* en estado germinal), existen suficientes excepciones, de forma que ambas pruebas deben realizarse para completar el perfil pronóstico molecular⁶. Por otra parte, la presencia de una deleción o de mutaciones en el gen *TP53* es factor pronóstico adverso y probablemente los pacientes con dicha alteración requieran tratamiento de la enfermedad con nuevos fármacos dirigidos como inhibidores de cinasas relacionadas con el receptor de célula B, BCR, (ibrutinib, idelalisib, etc.) o inhibidores de BCL-2 (ABT-199) que han mostrado su eficacia en pacientes en recaídas/refractarios que son portadores de esta alteración⁷.

La incorporación de los marcadores citogenéticos y moleculares ha revolucionado también la estratificación pronóstica de la LAM, facilitando el desarrollo de estrategias de tratamiento adaptadas al riesgo de recaída. El estudio citogenético, mediante cariotipo o HiSF, se ha convertido en herramienta necesaria para

el manejo de la LAM y permite la diferenciación de tres grupos con pronóstico diferente: riesgo citogenético favorable ($t(8;21)$; *RUNX1-RUNX1T1*, $inv(16)/t(16;16)$; *CBFB-MYH11*, $t(15;17)$; *PML-RARA*) intermedio (Cariotipo normal, +8, $t(9;11)$; *MLLT3-MLL*; alteraciones no favorables ni adversas) y desfavorable ($inv(3)/t(3;3)$; *RPN1-EVI1* $t(6;9)$; *DEK-NUP214*, $t(9;22)$; *BCR-ABL1*, $t(v;11)(v;q23)$; *MLL*, -5 o $del(5q)$; -7 o $del(7q)$ cariotipos complejos con más de 3 anomalías⁸. Este último grupo muestra un alto índice de resistencia al tratamiento de inducción, con una elevada probabilidad de recidiva y menor supervivencia global (5-14% a los 5 años). El grupo de pacientes incluidos en el grupo de riesgo citogenético intermedio, que suponen en su conjunto un 40-60% del total, es altamente heterogéneo. Por ello, la incorporación de marcadores moleculares ha permitido mejorar la estratificación pronóstica y el manejo clínico rutinario de este grupo de enfermos. Aunque se han descrito mutaciones somáticas o expresión desregulada en múltiples genes (*FLT3*, *NPM1*, *CEBPA*, *c-KIT*, *WT1*, *N-RAS*, *K-RAS*, *RUNX1*, *MLL*, *DNMT3*, *TET2*, *MAALC*, *ERG*, *EVI*, *PRAME*, *IDH1*, *IDH2*, entre otros), los tres marcadores que generalmente se usan en la práctica clínica diaria son las duplicaciones en tándem del *FLT3* (*FLT3-ITD*), mutaciones en *NPM1* y mutaciones bialélicas en *CEBPA*. La presencia o ausencia de estas alteraciones moleculares al diagnóstico en la enfermedad condiciona de forma importante el pronóstico y el tratamiento de los pacientes con cariotipo normal. Por ejemplo, es habitual incluir en protocolos de alto riesgo, incluyendo alotrasplante, a los pacientes con mutaciones de *FLT3*.

Finalmente, hay que destacar la importancia de los estudios de EMR, en los que las técnicas moleculares juegan un papel trascendental por su elevada sensibilidad y especificidad para detectar y cuantificar células tumorales residuales en un fondo de células policlonales, y facilitar así la detección precoz de recaídas. En la actualidad, los estudios de EMR empleando diferentes marcadores (por ejemplo, genes de fusión, reordenamiento de genes del BCR o del receptor de célula T-TCR-, mutaciones cuantificables, etc.) forman ya parte de la práctica diaria. Así, en los esquemas terapéuticos actuales de LLA, la determinación del nivel de EMR es obligatorio, ya que guía la actitud terapéutica⁹. Otro ejemplo lo constituye la monitorización molecular del nivel de transcritos de *BCR-ABL1* por RQ-PCR en la LMC y LLA Ph+, que tienen como objetivo prevenir la progresión de la enfermedad y objetivar la resistencia al tratamiento¹⁰. De esta forma, la detección de un incremento en el número de transcritos *BCR-ABL1* podría estar indicando una mala respuesta al tratamiento o la aparición de un clon mutado resistente, ya que entre los mecanismos de resistencia más frecuentes al tratamiento con inhibidores tirosina cinasa se encuentra

la aparición de mutaciones en el dominio cinasa de la proteína ABL1¹¹.

Nuevas alternativas en el diagnóstico molecular

En los últimos tiempos hemos asistido a una revolución en el campo del diagnóstico molecular debido fundamentalmente al desarrollo de la secuenciación masiva (*next generation sequencing*, NGS), que permite la lectura simultánea de miles de secuencias, aumentando enormemente el rendimiento y la velocidad de generación de los datos además de una reducción drástica de los costes. Esta nueva estrategia de diagnóstico molecular supone un gran avance sobre la metodología convencional de secuenciación de Sanger. Sin embargo, presenta algunos inconvenientes, como el gran número y la complejidad de los datos generados y que necesita herramientas bioinformáticas de gran potencia para su análisis. Además, la elevada sensibilidad de la técnica de NGS permite la detección de variantes alélicas de baja frecuencia para estudiar la heterogeneidad genética intratumoral¹² y abordar estudios de EMR⁹.

La aplicación de la NGS al estudio de las neoplasias hematológicas ha permitido importantes avances en su diagnóstico, pronóstico, terapéutica y monitorización. En la actualidad ya se dispone de estos estudios en la práctica totalidad de las neoplasias hematológicas (secuenciación de genoma completo-WGS, o bien del exoma completo-WES) que han revelado una gran heterogeneidad genética en la mayoría de estas neoplasias¹².

Por otra parte, la NGS también ha permitido profundizar en la heterogeneidad y evolución clonal en neoplasias hematológicas. Así, Landau et al., analizan mediante WES una serie de 149 pacientes con LLC y establecen como eventos iniciadores de la enfermedad mutaciones en *MYD88* tardíos y mutaciones en *TP53*¹³, (14) si bien hay que esperar a ver el verdadero valor de estas anomalías, que suelen ser muy poco frecuentes en LLC. El estudio de la evolución clonal en relación con el tratamiento permitirá refinar el conocimiento sobre los mecanismos de resistencia a fármacos y la cinética de repoblación del tumor. La investigación de esta línea continúa, ya que aún no se han definido bien los patrones de evolución clonal; así, mientras que en LLC se han identificado 3 patrones de repoblación de la masa tumoral tras el tratamiento¹⁴, en mieloma múltiple se han definido hasta 4¹⁵.

La técnica de NGS ha comenzado a utilizarse ya para monitorizar la EMR mediante el empleo de mutaciones o reordenamientos como marcadores moleculares para el seguimiento de la enfermedad. Esta técnica alcanza niveles de sensibilidad en torno a 10^{-6} , además de ser altamente automatizada, reproducible y coste-efectiva. De hecho, ya se han publicado varios trabajos en los

que emplean la NGS para la cuantificación de EMR utilizando como marcador molecular el reordenamiento de los genes de inmunoglobulinas en MM¹⁶ o LAL¹⁷⁽⁹⁾, o mutaciones somáticas en LAM¹⁸. En el campo de los síndromes linfoproliferativos, el empleo de NGS utilizando como diana el reordenamiento de los genes de inmunoglobulina y receptor de célula T presenta ventajas técnicas sobre otras alternativas convencionales, como la ASO-PCR, ya que permite analizar la evolución clonal de estos marcadores proporcionando información sobre el repertorio de células B y T. Por todo ello, y teniendo en cuenta que los costes de la NGS han disminuido considerablemente, esta técnica se postula como la nueva herramienta para la detección de EMR en sustitución de la técnica de RQ-PCR tradicional.

A pesar de la fuerte irrupción de la NGS, hoy día la secuenciación de Sanger continúa siendo la técnica estándar para el diagnóstico molecular rutinario. No obstante, debido a sus limitaciones tanto en el rendimiento como en el coste, cada vez son más los laboratorios que están dando paso a la NGS. Existe por tanto una demanda importante de elaborar flujo de trabajo flexible y coste-eficaz para la implantación de la NGS dentro de la rutina de los laboratorios de diagnóstico molecular. Por ello trataremos de revisar los aspectos más importantes para la implementación de esta técnica en los laboratorios de rutina molecular.

María Eugenia Sarasquete disfruta de un Contrato Miguel Servet (CP13/00080) del Instituto de Salud Carlos III. Este trabajo ha sido realizado en parte gracias a los siguientes proyectos financiados: RD12/0036/0069 Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RETICC); PI12/02311, PI12/02321 de Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III y BIO/SA44/14, GRS 847/A/13, HUS327U14 de la Junta de Castilla y León.

Bibliografía

- Durmaz AA, Karaca E, Demkow U, Toruner G, Schoumans J, Cogulu O. Evolution of genetic techniques: past, present, and beyond. *Biomed Res Int* 2015;2015:461524.
- Heinrichs S, Li C, Look AT. SNP array analysis in hematologic malignancies: avoiding false discoveries. *Blood* 2010;115(21):4157-61.
- Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia* 2003;17(12):2318-57.
- 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.
- Santamaría CM, Chillón MC, García-Sanz R, Pérez C, Caballero MD, Ramos F, et al. Molecular stratification model for prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood* 2009;114(1):148-52.
- Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol* 2015;90(5):446-60.
- Morabito F, Gentile M, Seymour JF, Polliack A. Ibrutinib, idelalisib and obinutuzumab for the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia: three new arrows aiming at the target. *Leuk Lymphoma* 2015; 11:1-20.
- http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp. 2015.
- Van Dongen JJ, van der Velden VH, Brüggemann M, Orfao A. Minimal residual disease (MRD) diagnostics in acute lymphoblastic leukemia (ALL): need for sensitive, fast and standardized technologies. *Blood* 2015;26:3996-4009.
- Baccarani M, Castagnetti F, Gugliotta G, Rosti G. A review of the European LeukemiaNet recommendations for the management of CML. *Ann Hematol* 2015;94(Suppl2):S141-S147.
- Baccarani M, Castagnetti F, Gugliotta G, Palandri F, Rosti G. Definition and treatment of resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia. *Expert Rev Hematol* 2014;7(3):397-406.
- Landau DA, Carter SL, Getz G, Wu CJ. Clonal evolution in hematological malignancies and therapeutic implications. *Leukemia* 2014;28(1):34-43.
- Landau DA, Carter SL, Stojanov P, McKenna A, Stevenson K, Lawrence MS, et al. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* 2013;152(4):714-26.
- Schuh A, Becq J, Humphray S, Alexa A, Burns A, Clifford R, et al. Monitoring chronic lymphocytic leukemia progression by whole genome sequencing reveals heterogeneous clonal evolution patterns. *Blood* 2012;120(20):4191-6.
- Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC, van Loo P, Alexandrov LB, Martincorena I, et al. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nat Communications* 2014;5:2997.
- Martínez-López J, Lahuerta JJ, Pepin F, González M, Barrio S, Ayala R, et al. Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. *Blood* 2014;123(20):3073-9.
- Logan AC, Vashi N, Faham M, Carlton V, Kong K, Buño I, et al. Immunoglobulin and T cell receptor gene high-throughput sequencing quantifies minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia and predicts post-transplantation relapse and survival. *Biology of Blood and Marrow Marrow Transplantation* 2014;20(9):1307-13.
- Salipante SJ, Fromm JR, Shendure J, Wood BL, Wu D. Detection of minimal residual disease in NPM1-mutated acute myeloid leukemia by next-generation sequencing. *Mod Pathol* 2014;27(11):1438-46.

Aplicación de las tecnologías de microarrays y secuenciación en el diagnóstico y pronóstico de las neoplasias hematológicas de célula B

S. BEÀ

Laboratorio de Patología Molecular. IDIBAPS-Hospital Clínic. Barcelona

Avances técnicos en hematopatología

Durante la última década el campo del diagnóstico en hematopatología ha experimentado un gran avance, debido principalmente a las nuevas metodologías que permiten caracterizar mejor las características fenotípicas, genéticas y moleculares de las neoplasias hematológicas. En este sentido, hemos visto una gran traslación de los conocimientos adquiridos con estas nuevas tecnologías, que se han aplicado tanto para establecer el diagnóstico de las diferentes entidades con más precisión como para guiar las estrategias terapéuticas de manera más efectiva y personalizada.

Con la finalización de la secuenciación del genoma humano, hace ya más de una década, se abrieron nuevas posibilidades para estudiar y caracterizar las alteraciones genéticas responsables del desarrollo de los tumores y de su progresión. La tecnología que más se ha usado en este contexto genómico ha sido la del estudio de las neoplasias linfoides mediante plataformas de microarrays, tanto para el estudio de los perfiles de expresión global como para el análisis de las alteraciones cromosómicas que implican pérdidas y ganancias de material genético. Recientemente, el importante desarrollo de la ultrasecuenciación (o secuenciación masiva, o secuenciación de nueva generación) aplicado a las muestras de neoplasias linfoides ha mostrado una gran cantidad de datos, incluyendo mutaciones y alteraciones estructurales. Muchos de estos resultados tienen implicaciones funcionales y clínicas, y han ayudado a avanzar en el desarrollo de nuevas terapias dirigidas.

Aplicación de los microarrays de ADN

La aplicación de los microarrays de ADN para el estudio de las alteraciones cromosómicas y el genotipado ha representado un paso importante en el estudio de las neoplasias linfoides. Ha sido útil, sobre todo, para ayudar a entender la patogénesis molecular y genética de estas enfermedades. Los microarrays de ADN de desarrollaron después de la técnica de hibridación genómica comparada (CGH, siglas en inglés), y en ellos en lugar de metafases se hibrida la muestra tumoral sobre fragmentos de ADN clonados en plásmidos, bacterias. Más recientemente se desarrollaron los microarrays de oligonucleótidos, basados en la hibridación competitiva de ADN tumoral y normal sobre las sondas de 50-70 nt (CGH arrays) o basados en la hibridación de ADN tumoral sobre sondas de 25 nt que contienen SNP (SNP arrays); en ambos casos hay muchos modelos, de diferentes casas comerciales y con diferente densidad. Cuanta más densidad tienen las sondas de un microarray mejor se detectan las alteraciones, especialmente aquellas focales que implican regiones pequeñas. Tanto los SNP-arrays como los CGH-arrays parten de ADN tumoral, con una carga tumoral de más del 30%, y después de marcar e hibridar se obtiene un perfil de ganancias y pérdidas de cada tumor. El ADN extraído de parafina también puede utilizarse en ambas plataformas. Los arrays no pueden detectar traslocaciones cromosómicas, sobre todo las balanceadas. Los CGH-arrays suelen ser más sensibles, mientras que la ventaja de los SNP-arrays es que, además de proporcionar información de ganancias y pérdidas, proporciona información de pérdida de heterocigosidad (LOH, del inglés); por tanto, podemos detectar regiones de disomía uniparental (UPD, del inglés). La principal aportación de los arrays de ADN en el estudio de las neoplasias linfoides ha sido la definición de los perfiles de alteraciones genéticas secundarias específicas de cada entidad, la identificación de genes y vías alteradas en consecuencia de las regiones alteradas, y la identificación de determinadas alteraciones genéticas o la elevada complejidad genómica asociadas a un peor pronóstico de los pacientes.

Algunas alteraciones cromosómicas se encuentran alteradas en varias neoplasias linfoides, aunque el perfil global es bastante característico de cada entidad. Por ejemplo, la leucemia linfática crónica (LLC) y el linfoma de células del manto (LCM) tienen, frecuentemente, pérdidas de 13q y 11q y trisomía 12; sin embargo, la LLC tiene pocas más alteraciones que los LCM, pero no las LLC, que tienen ganancias de 3q y pérdidas de 1p en

un 40-50% de los casos. La trisomía 3 también se halla en el linfoma esplénico de la zona marginal (LEZM) y en los linfomas difusos de células grandes (LDBCG) del subtipo ABC. Tanto los LEZM como los LDBCG-ABC tienen ganancias de 18q, pero solo los LDBCG tienen otras alteraciones frecuentes: -6q, -9p, -19q. En cambio, los LDBCG de subtipo GCB y los linfomas mediastínicos primarios de célula B son diferentes de los ABC, tienen frecuentes ganancias de 2p (incluyendo REL), y los linfomas mediastínicos primarios son los únicos que poseen ganancias de 9p. Una de las características principales de los LEZM es la pérdida de 7q. A pesar de esta heterogeneidad de perfiles, hay algunas alteraciones que sí comparten muchas de las neoplasias linfoides, y otros tumores en general, como son las deleciones de 17p, que afectan el gen *TP53*, y las deleciones homocigotas focales en 9p que afectan el gen *CDKN2A*, ambas asociadas a mal pronóstico. Los arrays han ayudado mucho a delimitar regiones mínimas comúnmente delecionadas o amplificadas, lo que ha permitido descubrir genes diana de estas alteraciones.

En los LDBCG-ABC las ganancias de 3q y 18q se relacionan con mal pronóstico, mientras que en los LCM son las ganancias de 3q y pérdidas de 8p y 9p, y en la LLC las pérdidas de 11q y 17p. Tanto en LLC como en LCM la complejidad genómica (un elevado número de alteraciones) también está muy relacionada con mal pronóstico.

Otro de los fenómenos que han permitido detectar los microarrays de ADN es la cromotripsis, que se caracteriza por muchos reordenamientos cromosómicos en un mismo cromosoma o en una región, y se cree que ocurre de una sola vez, en un solo evento y no de manera gradual. Los segmentos partidos se fusionan al azar y muchos fragmentos se pierden, de manera que el perfil que se detecta mediante arrays es muy característico. Se estima que este fenómeno está presente en el 5% de las muestras tumorales, y en la mayoría de entidades se asocia con mal pronóstico.

Estudios de GWAS

Los SNP-arrays, así como otras tecnologías basadas en genotipado, han permitido llevar a cabo estudios de asociación de todo el genoma (GWAS, del inglés), utilizando centenares y millares de muestras, para estudiar las variaciones genéticas comunes (o SNP) que contribuyen en el riesgo heredable de padecer ciertas neoplasias hematológicas. La LLC es la enfermedad que se ha estudiado más, es la más común en adultos y tiene un componente familiar bastante importante (8-9 veces más riesgo relativo en parientes de primer grado). Varios estudios, con 2.000 y 3.000 pacientes y 7.000 y 5.000 controles, han identificado 30 variantes de riesgo, que explicarían un 19% del riesgo familiar de padecer LLC,

de manera que aún quedan variantes adicionales por descubrir, por lo que serán necesarios estudios con más muestras y con más densidad de SNP. Se requieren más estudios para confirmar estas regiones y las posibles funciones, ya que algunos de los genes próximos están implicados en apoptosis, sugiriendo que podría ser un mecanismo biológico relevante.

Aplicación de los microarrays de expresión

Los microarrays de ARN han hecho posible el estudio de los perfiles globales de expresión de los tumores. Partiendo de ARN tumoral, se marca y se hibrida una matriz de oligonucleótidos, permitiendo una medida cuantitativa de los niveles de expresión de cada uno de los genes (o incluso transcritos e isoformas diferentes) examinados, de manera que permite identificar firmas de expresión relacionadas con la biología de los tumores. Los resultados son muy reproducibles, aunque a veces se requiere de conocimientos informáticos para el análisis más detallado. Actualmente también se ha optimizado el protocolo para muestras de ARN extraído de material parafinado. Su coste es elevado y, junto con la dificultad de análisis, hace que aún no se haya implementado su uso en la rutina clínica. Las principales contribuciones de los arrays de ARN al conocimiento de las neoplasias linfoides han sido principalmente que han identificado características y firmas moleculares de entidades conocidas, han permitido el reconocimiento de nuevas categorías de tumores o subtipos de tumores, han sido de gran utilidad en la identificación de nuevos biomarcadores así como de firmas de expresión que pueden utilizarse como modelos pronósticos robustos y, finalmente, han permitido detectar vías oncogénicas alteradas con implicación importante para aplicar terapias dirigidas.

En los LDBCG los arrays de expresión fueron de gran utilidad para identificar los dos grandes subtipos (ABC y GCB), con perfiles de expresión muy diferenciados y con implicación pronóstica. También permitieron subclasificar los linfomas mediastínicos primarios. Tanto los ABC como los mediastínicos tienen activación constitutiva de genes de la vía NF κ B, implicada en supervivencia, y en el tratamiento. En las LLC y la tricoleucemia se han visto expresión de genes relacionados con célula B de memoria, y dentro de la LLC los arrays de expresión permiten distinguir entre los casos con IGH mutado y no mutado (con implicación pronóstica). En el linfoma folicular han revelado firmas importantes relacionadas con el microambiente y la supervivencia. En los LCM han permitido identificar un subgrupo de casos sin la t(11;14) característica ni la sobreexpresión de ciclina D1, y además han permitido la identificación de un subgrupo caracterizado por su manifestación únicamente en la leucemia y un mejor

pronóstico, basándose en la expresión de una firma de genes, siendo *SOX11* uno de los principales y más usados para esta discriminación en la práctica clínica. Los estudios de arrays de expresión han sido muy útiles también para refinar el diagnóstico de los linfomas de Burkitt de los LDBCG, con características intermedias. El perfil de los linfomas mediastínicos primarios y el del linfoma de Hodgkin resultaron muy similares (hallazgo inesperado), lo que refuerza la idea de una estrecha relación entre ambos tipos de linfomas.

Algunos biomarcadores que han sido descritos mediante microarrays y son actualmente muy útiles en la práctica clínica incluyen *ZAP70* en LLC, anexina 1 en tricoleucemia y *SOX11* en la identificación de los LCM agresivos, y ciclina D2 en la identificación de LCM sin la sobreexpresión de ciclina D2.

Aplicación de la ultrasecuenciación

La tecnología de ultrasecuenciación, recientemente desarrollada, ha ampliado las posibilidades de analizar el espectro de mutaciones de los genomas de muestras de cáncer. Esto ha sido posible gracias a la rapidez, a su coste relativamente bajo y a la gran versatilidad, dado que es capaz de detectar todos los tipos de alteraciones genómicas, desde mutaciones, pequeñas inserciones y deleciones (*indels*) hasta ganancias y pérdidas de material cromosómico y traslocaciones, inversiones y todo tipo de reordenamientos del genoma, y todo en un solo experimento. Para esta técnica solo se necesita ADN tumoral, y a ser posible ADN normal del mismo tumor para descartar las alteraciones germinales, que ya están presentes en todas las células del organismo. La ultrasecuenciación puede realizarse con diferentes métodos y material de partida y así se puede secuenciar todo el genoma, todo el exoma, genes o regiones diana seleccionadas o bien secuenciar el ARN, que nos dará información no solo de la expresión de genes de manera cuantitativa, sino también de los diferentes transcritos, así como de las mutaciones.

Actualmente ya hay muchos estudios de secuenciación masiva de neoplasias linfoides que han proporcionado una gran cantidad de información, ofreciéndonos un panorama de mutaciones mucho más complejo de lo que habíamos previsto inicialmente. El perfil mutacional de cada linfoma es muy característico y el número de mutaciones por caso varía según la entidad (siendo más bajo en LLC y más elevado en mieloma múltiple y LCM). En general, se observa que el perfil de mutaciones se caracteriza por una gran heterogeneidad, pocas mutaciones en un gran número de casos y muchos genes mutados a bajas frecuencias. Es interesante el ejemplo de la tricoleucemia y la macroglobulinemia de Waldenström (MW), que son el escenario contrario, con prácticamente el 100% de

los casos con un gen mutado, *BRAF* en tricoleucemia y *MYD88* en la mayoría de MW. En la LLC pocos genes se encuentran mutados en frecuencias muy altas, siendo las máximas del 10-15% de los casos. Los genes más importantes que han sido hallados son *NOTCH1*, asociado a pronóstico adverso y transformación a linfoma agresivo, y *SF3B1*. En LDBCG el panorama es similar a la LLC, pocos genes mutados muy frecuentemente y muchos genes mutados a baja frecuencia. *MLL2* se encuentra muy frecuentemente mutado en LDBCG y aún más frecuentemente en LF. En lugar de genes, en LDBCG se encuentran mutados genes de *pathways* importantes, como la remodelación de la cromatina, el reconocimiento inmunitario por células T y el programa de diferenciación postcentro germinal. En mieloma hay más mutaciones por caso que en la LLC y los genes mutados incluyen también un amplio espectro de vías, maquinaria de traslación a proteína, vía NFκB y enzimas modificadoras de histonas. En los LCM detectamos frecuentemente mutaciones de *ATM* y *TP53*, que ya eran conocidas y mutaciones nuevas, las de *NOTCH1* y *NOTCH2* muy asociadas a mal pronóstico, así como otras mutaciones en *MLL2*, *WHSC1*, *MEF2B*, *TLR2* y *BIRC3*. Todos estos genes ya se habían visto afectados en LDBCG, mieloma, CLL y LSZM. La identificación de estos mecanismos moleculares que contribuyen a la patogénesis de cada una de las neoplasias linfoides ofrece dianas potenciales para la intervención terapéutica, como es el caso de *NOTCH1*.

Consideraciones finales

En vista de los avances a los que hemos asistido en esta última década, podemos considerar que las tecnologías de microarrays de ARN y ADN y la ultrasecuenciación han generado un conocimiento muy valioso, especialmente para la mejor comprensión de las neoplasias linfoides estudiadas. Actualmente varios de estos hallazgos ya han sido trasladados a la clínica, aunque aún hay algunos aspectos metodológicos que deben mejorarse y, sobre todo, estandarizar las técnicas y los criterios de análisis. Los resultados de la ultrasecuenciación masiva están generando una información muy útil y muy extensa y están cambiando la manera en que entendemos estas neoplasias. Nos están aportando información valiosa con marcado impacto diagnóstico y clínico, así como la identificación biomarcadores moleculares para la correcta clasificación de los casos y de biomarcadores predictivos para nuevas terapias.

Becas: FIS-ISCIi PI11/01177 y PI14/00571, Worldwide Cancer Research (12-0142), Marató de TV3-Cancer/2013410, Generalitat de Catalunya 2013-SGR-378, European Regional Development Fund "Una manera de hacer Europa".

Molecular characterization of hematological malignancies by high throughput sequencing: The example of Waldenström's macroglobulinemia

S.P. TREON

Harvard Medical School. Boston, Massachusetts, EE. UU.

Using whole genome sequencing, we identified highly recurrent activating mutations in MYD88 and CXCR4 in patients with Waldenström's Macroglobulinemia (WM)¹. Using highly sensitive AS-PCR assays, we and others confirmed the presence of MYD88^{L265P} mutations in 95% of untreated WM patients which occur from a C > T transversion at position 38182641 at 3p22.2²⁻⁶. Recent studies by us and others have shown that other activating MYD88 mutations including S243N, M232T, L265RPP can also occur in WM patients^{7,8}. In contrast to diffuse large B-cell lymphoma where non-L265P mutations make up a quarter of all MYD88 mutations, non-L265P mutations are rare in WM⁹. By in vitro modeling, we have shown that MYD88 mutations can trigger BTK, IRAK 4/IRAK1 and PI3K δ dependent survival signaling in WM cells, which can be abrogated by exogenous administration or endogenous lentiviral transduced expression of peptides which block MYD88 homodimerization¹⁰. Mutations in the C-terminal domain of CXCR4 are present in 30-40% of untreated WM patients, and are almost always present in MYD88 mutated patients¹¹⁻¹³. CXCR4 mutations are subclonal in most WM patients supporting their acquisition after mutations in MYD88. Multiple mutations including compound heterozygous and homozygous CXCR4 mutations may occur within individual patients suggestive of targeted CXCR4 genomic instability in WM patients. Modeling of CXCR4 mutations in WM cells show these to enhance AKT and ERK activation, and promote resistance to multiple agents including ibrutinib in response to SDF-1a¹⁴. Unsupervised clustering and principal component analysis of RNASeq data from WM patients demonstrate that MYD88 and CXCR4 mutation status are principal determinants of gene expression in WM. MYD88 and CXCR4 mutation status also impact bone marrow disease burden, serum IgM levels, and extra-medullary disease¹⁵.

Patients with mutated MYD88 exhibit longer overall survival (>10 years) versus those with wild-type

MYD88 (4.7 years), and also demonstrate higher overall and major responses to ibrutinib⁷. The findings highlight the importance of MYD88 and CXCR4 mutations in the pathogenesis and clinical outcome of patients with WM.

References

1. Treon SP, Xu L, Yang G, et al. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia. *N Engl J Med* 2012;367:826-33.
2. Xu L, Hunter Z, Yang G, et al. MYD88 L265P in Waldenström macroglobulinemia, immunoglobulin M monoclonal gammopathy, and other B-cell lymphoproliferative disorders using conventional and quantitative allele-specific polymerase chain reaction. *Blood* 2013;121(11):2051-8.
3. Jiménez C, Sebastián E, Del Carmen Chillón M, et al. MYD88 L265P is a marker highly characteristic of, but not restricted to, Waldenström's macroglobulinemia. *Leukemia* 2013;27(8):1722-8.
4. Varettoni M, Arcaini L, Zibellini S, et al. Prevalence and clinical significance of the MYD88 L265P somatic mutation in Waldenström macroglobulinemia, and related lymphoid neoplasms. *Blood* 2013;121:2522-8.
5. Poulain S, Roumier C, Decambon A, et al. MYD88 L265P mutation in Waldenström's macroglobulinemia. *Blood* 2013; 121(22):4504-11.
6. Ansell SM, Hodge LS, Secreto FJ, et al. Activation of TAK1 by MYD88 L265P drives malignant B-cell growth in Non-Hodgkin lymphoma. *Blood Cancer J* 2014 Feb 14;4:e183. doi: 10.1038/bcj.2014.4.
7. Treon SP, Xu L, Hunter ZR. MYD88 mutations and response to ibrutinib. *NEJM* 2015;373(6):584-586.
8. Nagao T, Oshikawa G, Ishida S, et al. A novel MYD88 mutation, L265RPP, in Waldenström's macroglobulinemia activates the NF- κ B pathway to upregulate Bcl-xL expression and enhance cell survival. *Blood Cancer J* 2015;5:e314. Doi: 10.1038/bcj.2015.36
9. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, Jhavar S, Xiao W, Lim KH, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* 2011;470(7332):115-9.
10. Yang G, Zhou Y, Liu X, Xu L, Cao Y, Manning RJ, et al. A mutation in MYD88 (L265P) supports the survival of lymphoplasmacytic cells by activation of Bruton tyrosine kinase in Waldenström macroglobulinemia. *Blood* 2013;122(7):1222-32.

11. Hunter ZR, Xu L, Yang G, Zhou Y, Liu X, Cao Y, et al. The genomic landscape of Waldenström's Macroglobulinemia is characterized by highly recurring MYD88 and WHIM-like CXCR4 mutations, and small somatic deletions associated with B-cell lymphomagenesis. *Blood* 2014;123(11):1637-46.
12. Roccaro A, Sacco A, Jiménez C, et al. C1013G/CXCR4 acts as a driver mutation of tumor progression and modulator of drug resistance in lymphoplasmacytic lymphoma. *Blood* 2014; 123(26):4120-31.
13. Schmidt J, Federmann B, Schindler N, et al. MYD88 L265P and CXCR4 mutations in lymphoplasmacytic lymphoma identify cases with high disease activity. *Br J Haematol* 2015 Mar 29. doi: 10.1111/bjh.13361. [Epub ahead of print]
14. Cao Y, Hunter ZR, Liu X, et al. The WHIM-like CXCR4S338X somatic mutation activates AKT and ERK, and promotes resistance to ibrutinib and other agents used in the treatment of Waldenström's Macroglobulinemia. *Leukemia*. 2014 Jun 10. doi: 10.1038/leu.2014.187.
15. Treon SP, Cao Y, Xu L, Yang G, Liu X, Hunter ZR. Somatic mutations in MYD88 and CXCR4 are determinants of clinical presentation and overall survival in Waldenström's Macroglobulinemia. *Blood* 2014;123(18):2791-6.

Eritropatología. Actualización en el metabolismo del hierro

COORDINADORES: **M. LÓPEZ RUBIO.** *Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Universitario Príncipe de Asturias. Alcalá de Henares, Madrid*

J.M. VAGACE VALERO. *Servicio de Hematología. Hospital Universitario Materno Infantil. Badajoz*

En los últimos años se ha producido un gran avance en el conocimiento del metabolismo férrico. Sabemos que la hepcidina, con su capacidad para unirse e inactivar la ferroportina, la única proteína exportadora de hierro, representa el punto central en la homeostasis férrica en el ámbito sistémico. Su producción hepática se incrementa en respuesta al hierro o a la inflamación por medio de señales celulares independientes y es inhibida por el denominado “regulador eritroide”, cuya identificación aún es objeto de investigación. Este sistema hormonal funciona de forma coordinada con el sistema IRE/IRP (*iron responsive element/iron responsive protein*) que, en el campo postraslacional, regula la producción de las principales proteínas implicadas en el transporte y el depósito de hierro, manteniendo así la homeostasis intracelular de este metal.

En su ponencia, la Dra. Clara Camaschella nos ilustrará sobre el estado actual del conocimiento en el metabolismo férrico, los trastornos congénitos o adquiridos que alteran la producción de hepcidina, bien por defecto como en las hemocromatosis, o por exceso como en la anemia de la inflamación. De este conocimiento se derivan nuevas líneas de investigación, la mayoría aún de modo experimental, encaminadas a modular la hepcidina. Así, el bloqueo de la matriptasa, y quizás en un futuro el bloqueo de la eritroferona, si se confirma como el regulador eritroide, podrían ser usados para tratar la sobrecarga férrica en las hemocromatosis y talasemias. En el extremo opuesto, los inhibidores de la hepcidina ya están usándose en ensayos clínicos fase II en la anemia de la inflamación.

A continuación, la Dra. Marta Morado hablará sobre el diagnóstico diferencial de las anemias microcíticas. Más allá de la ferropenia, las causas más frecuentes de anemia y microcitosis en el mundo son otras muchas: las enfermedades, congénitas o adquiridas, capaces de originar microcitosis por compromiso en la biodisponibilidad del hierro, en la síntesis de cadenas de globina o en la síntesis del Hem. La historia clínica, la morfología eritrocitaria, los datos hemocitométricos, los nuevos parámetros bioquímicos y las técnicas de biología molecular constituyen las herramientas disponibles para el diagnóstico que, sin duda, serán complementadas en un futuro inmediato por la determinación de hepcidina.

Los nuevos preparados de hierro intravenoso, más seguros y eficaces, plantean nuevos escenarios terapéuticos en otras indicaciones además de las anemias ferropénicas refractarias al tratamiento oral. Uno de estos escenarios es la anemia perioperatoria que, junto al sangrado y a la transfusión alogénica, contribuyen desfavorablemente a la evolución del paciente quirúrgico. En su ponencia, el Dr. Manuel Muñoz nos hablará del concepto de “*patient blood management*” (PBM), un nuevo paradigma en la medicina transfusional que incluye la correcta identificación y manejo de la anemia en el paciente quirúrgico, así como el uso de hierro, oral o intravenoso, para minimizar la necesidad de transfusión alogénica.

Finalmente, el Dr. Remacha nos hablará del manejo clínico de la anemia ferropénica refractaria, un problema común en la práctica diaria del hematólogo cuyo enfoque debe comenzar por una buena historia clínica para distinguir la verdadera refractariedad de otras circunstancias que pueden comprometer la respuesta al hierro oral. En su ponencia se revisan en profundidad los principales escenarios que conducen a este problema: la infección por *Helicobacter pylori*, la gastritis atrófica autoinmune con sus diferentes formas de presentación y la enfermedad celiaca, que a menudo es infradiagnosticada, sin olvidar los raros casos debidos a producción inadecuada de hepcidina.

Pathophysiology of iron homeostasis and potential therapeutic targets

C. CAMASCHELLA, A. NAI, L. SILVESTRI

Vita Salute University y San Raffaele Scientific Institute. Milán

The liver peptide hormone hepcidin is the key regulator of systemic iron homeostasis. Binding and internalizing ferroportin, the sole cellular iron exporter, hepcidin regulates iron release from enterocytes and macrophages to plasma. Hepcidin is upregulated by the BMP6-SMAD signaling pathway in response to iron and by the IL6-STAT3 signaling pathway in inflammation. Mutations of hepcidin, of the BMP coreceptor hemojuvelin (HJV), of *HFE* and of *TFR2* cause different types of hemochromatosis with different severity, all related to the inability to increase hepcidin synthesis in response to iron. Hepcidin transcription is suppressed in all conditions that require iron, such as iron deficiency, hypoxia and erythropoiesis expansion¹. Hepcidin suppression is mediated by the “erythroid regulator” that is active both in physiologic erythropoiesis and in ineffective erythropoiesis, as exemplified by the development of iron overload in non-transfusion dependent thalassemia. Several candidates have been proposed to play the role of erythroid regulator, among them GDF15, TWGS1, sHJV¹ and more recently the member of the C1q/TNFalpha family erythroferrone (ERFE)².

The serine protease matriptase-2 encoded by *TMPRSS6* is the hepatic protease that inhibitor the BMP/SMAD pathway *in vivo*. *TMPRSS6* inactivation in humans and mice causes iron-refractory iron-deficient anemia (IRIDA), since high hepcidin levels block intestinal absorption of dietary and pharmacological iron. *TMPRSS6* is stabilized in iron deficiency likely through a decreased degradation. A substrate of *TMPRSS6* is membrane-exposed hemojuvelin: its cleavage accounts for the downregulation of the BMP-SMAD pathway in iron deficiency³, a mechanism disrupted in IRIDA⁴. Genetic loss of *Tmprss6*, increasing hepcidin expression, improves hemochromatosis and ameliorates the phenotype of beta-thalassemia mouse *Hbb*^{thal3/+}, a model of non-transfusion-dependent thalassemia⁵. Along this line of evidence preclinical studies have shown the potential of silencing *Tmprss6* by genetic approaches (siRNA)⁶ or (ASO)⁷ for treatment of both

thalassemia and *HFE*-hemochromatosis in adult animals⁸. Iron restriction induced by different strategies (transferrin infusions, administration of minihepcidins and *Tmprss6* inhibition)⁹ is of benefit to thalassemia reducing iron overload, ineffective erythropoiesis and improving anemia. The hypothesized mechanisms are reduction of ROS formation, of globin chain imbalance mediated by low heme which may inhibit translation of alpha globin and decrease erythroid cell replication. Whether ERFE is a novel therapeutic target in thalassemia still remains to be demonstrated.

Hepcidin is increased in anemia of inflammation: where the pathogenesis of anemia is complex and due not only to macrophage iron sequestration but also to decreased erythropoietin production and suppression of erythroid commitment in the bone marrow. Antagonizing hepcidin will likely be an approach complementary to other treatments aimed at reverting the underlying diseases. However, there is great interest to manipulate the hepcidin pathway in this anemia and some hepcidin antagonist compounds are already in phase 2 clinical studies in anemia of cancer¹⁰.

Research in iron metabolism is extremely active. It may be foreseen that continuous advances in the field will provide novel therapeutic targets in the near future.

References

1. Hentze MW1, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell* 2010;142(1):24-38.
2. Kautz L, Jung G, Valore EV, Rivella S, Nemeth E, Ganz T. Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat Genet* 2014;46(7):678-84.
3. Silvestri L, Pagani A, Nai A, De Domenico I, Kaplan J, Camaschella C. The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell Metab* 2008;8(6):502-11.
4. Finberg KE, Heeney MM, Campagna DR, Aydinok Y, Pearson HA, Hartman KR, et al. Mutations in *TMPRSS6* cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Nat Genet* 2008;40(5):569-71.

5. Nai A, Lidonnici MR, Rausa M, Mandelli G, Pagani A, Silvestri L et al. The second transferrin receptor regulates red blood cell production in mice. *Blood* 2015;125(7):1170-9.
6. Schmidt PJ, Toudjarska I, Sendamarai AK, Racie T, Milstein S, Betencourt BR et al. An RNAi therapeutic targeting Tmprss6 decreases iron overload in Hfe(-/-) mice and ameliorates anemia and iron overload in murine β -thalassemia intermedia. *Blood* 2015;121(7):1200-8.
7. Guo S1, Casu C, Gardenghi S, Booten S, Aghajan M, Peralta R, et al. Reducing Tmprss6 ameliorates hemochromatosis and β -thalassemia in mice. *J Clin Invest* 2013;123(4):1531-41.
8. Camaschella C. Treating iron overload. *N Engl J Med* 2013; 368(24):2325-7.
9. Li H1, Rybicki AC, Suzuka SM, von Bonsdorff L, Breuer W, Hall CB, et al. Transferrin therapy ameliorates disease in beta-thalassemic mice. *Nat Med* 2010;16(2):177-82.
10. Van Eijk LT, John AS, Schwoebel F, Summo L, Vauléon S, Zöllner S, et al. Effect of the antihepcidin Spiegelmer lexaptetid on inflammation-induced decrease in serum iron in humans. *Blood* 2014;124(17):2643-6.

Diagnóstico diferencial de las anemias microcíticas: más allá de la ferropenia

M. MORADO ARIAS

Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Universitario La Paz. Madrid

Introducción

Se define como “anemia microcítica” la presencia de anemia con un volumen corpuscular medio (VCM) de los hematíes menor de 80 fL¹⁻³. En los niños hay que estudiar el valor del VCM en función de la edad⁴, ya que los hematíes son normalmente más pequeños, salvo en el periodo neonatal, en que son macrocíticos (Tabla 1).

El hematíe está constituido por una membrana, contenido enzimático y hemoglobina. La hemoglobina es una proteína de estructura tetramérica compuesta por dos parejas de cadenas de globinas, un átomo de hierro y un anillo tetrapirrólico de porfirina (grupo Hem). Un defecto en cualquiera de estos tres elementos va a producir microcitosis.

La anemia ferropénica es la causa más frecuente de anemia en el mundo y de microcitosis en nuestro medio; sin embargo, otras muchas otras condiciones pueden producir anemia microcítica^{1,3-5}. En esta revisión

se recogen las principales causas, su mecanismo de producción y la forma de confirmar el diagnóstico. En la Figura 1 se muestran, de forma esquemática, los principales elementos implicados en el metabolismo del hierro que serán tratados a lo largo de esta revisión.

La mejor aproximación ante una anemia microcítica es identificar si es congénita o adquirida (Tabla 2).

Anemias microcíticas adquiridas

Anemia ferropénica^{6,7}

La ferropenia es la principal causa de anemia en el mundo (80-50% de las anemias), con 1 o 2 billones de personas afectos. Se produce cuando la absorción del hierro no es capaz de suplir la pérdida del mismo. Se detecta al 1-2% de los adultos, el 2-4% varones (> 50a), el 36% ancianos, el 11% mujeres en edad fértil y el 5-25% de las gestantes. Hay que diferenciar la anemia ferropé-

Tabla 1. Índices eritrocitarios normales según la edad (tomado de: Richardson M, et al. Pediatrics Rev 2007;28:5-14)

Age	Mean hemoglobin (g/dL) (g/dL)	“-2SD”	Mean hematocrit (%) (proportion of 1.0)	“-2SD”	Mean cell volume (mcm ³)	“-2SD”
Birth	16.5 (165)	13.5 (135)	51 (0.51)	42 (0.42)	108	98
1 to 3 d	18.5 (185)	14.5 (145)	56 (0.56)	45 (0.45)	108	95
1 mo	14.0 (140)	10.0 (100)	43 (0.43)	31 (0.31)	104	85
2 mo	11.5 (115)	9.0 (90)	35 (0.35)	28 (0.28)	96	77
3 to 6 mo	11.5 (115)	9.5 (95)	35 (0.35)	29 (0.29)	91	74
6 mo to 2 y	12.0 (120)	10.5 (105)	36 (0.36)	33 (0.33)	78	70
2 to 6 y	12.5 (125)	11.5 (115)	37 (0.37)	34 (0.34)	81	75
6 to 12 y	13.5 (135)	11.5 (115)	40 (0.40)	35 (0.35)	86	77
12 to 18 y						
Female	14.0 (140)	12.0 (120)	41 (0.41)	36 (0.36)	90	78
Male	14.5 (145)	13.0 (130)	43 (0.43)	37 (0.37)	88	78
18 to 49 y						
Female	14.0 (140)	12.0 (120)	41 (0.41)	36 (0.36)	90	80
Male	15.5 (155)	13.5 (135)	47 (0.47)	41 (0.41)	90	80

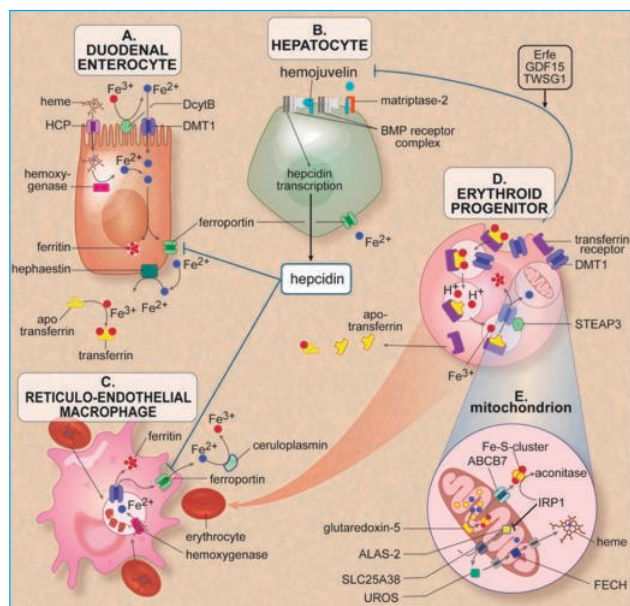


Figura 1. Elementos implicados en el metabolismo del hierro (tomado de Donker AE, et al. Blood 2014;123:3873-86).

nica de la ferropenia sin anemia (no hay anemia pero sí disminución de los depósitos de hierro) y del déficit funcional de hierro (defecto en la movilización de hierro de los depósitos en cantidad suficiente para abastecer a la eritropoyesis)^{6,7}.

La propia hipoxia por la anemia, los niveles bajos de hierro, el aumento de eritropoyetina (estimulado por hipoxia) y posiblemente la producción de eritroferona por parte de los precursores eritroides son los responsables de la disminución de hepcidina, lo que caracteriza la anemia ferropénica. La hepcidina es un péptido de 25aa sintetizado en el hígado en respuesta a inflamación (IL-6) y a niveles elevados de hierro, que se une a la ferroportina (único exportador extracelular de hierro) y la inactiva, con lo que impide la absorción intestinal de hierro y su salida del interior de los macrófagos⁸⁻¹⁰.

Las causas más frecuentes son: a) sangrado (gastrointestinal o genitourinario: metrorragias, neoplasias, angiodisplasia o toma de antiagregantes/anticoagulantes o antiinflamatorios); b) malabsorción por alteración de pH gástrico (toma crónica de antiácidos), gastritis (AINE, anemia pernicioso o infección por *Helicobacter pylori*) o enfermedad intestinal (celiaca, EII, parasitosis); c) aumento de la demanda (embarazo, lactancia, crecimiento y uso de eritropoyetina) y d) dieta inadecuada (malnutrición en países subdesarrollados o dietas vegetarianas). Otras causas menos frecuentes son la HPN o la ferropenia de los atletas. Los casos de anemia ferropénica refractaria (ausencia de incremento de 10 g/L tras 4-6 semanas de tratamiento con hierro oral) se deben a cirugía bariátrica, *Helicobacter pylori*, celiaca, anemia pernicioso o enfermedad inflamatoria intestinal, sin olvidar causas genéticas (IRIDA)^{6,7}.

Tabla 2. Clasificación de las anemias microcíticas

ADQUIRIDAS

- Anemia ferropénica
- Anemia inflamatoria o de trastorno crónico
- Síndromes mielodisplásicos
- Anemias sideroblásticas adquiridas:
 - Déficit de cobre/exceso de zinc
 - Déficit de piridoxina (B6)
 - Intoxicación por plomo
 - Fármacos
 - Alcohol
 - Hipotermia
 - Hipertiroidismo
 - Escorbuto
- Anemias hemolíticas adquiridas con esferocitos o esquistocitos
- Intoxicación por cadmio o aluminio
- Anticuerpos anti-receptorTF

CONGÉNITAS

- Talasemias
- Hemoglobinopatías estructurales y talasémicas
- Alteración en síntesis de grupo Hem o grupos de azufre-hierro:
 - anemias sideroblásticas congénitas
 - Ligadas al cromosoma X
 - XLSA (*ALAS2*)
 - XLSA con ataxia (*ABCB7*)
 - Autosómicas recesivas
 - SCL25A38*
 - Mutación en glutarredoxina (*GLRX-5*)
 - Síndrome SIFD (*TRNT1*)
 - Autosómicas dominantes
 - Porfirias
 - Protoporfiria eritropoyética por mutación de *FECH* y *ALAS2*
 - Porfiria eritropoyética congénita por mutación de *USOS* y *GATA-1*
 - Defecto de biodisponibilidad del hierro
 - IRIDA (*TMPRSS6*)
 - ¿Ferroportina (*SCL40A1*)?
 - Defecto de transporte y captación del hierro
 - Atrasferrinemia (*TF*)
 - Déficit de DMT-1 (*SCL11A2*)
 - Déficit de STEAP3 (*TSAP6*)
 - Déficit de reutilización del hierro
 - Aceruloplasminemia (*CP*)
 - Deficiencia de hemoxigenasa
 - Mutaciones en *KLF-1*
 - Membranopatías (esferocitosis y eliptocitosis congénitas graves)

En fases iniciales se observa una anemia normocítica y normocrómica con anisocitosis que precede a hipocromía y microcitosis. Posteriormente aparecen anulocitos, dianocitos, esquistocitos y poiquilocitos, especialmente eliptocitos extremadamente delgados (Figura 2A). El punteado basófilo y los dianocitos no son frecuentes. La proporción de eliptocitos y dacriocitos se correlaciona con el grado de anemia. La cifra de reticulocitos suele estar algo descendida. Los leucocitos y las plaquetas son normales. En casos de ferropenia por

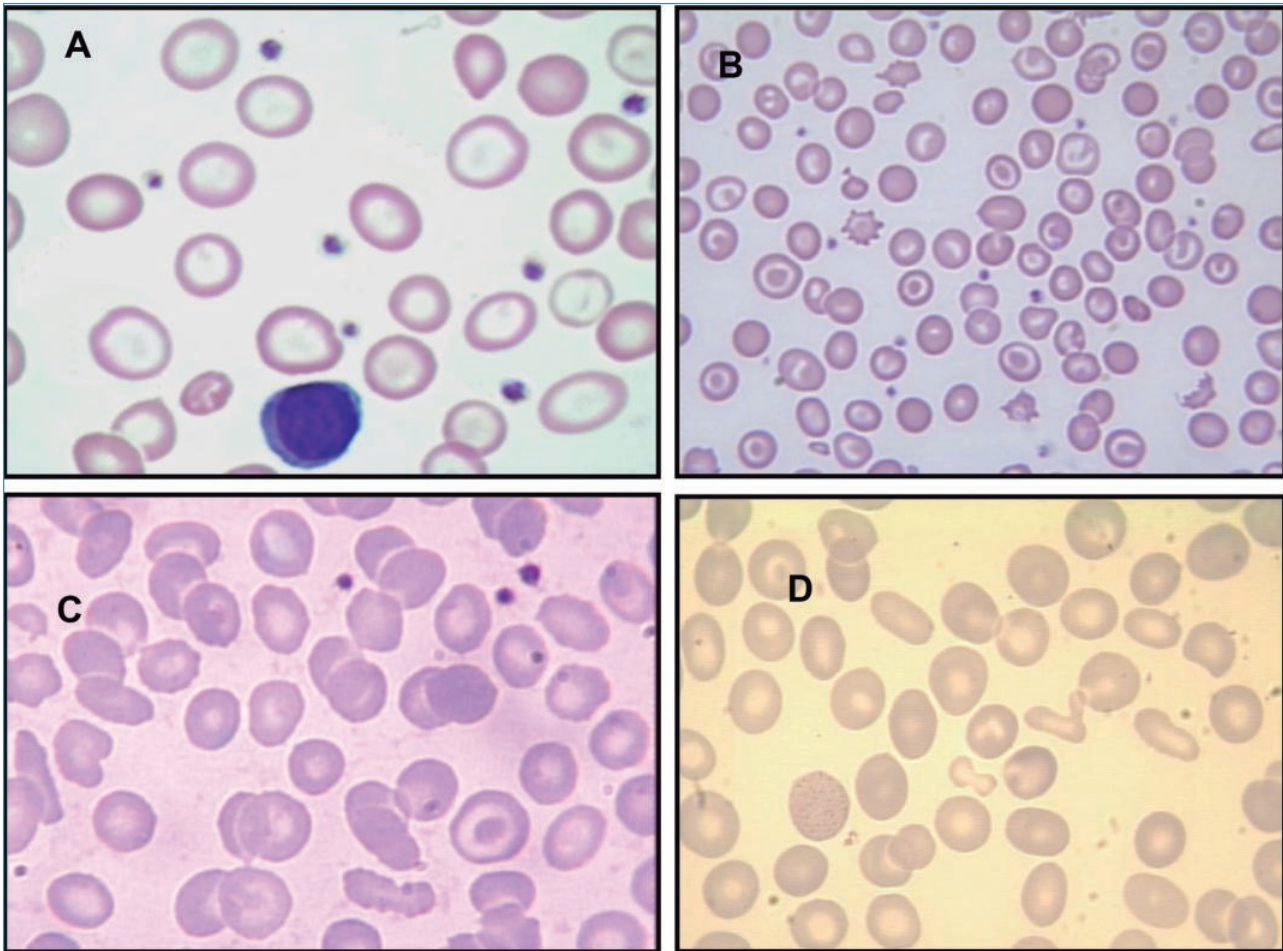


Figura 2. Imágenes de frotis de sangre. A. Anemia ferropénica. B. ATC por lupus eritematoso sistémico. C. β -talasemia heterocigota. D. Anemia sideroblástica congénita ligada al X (ALAS-2).

sangrado se observa trombocitosis. El examen de médula ósea revela hiperplasia eritroide con alteración en la hemoglobinización en los eritroblastos más maduros, con alteraciones nucleares escasas. Puede existir una discreta megalocitosis granulocítica y megacariocítica. La tinción de hierro de Perls demuestra escasos sideroblastos (< 10%) con 1 o 2 gránulos y ausencia del hierro macrofágico medular.

El primer dato ofrecido por los autoanalizadores es un incremento de ancho de distribución eritrocitaria (ADE). A continuación descienden la hemoglobina (Hb), el hematocrito y el número de hematíes, el VCM y la hemoglobina corpuscular media (HCM), por este orden. Un valor de HCM menor de 26 pg es indicativo de ferropenia con mayor sensibilidad que un VCM menor de 80 fl, así como un porcentaje de hematíes hipocrómicos (% de hematíes con menos de 280 g/L) mayor del 2,5%^{1,6,7}.

Para confirmar la ferropenia necesitamos pruebas complementarias (Tabla 3). La sideremia, por sí sola, es poco fiable por tener ritmo circadiano y depender

de la ingesta. La transferrina (TF) aumenta y su índice de saturación disminuye, de tal forma que un IS < 16% es altamente sugestivo de ferropenia en ausencia de hipotiroidismo. La ferritina está disminuida (< 20 ng/ml) como reflejo de los depósitos férricos tisulares ausentes. Al tratarse de un reactante de fase aguda, su utilidad es limitada en casos de inflamación. En estos casos se ha propuesto utilizar valores de corte de 70-100 ng/ml. Para confirmar la ferropenia en estos casos se puede utilizar el receptor soluble de la TF (rsTF), que se eleva en la ferropenia y no en la ATC. El cociente entre el rsTF y el logaritmo de la ferritina sérica es el parámetro que mejor permite diferenciar la anemia ferropénica de la ATC, pero no está disponible de forma general^{6,7}. La medición de niveles de hepcidina promete ser una herramienta diagnóstica muy potente, actualmente en fase de investigación. Se están realizando esfuerzos para estandarizar las diferentes técnicas y protocolos de determinación y así poder ofrecerlos a la práctica clínica. En la anemia ferropénica la hepcidina está descendida o es indetectable, a diferencia de la anemia

Tabla 3. Datos bioquímicos útiles el diagnóstico diferencial de situaciones con deficiencia de hierro

	Ferropenia	Anemia ferropénica	Anemia inflamatoria o ATC	ATC asociada a anemia ferropénica	Déficit funcional de hierro	IRIDA
Hemoglobina	Normal	Baja	Baja	Baja	Normal	Baja
VCM	Normal	< 80 fl	Normal o bajo	Bajo	Normal	< 60 fl
% sat TF	≥ 16%	< 16%	Baja o normal	Baja o normal	Baja o normal	< 10%
Ferritina	< 30 ng/ml	< 10 ng/ml	> 100 ng/ml	< 100 ng/ml	Normal	variable
Marcadores inflamación	Normales	Normales	Elevados	Elevados	Normales	Normales
srTF/logFerr	ND	> 2	< 1	> 2	ND	ND
Hepcidina	Baja	Muy baja	Elevada	Normal Elevada	Baja	Normal Elevada
CH reticuloc	< 25 pg	Baja	Baja	Baja	< 29 pg	Baja
Hierro en MO	Ausente	Ausente	Muy aumentado	Normal	Variable	Normal

inflamatoria, en la que está elevada, o la IRIDA, en que es normal/elevada^{8,9}. Los anticuerpos antitransglutaminasa A se deben solicitar en casos en los que se sospeche enfermedad celíaca (5-10% de los casos), y los anticuerpos antifactor intrínseco si se asocia anemia perniciosa (20% de los casos), que puede enmascarar la microcitosis de la ferropenia^{1,6,7}.

Anemia inflamatoria o de trastornos crónicos (ATC)¹¹⁻¹³

La anemia inflamatoria o anemia de procesos o trastornos crónicos es la segunda causa de anemia tras la ferropenia, con una incidencia que aumenta con la edad (20-26% en mayores de 85 años). Se produce en situaciones con infección aguda o crónica (18-95%), enfermedades autoinmunes (8-70%), patologías o insuficiencias crónicas de origen renal (23-50%), cardíaco, hepático o endocrino, en enfermedades neoplásicas (30-77%) o en pacientes de edad avanzada con componente inflamatorio menor. Se han descrito neoplasias productoras de hepcidina¹¹. El mecanismo principal de producción de la ATC es el aumento de hepcidina en respuesta al estímulo inflamatorio (principalmente por la IL-6) vía BMP-SMAD (hemojuvelina como corresponsor) o vía JAK-STAT3. La hepcidina que se une a la ferroporfina y la degrada, impidiendo la salida del hierro de los hepatocitos, enterocitos y macrófagos. Se produce una eritropoyesis con restricción de hierro, en la que los precursores eritroides no tienen acceso a este último, a pesar de tener los depósitos aumentados^{8,9,11,12}.

Los mecanismos que producen este tipo de anemia son: a) deficiencia funcional del hierro: el aumento de hepcidina produce ferropenia funcional, ya que la eritropoyesis está privada de acceso a hierro; b) inhibición de la eritropoyesis de forma directa por el INF- γ ; c) disminución de la producción renal de EPO por déficit de síntesis en los casos de insuficiencia renal, por inhibi-

ción de la producción secundaria a interleucinas o por reducción de las necesidades metabólicas en enfermedades endocrinas; y d) acortamiento de la vida media eritrocitaria por incremento de la fagocitosis macrofágica extravascular^{11,12}.

La anemia es leve, de instauración insidiosa y de tipo normocítica y normocrómica, pero puede presentarse como microcítica e hipocrómica a medida que avanza. Son signos de inflamación la presencia de neutrofilia, trombocitosis, Rouleaux y tinción de fondo (Figura 2B)¹. El aspirado medular muestra morfología eritroide normal, con acúmulo de hierro en los macrófagos y ausencia o disminución de sideroblastos. El hierro sérico y la saturación de la TF están disminuidos, los niveles de TF son normales o bajos y la ferritina se eleva por encima de 100 ng/ml (Tabla 3). En determinadas situaciones se utilizan niveles de ferritina mayores, por ejemplo, 200 ng/ml en dializados, y siempre ha de valorarse asociada a marcadores de inflamación (VSG y PCR). El problema se plantea cuando se asocia ferropenia verdadera. El cociente rsTF/log ferritina permite discriminar ambas entidades, siendo orientativo de ATC un valor < 0,8-1, mientras que un valor > 1,5-2 es sugestivo de ferropenia real. El porcentaje de hematíes hipocrómicos es el mejor marcador para identificar los casos de déficit funcional de hierro, ya que un valor ≥ 6% tiene un valor predictivo mayor que el rsTF. El siguiente mejor parámetro es el contenido de hemoglobina de los reticulocitos (CHr), un valor menor de 29 pg predice déficit funcional de hierro. Los niveles de eritropoyetina están más bajos de lo esperable para el grado de anemia, pero solo tiene valor si la Hb es menor de 100 g/L. La medición de la hepcidina (muy elevada) es un arma prometedora para el diagnóstico de la ATC, ya que permite diferenciarla de la ferropenia (en la que es normal o baja) y de las situaciones de deficiencia combinada (se eleva pero en menor cantidad)¹¹⁻¹³.

Síndromes mielodisplásicos

Cursan con anemia microcítica aquellos casos asociados a a-talasemia adquirida, por mutación adquirida del gen *ATR-X*¹.

Anemias sideroblásticas adquiridas (microcíticas)²⁴

- **Déficit de cobre o exceso de zinc:** el déficit de cobre ocurre por malabsorción o por intoxicaciones por zinc. Produce anemia normocítica/microcítica, neutropenia y clínica neurológica. La médula ósea muestra vacuolización de precursores eritroides y mieloides, con parada madurativa mieloides y sideroblastos en anillo.
- **Intoxicación por plomo:** el plomo inhibe varias enzimas de la síntesis del grupo Hem, de forma que niveles superiores a 20 µg/dl producen microcitosis e hipocromía. Se asocia sideroblastosis (no bien documentado en la literatura) y punteado basófilo grueso por inhibición de pirimidina 5 nucleotidasa.
- **Fármacos:** antituberculostáticos como isoniacida o pirazinamida producen anemia microcítica con sideroblastos por inhibición de la ALAS2 o por interferencia con piridoxina. Los quelantes tipo penicilamida lo producen por depleción de cobre. El linezolid puede producir anemia sideroblástica (normocítica).
- **Déficit de piridoxina:** la vitamina B6 es el cofactor de la ALAS2 y su déficit produce anemia microcítica e hipocrómica con sideroblastos en anillo.
- **Etanol:** el abuso de alcohol es la causa más frecuente de sideroblastosis inducida por tóxicos. La intoxicación aguda puede producir, además, vacuolización de eritroblastos, aunque suele ir asociada a cambios megaloblásticos.
- **Hipotermia:** las anemias sideroblásticas adquiridas idiopáticas asociadas a SMD cursan con macrocitosis, por lo que no se tratan en esta revisión, si bien esta descrita la existencia de una variante de tipo microcítico.

Hipertiroidismo

La anemia suele leve, normocítica o microcítica con hipocromía y anisopoikilocitosis.

Escorbuto

La anemia por déficit de vitamina C se debe al defecto de síntesis del grupo Hem.

Anemias hemolíticas adquiridas

Por presencia de esferocitos o esquistocitos, de menor tamaño que los hematíes normales (PTT, AHAI, etc.)¹.

Anemias microcíticas congénitas

Talasemias^{15,16}

La talasemia es la enfermedad monogénica más frecuente en el mundo, con una incidencia estimada del 2,5% al 25%, y se produce por defecto en la síntesis de las cadenas de globina, secundarias a mutaciones en el cromosoma 11 (*cluster* β) o cromosoma 16 (*cluster* α). Las manifestaciones clínicas varían desde los estados asintomáticos hasta la muerte intraútero, dependiendo del grado de déficit de síntesis y de la coexistencia de factores modificantes.

La α-talasemia se origina por pérdida total (α⁰) o parcial (α+) de función de uno o más de los cuatro genes de cadena de la α-globina, generalmente de origen delecional. Es prevalente en Asia, Oriente medio y África. El diagnóstico se sospecha en anemia microcítica e hipocrómica desde el nacimiento en ausencia de ferropenia, con niveles de HbA2 normales o bajos sin bandas de Hb anormales en la electroforesis. Los portadores silentes o con rasgo α-talasémico son asintomáticos, presentan mínima microcitosis e hipocromía (la primera más marcada que segunda), con punteado basófilo y dianocitos. La anisocitosis y los eliptocitos son menos evidentes que en la ferropenia. Los pacientes con enfermedad de HbH tienen anemia microcítica e hipocrómica moderada, con marcada anisopoikilocitosis. El déficit funcional de los cuatro genes (HbBart) produce muerte intraútero.

La β-talasemia se origina por la pérdida total (β⁰) o parcial (β+) de función de uno o más de los dos genes de la cadena de β-globina, generalmente debido a mutaciones puntuales. Es prevalente en el área mediterránea, Asia central, India y el sur de China. El diagnóstico se sospecha en anemia microcítica e hipocrómica, con ausencia de ferropenia, niveles de HbA2 elevados (normales si ferropenia), asociados o no a elevación de HbF (según alteración genética), y sin bandas de Hb anormales en la electroforesis. Los pacientes con rasgo β-talasémico (minor) son asintomáticos o presentan mínima anemia con mínima microcitosis e hipocromía (más evidente la primera que la segunda), con punteado basófilo fino y aislados dianocitos (Figura 2C). La β-talasemia mayor, o anemia de Cooley, se caracteriza por anemia grave a partir de los 6 meses de edad, hemólisis y eritropoyesis ineficaz, microcitosis importante con anisopoikilocitosis, dianocitos y punteado basófilo fino. El estudio de hemoglobinas muestra predominio de HbF. Un 10% de los pacientes tiene β-talasemia intermedia, que incluye pacientes homocigotos de δβ-talasemia, homocigotos o doble heterocigotos de β⁺ y/o β⁰, con anemia moderada y fenotipo variable entre la mayor y la menor.

Las δβ, y γδβ talasemias ocurren por deleción variable del *cluster* β, cursan con elevación de HbF de

distribución heterocelular y son indistinguibles de la β -talasemia menor, salvo por ausencia de elevación de HbA₂. En la $\epsilon\gamma\delta\beta$ talasemia se deletiona todo el *cluster* β y en estado homocigoto es incompatible con la vida (los heterocigotos simulan β talasemia menor). La persistencia hereditaria a la Hb fetal (PHHF) se produce por delección variable del *cluster* β o mutación/polimorfismos de genes reguladores y forma un espectro continuo con la $\delta\beta$ -talasemia, de la que la diferencia por una mayor cantidad de HbF (15-30% vs. 5-15%) con distribución pancelular.

Hemoglobinopatías¹⁶

La hemoglobinopatía E es una variante de cadena β -globina frecuente en el sudeste de Asia, China e India en la que existe un falso sitio de procesamiento del ARNm; lo reduce la síntesis de dicha cadena β , lo que hace que se comporte como una hemoglobinopatía talasémica. Los heterocigotos son asintomáticos y los homocigotos se comportan como una talasemia menor. La Hb Lepore, típica de la zona mediterránea, Balcanes y África, se forma por recombinación meiótica anómala, produciendo una fusión de genes $\delta\beta$ que se sintetiza a menor velocidad (hemoglobinopatía talasémica). La forma heterocigota es indistinguible de una talasemia menor y la homocigota se comporta como una mayor o intermedia. La hemoglobinopatía HbS homocigota produce anemia normocítica, de forma que la presencia de microcitosis nos hará sospechar la coexistencia de talasemia asociada, doble heterocigosis SC o ferropenia. La HbC homocigota cursa con anemia microcítica, con dianocitos, hematíes anormalmente contraídos y cristales de HbC.

Alteración en síntesis de grupo Hem o grupos de hierro-azufre (Fe-S): anemias sideroblásticas congénitas^{1,17-20}

El hierro se utiliza en la mitocondria para la incorporación al grupo Hem y para formar los grupos de Fe-S necesarios para el funcionamiento de múltiples proteínas. El defecto mitocondrial en la utilización del hierro hace que se deposite en las mitocondrias perinucleares y su reflejo morfológico son los sideroblastos anillados. La sideroacresia produce anemia, que puede ser microcítica, normocítica o macrocítica. La mutación de ADN mitocondrial responsable del síndrome de Pearson (PMPs), del transportador de tiamina (*SCL19A2*) y de los genes responsables de los síndromes de miopatía con acidosis láctica 1 y 2 (*PUS1* y *YARS2*) producen anemia sideroblástica congénita no microcítica, por lo que no se tratan en esta revisión^{19,20}. Las anemias sideroblásticas microcíticas son las siguientes (Tabla 4):

Ligadas al cromosoma X¹⁷⁻¹⁹

- *Sideroblástica congénita ligada al X (XLSA)*: mutación del gen de la ácido deltaaminolevulínico sintetasa-2 *ALAS2* (Xp11.21), que cataliza la unión de glicina y succinil CoA, primer paso en la síntesis del anillo de porfirina. En hombres (y mujeres homocigotas o con lionización extrema/incrementada por la edad) produce anemia microcítica e hipocrómica con eritropoyesis ineficaz y sobrecarga férrica que debuta en la infancia, aunque puede diagnosticarse en la edad adulta. Se observa doble población eritrocitaria (especialmente en portadoras), una normocítica y la patológica microcítica con anisopoiquilocitosis, punteado basófilo y signos variables de sobrecarga férrica (siderocitos) (Figura 2 D). El aspirado medular muestra hiperplasia eritroide con mínima displasia y presencia de sideroblastos en anillo. En las mujeres portadoras lo más destacable es la presencia de anisocitosis. Este tipo de anemia responde a piridoxina.
- *XLSA asociada a ataxia espinocerebelosa*: mutación del gen *ABCB7* (Xq13.1-13.3). Produce un defecto en la exportación de los grupos de Fe-S de la mitocondria al citosol. En hombres produce anemia microcítica e hipocrómica moderada, eritropoyesis ineficaz con sobrecarga férrica. Asocia ataxia y disimetría no progresiva desde edades tempranas.

Autosómicas recesivas¹⁷⁻¹⁹

- Mutación del gen *GLRX5* (14q32): defecto en la glutarredoxina 5, que conlleva un defecto en el metabolismo de grupos de Fe-S, se activan las proteínas que responde a hierro (IRP-1) y disminuye la síntesis de *ALAS2*. Cursa con anemia microcítica con sobrecarga férrica que no responde a piridoxina pero sí a quelación.
- Mutación del gen *SCL25A38* (3p22.1): codifica para una proteína transportadora de la glicina al interior de la mitocondria. Produce anemia microcítica e hipocrómica grave, con dependencia transfusional desde el nacimiento, eritropoyesis ineficaz y sobrecarga férrica que precisa quelación. El único tratamiento curativo es el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.
- Mutación del gen *TRNT1* (3p26.2): codifica para una enzima que cataliza la adición de una cola de CCT en el extremo 3' del tARN. El defecto produce anemia sideroblástica microcítica grave, inmunodeficiencia de tipo B, fiebre periódica y retraso mental (síndrome SIFD).

Tabla 4. Características de las anemias microcíticas congénitas (adaptado de: Donker AE. Blood 2014;123:3873-86)

	XLAS	XLSAA	SCL25A38	GLRX5	SIFD	PPE	PPEX	PEC	PEC-X	IRIDA	Ferro portina	Atras ferrinemia	DMT1	STEAP3	Acerulo plasmínemia
GEN	ALAS2	ABCB7	SCL 25A38	GLRX5	TNRT1	FECH	ALAS2	UROS	GATA1	TMPR SS6	SCL 40A1	TF	DMT1 SCL 11A2	STEAP3	CP
Proteína	ALAS2	ABCB7	SCL 25A38	GLRX5	TNRT1	FECH	ALAS2	UROS	GATA1	Matrip tasa-2	Ferro portina	TF	DMT1	STEAP3	CP
Herencia	LigX	LigX	AR	AR	AR	AR	LigX	AR	LigX	AR	AD	AR	AR	D/R	R/D
N.º Pac	> 100	5-20	20-100	1	< 5	> 100	20-100	> 200	1	20-100	> 200	5-20	5-20	3	20-100
Edad	Variable	Infantil	Infantil	Adulto	Infantil	Neonato	Neonato	Variable	Neonato	Infantil	Adulto	Varia	Infan	Infan	Adult
Neuro	No	Sí	No	No	Sí	No	No	No	No	No	No	No	No	No	Sí
Piel	No	No	No	No	No	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No	No	No	No	No
Anemia	Leve	Leve	Grave	Leve	Grave	Leve	Leve	Hemólisis Variable	Hemólisis Grave	Variable	Leve 10%	Varia	Varia	Varia	Leve
VCM	Micro	Micro	Micro	Micro	Micro	Micro Normo	Normo	Sin datos	Micro	Micro	Normo	Micro	Micro	Micro Norm	Micro Norm
Siderob Anillo	Sí	Sí	Sí	Sí	Sin datos	Sí	Sin datos	No	No	No	No	No	No	Sí	No
Sobre carga Fe	Variable	No	Sí	Sí	Sin datos	No	No	Sin datos	No	No	Sí	Sí	Varia	Varia	Sí
Ferritina	Variable	Normal	Alta	Alta	Sin datos	Baja Normal	Baja Normal	Sin datos	Normal	Normal Baja	Alta	Alta	Varia	Alta	Alta
IS TF	Normal Alta	Normal	Alta	Alta	Sin datos	Baja Normal	Baja Normal	Sin datos	Normal	< 10%	Normal Alta	100%	Alta	Alta	Baja
Hepcidina	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	Sin datos	alta	variable	baja	normal Baja	normal alta	Sin dato

Autosómica dominante

Los genes implicados se desconocen.

Porfirias^{17,21}

Dos tipos de porfirias pueden producir anemia microcítica:

- *Protoporfiria eritropoyética*: autosómica recesiva por mutación del gen de la ferroquelatasa (FECH), última enzima de la síntesis del grupo Hem. Se acumula protoporfirina IX. Produce fotosensibilidad y anemia microcítica leve. Existe una variante ligada al X por mutación en *ALAS2*.
- *Porfiria eritropoyética congénita*: más grave pero menos frecuente que la anterior, autosómica recesiva por mutación de la uroporfirinógeno sintetasa III (*UROS*). Se acumulan uroporfirina I y coproporfirina I. Cursa con anemia hemolítica severa (similar a talasemia intermedia) y fotosensibilidad. En los hematíes pueden observarse inclusiones en forma de cristal. Existe una variante ligada al X, por mutación en *GATA-1*.

Defecto en la biodisponibilidad del hierro (Tabla 4)

Iron deficiency iron refractory anemia (IRIDA)^{17-19, 22,23}

Producida por mutación del gen *TMPRSS6* (22q12.3-13.1), que codifica para la matriptasa-2 serín-proteasa transmembrana que en condiciones normales regula a la baja la hepcidina por escisión de la hemojuvelina, proteína que, a su vez, actúa estimulando la transcripción de hepcidina (vía BMP/SMAD). Se hereda de forma autosómica recesiva y produce anemia congénita microcítica e hipocrómica resistente a tratamiento con hierro oral de debut en la infancia o la adolescencia (no presente al nacimiento) y que suele mejorar con los años (no así la sideremia). Se sospecha por la presencia de microcitosis intensa (VCM 45-65 fl) e hipocromía mayor de la esperable para la anemia, y con hierro sérico y saturación de TF extremadamente bajos (<5%), mayor de lo esperable para el nivel de ferritina, que suele estar en el rango de la normalidad. El diagnóstico requiere confirmar la refractariedad al tratamiento con hierro oral. La respuesta hematológica es parcial y lenta al hierro parenteral, a pesar de la ferritina elevada. La medición de niveles de hepcidina, inadecuadamente altos, facilitaría identificar esta entidad.

Deficiencia de ferroportina¹⁷

Autosómica dominante por mutación del gen *SCL40A1*, produce hemocromatosis tipo IV. En animales se añade

anemia macrocítica, pero solo el 10% de los humanos tienen anemia (normocítica).

Déficit de transporte y captación celular (Tabla 4)¹⁷⁻¹⁹

Atransferrinemia

Defecto autosómico recesivo por mutación del gen *TF* que codifica TF, proteína transportadora del hierro a los tejidos. Produce anemia microcítica e hipocrómica grave desde el nacimiento. El perfil férrico presenta niveles muy bajos o indetectables de TF y elevados de hierro y ferritina (por supresión de hepcidina). El hierro circula en sangre en forma de hierro libre (NTBI), altamente tóxico para los tejidos.

Déficit de DMT-1 (SCL11A2)

Mutación del gen *SCL11A2* que codifica para el receptor de metales divalentes DMT1, proteína responsable de la absorción intestinal del hierro no hemínico. Los pacientes presentan anemia microcítica e hipocrómica desde el nacimiento o la infancia. Se acompaña de aumento de ferritina y de la saturación de TF, con sobrecarga férrica tisular y hepcidina anormalmente baja para el grado de ferropenia.

Déficit de STEAP3 (TSAP6)

Mutación del gen que codifica para la proteína Steap3, ferroreductasa endosómica, clínicamente similar a las anteriores, con anemia microcítica e hipocrómica con sobrecarga férrica. Puede tener aislados sideroblastos en anillo.

Déficit de la reutilización del hierro (Tabla 4)¹⁷⁻¹⁹

Aceruloplasminemia

La ceruloplasmina transporta el 95% del cobre del organismo y además exporta el hierro reciclado de la degradación del grupo Hem en los macrófagos, oxidándolo a través de su función ferrooxidasa. La aceruloplasminemia por mutación del gen *CP* produce anemia normocítica o microcítica. La tríada clínica típica incluye degeneración retiniana, diabetes mellitus y alteraciones neurológicas. La ferritina sérica está elevada, pero con saturación de TF y hierro sérico disminuidos asociado a cobre sérico muy bajo.

Deficiencia de hemooxigenasa-1²⁴

La hemooxigenasa-1 cataliza la degradación del grupo Hem a biliverdina, hierro libre y monóxido de carbono. Su déficit produce, entre otros síntomas, anemia macrocítica.

Mutaciones en KLF-1²⁵

Mutaciones del gen *KLF-1* (Krüppel-like factor-1) están descritas en la anemia disritropoyética congénita tipo IV, pero también producen anemia microcítica e hipocrómica con aumento de Hb fetal.

Membranopatías²⁶

La esferocitosis hereditaria produce anemia hemolítica con VCM variable en función de la cantidad de esferocitos presentes, siendo más microcítica en los casos más graves. En la eliptocitosis la anemia será más microcítica en las formas más graves (mayor anisopoiquilocitosis).

Conclusión

La anemia ferropénica es la causa más frecuente de anemia microcítica en nuestro medio pero no es la única. El momento de debut, los antecedentes familiares, la historia clínica, la morfología eritrocitaria y los parámetros bioquímicos permitirán orientar el diagnóstico. La determinación de hepcidina será de gran utilidad para diagnosticar y diferenciar muchas de estas entidades. Las técnicas de biología molecular permiten identificar las mutaciones de las anemias congénitas.

Bibliografía

- Bain B. Disorders of red cells and platelets. En: Blood Cells: a practical guide. 4^o Ed. Blackwell Publishing; 2006.
- Ford J. Red blood cell morphology. Int Jnl Lab Hem 2013;35:351-7.
- De Loughery TG. Microcytic anemia. N Eng J Med 2014;371:1324-31.
- Richardson M, Microcytic Anemia. Pediatrics Rev 2007;28:5-14.
- Camaschella C. How I manage patients with atypical microcytic anaemia. Br J Haematol 2012;160:12-24.
- Camaschella C. Iron-Deficiency anemia. N Eng J Med 2015; 372:1832-43.
- Powers JM, Buchanan GR. Diagnosis and management of iron deficiency anemia. Hematol Oncol Clin N Am 2014;28:729-45.
- Camaschella C. Iron and hepcidina: a story of recycling and balance Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2013; 2013:1-8.
- Arezes J, Nemeth E. Hpcidin and iron disorders: new biology and clinical approaches. Int Jnl Lab Hem 2015;37:92-8.
- Kautz L, Jung G, Valore EV, Rivella S, Nemeth E, Ganz T. Identification of Erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. Nat Genet 2014;46: 678-84.
- Poggiali E, Migone de Amicis M, Morra I. Anemia of Chronic disease: a unique defect of iron recycling for many different chronic diseases. Eur J Int Med 2014;25:12-17.
- Cullis JO. Diagnosis and management of anaemia of chronic disease. Br J Haematol 2011;154:289-300.
- Thomas DW, Hinchliffe RF, Briggs C, Macdougall IC, Littlewood T, Cavill I. Guideline for the laboratory diagnosis of functional iron deficiency. Br J Haematol 2013;161:639-48.
- Alcindor T, Bridges KR. Sideroblastic anemias. Br J Haematol 2002;116:733-43.
- Rachmilewitz EA, Giardina PJ. How I treat thalassemia. Blood 2011;118:3479-88.
- Bain B. The α , β , δ and γ thalassaemias and related conditions. En: Hemoglobinopathy diagnosis. 2^o Ed. Blackwell Publishing; 2004.
- Donker AE, Raymakers RAP, Vlasveld LT, van Barneveld T, Terink R, Dors N et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of microcytic anemias due to genetic disorders of iron metabolism or heme synthesis. Blood 2014;123: 3873-86.
- Iolascon A, De Falco L, Beaumont C. Molecular basis of inherited microcytic anemia due to defects in iron acquisition or heme synthesis. Haematologica 2009;94:395-408.
- Cazzolla M, Invernizzi R. Ring sideroblasts and sideroblastic anemias. Haematologica 2011;96:789-92.
- Bottomley SS, Fleming MD. Sideroblastic anemias: Diagnosis and Management. Hematol Oncol Clin N Am 2014;28:653-70.
- Blawani M, Ddesnick. The porphyrias: advances in diagnosis and treatment. Blood 2012;120:4496-504.
- De Falco L, Sánchez M, Silvestri L, Kannengiesser C, Muckenthaler MU, Iolascon A, et al. Iron refractory iron deficiency anemia. Haematologica 2013;98:845-53.
- Heeney MM, Finberg KE. Iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). Hematol Oncol Clin N Am 2014;28:637-52.
- Kawashima A, Oda Y, Yachie A, Koizumi S, Nakanishi I. Heme Oxygenase-1 deficiency: the first autopsy case. Hum Patol 2002; 33:125-30.
- Huang J, Zhang X, Lui D, Wei X, Shang X, Xiong F, et al. Compound heterozygosity for KLF1 mutations is associated with microcytic hypochromic anemia and increased fetal haemoglobin. Eur J Hum Genet 2015; doi: 10.1038/ejhg.2014.291.
- Da Costa L, Galimand J, Fennetau O, Mohandas N. Hereditary spherocytosis, elliptocytosis, and other red cell membrane disorders. Blood Rev 2013;27:167-78.

Terapia parenteral del hierro y optimización de la hemoglobina preoperatoria

M. MUÑOZ GÓMEZ¹, S. GÓMEZ RAMÍREZ², Á.F. REMACHA³, J.A. GARCÍA ERCE⁴

¹Medicina Transfusional Perioperatoria. Universidad de Málaga. Málaga. ²Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario Virgen de la Victoria. Málaga. ³Servicio de Hematología. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona. ⁴Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital General San Jorge. Huesca

Prevalencia y consecuencias de la anemia en el paciente quirúrgico

En un procedimiento de cirugía mayor, la anemia preoperatoria (AP), la pérdida de sangre y la transfusión alogénica (TSA) influyen desfavorablemente en la evolución postoperatoria del paciente (Figura 1)¹. Utilizando los criterios de la OMS, la AP está presente en buena parte de los pacientes atendidos en los servicios quirúrgicos y varios estudios observacionales amplios han confirmado que la AP (aún leve) es un factor independiente de riesgo de peor resultado clínico y mayor consumo de recursos (aumento de la morbimortalidad y de la duración de la estancia hospitalaria)^{2,3}.

La pérdida perioperatoria de sangre puede conducir a anemia aguda, especialmente en los pacientes con una hemoglobina (Hb) preoperatoria baja (Hb < 130 g/L). El tratamiento habitual de esta anemia es la TSA, que a su vez se asocia frecuentemente con un peor resultado clínico^{4,5} (Figura 1). Además, los efectos negativos de la pérdida de sangre, TSA y la AP parecen ser sinérgicos. En adultos sometidos a cirugía cardíaca el sangrado profuso es *per se* un factor de riesgo de mortalidad en los

30 días siguientes a la intervención, riesgo que es fuertemente potenciado por la TSA y, en menor medida, por la AP⁶ (Figura 1). Finalmente, la TSA es un recurso terapéutico mal utilizado (variabilidad), caro (\approx 350-400 € por unidad de concentrado de hematíes transfundida) y, a veces, escaso.

El concepto de “*patient blood management*” (PBM), recientemente reconocido por la OMS, supone un cambio de paradigma en Medicina Transfusional. El enfoque del PBM es multidisciplinar y multimodal, y se centra en la identificación y provisión de los cuidados necesarios para minimizar la necesidad de TSA, mejorar el resultado clínico y reducir los costes de tratamiento. Obviamente, el tratamiento farmacológico para optimizar la Hb preoperatoria y/o corregir la anemia preoperatoria, así como las deficiencias de hematínicos sin anemia, constituye uno de los pilares fundamentales de un programa de PBM. La eficacia, seguridad y recomendaciones de estos tratamientos han sido recogidas en la actualización del Documento Sevilla de Consenso sobre Alternativas a la Transfusión (DS2013) y la Guía de la Sociedad Europea de Anestesiología sobre manejo del sangrado perioperatorio (Guía ESA)^{6,7}.

Diagnóstico de la anemia en el paciente quirúrgico

En los pacientes programados para cirugía mayor se debería detectar la presencia de anemia preoperatoria al menos 30 días antes de la intervención, para realizar su diagnóstico diferencial e instaurar el tratamiento adecuado, si procede⁸. Obviamente, aunque esta recomendación no es aplicable al paciente sometido a cirugía no electiva, la detección de la anemia y su posterior clasificación deberían realizarse lo antes posible. Para ello, debemos discernir qué pruebas son imprescindibles para clasificar la anemia diagnóstico en la mayoría de estos pacientes y hacerlo de la manera más coste-efectiva posible.

La analítica preoperatoria habitual consiste en hemograma completo, coagulación básica, urea, creatinina e iones. Para la clasificación de la anemia micro-

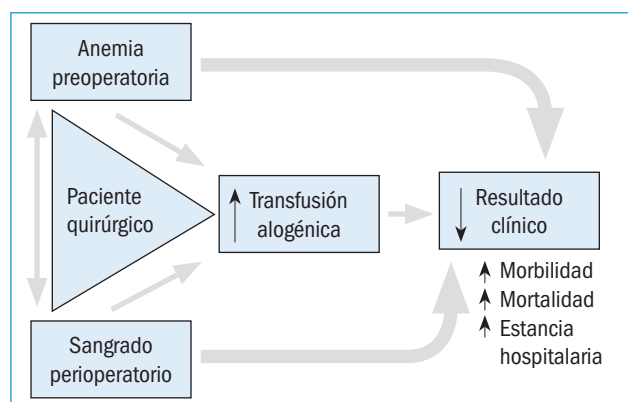


Figura 1. Efectos de la anemia, el sangrado y la transfusión sobre el resultado clínico en pacientes intervenidos de cirugía mayor.

cítica o normocítica deberíamos añadir, inicialmente, el recuento de reticulocitos, la ferritina sérica (depósitos de hierro), la saturación de transferrina (disponibilidad de hierro para la eritropoyesis) y la proteína C reactiva (marcador de inflamación). Estos datos permitirán el diagnóstico de las anemia más frecuentes: ferropénica, inflamatoria (incluyendo la anemia renal) y mixta (anemia inflamatoria con ferropenia) (Figura 2). El porcentaje de eritrocitos hipocrómicos (> 5%), la hemoglobina reticulocitaria (< 28 pg) y/o el cociente receptor soluble de transferrina/log ferritina (> 2) son útiles para diferenciar la anemia inflamatoria de la mixta, así como para predecir la respuesta al tratamiento con hierro, pero no están disponibles en todos los laboratorios⁹.

Si no llegamos a un diagnóstico habría que solicitar el estudio de una posible hemólisis (haptoglobina, bilirrubina, LDH; además de la morfología eritrocitaria y de los reticulocitos), de los factores de maduración (vitamina B₁₂ y folato) si la anemia es macrocítica, de

hemoglobinopatías-talasemias (determinaciones de la HbF, de la HbA₂ y una electroforesis de hemoglobinas) o de la función tiroidea o hepática, con lo se puede conseguir la clasificación de prácticamente todas las anemias (Figura 2).

Una vez clasificada la anemia (por ejemplo, anemia por déficit de hierro/vitamina B₁₂/ácido fólico) hay que investigar y tratar su causa (por ejemplo, sangrado, gastritis atrófica, celiaquía, infección por *Helicobacter pylori*), si es posible, y no limitarnos simplemente a la reposición del factor deficitario⁹.

En determinados grupos de pacientes (por ejemplo, mujeres en edad fértil o desnutridos) se debe tener en cuenta la posible presencia de deficiencias de hematínicos sin anemia, ya que la corrección de estas deficiencias es de capital importancia para optimizar los niveles preoperatorios de Hb, especialmente si reciben agentes estimuladores de la eritropoyesis, y para acelerar la recuperación de la anemia postoperatoria.

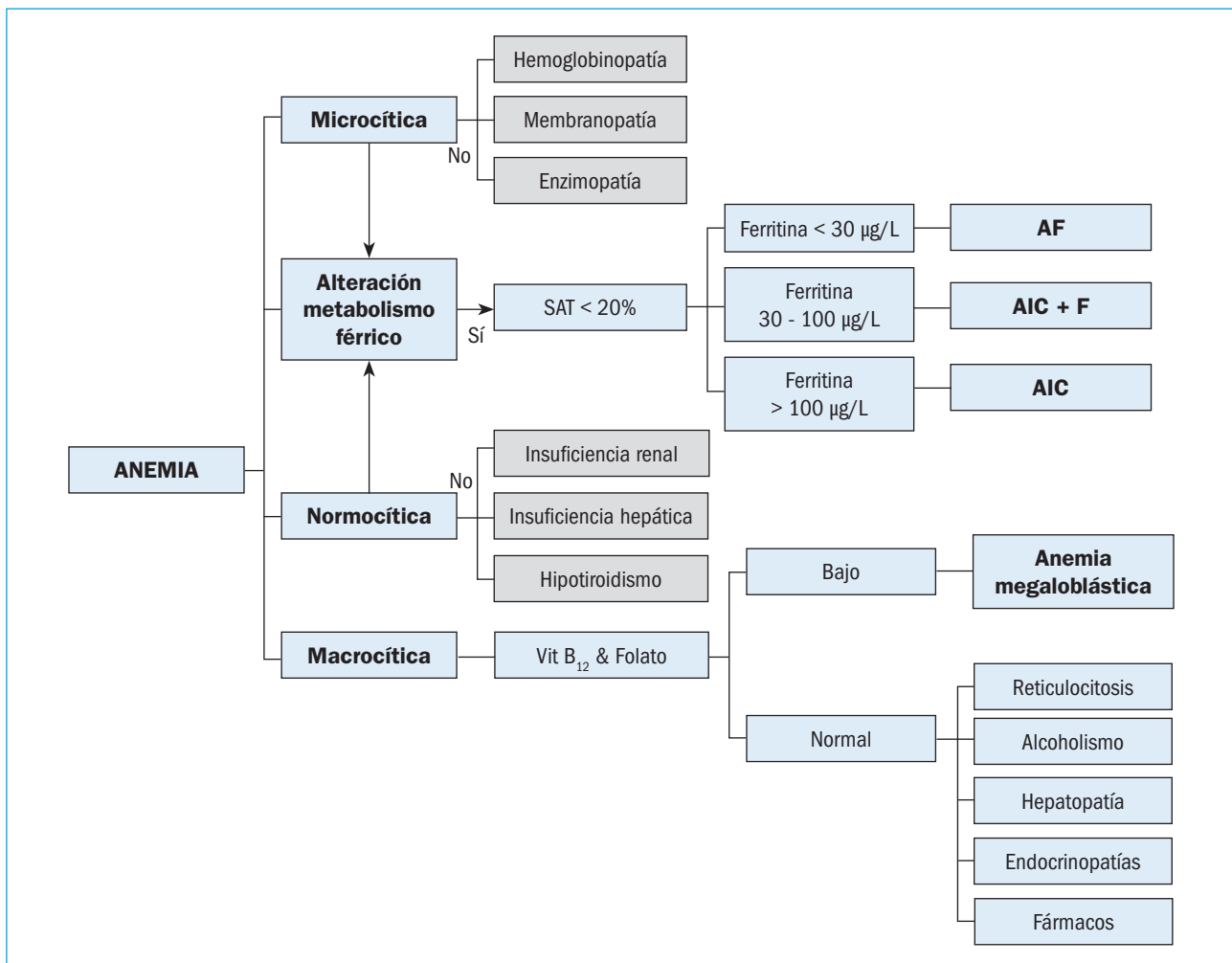


Figura 2. Algoritmo simplificado para la clasificación de la anemia preoperatoria (Hb < 130 g/L) (AF: anemia ferropénica; AIC: anemia inflamatoria; AIC+F: anemia inflamatoria con ferropenia; SAT: saturación de transferrina).

Papel del hierro en la optimización de la hemoglobina preoperatoria

El objetivo del tratamiento de la anemia preoperatoria debe ser alcanzar niveles normales de Hb, de acuerdo con los criterios de la OMS. Sin embargo, en los pacientes que van a ser sometidos a procedimientos quirúrgicos con un sangrado medio-alto es deseable alcanzar un nivel de Hb \geq 130 g/L para minimizar el riesgo de transfusión, lo que puede implicar posponer la intervención, si es posible¹⁰.

Aplicando la aproximación diagnóstica arriba mencionada en una serie de pacientes de cirugía no cardíaca (ortopédica, ginecológica, urológica, de resección de cáncer de colon o de metástasis hepáticas; n = 2.699), encontramos que: a) la AP afectaba a 1 de cada 3 pacientes; b) el 65% de los pacientes con AP presentaba un déficit absoluto o funcional de hierro; y c) más de la mitad de los pacientes sin AP presentaban depósitos de hierro inadecuados para recuperarse de la anemia postoperatoria inducida por el sangrado. Dado que muchos pacientes quirúrgicos pueden beneficiarse de la ferroterapia preoperatoria, revisaremos la eficacia y seguridad de la administración de suplementos de hierro oral o parenteral en estos pacientes.

Administración preoperatoria

La Guía ESA recomienda de forma genérica tratar la deficiencia de hierro mediante la administración de hierro oral o intravenoso⁷, pero el DS2013 matiza esta recomendación según la gravedad de la anemia, el tipo de cirugía y el tiempo disponible para tratarla⁶.

Ante una ferropenia preoperatoria, con o sin anemia, siempre que sea posible y se disponga del tiempo necesario, se debe considerar el uso de hierro oral (por ejemplo, sulfato ferroso) por su bajo costo y fácil administración^{6,7,11}.

Sin embargo, en algunas ocasiones, bien sea por mala absorción, mala tolerancia o para acelerar la res-

puesta al tratamiento, está plenamente justificado el uso de hierro parenteral (generalmente por vía intravenosa), con lo que la respuesta medular y la repleción de los depósitos serán más rápidas (1-2 semanas). Así, en pacientes anémicos programados para cirugía de cáncer de colon, histerectomía abdominal o cirugía ortopédica, la administración preoperatoria de hierro sacarosa intravenoso o carboximaltosa de hierro intravenoso elevó significativamente los niveles de Hb y consiguió un alto porcentaje de corrección de la anemia, al tiempo que redujo las necesidades de TSA^{6,7,12,13}. Los pacientes con anemia ferropénica o mixta serían los más beneficiados de la monoterapia con hierro intravenoso y las nuevas formulaciones que permiten la administración rápida de dosis elevadas (por ejemplo, hierro isomaltosa-1000 y carboximaltosa de hierro) facilitan la implementación de estas recomendaciones (Figura 3)^{9,10,12}. Los pacientes de cirugía ortopédica programada con un componente inflamatorio significativo pueden beneficiarse de la terapia conjunta con hierro intravenoso y eritropoyetina¹⁴. En pacientes anémicos sometidos a cirugía cardíaca o resección de cáncer gastrointestinal se ha documentado la eficacia de la administración perioperatoria de eritropoyetina más hierro oral o hierro intravenoso para reducir las necesidades de TSA, aunque debe recordarse que en Europa este uso no está contemplado en la ficha técnica⁸.

Administración perioperatoria

En muchas ocasiones no disponemos de varias semanas para realizar el tratamiento de la anemia, bien por tratarse de cirugías no electivas o urgentes, bien porque el paciente llega al hospital el día antes del señalado para la intervención. En estos casos aún se puede recurrir al tratamiento perioperatorio de su anemia. En cirugía ortopédica para reparación de fractura de cadera, así como en artroplastia de rodilla o cadera, la administración perioperatoria de hierro intravenoso (400-600

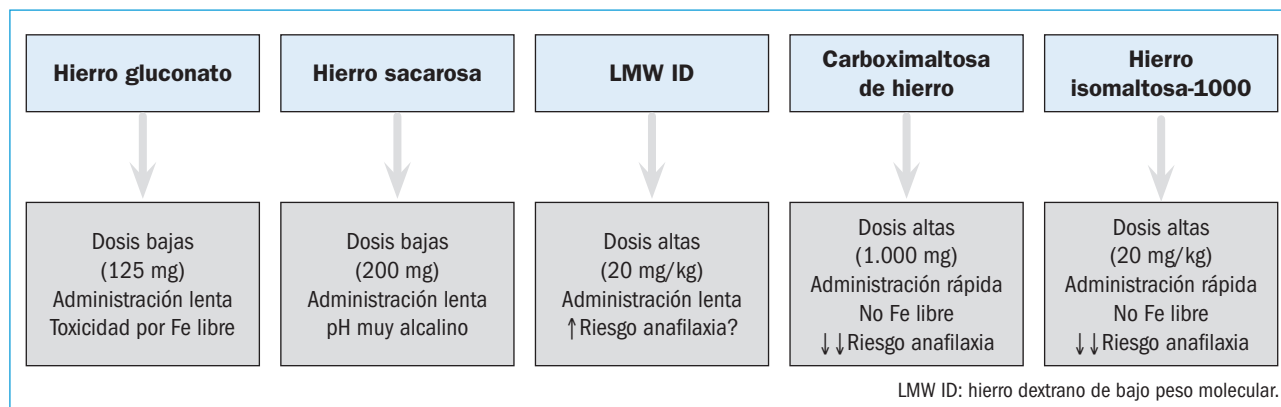


Figura 3. Formulaciones de hierro intravenoso disponibles en Europa.

mg), con o sin una sola dosis preoperatoria de rHuEPO de 40.000 UI, más un criterio restrictivo de transfusión (Hb < 80 g/L), redujo la necesidad de TSA y contribuyó a una más rápida corrección de la anemia postoperatoria^{15,16}. Se han obtenido resultados similares en cirugía cardíaca¹⁷.

Seguridad de los preparados de hierro intravenoso

Aunque no se han descrito efectos adversos serios atribuibles a la administración de hierro intravenoso en los trabajos examinados, el número de pacientes incluidos en ellos no parece ser suficiente para extraer conclusiones definitivas respecto su seguridad en pacientes quirúrgicos. Sin embargo, en 2013, el European Medicines Agency's Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) concluyó que los beneficios de estos medicamentos son mayores que sus riesgos, siempre que estén indicados y se tomen las medidas adecuadas para minimizar el riesgo de reacciones alérgicas (EMA/579491/2013)¹⁸. El CHMP considera que existe una clara asociación entre la administración de hierro intravenoso y las reacciones de hipersensibilidad, cuya incidencia es muy baja, pero pueden ser mortales¹⁸. Sin embargo, matizan que los datos aportados por la industria y los centros nacionales de farmacovigilancia proporcionan una evidencia de calidad muy baja y no son válidos para detectar diferencias de seguridad entre los preparados de hierro intravenoso (Figura 3). También ha formulado recomendaciones en relación con la administración y las contraindicaciones del hierro intravenoso¹⁸. Recientemente se ha publicado un documento de consenso sobre el manejo de las reacciones de hipersensibilidad al hierro intravenoso¹⁹.

En lo que respecta al incremento del riesgo de infección, un metaanálisis de 103 estudios (> 19.000 pacientes) no objetiva un aumento del riesgo de infección en los pacientes que reciben hierro intravenoso²⁰. No obstante, conviene recordar que el riesgo de infección está aumentado en la sobrecarga férrica, pero también en la ferropenia, y que la administración de hierro intravenoso en pacientes no ferropénicos podría aumentar la tendencia a las infecciones. Por tanto, la realización de un diagnóstico correcto es primordial para la eficacia y seguridad del uso de hierro intravenoso. Además, es aconsejable evitar su administración en pacientes con infección activa, así como en pacientes con afectación hepática grave.

Por otra parte, en relación con un posible incremento de eventos tromboembólicos, debe recordarse que el hierro intravenoso aporta material necesario para la eritropoyesis pero no interviene en su regulación. Por tanto, su administración no comporta riesgo de alcanzar niveles supranormales de Hb ni de trombocitosis, como

sí puede ocurrir con la administración de eritropoyetina. Además, la adición de hierro intravenoso al tratamiento con eritropoyetina permite reducir las dosis (disminuyendo costes y riesgos) y mejorar las tasas de respuesta hematológica, así como disminuir los requerimientos transfusionales.

Conclusiones

- La anemia preoperatoria tiene una prevalencia alta y se considera factor independiente de mayor morbilidad y mortalidad perioperatorias, así como el principal factor predictivo de TSA, que también se asocia a una mayor morbilidad y mortalidad en estos pacientes.
- Siempre que sea clínicamente factible, en los pacientes programados para cirugía mayor se debe determinar la presencia de anemia preoperatoria, preferiblemente al menos 30 días antes de la intervención, para realizar su diagnóstico diferencial e instaurar el tratamiento adecuado, si procede.
- Se debe tener en cuenta la posible presencia de deficiencias de hematínicos (hierro, B₁₂ y fólico) sin anemia, ya que la corrección de estas deficiencias es de capital importancia para optimizar los niveles preoperatorios de Hb y acelerar la recuperación de la anemia postoperatoria.
- Los pacientes con anemia que van ser sometidos a un procedimiento de cirugía mayor pueden beneficiarse de la administración de hierro (preferentemente por vía intravenosa) durante el periodo perioperatorio para disminuir el porcentaje de pacientes expuestos a la TSA.
- La administración preoperatoria o perioperatoria de eritropoyetina en pacientes de cirugía ortopédica programada con anemia moderada (Hb entre 100 g/L y 130 g/L) debe acompañarse de terapia coadyuvante con hierro, preferiblemente por vía intravenosa.

Bibliografía

1. Muñoz Gómez M, Leal Noval SR. Perioperative anemia correction in Patient Blood Management programs: Lights and shadows. *Rev Esp Anesthesiol Reanim* 2015. DOI: 10.1016/j.redar.2015.02.007
2. Musallam KM, Tamim HM, Richards T, Spahn DR, Rosendaal FR, Habbal A, et al. Preoperative anaemia and postoperative outcomes in non-cardiac surgery: a retrospective cohort study. *Lancet* 2011;378:1396-407.
3. Baron DM, Hochrieser H, Posch M, Metnitz B, Rhodes A, Moreno RP. Preoperative anaemia is associated with poor clinical outcome in non-cardiac surgery patients. *Br J Anaesth* 2014;113:416-23.
4. Leal-Noval SR, Muñoz-Gómez M, Jiménez-Sánchez M, Cayuela A, Leal-Romero M, Puppo-Moreno A, et al. Red blood cell transfusion in non-bleeding critically ill patients with moderate anemia: is there a benefit? *Intensive Care Med* 2013;39:445-53.

5. Ferraris VA, Davenport DL, Saha SP, Austin PC, Zwischenberger JB. Surgical outcomes and transfusion of minimal amounts of blood in the operating room. *Arch Surg* 2012;147:49-55.
6. Ranucci M, Di Dedda U, Castelvechio S, Menicanti L, Frigiola A, Pelissero G, et al; Surgical and Clinical Outcome Research (SCORE) Group. Impact of preoperative anemia on outcome in adult cardiac surgery: a propensity-matched analysis. *Ann Thorac Surg* 2012;94:1134-41.
7. Leal-Noval SR, Muñoz M, Asuero M, Contreras E, García-Erce JA, Llau JV, et al. Spanish Consensus Statement on alternatives to allogeneic blood transfusion: the 2013 update of the "Seville Document". *Blood Transfus* 2013;11:585-610.
8. Goodnough LT, Maniatis A, Earnshaw P, Benoni G, Beris P, Bisbe E, et al. Detection, evaluation, and management of preoperative anaemia in the elective orthopaedic surgical patient—NATA guidelines. *Br J Anaesth* 2011;106:13-22.
9. Muñoz M, García-Erce JA, Remacha AF. Disorders of iron metabolism. Part II: iron deficiency and iron overload. *J Clin Pathol* 2011;64:287-96.
10. Muñoz M, Gómez-Ramírez S, Kozek-Langenecker S, Shander A, Richards T, et al. 'Fit to fly': overcoming barriers to preoperative haemoglobin optimization in surgical patients. *Br J Anaesth* 2015. DOI:10.1093/bja/aev165.
11. Cuenca J, García-Erce JA, Martínez F, Cardona R, Pérez-Serrano L, Muñoz M. Preoperative haematinics and transfusion protocol reduce the need for transfusion after total knee replacement. *Int J Surg* 2007;5:89-94.
12. Bisbe E, García-Erce JA, Díez-Lobo AI, Muñoz M; Anaemia Working Group España. A multicentre comparative study on the efficacy of intravenous ferric carboxymaltose and iron sucrose for correcting preoperative anaemia in patients undergoing major elective surgery. *Br J Anaesth* 2011;107:477-8.
13. Díaz Espallardo C, Laso Morales MJ, Colilles Calvet C, Mora López L, Roig Martínez I, Martínez Marín MT. The multidisciplinary approach is useful for optimising preoperative haemoglobin in colorectal cancer surgery. *Cir Esp* 2011;89:392-9.
14. Basora M, Colomina MJ, Tio M, Mora L, Salazar F, Ciercoles E. Optimizing preoperative haemoglobin with intravenous iron. *Br J Anaesth* 2013;110:488-90.
15. Serrano-Trenas JA, Ugalde PF, Cabello LM, Chofles LC, Lázaro PS, Benítez PC. Role of perioperative intravenous iron therapy in elderly hip fracture patients: a single-center randomized controlled trial. *Transfusion* 2011;51:97-104.
16. Muñoz M, Gómez-Ramírez S, Cuenca J, García-Erce JA, Iglesias-Aparicio D, Haman-Alcober S, et al. Very-short-term perioperative intravenous iron administration and postoperative outcome in major orthopedic surgery: a pooled analysis of observational data from 2547 patients. *Transfusion* 2014; 54:289-99.
17. Weltert L, Rondinelli B, Bello R, Falco M, Bellisario A, Maselli D, et al. A single dose of erythropoietin reduces perioperative transfusions in cardiac surgery: results of a prospective single-blind randomized controlled trial. *Transfusion* 2015. DOI: 10.1111/trf.13027.
18. European Medicines Agency. New recommendations to manage risk of allergic reactions with intravenous iron-containing medicines. Available at: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news_and_events/news/2013/06/news-detail_001833.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1 (Accessed September 19, 2014).
19. Rampton D, Folkersen J, Fishbane S, Hedenus M, Howaldt S, Locatelli F, et al. Hypersensitivity reactions to intravenous iron: guidance for risk minimization and management. *Haematologica* 2014;99:1671-6.
20. Avni T, Bieber A, Grossman A, Green H, Leibovici L, Gafter-Gvili A. The safety of intravenous iron preparations: systematic review and meta-analysis. *Mayo Clin Proc* 2015; 90:12-23.

Enfoque diagnóstico y terapéutico de las anemias ferropénicas refractarias

Á.F. REMACHA, J. MARSAL, J. REMACHA

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

Definición y terminología

Intuitivamente, el concepto de anemia ferropénica (AF) refractaria es muy claro. Sin embargo, no hay una definición precisa de AF refractaria. También la terminología usada es confusa: además de AF refractaria¹, se ha utilizado AF refractaria inexplicada², AF de origen incierto³ y AF refractaria u oscura⁴.

Se han usado diferentes definiciones:

- Pacientes con AF (Hb < 140 g/L en hombres, y < 120 g/L en mujeres y ferritina sérica < 30 µg/L) sin causa obvia de pérdida sanguínea, dieta inadecuada, enfermedad crónica o neoplasias. No se incluyó respuesta al tratamiento¹.
- Se define como AF refractaria al hierro oral como la falta de respuesta a dosis de al menos 100 mg de hierro elemental diarias durante 4-6 semanas, pero en los estudios también se incluyeron aquellos en los cuales la anemia persistía a pesar de una exploración gastrointestinal intensiva².
- Una anemia ferropénica (Hb < 110 g/L y ferritina sérica < 14 µg/L) refractaria al tratamiento con hierro oral de más de 2 años de duración, y estudios digestivos y ginecológicos (si eran mujeres) sin causas que justificaran la ferropenia³.
- Se definió la refractariedad como un incremento de la Hb < 10 g/L tras 4-6 semanas de tratamiento de al menos 100 mg de hierro elemental diario. Se definió como AF cuando la Hb era < 110 g/L y la ferritina sérica < 12 µg/L⁴.
- En las guías británicas se comenta que el tratamiento debe restaurar la Hb y los depósitos de hierro. Si no se consigue, se deben considerar posteriores evaluaciones⁵.
- Se consideró AF refractaria al tratamiento con hierro oral cuando no se consiguió una remisión completa (normalización de la Hb y ferritina sérica ≥ 15 µg/L o una remisión parcial (normalización de la Hb pero ferritina sérica < 15 µg/L; o persistencia de anemia con incremento de la

Hb ≥ 20 g/L). Se administraron 80 mg/d de hierro y a las 8 semanas se evaluó a las pacientes. Si no se conseguía una remisión completa se continuaba otras 8 semanas doblando la dosis de hierro. A las 16 semanas las no respondedoras se consideraron refractarias. Con esta pauta se observó respuesta en 34 de 35 mujeres premenopáusicas (97,2%) sin patologías asociadas. Es decir, solo una fue refractaria, en la que demostró la presencia de *Helicobacter pylori*⁶.

Diagnóstico de anemia ferropénica refractaria

Ante una AF se recomienda dar tratamiento hasta conseguir solventar la anemia y replecionar los depósitos férricos. Se recomienda investigar cualquier nivel de AF. Además, los hombres con Hb < 120 g/L y las mujeres postmenopáusicas con Hb < 100 g/L deben investigarse de forma urgente, pues niveles más bajos de Hb sugieren una patología de base más seria (nivel de evidencia A, según las guías británicas)⁵.

En la práctica diaria, la mayoría de las AF son tratadas por los médicos de Atención Primaria o por diversos especialistas (ginecólogos, dermatólogos, internistas, etc.). Muchos de estos pacientes son referidos a los digestólogos para el estudio de la causa de la anemia. Cuando existe algún tipo de problema con el tratamiento, entre ellos la refractariedad, o con el diagnóstico de la patología de base, remiten los pacientes al hematólogo. En estas circunstancias el hematólogo ha de plantearse varias situaciones clínicas antes de llegar al diagnóstico de AF refractaria (Figura 1). En todos ellos la historia clínica es fundamental, frente a la opinión de algunos².

Se debe distinguir la verdadera refractariedad de un estudio digestivo aparentemente negativo, es decir, los casos con colonoscopia, esofagogastroduodenoscopia e incluso cápsula endoscópica negativas.

Para diagnosticar una AF refractaria se ha de confirmar la presencia de una AF, pues no es infrecuente su confusión con las talasemias, especialmente las formas atípicas, o con la anemia de tipo crónico⁷.

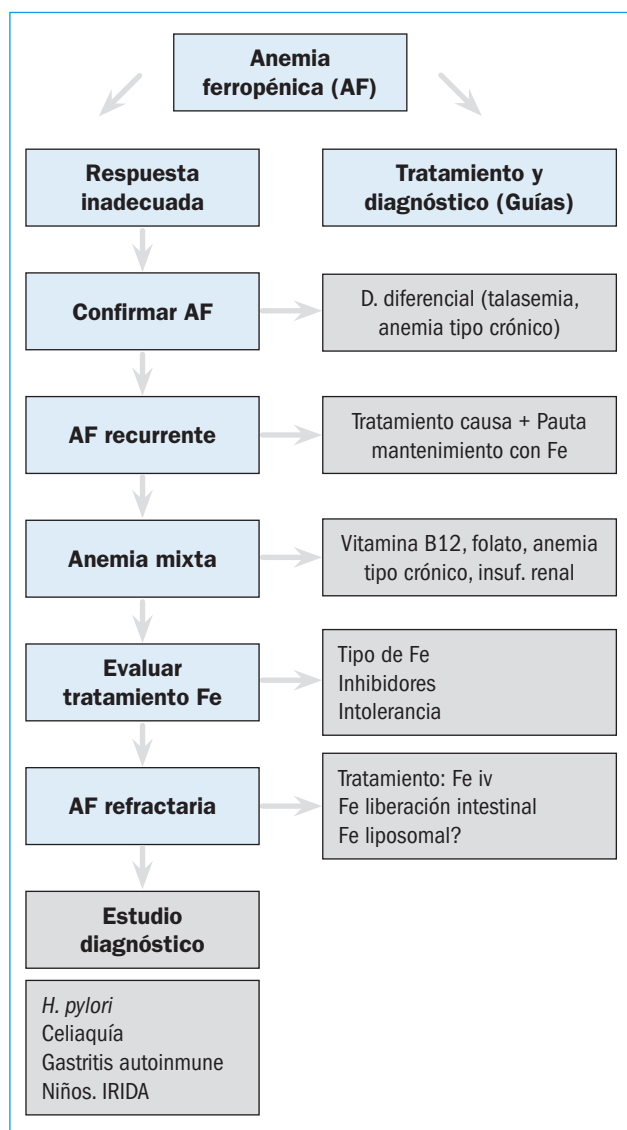


Figura 1. Evaluación de la anemia ferropénica refractaria.

Se ha de considerar e investigar la presencia de anemia mixta, como la coexistencia de un déficit de vitamina B₁₂ o folato, la coexistencia con una anemia de tipo crónico o con insuficiencia renal. De entrada, en todas ellas hay una respuesta inadecuada al hierro oral.

Es importante evaluar el tratamiento férrico que ha recibido el paciente: se ha de valorar el tipo de hierro que ha tomado. Existen numerosos preparados de sales férricas que se absorben mal; en este caso, simplemente cambiando el tipo de hierro se puede solventar la supuesta AF refractaria. El tratamiento recomendado de la AF se basa en la toma de sales ferrosas antes de la ingesta con o sin vitamina C^{2,5}.

La intolerancia digestiva puede provocar el abandono del tratamiento o el cambio de forma de toma. Si el hierro oral se toma con las comidas se mejora su tole-

rancia, pero se disminuye su absorción y, dependiendo del tipo de dieta, se impide. A pesar de esto, algunos autores recomiendan tomar el hierro con las comidas⁷. En mujeres jóvenes hasta un 75% demostraron algún tipo de efecto adverso digestivo, aunque todas ellas completaron el tratamiento recomendado una vez fueron informadas de los problemas del hierro oral⁶.

Existen numerosas situaciones que pueden interferir con la absorción del hierro, como la toma de inhibidores de la bomba de protones (por ejemplo, omeprazol) u operaciones gástricas previas (gastrectomía o gastroplastia).

Otra situación clínica que hay que diferenciar es la AF recurrente. Muchas de las causas de AF más frecuentes son crónicas y persistentes, como la hipermenorrea, el sangrado por hemorroides, la angiodisplasia intestinal y la hernia de hiato, a pesar de que no aparezcan reflejadas entre las causas gastroenterológicas más frecuentes de AF en las guías⁵. Se debe prestar especial atención a la telangiectasia hemorrágica hereditaria o enfermedad de Rendu-Osler^{8,9}. Estas causas pueden estar agravadas por trastornos congénitos de la hemostasia, la anticoagulación o antiagregación terapéutica⁶. Estos casos no son una verdadera AF refractaria, pues se debe dar un tratamiento de mantenimiento mientras la causa persista para evitar recurrencias.

Etiología de la anemia ferropénica refractaria

Fundamentalmente se produce por tres causas: la AF asociada a la infección por *Helicobacter pylori* (HP) (68% con AF refractaria), la celiacía (100% con AF refractaria) y la gastritis atrófica autoinmune (69% con AF refractaria)¹⁻⁴, sin olvidar la AF refractaria por producción inadecuada de hepcidina.

AF refractaria asociada a la infección por *Helicobacter pylori*

El HP es un bacilo gramnegativo de forma espiral, microaerófilo, de crecimiento lento y con varios flagelos móviles en un extremo. Este bacilo fue redescubierto, cultivado e identificado como el principal causante del ulcus gastroduodenal¹⁰⁻¹⁷.

Entre las enfermedades asociadas a esta bacteria las más frecuentes son la gastritis crónica activa y el ulcus péptico gastroduodenal (aproximadamente 10%). Además entre un 1% y un 3% desarrollan carcinoma gastrointestinal y menos del 0,1% linfoma MALT¹²⁻¹⁴ (Figura 2). También se ha asociado a manifestaciones extradigestivas, estando confirmada su implicación en algunas patologías hematológicas como en la AF inexplicada y en la púrpura trombopénica idiopática. También existen evidencias de su implicación en el déficit de vitamina B₁₂, y se ha sugerido un papel en el desarrollo

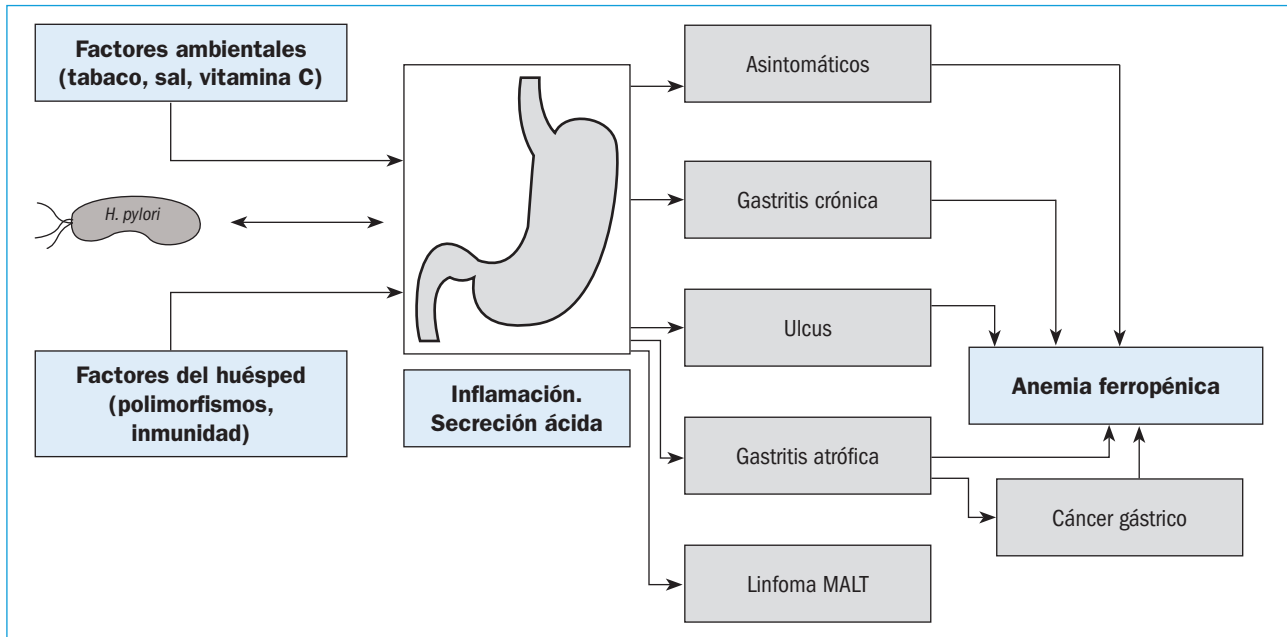


Figura 2. Factores que contribuyen a la patogenicidad del *H. pylori* (tomado de: van Amsterdam K, van Vliet AHM, Kusters JG, van der Ende A. Of microbeandman: determinants of Helicobacter pylori-related diseases. Microbiol Rev 2006;30:131-56).

patogénico de la anemia perniciosa, donde un pequeño porcentaje de pacientes tienen HP^{2,4,15-17}.

Epidemiología y transmisión

En el estudio NHANES III se objetivó que el 27%, 6,7% y 1,9% de la población tuvieron infección por HP, ferropenia y AF, respectivamente. La presencia de HP en el análisis multivariante se asoció a un aumento del 40% de prevalencia de ferropenia: los pacientes con HP tenían una ferritina más baja (14% menos de ferritina sérica)¹⁸.

Esta bacteria infecta a más de la mitad de la población mundial; sin embargo, solo un 20% de los infectados desarrolla algún tipo de sintomatología¹⁰⁻¹⁷. Se conoce que ha colonizado el estómago humano desde hace más de 50.000 años y se ha encontrado en las momias faraónicas. Su prevalencia cambia ostensiblemente de unas áreas a otras. En los países industrializados es más baja, oscila entre un 20% y un 50%, es rara en los niños y más común en los adultos. En los países en desarrollo puede llegar al 80%. En estos países la mayoría de los niños están infectados a los 10 años y alcanza el 80% antes de los 50 años. Hay una relación con el desarrollo económico del país (familias con ingresos medios frente a familias con ingresos bajos, 36,9% vs. 48,3%) y la educación (educación elevada frente a baja, 39,5% vs. 50,8%). En Japón la prevalencia era del 70-80% en adultos nacidos antes de 1950, 45% entre 1950 y 1960

y 25% entre 1960 y 1970¹⁹. También en Chequia ha pasado del 42% en 2001 al 23,5% en 2011, asociándose este descenso al incremento del nivel económico y al descenso de la natalidad. Lo mismo se ha observado en niños en Estonia y en Rusia^{20,21}. En adultos, la reinfección tras tratamiento erradicativo exitoso se ha estimado en 2% por año^{14,19}.

Su transmisión parece deberse, en los países desarrollados, a contacto persona a persona por vómito, saliva o heces. En los países en desarrollo se han implicado vías de transmisión adicionales como el agua contaminada^{19,21}. No se ha evidenciado transmisión desde animales, aunque se ha objetivado la presencia de HP en primates y en otros animales¹⁹. La transmisión se ha observado de forma vertical (padres a hijos) y de forma horizontal (contaminación ambiental o interindividuos)²¹.

Los estudios epidemiológicos se han centrado sobre todo en la infancia, el periodo donde se adquiere en muchos casos la infección. Es de destacar la diferencia en infección en niños según los países. La seroprevalencia en niños entre 11-16 años en Texas es del 12%, frente al 56% en la India^{20,21}. Se ha demostrado un alto riesgo de transmisión intrafamiliar durante la infancia, donde la madre juega un papel clave. El principal reservorio es el estómago y la transmisión persona a persona vía oral-oral o fecal-oral. La infección se asocia a condiciones sanitarias pobres, agua contaminada y al número de personas por habitación en la vivienda, aun-

que la transmisión madre-hijo es el factor más importante (OR: 13) y más probable; sin desdeñar el efecto domiciliario con gastroenteritis (OR: 4,8). La transmisión niño-niño en la guardería es muy improbable y es inferior a la transmisión madre-hijo²¹. De esta forma, en estos países a los 16 años un 50% de los jóvenes están infectados por HP. Sin embargo, la infección globalmente está disminuyendo, sobre todo en los países industrializados, pero también en los países en vías de desarrollo. En los países geográficamente grandes también varían según los grupos étnicos y las regiones, como se ha observado en Canadá^{20,21}.

Fisiopatología

Contrariamente al dogma ampliamente admitido, el estómago no es estéril; más de 200 especies pueden crecer. Sin embargo, cuando el HP está presente es predominante y fácilmente demostrable en las biopsias gástricas. El HP es un organismo extraordinariamente adaptado a establecerse, vivir y crecer en un medio tan hostil como el estómago. En este sentido, la bacteria ha desarrollado un mecanismo sofisticado de regulación del metabolismo férrico y de otros metales que regulan la adaptación y supervivencia del HP en ese medio. Muchos de estos mecanismos, que recuerdan al control ejercido por el contenido intracelular del hierro en el hombre y otros mamíferos, están presentes en otras bacterias; pero el HP es el más eficiente y sofisticado. Un campo de investigación muy activo es el estudio de las características de las cepas de HP más agresivas (cáncer gástrico) frente a otras que pasan casi desapercibidas. Esta capacidad es en gran parte mediada por el hierro²²⁻²⁸.

Tras la colonización gástrica, la capacidad constitutiva del HP de las vías de reparación del ADN y de las proteínas, combinado con la diversificación del genoma de la bacteria y la atenuación de la respuesta defensiva del huésped, son esenciales para la persistencia del HP en su nicho²⁴.

La colonización inicial depende de la capacidad del HP para producir ureasa, que eleva el pH gástrico y permite la movilidad del HP impulsado por su forma especial helicoidal y flagelada. Este cambio del pH cambia las propiedades fisicoquímicas del moco protector gástrico (de gel a una forma viscoelástica). De esta forma entra en contacto con las células del epitelio gástrico, induciendo una respuesta inflamatoria²².

La persistencia de la colonización de la mucosa gástrica depende de la capacidad del HP para hacer frente a la respuesta inmune, especialmente la mediada por radicales libres derivados del oxígeno. El HP produce varias proteínas antirradicalarias y ha desarrollado un poderoso sistema de reparación del ADN potencialmente dañado por esa actividad radicalaria, frente a las

células circundantes que acumulan lesiones en su ADN. Además, el HP secreta una serie de toxinas, relacionadas con su virulencia, que manipulan los tejidos adyacentes y provocan su propia persistencia. Especialmente los efectores VacA (*vacuolating cytotoxin A*) y CagA (*cytotoxin-associated gene A*). La toxina VacA forma un poro que induce la apoptosis de las células epiteliales e inhibe la proliferación y las funciones efectoras de los linfocitos T. La proteína CagA es una oncoproteína y en los pacientes con cepas más virulentas es el antígeno inmunodominante. Esta proteína es traslocada a las células del huésped a través del sistema de secreción Cag tipo IV (*type IV secretion system T4SS*)^{22,24} codificado en el islote patogénico Cag (cag-PAI). La producción de CagA se asocia a un riesgo aumentado de cáncer gástrico y su expresión en modelos animales induce este cáncer y otros tipos de neoplasias^{22,24}. La interacción CagA y VacA promueve la captación de hierro vía transferrina por la bacteria, promoviendo una colonización eficiente en un medio con escasos recursos férricos como es el estómago²⁴.

La evasión del reconocimiento inmune es crucial para persistir. El HP ha desarrollado varias estrategias para evadir las defensas inmunes del huésped. En este sentido, el HP ha evolucionado para evadir la detección por los diferentes receptores de patrones de reconocimiento (*pattern recognition receptors*, PRR) frente a otras enteropatógenos gramnegativos. Los mejores conocidos son los diversos tipos de receptores *Toll-like* (TLR), que unen diversos patógenos microbianos (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMP). El mejor conocido es la evasión de la detección del ligando de TLR4, el LPS. El LPS del HP es 1.000 veces menos bioactivo que el LPS del *E. coli*. También suprime las señales mediadas por los receptores lectina tipo C (CLR); como consecuencia la subunidad 65 del NF- κ B se acetila, con lo que prolonga e induce la transcripción de la IL-10, una citocina con actividad antiinflamatoria. Respecto a células dendríticas, el HP induce la producción de IL-18 y IL-1 β ; la IL-18 es crucial para inducir células T-reguladoras (*regulatory T-cell*, Treg). El HP induce la supresión de la inmunidad mediada por Th1 y Th17, mientras que los linfocitos B y los anticuerpos están poco involucrados en la defensa frente al HP (de ahí que no se haya obtenido éxitos con la vacunación). La respuesta efectora T CD4+, con especial mención a los subtipos Th1 y Th17, es crítica para controlar la infección. Hay dos factores de virulencia del HP que manipulan la respuesta inmune T. La VacA previene la traslocación del factor nuclear de células T (*nuclear translocation of the T-cell transcription factor*, NF-AT) y la subsecuente transactivación de genes de respuesta inmune T. El otro factor es la gammaglutamil transpeptidasa (GGT), que inhibe la actividad cinasa ciclina-dependiente (CDK) y la disrupción de la vía Ras. Además, ambos factores indirectamente promueven la

diferenciación de las células T naif a Treg. Para ello se requiere la interacción de la células T naif con células dendríticas. Este contacto se puede producir en la mucosa gástrica o en los ganglios linfáticos de drenaje gástrico (ganglios gástricos o mesentéricos). Las células dendríticas expuestas a HP no inducen respuesta tipo T mediada por Th1 y Th17; en vez de esto induce el factor de transcripción Treg-específico FoxP3, el marcador de superficie CD25 y la producción de la interleucina antiinflamatoria IL-10 en las células T-naif. Las Treg son mayoritariamente células T CD4+ que suprimen la respuesta inmune inducida por otras células, mantienen la autotolerancia y previenen la autoinmunidad; su factor de transcripción es FoxP3²⁴.

Como consecuencia de la infección por HP se induce una inmunosupresión (inhibición y manipulación de la respuesta inmune T) con repercusiones sistémicas. Este efecto protege frente a enfermedades alérgicas como el asma bronquial o enfermedades inflamatorias como la enfermedad inflamatoria intestinal. Estas patologías, que están aumentando, se relacionan con la negativización de la colonización por HP derivada de las mejores condiciones sanitarias y el uso de antibióticos. En un modelo murino los Treg asilados de ratones infectados con HP protegen contra el asma²⁴.

Otro aspecto es conocer la patogenia y poseer marcadores que identifiquen las cepas más agresivas que predisponen a las formas más graves de la patología inducida por el HP. Se han explorado varias opciones y vías metabólicas, incluyendo la enzima antioxidante alquil-hidroperóxido reductasa (AhpC), que es más expresada en las cepas de HP observadas en pacientes con gastritis crónica, y dos proteínas inducidas por el estrés osmótico y por el estrés ácido, la proteína activadora de neutrófilos (NapA, *neutrophil-activating protein*) y la ferritina unidora de hierro no Hem (Pfr, *non-heme iron-binding ferritin*)²⁵. Estas proteínas son mecanismos defensivos frente al estrés ambiental, incluyendo el oxidativo, el osmótico y el ácido, o frente a la inflamación gástrica.

El estrés oxidativo se asocia a la inflamación crónica originada por HP; como consecuencia se liberan radicales libres, que pueden dañar la mucosa gástrica. El HP ha desarrollado mecanismos de defensa para sobrevivir. La enzima antioxidante AhpC del HP es capaz de balancear estos radicales por su actividad peroxidada. Esta enzima posee una actividad dual *in vivo*. Las formas de bajo peso molecular poseen actividad peroxidasa en condiciones microaeróbicas, pero bajo condiciones de estrés oxidativo persistente se forman complejos de alto peso molecular con actividad chaperona protegiendo a otras proteínas. Es decir, la enzima AhpC actúa como un sensor de actividad radicalaria y permite sobrevivir al HP con su actividad chaperona en caso de persistencia de la actividad radicalaria en el estómago.

El estrés osmótico aparece cuando hay un alto contenido en sales. NapA es una proteína que une hierro, con lo que protege el ADN del HP de un posible daño radicalario mediado por el hierro. El HP aumenta la producción de NapA ante el estrés osmótico producido por un alto contenido en sales liberando Fe₂₊, que reaccionará con el oxígeno para producir H₂O₂, lo cual aumentará el riesgo oxidativo de la mucosa gástrica^{25,26}.

El estrés ácido es consecuencia del pH estomacal. La proteína Pfr, que forma parte de la familia de ferritinas de los procariotas, es esencial para almacenar hierro y permite sobrevivir al HP en condiciones de privación de hierro. Esta especie de ferritina protege al HP de la toxicidad del hierro amplificada por el medio ácido. Tiene una función dual, ya que Pfr puede pasar de ser una proteína de almacenamiento de hierro con actividad ferrioxidasa a una función protectora del ADN al unirse a él. Este cambio se produce cuando esta ferritina se expone a ácido. En las condiciones de actividad radicalaria aumentada por el ácido el HP se ve forzado a proteger su ADN, la bacteria incrementa la producción de Pfr y cambia su función de almacenamiento de hierro a unirse a ADN y protegerlo²⁵.

De lo anterior se deduce que el HP regula sus genes en respuesta a los cambios del ambiente que lo rodea. En este sentido, el HP ha desarrollado un control muy eficiente de su homeostasis férrica, superior a la de otros organismos afines. Este control es ejercido por la proteína reguladora de la captación de hierro o Fur (*ferric uptake regulator*), que esencialmente regula la transcripción de genes involucrados en la adquisición y almacenamiento del hierro según la disponibilidad de hierro; para ello Fur regula numerosos genes en respuesta a pH bajo, estrés oxidativo y al contenido en sales. Esto quiere decir que Fur cumple una función muy importante en la reconocida plasticidad del HP en las hostiles condiciones que lo rodean. Esta proteína también existe en otras especies de bacterias, donde juega un papel importante en su patogenicidad (*Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bacillus cereus* y *Vibrio cholera*). Su inactivación reduce la virulencia de estas bacterias.

El hierro es esencial para todos los organismos y el HP no es una excepción. En el estómago, la ingesta provee hierro en dos formas: hierro Hem y hierro no Hem. El pH bajo y las enzimas gástricas liberan el hierro de sus ligandos al lumen gástrico. Allí, HP y el huésped compiten por el hierro liberado desplegando mecanismos para su adquisición, junto a otros metales. El secuestro de estos micronutrientes es una de las primeras líneas de defensa frente a la infección bacteriana (inmunidad nutricional). En este sentido, el HP está perfectamente adaptado a competir por el hierro con su huésped, de manera que en modelos murinos se ha demostrado que, en condiciones de escasez de

hierro, induce AF en el animal. El pH ácido mantiene la forma ferrosa del hierro e impide su transformación en la forma férrica. La forma ferrosa es adquirida de forma pasiva a través de la membrana del HP; una vez en el citoplasma, se une a transportadores de alta afinidad (FeoB). También es capaz de utilizar otras fuentes de hierro (citrato férrico, holotransferrina, hololactoferrina, hemoglobina) con sus correspondientes proteínas de transporte.

Para el control de la homeostasis férrica Fur activa y reprime genes con variadas funciones en respuesta a la disponibilidad intracelular de hierro. Fur regula negativamente las proteínas anteriormente involucradas en el transporte de hierro, incluyendo los receptores de la transferrina y de la lactoferrina. En condiciones de bajo hierro intracelular Fur no se une a las secuencias Fur de los promotores de los genes anteriores y sus transcripciones no son reprimidas, con lo que la capacidad del HP para adquirir hierro intracelular aumenta drásticamente^{22,27,28}. Es decir, Fur reprime (*Fe-off*) o estimula (*Fe-on*) (Figura 3) la expresión de genes regulados por el contenido de hierro. La unión de Fur como un dímero al ADN reprime la transcripción²³. Entre estas proteínas están las flavorreductasas, que transforman el extracelular hierro férrico en el soluble hierro ferroso. El gen GGT es dependiente de Fur, así como la bacterioferritina Pfr, lo que reprime su síntesis en condiciones de bajo hierro. También estimula la función de enzimas que requieren hierro por medio de la formación de los *cluster* Fe-S (transporte de electrones, catálisis redox, replicación y reparación del ADN, etc.). También eleva la superóxido dismutasa (SOD). Los genes

CagA y VacA, relacionados con la virulencia del HP, también son activados por Fur. CagA facilita la adquisición de hierro^{27,28}.

Fur es esencial para la colonización por HP, pero no para su mantenimiento. También Fur determina el patrón de invasión gástrica, HP coloniza tanto el cuerpo como el antro gástrico. Sin embargo, el HP predomina en la región antral, donde la producción de ácido es inferior. Esta distribución difiere en los animales con formas mutadas de Fur menos activas. También correlaciona con la inflamación gástrica. La ausencia de Fur se correlaciona con una menor inflamación en antro y cuerpo gástrico, un factor procarcinógeno. Por ello estos animales deficientes en Fur desarrollan menos adenocarcinoma^{22,27,28}.

El papel de Fur en la etiología de la AF relacionada se debe a su papel fundamental como regulador de la homeostasis férrica en el HP. Cambios en su función o su malfuncionamiento llevan a un aumento de la utilización de hierro por el HP frente al huésped. La infección por cepas mutantes de Fur, que constitutivamente expresan las proteínas transportadoras de hierro, favorecen el desarrollo de déficit de hierro^{27,28}.

Relación entre anemia ferropénica e infección por HP

El 80% del hierro dietético (hierro no Hem o inorgánico) requiere del pH ácido gástrico para ser reducido a la forma ferrosa y así facilitar su absorción. Esta reacción es facilitada por ácido ascórbico, que es secretado por

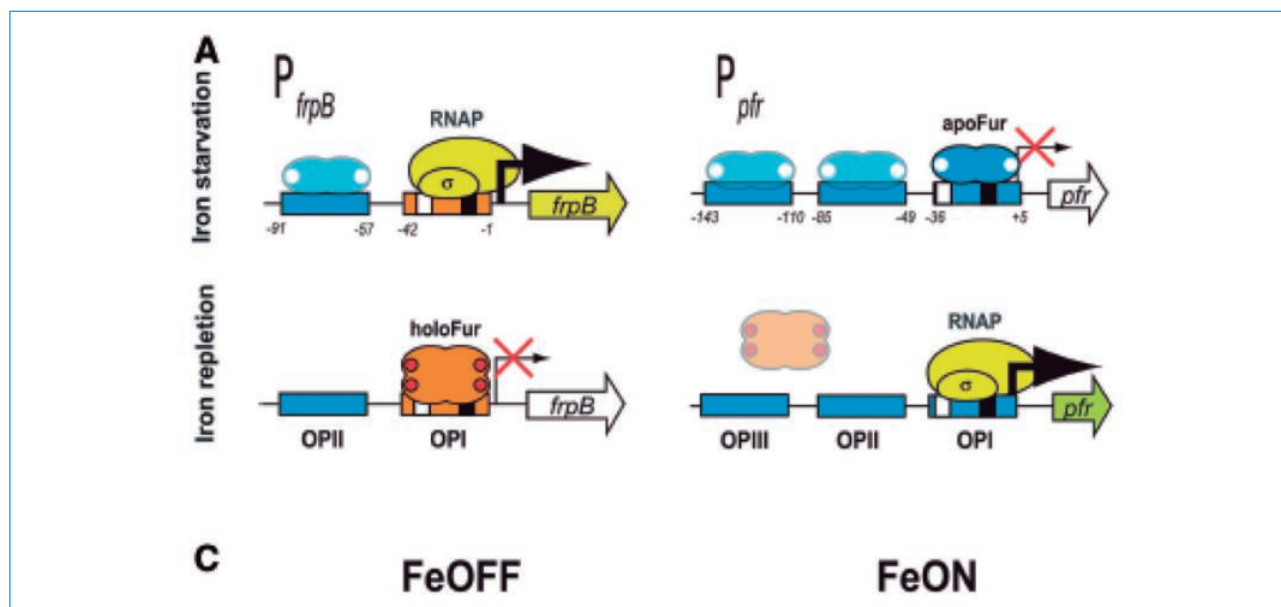


Figura 3. Regulación de Fe OFF/ON por la proteína Fur del *H. pylori* (tomado de: Agriesti F, Roncarati D, Musiani F, Del Campo C, Iurlaro M, Sparla F, et al. FeON-FeOFF: the Helicobacter pylori Fur regulator commutates iron-responsive transcription by discriminative read out of opposed DNA grooves. Nucleic Acids Res 2014;42:3238-51).

el plasma al jugo gástrico. Tras la publicación de los primeros casos clínicos de la asociación entre HP y AF, diferentes estudios epidemiológicos bien controlados, revisados en varios metaanálisis^{29,30}, han demostrado la asociación entre AF e infección por HP²⁰. La erradicación se asocia a recuperación de la AF, incluso en pacientes que no reciben tratamiento férrico^{20,29,30}. Se ha observado que los pacientes con AF sin HP responden mejor al hierro oral, sugiriendo que incluso los pacientes asintomáticos tienen la absorción férrica disminuida^{20,29-31}. La respuesta a erradicación se ha observado en todas las edades, así como en las embarazadas³¹.

Varias guías médicas reportadas por múltiples sociedades científicas recomiendan investigar y erradicar el HP, aunque no debe sustituir el estudio de otras causas comunes de AF³²⁻³⁶. La infección por HP se ha incluido dentro de las causas de AF de causa no explicada^{31,37}. Otro aspecto recientemente demostrado es que los pacientes con AF relacionada con HP y modelos animales están más predispuestos a tener carcinoma gástrico, pues las cepas de estos pacientes son más virulentas^{38,39}.

Se han implicado varios mecanismos por los cuales el HP puede dar lugar a AF en sus huéspedes, además de la hemorragia activa causada por gastritis, úlcus péptico o cáncer gástrico. La gastritis crónica activa provocada por el HP induce disminución de la producción de ácido y de la secreción de ácido ascórbico, con lo que se dispone de menos hierro ferroso. Es también evidente que el HP compite por el hierro gástrico con el huésped y que está dotado de mecanismos muy evolucionados para conseguirlo, sin olvidar que, además, se relacionan con su virulencia y su oncogenicidad^{2,19-22,31}.

Estudio diagnóstico

Para demostrar la presencia del HP se dispone de varias metodologías diagnósticas a partir de las biopsias gástricas, en suero o en heces, todas ellas con altas sensibilidades y especificidades. El más extendido es el test del aliento. Además, en la gastroscopia y la biopsia gástrica se puede observar el tipo de alteración patológica producida por el HP⁴⁰.

Tratamiento

El tratamiento erradicador se ha recomendado en todos los pacientes con AF e infección por HP³²⁻³⁶ mediante el uso de una terapia triple de primera línea durante 10 días con omeprazol, amoxicilina y claritromicina o compuestos con bismuto; ambas pautas tienen efectividades superiores al 80%. Existen varias alternativas como segunda línea o en áreas con formas de HP resistentes a amoxicilina o claritromicina, que se pueden consultar en las diferentes guías³²⁻³⁶. Se ha valorado el coste de la erradicación de HP, tanto en cuanto a sus

potenciales beneficios como a los perjuicios que pudiera ocasionar por el impacto del HP sobre enfermedades inflamatorias y alérgicas⁴¹.

La mayoría de estos pacientes no responden bien al tratamiento clásico con sulfato ferroso oral. Se han observado mejores respuestas con las sales ferrosas orales de liberación retardada en el ámbito intestinal (ferroglicina sulfato, sulfato ferroso con glicina)⁴², y el hierro liposomal también podría ser una alternativa oral válida^{43,44}. Ambas terapias orales precisan de estudios más extensos para demostrar que son alternativas fiables al hierro intravenoso. La alternativa más fiable hoy es el tratamiento con hierro intravenoso, con alguna de las excelentes formulaciones existentes².

Un aspecto importante que hay que considerar es que la infección por HP también se asocia a déficit de vitamina B₁₂. Si ambos coexisten han de tratarse ambos^{2,13-20}.

Enfermedad celiaca

Varios estudios han demostrado la presencia de enfermedad celiaca (EC) en pacientes con AF (prevalencia 2-15%)⁴⁵. La EC es una enfermedad de origen inmune provocada por el gluten de la dieta en personas susceptibles genéticamente. El gluten se encuentra en varios cereales (trigo, avena, centeno). Esta enfermedad se caracteriza por formas variadas de presentación, por una respuesta específica en forma de autoanticuerpos séricos (anticuerpos antiendomesio o antitransglutaminasa o anti-TTG tisular) y por una alteración característica de la mucosa del intestino delgado (Figura 4). La enfermedad celiaca afecta a entre un 0,6% y un 1% de la población mundial, con amplias diferencias regionales (0,3% en Alemania y 2,4% en Finlandia). Los estudios recientes demuestran que su prevalencia está aumentando y que por cada paciente diagnosticado hay de 7 a 8 sin diagnosticar⁴⁶⁻⁴⁸.

La clínica de presentación es muy variable. Suele presentarse como un colon irritable con diarrea, pérdida de peso o anemia inexplicable. Es frecuente encontrar una historia familiar positiva. La anemia puede ser el primer síntoma de esta enfermedad. En general, debido a la malabsorción intestinal, se trata de una anemia mixta con múltiples déficit de variadas, vitamina B₁₂ y/o de folato, combinado con otros déficit de micronutrientes (vitamina K, D, etc.); pero también puede presentarse únicamente como una AF. Como se ha comentado, al diagnóstico se llega mediante el estudio de los autoanticuerpos específicos (con sensibilidades y especificidades muy altas, el más usado es el anti-TTG IgA) (Figura 5). Además, otros criterios adicionales serían la identificación de los genotipos HLA-DQ2 o DQ8 y la respuesta a la dieta libre en gluten. Los pacientes deben ser remitidos a los gastroenterólogos para el tratamiento de la EC

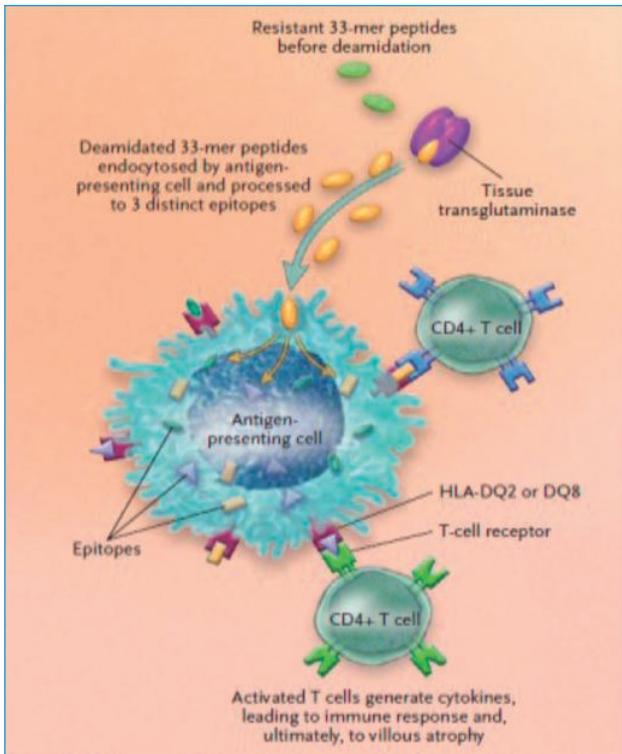


Figura 4. Patogénesis de la enfermedad celíaca (tomado de: Fasano A. Celiac disease-How handle a clinical chameleon. *N Engl J Med* 2003;348:2568-70).

(dieta libre en gluten) y para los consejos dietéticos⁴⁶⁻⁴⁸. Si presentan AF no suelen responder al hierro oral hasta que no se instaura un tratamiento de la EC, por lo que se recomienda el tratamiento con hierro parenteral^{2,49}. Existen varias guías sobre el manejo de la EC^{50,51}. Las guías inglesas para el manejo de la AF recomiendan realizar un estudio para descartar EC en todos los pacientes con AF, pues el 5% de las AF allí presentan EC⁵.

Gastritis autoinmune

La gastritis crónica se puede clasificar en activa, la que se observa frecuentemente en la infección por el HP, o atrófica. Dentro de la gastritis crónica atrófica (GCA) se diferencian la tipo A o autoinmune, que predomina en el cuerpo, y la tipo B o no autoinmune, que predomina en el antro. La GCA tipo A que predomina en el cuerpo involucra el fundus y el cuerpo gástrico, suele preservar el antro, típicamente produce hipo/aclorhidria, hiper-gastrinemia y es el sustrato patológico de la anemia perniciosa. La GCA antral o tipo B afecta también al cuerpo y al fundus gástrico, además de al antro. No se asocia a hiper-gastrinemia debido a la afectación de las células del antro que producen gastrina⁵².

Ya que para la absorción del hierro es crítica la acidez gástrica, ambas gastritis pueden provocar malabsorción

de hierro y AF. Por esto varios grupos han estudiado este aspecto y recomiendan realizar biopsias gástricas para excluir estos tipos de gastritis, sobre todo en caso de AF refractaria o no explicada, pues puede ser responsable de hasta el 30% de los casos de este tipo de AF^{1,2,4}, aunque las guías británicas no recomiendan su exploración sistemática⁵.

En la anemia perniciosa (GCA autoinmune) una proporción sustancial de células parietales gástricas se destruyen, lo que resulta en la no producción de factor intrínseco y en la consecuente malabsorción de vitamina B₁₂. También como consecuencia de la aclorhidria se produce malabsorción de hierro, de aquí que sea frecuente observar en la AP ferropenia asociada. De hecho, es una de las causas más frecuentes de las denominadas “anemias megaloblásticas enmascaradas”. En realidad, son anemias mixtas que se presentan con un cuadro de anemia microcítica o normocítica con patrón de ferropenia; la mayoría de los casos responden mal o no responden al hierro^{2,4,53,54}. Cuando se investigan se observa un déficit concomitante de vitamina B₁₂ y características de AP (hipergastrinemia, anticuerpos anticélula parietal gástrica o antifactor intrínseco positivos y en la biopsia gástrica la GCA con o sin metaplasia intestinal)^{2,54}. Se ha comunicado que aproximadamente un 10% de las AP se manifiestan de esta manera⁵⁴. Característicamente se da en personas más jóvenes, en general mujeres, y se asocia a alguna causa de hemorragia (la mayoría con hipermenorrea) y/o con una ingesta férrica inadecuada. Esta forma de presentación ha sido considerada como una posible entidad diferente de la clásica AP; sin embargo, son la misma enfermedad pero con una presentación diferente, que depende de otros factores concomitantes. Es decir, en las personas con una causa añadida de déficit de hierro (hipermenorrea, rectorragias, dieta inadecuada, etc.) se manifestará como una AF refractaria hasta que se diagnostique el déficit de vitamina B₁₂^{1,2,4}. En las personas mayores sin estas causas de sangrado aparecerá el cuadro típico de la anemia megaloblástica². En este sentido, no es infrecuente observar en las AP típicas, después de tratarlas con vitamina B₁₂, una ferropenia que se debe tratar⁵⁴.

Un capítulo importante es el diagnóstico de estos casos con anemias megaloblásticas enmascaradas, pues en la AF baja la vitamina B₁₂ sérica sin que exista un déficit. En estos casos el tratamiento con hierro normaliza los niveles de vitamina B₁₂. Para poder estudiar adecuadamente estos casos hemos de tener en cuenta que se deberían determinar los factores de maduración de todas las AF con más de 60 años y, si existe una hipovitaminemia B₁₂, realizar una determinación de alguno de los metabolitos que se alteran en este déficit (homocisteína o ácido metilmalónico, fundamentalmente)^{54,55}.

Sin embargo, dentro de las AF refractarias con GCA solo aproximadamente la mitad tienen la vitamina B₁₂

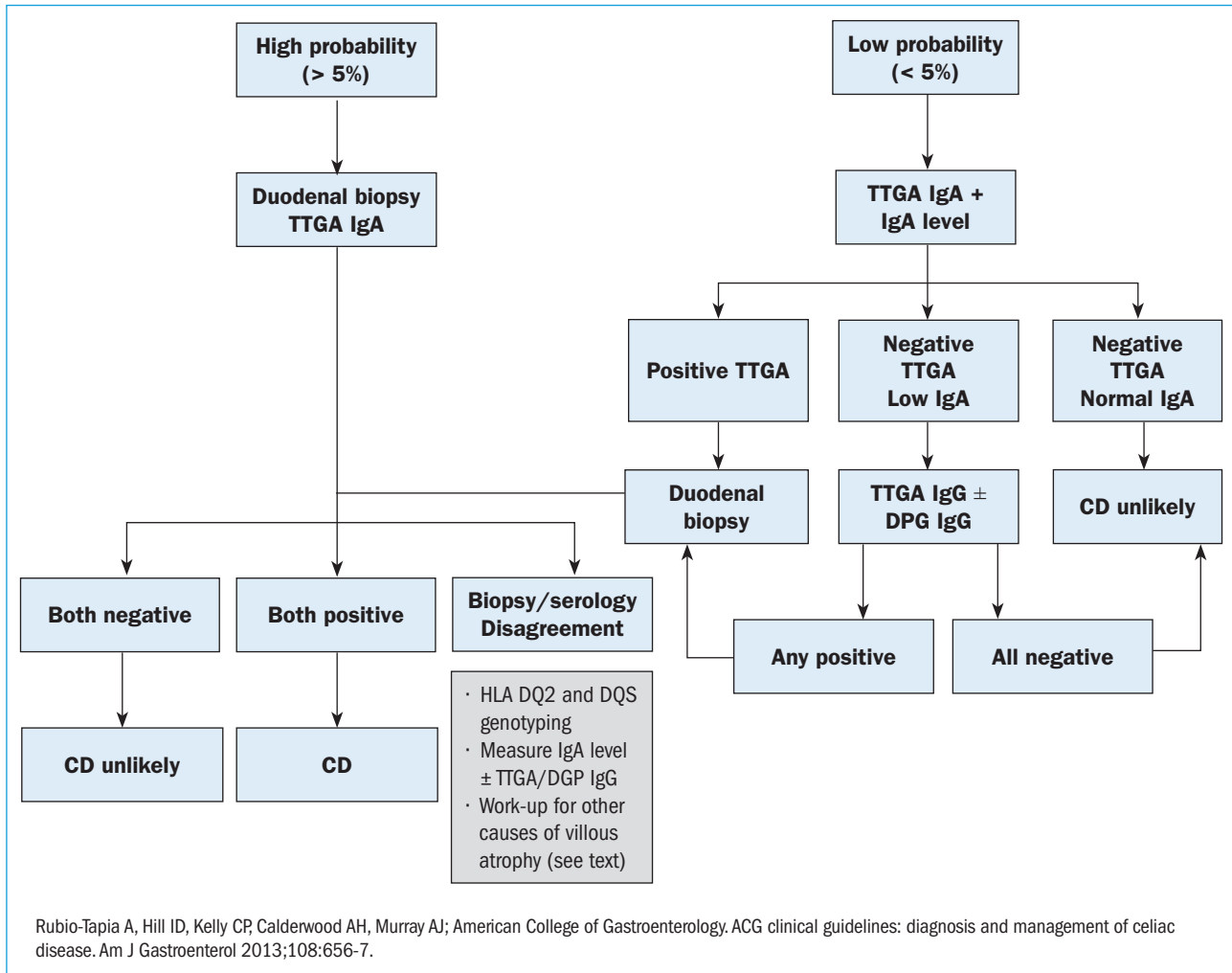


Figura 5. Evaluación diagnóstica de la enfermedad celíaca.

baja, y de estas algunas son realmente deficitarias. El resto serían AF asociada a una GCA sin criterios de AP^{1,2}. Como se ha comentado, la mayoría son personas con otras causas de sangrado o una dieta inadecuada. Algunos de estos casos presentan anticuerpos anticélula parietal gástrica, típicamente la gastrina es normal o poco elevada y muy raramente se detectan anticuerpos antifactor intrínseco^{1,2,4}. Si se trata de una forma de pre-AP que después evolucionará a AP queda por determinar⁵⁶.

Anemia ferropénica refractoria por producción inadecuada de hepcidina

Se ha observado, en casos raros de AF refractoria al hierro oral, la presencia de una producción inadecuada de hepcidina. Se trataría de una forma de IRIDA (*iron refractory iron deficiency anemia*) adquirida.

Se ha comprobado que los adenomas hepáticos secundarios a la enfermedad de depósito del glucógeno

tipo 1a (GSD1a) producen hepcidina y que muchos de estos pacientes tiene una AF moderada, pero en un 6% la AF es grave. El tratamiento prolongado y continuo con glucosa permite a los pacientes alcanzar la edad adulta y desarrollar otras complicaciones, entre ellas adenomas hepáticos y anemia. La anemia es secundaria a la producción de hepcidina por los adenomas hepáticos y se recupera tras extirpar los adenomas hepáticos⁵⁷.

Esta forma de anemia y su asociación a carcinoma renal merecen especial atención. Junto con la hipertensión, la anemia es una manifestación frecuente en los tumores renales (prevalencia 24-60%). La mayoría son anemias de tipo crónico, pero aproximadamente en un tercio la anemia es microcítica hipocrómica con signos de ferropenia, sin que se observe sangrado que lo justifique⁵⁸. La anemia y el patrón férrico mejoran con la extirpación del tumor⁵⁹. Se ha demostrado que las células tumorales expresan hepcidina, confiriendo mal pronóstico⁶⁰. Este patrón, aunque con menos frecuencia, puede observarse en otros tumores⁶¹.

Iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA)

La regulación de la hepcidina es compleja y depende de varias señales, tanto estimulantes como inhibitorias. Fisiológicamente la más importante es el contenido de hierro que, cuando está elevado, induce la producción de hepcidina a través de la vía BMP6/BMP receptor/HJV/SMAD4 (*bone morphogenic protein 6, hepcidina*). La activación de esta vía provoca un incremento de hepcidina. Esta regulación es modulada por varios factores inhibidores. La matriptasa-2 (Tmprss6) es un represor de la producción de hepcidina que actúa provocando la degradación proteolítica de la hepcidina (HJV). Esta proteína reguladora negativa es fundamental para el buen desarrollo de la homeostasis férrica en todos los periodos de la vía. Una disminución de actividad en esta proteína provoca una AF que no responde al hierro oral (IRIDA)^{62,63}.

Recientemente, un grupo holandés ha publicado unas guías sobre los defectos genéticos que producen anemia microcítica relacionados con el metabolismo férrico y del grupo Hem. Dentro de estos defectos, el IRIDA se encontraría en los que hay una baja disponibilidad de hierro para la eritropoyesis (Tabla 1).

Tabla 1. Anemias microcíticas por trastornos del metabolismo férrico o del grupo Hem

1. Enfermedades por baja disponibilidad de Fe por la eritropoyesis.
1A. Iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA) causada por defectos en Matriptasa2 (TMPRSS6).
1B. Enfermedad de la ferroportina por defectos en Ferroportina (SLC40A1) (solo en ratón)
1C. Aceruloplasminemia (ACP)
2. Enfermedades por defectos en la adquisición de Fe por los eritroblastos
2A. Hipotransferrinemia congénita.
2B. Anemia con sobrecarga férrica por defectos en SLC11A2 (DMT1)
2C. Anemia sideroblástica por defectos en STEAP3
3. Enfermedades por defectos en la síntesis del heme y/o Fe-S cluster synthesis
3A. Anemia sideroblástica por defectos en SLC25A38
3B. Anemia sideroblástica ligada a X con ataxia cerebelosa por defectos de ABCB7
3C. Anemia sideroblástica ligada a X por defectos de ALAS2
3D. Anemia sideroblástica por defectos de GLRX5
3E. Protoporfiria eritropoyética debido a defectos de FECH y mutaciones con ganancia de función en ALAS2 (<i>X-linked dominant protoporphyria XLDP</i>)
3F. Porfiria eritropoyética congénita por defectos en UROS o GATA1

Donker AE, Raymakers RAP, Vlasveld LT, van Barneveld T, Terink R, Dors N, et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of microcytic anemias due to genetic disorders of iron metabolism or heme synthesis. *Blood* 2014;123:386-7.

La prevalencia del IRIDA es desconocida, pero probablemente está infradiagnosticada. Se han descrito más de 60 casos en unas 40 familias. La mayoría son homocigotos o dobles heterocigotos (herencia autosómica recesiva), pero se han reportado algunos casos que son solo heterocigotos (herencia autosómica dominante). La mayoría de los casos se presentan en la infancia como una anemia microcítica moderada-grave que mejora con la edad. Presentan sideremia baja, capacidad total de transporte normal o alta, índice de saturación bajo y ferritina normal o baja. Típicamente, el receptor de la soluble de la transferrina está elevado, así como las cifras de hepcidina en sangre u orina con ausencia de signos inflamatorios que lo justifiquen. La mayoría no responden al hierro oral^{2,64}. Este hecho nos ha de hacer diferenciarla de otras alteraciones, tanto congénitas (defectos DMT1)⁶⁵ como adquiridas (infección por HP, gastritis crónica, EC, etc.)^{2,64}.

Tratamiento

La mayoría de los casos son resistentes al hierro oral; unos pocos casos responden parcialmente al hierro oral, algún caso tras suplementar con ácido ascórbico (3 mg/día). El hierro intravenoso mejora la Hb, aumenta la ferritina y disminuye el receptor soluble de la transferrina; sin embargo, es más difícil normalizar la saturación de la transferrina y el VCM. Estos pacientes están en riesgo de padecer sobrecarga férrica si se tratan excesivamente, por lo que es conveniente monitorizar el hierro hepático y no sobrepasar una ferritina de 500 µg/L⁶⁴. El papel de la Epo es controvertido^{64,65}, aunque en nuestra opinión también es importante⁶⁶. En un caso se observó respuesta a corticoides (metilprednisolona), aunque el diagnóstico de IRIDA de este caso ha sido cuestionado^{67,68}. No existe experiencia con los nuevos inhibidores de la hepcidina^{2,64}, aunque han demostrado su posible aplicación en la anemia de tipo crónico⁶⁹.

Bibliografía

1. Annibale B, Capurso G, Chistolini A, D'Ambra G, DiGiulio E, Monarca B, DelleFave G. Gastrointestinal causes of refractory iron deficiency anemia in patients without gastrointestinal symptoms. *Am J Med* 2001;111(6):439-45.
2. Hershko C and Camaschella C. How I treat unexplained refractory iron deficiency anemia. *Blood* 2014;123:326-33.
3. Pérez Roldán F, Castellanos JJ, González Carro P, Villafañez MC, Roncero O, Legaz ML, et al. Efecto de la erradicación de *Helicobacter pylori* en la anemia ferropénica de origen incierto. *Gastroenterol Hepatol* 2008;31(4):213-6.
4. Hershko C, Hoffbrand AV, Keret D, Souroujon M, Maschler I, Monselise Y, Lahad A. Role of autoimmune gastritis, *Helicobacter pylori* and celiac disease in refractory or unexplained iron deficiency anemia. *Haematologica* 2005;90:585-95.
5. Goddard AF, James MW, McIntyre AS, Scott BB; British Society of Gastroenterology. Guidelines for the management of iron deficiency anaemia. *Gut* 2011;60:1309-16.

6. Fernández MC, Moreno G, Wright I, Murga MJ, Vaquero MP, Remacha AF. La clínica hematológica y no hematológica en la anemia ferropénica. Características y evaluación de la respuesta al tratamiento con hierro oral. IV Reunión Nacional de la SEHH. Sevilla. 2013. Pc-026 Pág. 102.
7. DeLoughery TG. Microcytic Anemia. *N Engl J Med* 2014;371:1324-31.
8. Suppressa P, Liso A, Sabba C. Low dose intravenous bevacizumab for the treatment of anaemia in hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Br J Haematol* 2010;152:365.
9. Wooderchak W, Gedge F, McDonald M, Krautscheid P, Wang X, Malkiewicz J, Bukjiok CJ, Lewis T, Bayrak-Toydemir P. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: two distinct ENG deletions in one family. *Clin Genet* 2010;78:484-9.
10. Marshall BJ. Unidentified curved bacillus on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983;8336:1273-5.
11. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984;8390:1311-5.
12. Yokoyama H, Fujii S. Structures and Metal-Binding Properties of Helicobacter pylori Neutrophil-Activating Protein with a Di-Nuclear Ferroxidase Center. *Biomolecules* 2014;4:600-615.
13. Hagymási K, Tulassay Z. Helicobacter pylori infection: New pathogenetic and clinical aspects. *World J Gastroenterol* 2014;20:6386-99.
14. Malnick SDH, Melzer E, Attali M, Duek G, Yahav J. Helicobacter pylori: Friend or foe? *World J Gastroenterol* 2014;20:8979-85.
15. Kaptan K, Beyan C, Ural AU, Cetin T, Avcu F, Gülen M, et al. Helicobacter pylori—is it a novel causative agent in Vitamin B12 deficiency? *Arch Intern Med* 2000;160:1349-53.
16. Pérez-Pérez G. Role of Helicobacter pylori Infection in the Development of Pernicious Anemia. *Clin Infect* 1997;25:1020-2.
17. Song IC, Lee HJ, Kim HJ, Bae SB, Lee KT, Yang YJ, et al. A multicenter retrospective analysis of the clinical features of pernicious anemia in a Korean population. *J Korean Med Sci* 2013;28:200-4.
18. Cárdenas VM, Mulla ZD, Ortiz M, Graham DY. Iron deficiency and Helicobacter pylori infection in the United States. *Am J Epidemiol* 2006;163:127-34.
19. Suerbaum S, Michetti P. Helicobacter pylori infection. *N Engl J Med* 2002;347:1175-86.
20. Akçam M. Helicobacter pylori and Micronutrients. *Indian Pediatrics* 2010;47:119-26.
21. Yucl O. Prevention of Helicobacter pylori infection in childhood. *World J Gastroenterol* 2014;20(30):10348-54.
22. Vannini A, Roncarati D, Spinsanti M, Scarlato V, Danielli A. In Depth Analysis of the Helicobacter pylori cag Pathogenicity Island Transcriptional Responses. *PLoS ONE* 2014;9:e98416.
23. Agriesti F, Roncarati D, Musiani F, Del Campo C, Iurlaro M, Sparla F, et al. FeON-FeOFF: the Helicobacter pylori Fur regulator commutates iron-responsive transcription by discriminative readout of opposed DNA grooves. *Nucleic Acids Res* 2014;42:3138-51.
24. Salama NR, Hartung ML, Müller A. Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen Helicobacter pylori. *Nat Rev Microbiol* 2013; 11:385-99.
25. Huang CH, Chiou SH. Clinical proteomics identifies potential biomarkers in Helicobacter pylori for gastrointestinal diseases. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 1529-1536
26. Yokoyama H, Fujii S. Structures and Metal-Binding Properties of Helicobacter pylori Neutrophil-Activating Protein with a Di-Nuclear Ferroxidase Center. *Biomolecules* 2014;4:600-615.
27. Pich OQ, Merrell DS. The ferric uptake regulator of Helicobacter pylori: a critical player in the battle for iron and colonization of the stomach. *Future Microbiol* 2013;8:725-38.
28. Troxell B, Hassan HM. Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Front Cell Infect Microbiol* 2013;3:59.
29. Yuan W, Li Yumin D, Yang L. Iron deficiency anemia in Helicobacter pylori infection: meta-analysis of randomized controlled trials. *Scand J Gastroenterol* 2010;45:665-76.
30. Qu XH, Huang XL, Xiong P, Zhu CY, Huang YL, Lu LG, et al. Does Helicobacter pylori infection play a role in iron deficiency anemia? A meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2010;16:886-96.
31. Campuzano-Maya G. Hematologic manifestations of Helicobacter pylori infection. *World J Gastroenterol* 2014;20(36):12818-38.
32. Bourke B, Ceponis P, Chiba N, Czinn S, Ferraro R, Fischbach L, et al; Canadian Helicobacter Study Group. Canadian Helicobacter Study Group Consensus Conference: Update on the approach to Helicobacter pylori infection in children and adolescents—an evidence-based evaluation. *Can J Gastroenterol* 2005;19:399-408.
33. World Gastroenterology Organisation. World Gastroenterology Organisation Global Guideline: Helicobacter pylori in developing countries. *J Clin Gastroenterol* 2011;45(5):383-8.
34. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Atherton J, Axon AT, Bazzoli F, et al; European Helicobacter Study Group. Management of Helicobacter pylori infection—the Maastricht IV/Florence Consensus Report. *Gut* 2012;61(5):646-64.
35. Qu XH, Huang XL, Xiong P, et al. Does Helicobacter pylori infection play a role in iron deficiency anemia? A meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2010;16:886e96.
36. Fock KM, Katelaris P, Sugano K, Ang TL, Hunt R, Talley NJ, et al; Second Asia-Pacific Conference. Second Asia-Pacific Consensus Guidelines for Helicobacter pylori infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24(10):1587-600.
37. Monzón H, Forné M, Esteve M, Rosinach M, Loras C, Espinós JC, et al. Helicobacter pylori infection as a cause of iron deficiency anaemia of unknown origin. *World J Gastroenterol* 2013;19(26):4166-71.
38. Noto JM, Gaddy JA, Lee JY, Piazuelo MB, Friedman DB, Colvin DC, et al. Iron deficiency accelerates Helicobacter pylori-induced carcinogenesis in rodents and humans. *J Clin Invest* 2013;123(1):479-92.
39. El-Omar EM. Iron deficiency and Helicobacter pylori-induced gastric cancer: too little, too bad. *J Clin Invest* 2013; 123(1):113-4.
40. Logan RP, Walker MM. ABC of the upper gastrointestinal tract: Epidemiology and diagnosis of Helicobacter pylori infection. *BMJ* 2001;323:920-2.
41. Gatta L, Vakil N, Vaira D, Scarpignato C. Global eradication rates for Helicobacter pylori infection: systematic review and meta-analysis of sequential therapy. *BMJ* 2013;347:f4587.
42. Hershko C, Ianculovich M, Souroujon M. Decreased treatment failure rates following duodenal release ferrous glycine sulfate in iron deficiency anemia associated with autoimmune gastritis and Helicobacter pylori gastritis. *Acta Haematol* 2007; 118:19-26.
43. Pisani A, Riccio E, Sabbatini M, Andreucci M, Del Río A, Visciano B. Effect of oral liposomal iron versus intravenous iron for treatment of iron deficiency anaemia in CKD patients: a randomized trial. *Nephrol Dial Transplant* 2015;30:645-52.
44. Xu Z, Liu S, Wang H, Gao G, Yu P, Chang Y. Encapsulation of iron in liposomes significantly improved the efficiency of iron supplementation in strenuously exercised rats. *Biol Trace Elem Res* 2014;162:181-8.
45. Fernández-Bañares F, Monzón H, Forné M. A short review of malabsorption and anemia. *World J Gastroenterol* 2009; 15:4644-52.

46. Fasano A. Celiac Disease—How to Handle a Clinical Chameleon. *N Engl J Med* 2003; 348:2568-70.
47. Fasano A, Catassi C. Clinical practice. Celiac disease. *N Engl J Med* 2012;367:2419-26.
48. Mooney PD, Hadjivassiliou M, Sanders DS. Coeliac disease. *BMJ* 2014;348:g1561.
49. Auerbach M, Goodnough LT, Shander A. Iron: the new advances in therapy. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2013;27(1):131-140
50. Bai JC, Fried M, Corazza GR, Schuppan D, Farthing M, Catassi C, et al; World Gastroenterology Organization. World Gastroenterology Organisation global guidelines on celiac disease. *J Clin Gastroenterol* 2013;47:121-6.
51. Rubio-Tapia A, Hill ID, Kelly CP, Calderwood AH, Murray JA; American College of Gastroenterology. ACG clinical guidelines: diagnosis and management of celiac disease. *Am J Gastroenterol* 2013;108:656-76.
52. Bini EJ. Helicobacter pylori and Iron Deficiency Anemia: Guilty as Charged? *Am J Med* 2001;111:495-7.
53. Jolobe O. Microcytic anaemia can 'mask' co-existing cobalamin deficiency. *QJM* 2009;102(5):362-3
54. Carmel R. How I treat cobalamin (vitamin B12) deficiency. *Blood* 2008;112:2214-21.
55. Remacha AF, Sardà MP, Canals C, Queraltó JM, Zapico E, Remacha J, et al. Combined cobalamin and iron deficiency anemia: a diagnostic approach using a model based on age and homocysteine assessment. *Ann Hematol* 2013;92:527-31.
56. Stetiu M, Savoye G, Lerebours E. Progression from iron deficiency anaemia to Cobalamin depletion in autoimmune atrophic gastritis: is it simply a question of time? *Dig Liver Dis* 2006;38:939-40.
57. Weinstein DA, Roy CN, Fleming MD, Loda MF, Wolfsdorf JJ, Andrews NC. Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implications for the anemia of chronic disease. *Blood* 2002;100:3776-81.
58. Doherty JG, Rüfer A, Bartholomew P, Beaumont DM. The presentation, treatment and outcome of renal cell carcinoma in old age. *Age Ageing* 1999;28:359-62.
59. Mufti GJ, Hamblin TJ, Stevens J. Basic isoferritin and hypercalcaemia in renal cell carcinoma. *J Clin Pathol* 1982;35:1008-10.
60. Kamai T, Tomosugi N, Abe H, Arai K, Yoshida KI. Increased serum hepcidin-25 level and increased tumor expression of hepcidin mRNA are associated with metastasis of renal cell carcinoma. *BMC Cancer* 2009;9:270.
61. Wang SJ, Chong G, Chen BA. Advancement of the study on iron metabolism and regulation in tumor cells. *Chin J Cancer* 2009;28:451-5.
62. Finberg KE, Heeney MM, Campagna DR, et al. Mutations in *TMPRSS6* cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Nat Genet* 2008;40:569-71.
63. Willemetz A, Lenoir A, Deschemin JC, López-Otin C, Ramsay AJ, Vaulont S, Nicolas G. Matriptase-2 is essential for hepcidin repression during fetal life and postnatal development in mice to maintain iron homeostasis. *Blood* 2014;124:441-4.
64. Donker AE, Raymakers RAP, Vlasveld LT, van Barneveld T, Terink R, Dors N, et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of microcytic anemias due to genetic disorders of iron metabolism or heme synthesis. *Blood* 2014;123:3873-86.
65. Lehmsberg K, Grosse R, Muckenthaler MU, et al. Administration of recombinant erythropoietin alone does not improve the phenotype in iron refractory iron deficiency anemia patients. *Ann Hematol* 2013;92:387-4.
66. Ramsay AJ, Quesada V, Sánchez M, et al. Matriptase-2 mutations in iron-refractory iron deficiency anemia patients provide new insights into protease activation mechanisms. *Hum Mol Genet* 2009;18:3673-83.
67. Nie N, Shi J, Shao Y, Li X, Ge M, Huang J, et al. A novel tri-allelic mutation of *TMPRSS6* in iron-refractory iron deficiency anaemia with response to glucocorticoid. *Br J Haematol* 2014;166:292-308.
68. Donker1AE, Brons PPT, Swinkels DW. Microcytic anaemia with low transferrin saturation, increased serum hepcidin and non-synonymous *TMPRSS6* variants: not always iron-refractory iron deficiency anaemia. *Br J Haematol* 2014. doi: 10.1111/bjh.13186.
69. De Falco L, Sánchez M, Silvestri L, Kannengiesser C, Muckenthaler MU, Iolascon A, et al. Iron refractory iron deficiency anemia. *Haematologica* 2013;98:845-53.

Mielodisplasia. Actualización en leucemia mielomonocítica crónica

COORDINADORES: **J. SÁNCHEZ GARCÍA.** *Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba*
M. DÍEZ CAMPELO. *Hospital Universitario de Salamanca, IBSAL IBMCC (USAL-CSIC). Salamanca*

La leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) es una entidad con características propias y exclusivas que precisa criterios diagnósticos, pronósticos y algoritmos terapéuticos diferenciados del resto de neoplasias mielodisplásicas o mieloproliferativas. Este simposio revisa de forma exhaustiva, gracias a la colaboración de expertos nacionales e internacionales, las características diferenciales de esta entidad con el objeto de profundizar en su conocimiento.

En primer lugar, el Dr. Itzykson revisará los mecanismos moleculares implicados en la patogenia de la LMMC analizando el papel de las mutaciones somáticas adquiridas en los genes reguladores epigenéticos y de la maquinaria de *splicing* para intentar esclarecer cómo se orquesta el modelo de desarrollo de la hematopoyesis clonal. Desde su amplia experiencia ante un microscopio óptico y un citómetro de flujo, las Dras. Florensa y Vidriales detallarán las características morfológicas e inmunofenotípicas de la maduración monocitaria y sus implicaciones en el correcto diagnóstico, no siempre fácil, de esta entidad. La Dra. Such revisará los principales sistemas pronósticos utilizados actualmente en la estratificación de esta entidad, analizando las variables más relevantes de cada uno de ellos, y el papel que los estudios moleculares tienen a día de hoy en estos sistemas pronósticos y en la práctica clínica habitual. La Dra. Xicoy finalizará el simposio haciendo una minuciosa revisión de cuándo y cómo tratar a estos pacientes abordando todas las estrategias de tratamiento disponibles en la actualidad.

Clonal architecture of chronic myelomonocytic leukemias

R. ITZYKSON

Service d'hématologie. Hôpital Saint-Louis, Université Paris Diderot. Paris, France

Chronic myelomonocytic leukemia (CMML) is a rare clonal disorder of the elderly with poor prognosis. CMML is defined by myelomonocytic hyperplasia contrasting with cytopenias. In addition to mutations in the Ras pathway, recurrent mutations in genes encoding epigenetic regulators (*TET2*, *ASXL1*) and splicing factors (*SRSF2*) have been reported in recent years.

We have described recurrent genetic abnormalities in a cohort of 312 CMML patients and their phenotypic consequences. Mutations in the *TET2*, *ASXL1* and *SRSF2* genes are the most frequent. A prognostic score including clinical and genetic variables has been established. It highlights the poor prognostic value of *ASXL1* mutations.

The architecture of the leukemic clone was studied by genotyping colonies of hematopoietic progenitors grown in liquid medium. CMML is characterized by

early clonal dominance during hematopoietic differentiation, at the CD34⁺/CD38⁻/CD90⁺ hematopoietic stem cell stage. In most cases, mutations are acquired sequentially in a single clone. The order of acquisition is stereotyped, with *TET2* (\pm *SRSF2*), or *ASXL1* mutations often preceding mutations in the Ras pathway. Complex clonal architectures can result from mitotic recombinations, generating minor subclones.

Early clonal dominance, notably of *TET2* mutations, may cause an expansion of common myeloid and multipotent progenitors and skew their differentiation towards granulomonocytic lineages, while aberrant response of myeloid progenitors to GM-CSF induced by mutation in the Ras pathway worsen myelomonocytic hyperplasia in 40% of patients. These studies lead to propose a model for CMML pathophysiology linking clonal architecture and phenotypic presentation.

Identificación del monocito patológico: citología óptica y citometría de flujo como métodos de cribado inicial para el diagnóstico. Debate integrado: citología óptica

L. FLORENSA, L. ARENILLAS, X. CALVO, A.M. FERRER

Laboratori de Citologia Hematològica. Servicio de Patología. Escola de Citologia Hematològica Soledad Woessner. GRETNHE. Hospital del Mar-IMIM. Barcelona

Introducción

La leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) es una hemopatía clonal con rasgos de neoplasia mieloproliferativa y de síndrome mielodisplásico. Se caracteriza por una monocitosis persistente de más de $1,0 \times 10^9/L$, menos del 20% de blastos en médula ósea y sangre periférica (incluyendo en el término de blastos los mieloblastos, monoblastos y promonocitos), ausencia de cromosoma Ph y del gen de fusión *BCR/ ABL*, y presencia de displasia en una o más de las series mieloides. Cuando la displasia no es suficiente, el diagnóstico de LMMC se puede establecer si se demuestra la presencia de una anomalía citogenética o molecular clonal, o una monocitosis persistente al menos 3 meses con exclusión de todas las causas de monocitosis secundarias (neoplasia, infección o inflamación).

Según el número de blastos y promonocitos en médula ósea y sangre periférica se reconocen dos tipos de LMMC con distinto valor pronóstico, la LMMC-1 y la LMMC-2^{1,2}.

La identificación morfológica de los elementos de la serie monocítica en sangre periférica y médula ósea, junto a los datos citogenéticos, es imprescindible para el diagnóstico y la clasificación de la LMMC, ya que no se dispone de ningún marcador biológico que defina esta enfermedad. La correcta valoración morfológica de la población neoplásica requiere de un conocimiento previo de las características morfológicas de la granulopoyesis y la monopoyesis normal.

Las células monocíticas son células del sistema mononuclear fagocítico cuyo origen mielóide está bien establecido. La forma más joven de esta línea es el monoblasto, célula de identificación morfológica incierta. Le sigue el promonocito, de reconocimiento morfológico inequívoco; el promonocito se transforma en monocito que circula durante unos días por sangre periférica y finalmente se establece en los tejidos en forma de histiocito o macrófago³⁻⁵ (Figura 1). Los monoblastos son difícilmente identificables en la médula ósea de los sujetos normales; no obstante, gracias a estudios cito-

químicos y al aspecto morfológico óptico y ultraestructural observado en las leucemias agudas monoblásticas, se los considera diferenciables de los mieloblastos. El tamaño de los monoblastos es superior al de los mieloblastos, de 15 μm a 25 μm ; son células redondeadas con un gran núcleo, también redondeado, provisto de una cromatina muy laxa con numerosos nucleolos (generalmente más de 3). Su citoplasma, más abundante que el del mieloblasto, es intensamente basófilo y adquiere una tonalidad azul plomizo con las tinciones panópticas habituales. El dato más fidedigno para la filiación del monoblasto es la existencia de una intensa positividad esterasa inespecífica, de distribución difusa, fluoruro-sensible. Los promonocitos, claramente identificables en la médula ósea pese a su escaso número, poseen un tamaño algo superior y una elevada relación nucleocitoplasmática. El núcleo, de aspecto morfológico irregular, con pliegues y hendiduras, posee una cromatina algo más condensada que la de su precursor, a pesar de lo cual son visibles uno o dos nucleolos. El citoplasma es basófilo por su riqueza en polirribosomas; puede contener un número variable, aunque generalmente escaso, de gránulos azurófilos, lo que hace a veces difícil su diferenciación de los promielocitos (Figura 1, A y B). Citoquímicamente los promonocitos contienen fosfatasa ácida y esterasa inespecífica fluorurosensible (naftol-As-D-acetato-esterasa, α -naftil-butirato-esterasa) y peroxidasa. El monocito tiene un tamaño que oscila entre 15 y 30 μm de diámetro, con una forma irregular, cuadrangular u oval. El núcleo, situado en posición central, es voluminoso y adopta formas abigarradas en herradura, con hendiduras o doblado; la cromatina es densa y con aspecto peinado en finas franjas cromatínicas y está desprovisto de nucleolos visibles. El citoplasma es amplio, con ocasionales mamelones periféricos de color azul plomizo, y contiene un número variable de gránulos azurófilos finos y (Figura 1 C-F), en ocasiones, finas vacuolas (Figura 1F). Se han descrito diferencias entre los monocitos normales y los monocitos observados en sangre después de su estimulación. Mientras los monocitos normales o maduros son células con núcleo

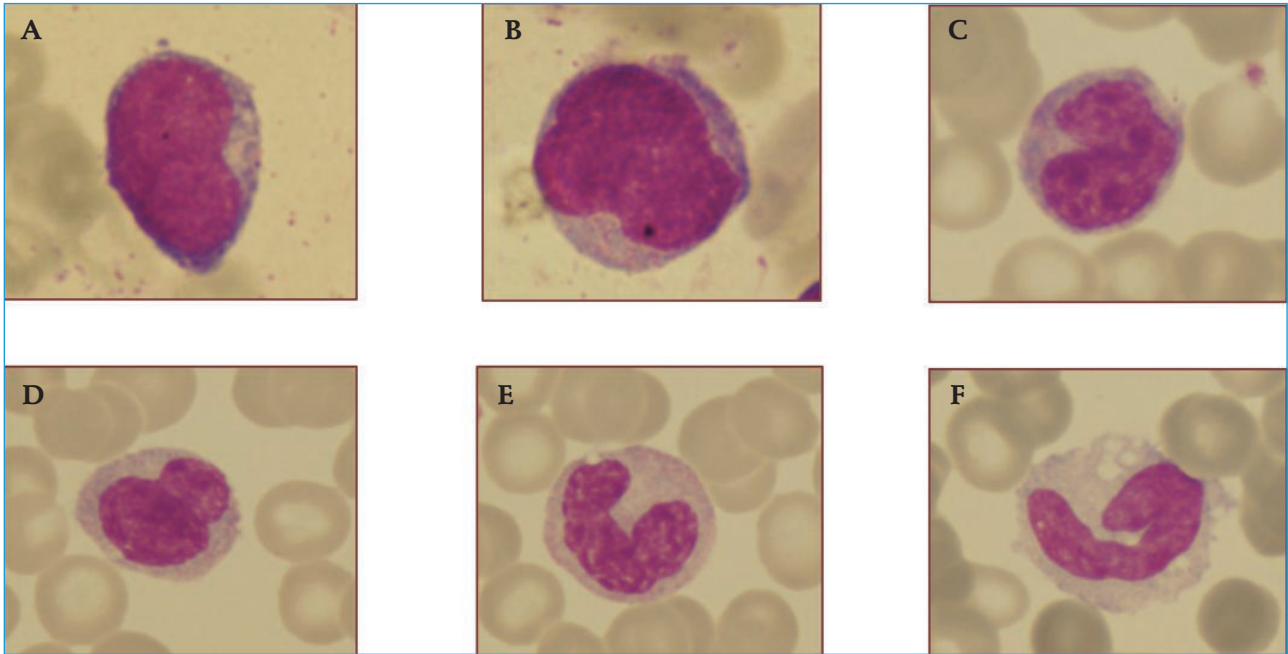


Figura 1. Serie monocítica: A. Monoblasto. B. Promonocito. C. Monocito en médula ósea. D-F. Monocitos maduros en sangre periférica (May-Grünwald-Giemsa).

lobulado/hendido que no muestran nucleolo visible, los monocitos estimulados son células también de núcleo plegado/hendido que ocasionalmente puede presentar un pequeño nucleolo visible. Estudios ultraestructurales han permitido observar en los monocitos dos tipos de granulación: la primaria, peroxidasa positiva, que aparece en estadios evolutivos iniciales, y la secundaria, peroxidasa negativa, típica de los monocitos maduros. Este segundo tipo de granulación no tiene nada que ver con la granulación secundaria de la granulopoyesis. Citoquímicamente, los monocitos, como los monoblastos y promonocitos, se caracterizan por su riqueza en esterasas inespecíficas (naftol-As-D-acetato-esterasa, α -naftil-acetato-esterasa ácida y butirato-esterasa), que se inhiben casi totalmente con el fluoruro sódico (Figura 2). Asimismo, tienen actividad peroxidásica débil. A diferencia de la granulopoyesis neutrófila, los monocitos son negativos a la naftol-As-D-cloro-acetato-esterasa y tampoco contienen fosfatasa alcalina.

Junto a la morfología y citoquímica, los monocitos se identifican por citometría de flujo en función de sus propiedades de dispersión de luz y de marcadores de la superficie celular, como CD14 y CD16. Desde el punto de vista inmunofenotípico se reconocen tres subtipos de monocitos: a) el monocito clásico CD14⁺⁺/CD16⁻; b) el monocito no clásico CD14⁺/CD16⁺⁺ que se expande en enfermedades inflamatorias; y c) el monocito intermedio CD14⁺⁺, CD16⁺⁺, que está poco representado en sangre periférica normal y que se expande en enfermedades inflamatorias y con el tratamiento con

citocinas. Los monocitos clásicos y los no clásicos comparten características morfológicas y citoquímicas^{6,7}.

Monocito patológico

En la LMMC los monocitos de la sangre generalmente son maduros y de morfología muy semejante al monocito normal, o pueden mostrar núcleo de configuración bizarra o basofilia citoplasmática aumentada, siendo difícil diferenciarlos del monocito reactivo o estimu-

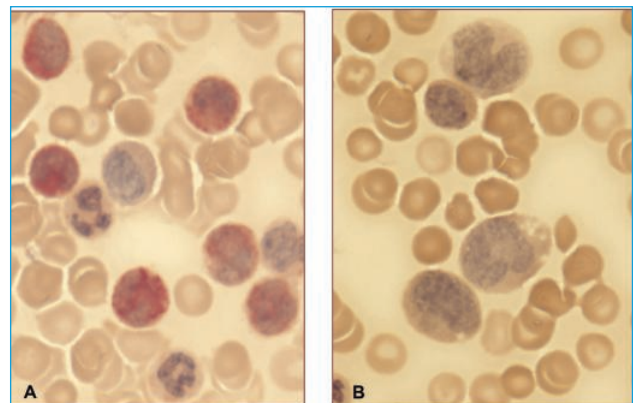


Figura 2. Sangre periférica de un paciente con leucemia mielomonocítica crónica: A. Reacción difusa de la alfa-naftil-butilato-esterasa en los monocitos. B. Inhibición de la reacción de la alfa-naftil-butilato-esterasa de los monocitos con la incubación con fluoruro sódico.

lado. Es frecuente observar monocitos inmaduros o monocitos atípicos de características semejantes a los monocitos estimulados, en raras ocasiones con nucleolo visible^{8,9} (Figura 3, A y B). Es importante saber reconocer estos monocitos atípicos o inmaduros para poderlos diferenciar de los promonocitos y monoblastos, ambos considerados como blastos en el contexto de la LMMC, por sus implicaciones diagnósticas y pronósticas. En ocasiones los monocitos se acompañan de elementos neutrófilos con claros signos de disgranulopoyesis, como hiposegmentación y desgranulación (Figura 3C).

En estos casos el componente monocítico se debe confirmar mediante la reacción de las esterasas inespecíficas, que es positiva en los monocitos y se inhibe con fluoruro sódico, si bien conviene recordar que los monocitos neoplásicos pueden presentar como rasgo aberrante la pérdida de alguna esterasa inespecífica o presentar actividad de cloro-acetato-esterasa.

La citometría de flujo puede ser una herramienta útil en la identificación de los monocitos patológicos. En estudios recientes se han descrito perfiles inmunofenotípicos de los monocitos que permiten realizar el diagnóstico diferencial entre la LMMC y otros tipos de monocitosis¹⁰. En la siguiente ponencia se discutirá el papel de la citometría de flujo en el estudio de la LMMC.

Se acepta que una monocitosis absoluta es un criterio seguro de LMMC. Sin embargo, en los pacientes que presentan cifras de leucocitos elevadas la utilización del porcentaje de monocitos puede ser más seguro que las cifras absolutas. Por este motivo se postula que en la próxima propuesta de la clasificación de la LMMC el porcentaje de monocitos se considere como un criterio diagnóstico adicional, especialmente cuando los recuentos de leucocitos sean muy elevados¹¹. Cabe recordar la existencia de síndromes mielodisplásicos que cursan con > 10% de

monocitos en sangre periférica sin alcanzar cifras absolutas de más de $1,0 \times 10^9/L$, y que obligan a realizar un seguimiento más estrecho de su evolución por tratarse, en algunos casos, de fases muy iniciales de una LMMC¹².

El diagnóstico de la LMMC se realiza tomando en consideración los datos de sangre periférica y médula ósea. Es importante la correcta filiación morfológica de la población monocítica en todas sus fases madurativas que se consigue, en la gran mayoría de los casos, con la ayuda de la citoquímica. Es fundamental realizar la valoración de la morfología de la serie monocítica teniendo en cuenta la morfología del resto de las líneas mieloides y es imprescindible integrarla con el resto de datos clínicos y parámetros biológicos del paciente^{1,13}.

Bibliografía

- Orazi A, Bennett JM, Germing U, Brunning RD, Bain BJ, Thiele J. Chronic myelomonocytic leukaemia. En: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al., editores. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC; 2008. pp. 76-9.
- Such E, Germing U, Malcovati L, Cervera J, Kuendgen A, Della Porta MG et al. Development and validation of a prognostic scoring system for patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 2013;121:3005-15.
- Bessis M Cellules du sang normal et pathologique. París: Masson et C; 1972. pp. 596.
- Woessner S, Florensa L. La citología óptica en el diagnóstico hematológico. Acción Médica. Madrid: FEHH; 2006.
- Nichols BA, Bainton DF, Farquhar MG. Differentiation of monocytes. Origin, nature, and fate of their azurophil granules. *J Cell Biol* 1971;50:498-15.
- Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 2010;116:e74-80.
- Almeida J, Bueno C, Alguero MC, Luz Sánchez M, de Santiago M, Escribano L, et al. Comparative analysis of the morphological, cytochemical, immunophenotypical and functional characteristics of normal human peripheral blood lineage. *Clinical Immunol* 2001;100:325-38.
- Goasguen JE, Bennett JM, Bain BJ, Vallespi T, Brunning R, Mufti GJ. Morphological evaluation of monocytes and their precursors. *Haematologica* 2009;94:994-7.
- Kerrigan DP, Castillo A, Foucar K, Townsend K, Neidhart J. Peripheral blood morphologic changes after high-dose anti-neoplastic chemotherapy and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor administration. *Am J Clin Pathol* 1989;92(3):280-5. See comment in PubMed Commons below
- Selimoglu-Buet D, Wagner-Ballon O, Saada V, Bardet V, Itzykson R, Bencheikh L, et al; Groupe Francophone des Myélodysplasies. Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 2015;125:3618-26.
- Valent P, Orazi A, Guntram B, Schmitt-Graff, George TI, Sotlar K, et al. Standards and impact of hematopathology in myelodysplastic syndromes (MDS). *Oncotarget* 2010;1:483-96.
- Hall J, Foucar K. Diagnosing myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms: laboratory testing strategies to exclude other disorders. *Int J Lab Hematol.* 2010;32:559-71.
- Rigolin GM1, Cuneo A, Roberti MG, Bardi A, Castoldi G. Myelodysplastic syndromes with monocytic component: hematologic and cytogenetic characterization. *Haematologica* 1997;82(1):25-30.

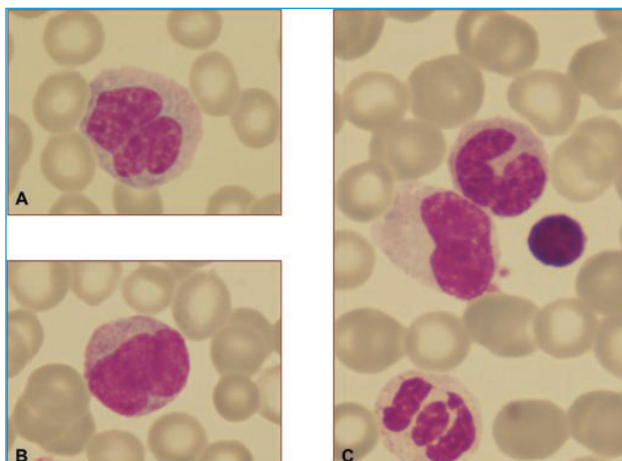


Figura 3. Sangre periférica de un paciente con leucemia mielomonocítica crónica: A y B. Monocitos. C. Se observan un monocito, un neutrófilo inmaduro desgranulado, un neutrófilo polisegmentado y un linfocito (May-Grünwald-Giemsa).

Identificación del monocito patológico: citología óptica y citometría de flujo como métodos de cribado inicial para el diagnóstico. Debate integrado: citometría de flujo

M.T. HA¹, M. DÍEZ CAMPELO^{1,2}, A. MARTÍN^{1,2}, N. PUIG^{1,2}, J.J. PÉREZ¹, A.Á. MARTÍN LÓPEZ¹, J. DÁVILA¹, S. ALONSO¹, I. AIRES³, C. DEL CAÑIZO^{1,2,3}, M.B. VIDRIALES^{1,2}

¹Servicio de Hematología. Hospital Universitario de Salamanca. Salamanca. ²Instituto Biosanitario de Salamanca (IBSAL). Salamanca. ³Centro de Investigación del Cáncer. Salamanca

Introducción

La leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) es una enfermedad clonal, heterogénea clínica y biológicamente, que presenta características propias de los síndromes mielodisplásicos (SMD) y de las neoplasias mieloproliferativas (NMP), por lo que su clasificación sigue planteando problemas. Inicialmente considerada dentro de los SMD por la clasificación FAB, la clasificación OMS la encuadra dentro del grupo denominado “neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas”¹. Además, diferencia dos tipos (LMMC-1 y LMMC-2) en función de los blastos en SP y en MO (< 5% o ≥ 5%, y < 10% y ≥ 10%, respectivamente). En la clasificación OMS de 2008 aparece una entidad independiente que corresponde a los pacientes con reordenamientos de genes de factores de crecimiento y que se denomina “neoplasias mieloides/linfoides con eosinofilia asociadas a reordenamientos en los genes PD-GFRA, PDGFRB y FGFR1”.

En la actualidad, para el diagnóstico de LMMC según la OMS, se exigen la presencia de monocitosis (> 1 × 10⁹/L), un porcentaje de blastos y promonocitos < 20% en SP y MO, presencia de displasia en una o más líneas mieloides y ausencia de cromosoma Filadelfia/reordenamiento BCR-ABL, y de reordenamiento de los genes PDGFRA y PDGFRB. Si no se identifica displasia se exige que la monocitosis sea persistente durante más de 3 meses, sin otras causas que la justifiquen, o la presencia de una alteración clonal citogenética y/o molecular.

Con frecuencia puede haber problemas diagnósticos, ya que por el momento no se dispone de un marcador biológico inequívoco de la enfermedad, las alteraciones cromosómicas aparecen en torno a un tercio de los casos^{2,3} y las mutaciones genéticas, aunque más frecuentes, son heterogéneas e inespecíficas (TET-2, ASXL1, CBL, IDH, NRAS, KRAS, RUNX1, UTX, EZH2, DNMT3, JAK2, etc.)^{4,5}. Hay distintas entidades con las que puede ser necesario hacer un diagnóstico diferencial, como la LMC (basado en la citogenética/biología molecular), la LMC atípica (en el que puede

ser especialmente difícil) o las monocitosis reactivas. Se puede detectar monocitosis en distintas situaciones, como infecciones crónicas, infecciones víricas, parasitosis, enfermedades autoinmunes, recuperación de neutropenia o neoplasias, y en estas situaciones puede ser difícil el diagnóstico diferencial, especialmente con la LMMC-1.

El estudio inmunofenotípico mediante citometría de flujo (CMF) puede contribuir al diagnóstico, porque es frecuente detectar aberraciones fenotípicas tanto en monocitos como en otras células hematopoyéticas⁷⁻¹³, aunque estos estudios no se han incorporado a la rutina en el diagnóstico clínico. Además, la CMF puede ser especialmente útil en los casos de LMMC en los que la displasia está ausente o los rasgos displásicos son mínimos y no se encuentran alteraciones genéticas o moleculares. En estos casos, con monocitosis persistente sin causa, la detección de aberraciones fenotípicas puede ayudar al diagnóstico al identificar rasgos más compatibles con proceso clonal que con monocitosis reactiva.

Revisaremos aquí el papel de la CMF multiparamétrica en la identificación del monocito patológico y su posible papel como método de cribado inicial en el diagnóstico de la LMMC.

Citometría de flujo en el diagnóstico de IMMC

La citometría de flujo es una herramienta cada vez más empleada en los laboratorios clínicos y en los últimos años numerosos trabajos han demostrado que puede tener un papel en el diagnóstico y la evaluación pronóstica de los SMD^{14,15}. Así, el European Leukemia Net Working Group (ELNet) ha publicado recientemente unas recomendaciones para la estandarización del análisis por CMF de los SMD¹⁶ y existe una propuesta para incorporar esta información en la próxima clasificación de la WHO de los SMD¹⁷. Sin embargo, en el caso de la LMMC la información disponible es menor, con pocos estudios o con trabajos que incluyen un escaso número de casos de LMMC⁶⁻¹⁰.

Mediante CMF se pueden identificar los monocitos en función de la expresión intensa de CD45, un SSC intermedio, y la expresión de marcadores monocitarios como CD64, CD33++, CD36 o CD14. Es mejor no emplear antígenos que aparecen tardíamente en la diferenciación monocitaria, como el CD14, porque pueden no identificarse las formas inmaduras. Es preferible emplear antígenos como el CD64, o el CD33++, que son intensos y aparecen precozmente, y también hay que poner especial cuidado en no incluir en el análisis poblaciones de granulocitos¹⁶. Además, se ha observado¹⁸ que la CMF identifica los monocitos mejor que la morfología o la citoquímica.

Las alteraciones más frecuentemente encontradas en los SMD en la línea monocitaria son la expresión anormal de CD45, CD14, CD13, CD33, CD36, HLA-DR, CD34, CD38, CD11b, HLA-DR, la expresión de antígenos asociados a línea linfóide (CD2, CD5, CD7, CD19) y sobreexpresión de CD56^{11,14,16}. Así, en las recomendaciones del ELNet¹⁶ para la estandarización del estudio de CMF en los SMD, en lo que se refiere a los monocitos se recomienda analizar, además del porcentaje de células monocitarias, la distribución de los diferentes estadios madurativos (valorando desviación hacia la inmadurez), la presencia de un patrón de expresión alterado de HLA-DR y CD11b, de CD36 y CD14, y de CD13 y CD33, y la expresión de CD56 en los monocitos (infidelidad de línea).

En el caso concreto de la LMMC, aunque los monocitos presentan un fenotipo parecido a los monocitos normales, que son fenotípicamente heterogéneos¹⁹, diferentes trabajos han demostrado que presentan aberraciones fenotípicas⁷⁻¹³ incluso con más frecuencia que los SMD¹². Se han descrito numerosas alteraciones como la expresión de CD56 y/o CD2, infraexpresión o sobreexpresión de HLA-DR, patrón anómalo de antígenos como CD14 o CD16, o la expresión de CD62L o CD115^{6,8-10,12,13}.

Aunque las aberraciones fenotípicas de los monocitos no son específicas de la LMMC, ni tampoco se corresponden exactamente con la morfología de monocitos inmaduros, consideradas en su totalidad sí que podrían emplearse para discriminar entre monocitosis neoplásicas y reactivas. En un reciente trabajo¹², con un elevado número de casos (n = 118), se ha comunicado que en el 96% de las LMMC se pueden encontrar aberraciones fenotípicas en los monocitos y también son frecuentes en otros compartimentos celulares de la MO (células mieloides CD34+, granulocitos). El número de aberraciones detectadas es especialmente elevado en las células CD34+ mieloides, con una media de 6 aberraciones, entre las que se encuentran expresión de antígenos asociados a línea linfóide (CD2, CD5, CD7, CD19, CD56), infraexpresión de CD38 o asincronismos madurativos que implican a CD64 y CD15¹².

También es frecuente observar, al igual que en SMD, una marcada disminución de los progenitores linfoides CD34+CD19+^{20,21}, mientras que en otras NMP este tipo celular suele estar más conservado⁷. Es interesante señalar que la proporción de células CD34+ con expresión de antígenos asociados a línea monocitaria (CD64, CD15, CD11b) no es mayor en la LMMC que en los SMD, lo que indicaría que en el compartimento de células CD34+ no existe una mayoría comprometida a línea monocitaria^{7,12}. Estos hallazgos permitirían afirmar que inmunofenotipo de la LMMC es más cercano a los SMD que a las NMP^{6,7,9,12}.

Sin embargo, hay que tener presente que muchas de las alteraciones fenotípicas descritas en la LMMC también se pueden encontrar en otras situaciones. Cabe señalar especialmente la expresión de CD56 en monocitos, que se ha descrito incluso en la SP individuos normales²² y es frecuente encontrarlo a la salida de la aplasia postquimioterapia o postrasplante, o en condiciones de activación o respuesta inflamatoria^{9,23}. Aunque en el trabajo de Shen et al.¹² sugieren que la expresión de CD56 en situaciones reactivas es siempre inferior al 25% en la población monocitaria, Muroi²³ ha comunicado que puede estar presente en más del 70% de los granulocitos tras trasplante alogénico. Además, no todas las aberraciones detectadas en LMMC son igualmente válidas para la identificación de células neoplásicas, ya que se ha comunicado que patrones expresión anómalos de CD13, CD117, HLA-DR, CD34, CD33, y CD38 también se pueden observar en células inmaduras de pacientes sin neoplasias hematológicas²⁴. Por tanto, para sospechar clonalidad en función de los hallazgos inmunofenotípicos, la recomendación es que se detecten al menos 2 aberraciones.

Una aproximación de análisis diferente es la que se basa en los tipos de monocitos presentes en SP. Actualmente se acepta que en SP se pueden definir 3 tipos de monocitos^{25,26} en función de la expresión de CD14 y CD16: monocitos "clásicos" (CD14+ CD16-), monocitos "intermedios" (CD14+ CD16+) y monocitos "no clásicos" (CD14low CD16+), que tienen diferentes funciones²⁶ y diferente perfil genético²⁷. En condiciones normales, los monocitos "clásicos" son la población predominante (en torno al 85%) en el compartimento de células monocitarias de SP²⁵. Aunque ya existían datos preliminares, Selimoglu-Buet et al.¹³ han comunicado recientemente que la distribución de los distintos tipos de monocitos (clásicos, intermedios y no clásicos) en la SP podría ser empleada en el diagnóstico de la LMMC. En su trabajo muestran que los pacientes con LMMC presentan, dentro del compartimento de monocitos de SP, una gran mayoría de monocitos clásicos (> 94%) y que este marcador puede ser empleado con elevada sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de las LMMC, ya que los individuos sanos y los pacientes con

monocitosis reactivas no presentan una proporción tan elevada de este subtipo de monocitos. Esta aproximación tiene la ventaja de ser más simple que el estudio de aberraciones fenotípicas, que exige la realización de paneles más amplios y una mayor experiencia en el análisis fenotípico. En este trabajo los autores encuentran que esta alteración está presente independientemente del estado mutacional y que se corrige tras el tratamiento con agentes hipometilantes. Esto puede considerarse en concordancia con los resultados de Shen et al.¹², que han comunicado que aunque el tratamiento con hipometilantes puede reducir significativamente el número de monocitos, promonocitos y blastos las aberraciones fenotípicas, especialmente las que afectan a las células CD34+ mieloides, no se corrigen.

Un asunto de especial relevancia es el hecho de que para que estos resultados se puedan aplicar en un laboratorio clínico asistencial sería necesario definir claramente cuáles son las aberraciones más útiles y simplificar los criterios para definir estas aberraciones, ya que en ocasiones en la literatura científica las definiciones de las aberraciones no están bien detalladas o son subjetivas y complejas para emplearlas en el diagnóstico asistencial. Estos factores determinan que en ocasiones sea difícil comparar resultados de diferentes estudios y aplicar estos resultados a la práctica clínica. En este sentido, una aproximación analítica más automática y el diseño de paneles de estudio más cortos, e idealmente disponibles comercialmente ya combinados, podría facilitar el análisis inmunofenotípico tanto en la LMMC como en otras enfermedades.

Conclusión

Podemos concluir, por tanto, que en la LMMC se pueden detectar alteraciones fenotípicas en células inmaduras CD34+, en monocitos y en serie mieloides, detectables incluso con mayor frecuencia y de forma más homogénea que en los SMD. Además, la distribución de las subpoblaciones de monocitos definidas en función de CD14 y CD16 también puede contribuir al diagnóstico de la LMMC. La CMF puede ser especialmente útil en casos de difícil diagnóstico, cuando no se detectan rasgos displásicos ni alteraciones genéticas o moleculares. En estos casos, la detección de aberraciones fenotípicas puede ayudar al diagnóstico al identificar rasgos más compatibles con proceso clonal que con monocitosis reactiva.

Bibliografía

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press; 2008.
2. Such E, Cervera J, Costa D, et al. Cytogenetic risk stratification in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica* 2011; 96(3):375-83.
3. Tang G, Zhang L, Fu B, et al. Cytogenetic risk stratification of 417 patients with chronic myelomonocytic leukemia from a single institution. *Am J Hematol* 2014;89(8):813-8.
4. Kohlmann A, Grossmann V, Klein HU, et al. Next-generation sequencing technology reveals a characteristic pattern of molecular mutations in 72.8% of chronic myelomonocytic leukemia by detecting frequent alterations in TET2, CBL, RAS, and RUNX1. *J Clin Oncol* 2010;28(24):3858-65.
5. Jankowska AM, Makishima H, Tiu RV, et al. Mutational spectrum analysis of chronic myelomonocytic leukemia includes genes associated with epigenetic regulation: UTX, EZH2, and DNMT3A. *Blood* 2011;118(14):3932-41.
6. Lacroix-Gazaille C, Chaury MP, Le Guyader A, et al. A simple method for detection of major phenotypic abnormalities in myelodysplastic syndromes: expression of CD56 in CMML. *Haematologica* 2007; 92(6):859-60.
7. Subira D, Font P, Villalón L, et al. Immunophenotype in chronic myelomonocytic leukemia: is it closer to myelodysplastic syndromes or to myeloproliferative disorders? *Transl Res* 2008;151(5):240-5.
8. Gorczyca W. Flow cytometry immunophenotypic characteristics of monocytic population in acute monocytic leukemia (AML-M5), acute myelomonocytic leukemia (AML-M4), and chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Methods Cell Biol* 2004;75:665-77.
9. Xu Y, McKenna RW, Karandikar NJ, et al. Flow cytometric analysis of monocytes as a tool for distinguishing chronic myelomonocytic leukemia from reactive monocytosis. *Am J Clin Pathol* 2005;124(5):799-806.
10. Kern W, Bacher U, Haferlach C, et al. Acute monoblastic/monocytic leukemia and chronic myelomonocytic leukemia share common immunophenotypic features but differ in the extent of aberrantly expressed antigens and amount of granulocytic cells. *Leuk Lymphoma* 2011;52(1):92-100.
11. Sojitra P, Gandhi P, Fitting P, et al. Chronic Myelomonocytic Leukemia Monocytes Uniformly Display a Population of Monocytes With CD11c Underexpression. *Am J Clin Pathol* 2013;140:686-92.
12. Shen Q, Ouyang J, Tang G, et al. Flow Cytometry Immunophenotypic Findings in Chronic Myelomonocytic Leukemia and Its Utility in Monitoring Treatment Response. *Eur J Haematol* 2015;95(2):168-76.
13. Selimoglu-Buet D, Wagner-Ballon O, Saada V, et al. Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 2015;125(23):3618-26.
14. van de Loosdrecht AA, Westers TM, Westra AH, et al. Identification of distinct prognostic subgroups in low- and intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes by flow cytometry. *Blood* 2008;111(3):1067-77.
15. Kern W, Haferlach C, Schnittger S, Alpermann T, et al. Serial assessment of suspected myelodysplastic syndromes: significance of flow cytometric findings validated by cytomorphology, cytogenetics, and molecular genetics. *Haematologica* 2013;98(2):201-7.
16. Westers TM, Ireland R, Kern W, et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: a report from an international consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leukemia* 2012;26(7):1730-41.
17. Porwit A, van de Loosdrecht AA, Bettelheim P, et al. Revisiting guidelines for integration of flow cytometry results in the WHO classification of myelodysplastic syndromes-proposal from the International/European Leukemia-Net Working Group for Flow Cytometry in MDS. *Leukemia* 2014;28(9):1793-8.

18. Dunphy CH. Comparative analysis of detecting monocytic cells and their aberrancy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2011;19(4):336-40.
19. Hudig D, Hunter KW, Diamond WJ, et al. Properties of Human Blood Monocytes. II. Monocytes from Healthy Adults are Highly Heterogeneous Within and Among Individuals. *Clinical Cytometry* 2014;86:121-34.
20. Tang G, Jorgensen LJ, Zhou Y, et al. Multicolor CD34(+) progenitor-focused flow cytometric assay in evaluation of myelodysplastic syndromes in patients with post cancer therapy cytopenia. *Leuk Res* 2012;36(8):974-81.
21. Maftoun-Banankhah S, Maleki A, Karandikar NJ, et al. Multiparameter flow cytometric analysis reveals low percentage of bone marrow hematogones in myelodysplastic syndromes. *Am J Clin Pathol* 2008;129(2):300-8.
22. Sconocchia G, Keyvanfar K, El Ouriaghli F, et al. Phenotype and function of a CD56+ peripheral blood monocyte. *Leukemia* 2005;19(1):69-76.
23. Muroi K, Fujiwara S, Tatara R, et al. CD56 expression in normal immature granulocytes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Exp Hematop* 2013;53(3):247-50.
24. Harrington A, Olteanu H, Kroft S. The Specificity of Immunophenotypic Alterations in Blasts in Nonacute Myeloid Disorders. *Am J Clin Pathol* 2010;134:749-61.
25. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 2010; 116(16):e74-80.
26. Yona S, Jung S. Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Curr Opin Hematol* 2010;17(1):53-9.
27. Wong KL, Tai JJ-Y, Wong W-C, et al. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* 2011;118(5):e16-31.

Estratificación del pronóstico en la LMMC. ¿Cómo lo hacemos?

E. SUCH, J. CERVERA, G. SANZ

Laboratorio de Citogenética y Biología Molecular Oncohematológica. Servicio de Hematología. Hospital Universitario La Fe. Valencia

Introducción

La observación de un curso clínico variable en la leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) ha sido un estímulo para la investigación de factores pronóstico en esta peculiar variedad de síndrome mielodisplásico (SMD), hoy considerada un grupo de enfermedades fronterizas entre los SMD y las neoplasias mieloproliferativas (NMP). Aunque este asunto ha sido objeto de diversas aportaciones en la literatura, en estos últimos años ha tenido una gran repercusión la inclusión de nuevos marcadores citogenéticos y moleculares al estudio de los factores pronósticos de la LMMC y su valor relativo con respecto a otras variables relacionadas con el paciente y con su enfermedad.

La LMMC tiene una gran variabilidad clínica, desde pacientes asintomáticos hasta pacientes con clínica avanzada y necesidad de tratamiento. La mediana de supervivencia se sitúa en torno a los 20 meses, con una frecuencia de transformación a leucemia aguda del 15% a los 2 años¹. Estudios preliminares como los llevados a cabo por el grupo de Düsseldorf² o el MD Anderson³ demostraron que la cifra medular de blastos, la hemoglobina, los leucocitos, los linfocitos, los neutrófilos y la lactato deshidrogenasa eran factores pronóstico con influencia determinante en la evolución de la enfermedad. Con estas variables se desarrollaron diferentes índices de estratificación del pronóstico específicos para LMMC que eran capaces de predecir la supervivencia pero no el riesgo de transformación leucémica. Sin embargo, y a pesar de no ser un índice pronóstico específico de la LMMC, se convirtió en práctica clínica habitual el empleo del Índice Pronóstico Internacional (IPSS), desarrollado para los SMD y que excluye a los pacientes con leucocitos $> 12 \times 10^9/L^4$.

En los últimos años, gracias fundamentalmente a los progresos producidos por el empleo de técnicas de análisis molecular masivo, se han producido avances notables en la caracterización de diversas alteraciones moleculares que parecen jugar un papel clave en la leucemogénesis. Asimismo, su potencial impacto pronóstico y terapéutico continúa siendo objeto de estudio. En este artículo

se revisarán los principales aspectos del conocimiento actual de las alteraciones citogenéticas y moleculares de la LMMC y su influencia en la estimación del pronóstico.

Alteraciones citogenéticas

Recientemente los modelos pronósticos de LMMC se han intentado mejorar definiendo grupos de riesgo según las alteraciones citogenéticas y moleculares. Aunque varios modelos anteriores no pudieron demostrar una asociación con el pronóstico de las anomalías citogenéticas, el Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos (GESMD) mostró, en una serie de 414 pacientes, una estratificación en 3 grupos de riesgo que mantenía su valor pronóstico con respecto a otras variables relacionadas con el paciente y la enfermedad. Podían distinguirse 3 categorías de riesgo citogenético: un grupo de bajo riesgo (cariotipo normal y pérdida del cromosoma Y), un grupo de alto riesgo (trisomía 8, anomalías del cromosoma 7 y cariotipo complejo) y un grupo de riesgo intermedio (donde se incluyeron el resto de alteraciones simples o dobles)⁵. De este modo se confirmó la fuerte asociación entre la presencia de determinadas anomalías citogenéticas con una menor supervivencia (35% en el bajo riesgo, 26% en el intermedio y 4% en el alto riesgo a los 5 años, $P < 0,001$) y un mayor riesgo de evolución a LMA (12% en el bajo riesgo, 29% en el intermedio y 46% en el alto riesgo a los 2 años, $P < 0,001$). Posteriormente, esta clasificación constituyó la base para el desarrollo de un nuevo índice pronóstico para LMMC, el *CMML-Prognostic Scoring System* (CPSS)⁶, capaz de predecir tanto la supervivencia global como el riesgo de transformación a LMA. Sin embargo, aunque esta clasificación ha sido validada en una serie de pacientes independiente, otros grupos han propuesto diversas modificaciones (Tabla 1), que se exponen a continuación.

MD Anderson

El MD Anderson Cancer Center, en un estudio en 417 pacientes de su propio centro, propuso modificar el

Tabla 1. Grupos de riesgo citogenético

	Grupos de riesgo citogenético			Supervivencia global	Evolución a AML
	Bajo	Intermedio	Alto		
CPSS ⁶	CN y -Y	Otras alteraciones	+8, alt(7), y CC	P < 0,001	P < 0,001
MD Anderson ⁷	CN y -Y	Otras alteraciones (incluida la +8 aislada)	Alt(7) y CC	P < 0,001	P < 0,001
Clínica Mayo - Grupo Francés ⁹	CN, -Y y der (3)	Otras	CC y CM	P < 0,001	P = 0,004
CPSS-mol ¹⁶	CN y -Y	Otras alteraciones y mutaciones de ASXL1	+8, alt(7), CC y mutaciones de SETBP1 y RUNX1	P < 0,001	P < 0,001

CN: cariotipo normal; CC: cariotipo complejo; CM: cariotipo monosómico.

índice pronóstico citogenético del GESMD incluyendo la trisomía del cromosoma 8 (+8) aislada dentro del grupo de riesgo citogenético intermedio. Esta propuesta se basaba en la mejor supervivencia global, cercana al grupo intermedio, que presentaban estos pacientes en su serie (24 meses en el grupo intermedio y 22 meses la +8 aislada, $P = 0,132$). Con este cambio conseguían en su serie una mejor separación de los grupos de riesgo, principalmente en la supervivencia libre de enfermedad (SLE). Sin embargo, al igual que ocurre en la clasificación propuesta por el GESMD, la +8 aislada no presenta diferencias significativas en la SLE con aquellos incluidos en el alto riesgo ($P = 0,243$)⁷.

Por otro lado, este mismo grupo también ha demostrado la importancia de las alteraciones citogenéticas adquiridas durante la evolución de la LMMC. Ocurren en un 25% de los pacientes y las alteraciones más frecuentes son -7/del(7q), +21, +8, del(20q), -17/i(17q)/del(17p) y cariotipo complejo. La adquisición de anomalías se produce con un periodo de latencia de alrededor de 17 meses y está asociado a una mayor progresión a LMA y a una menor SLE, principalmente los casos con +8 y los cariotipos complejos⁹.

Consortio Clínica Mayo-Grupo Francés de SMD

El consorcio formado por la Clínica Mayo y el Grupo Francés de SMD (GFS) propuso una nueva estratificación citogenética en la que se incluye los casos con der(3q) aislados dentro del grupo de bajo riesgo (junto al cariotipo normal y la pérdida aislada del Y) y deja en el de alto riesgo exclusivamente los casos con cariotipo complejo y cariotipo monosómico⁹. Esta propuesta se basaba en los resultados obtenidos por Alsahlawi y cols. (2014), que sugerían que el cariotipo monosómico podría conferir peor pronóstico que el resto de anomalías citogenéticas¹⁰. Sin embargo, la incidencia del cariotipo monosómico en LMMC, al contrario de lo que ocurre en los SMD (16-47% según las series), es un evento poco frecuente (3%). Además, la mayor parte de los casos publicados presentan monosomías

de los cromosomas 5 y/o 7¹⁰. Por ello, queda todavía por demostrar si el cariotipo monosómico tiene un valor pronóstico independiente o, por el contrario, al igual que en los SMD, está determinado por el tipo y el número de anomalías cromosómicas que presentan¹¹.

Alteraciones moleculares

La diversidad en los genes con mutaciones encontrados en la LMMC y la concomitancia mostrada por determinadas mutaciones sugieren que, al igual que en otras formas de cáncer, se producen de forma secuencial y juegan un papel determinante en el desarrollo de la LMMC y la posterior evolución clonal. Por otro lado, dado que dos tercios de los pacientes presentan un cariotipo normal y que se han descrito mutaciones en aproximadamente el 90% de las LMMC, hay un especial interés por incorporar las mutaciones a los índices pronóstico¹².

La secuenciación masiva ha demostrado que aproximadamente el 90% de las LMMC presentan mutaciones en distintos genes. Un reciente metaanálisis que incluye casi 400 pacientes con estudios moleculares de las principales series publicadas ha demostrado que las mutaciones más frecuentes se producen en los genes *TET2* (58%), *SRSF2* (42%), *ASXL1* (31%), *RUNX1* (17%) *CBL* (12%), *NRAS* (12%), *JAK2* (4%) y *SETBP1* (1%)¹²⁻¹⁶ (Tabla 2).

Se ha demostrado una asociación con el pronóstico en análisis multivariantes junto a variables clinicobiológicas para supervivencia global en *ASXL1*, *SFRF2*, *SETBP1*, *RUNX1* y *CBL* y para evolución a LMA en *ASXL1*, *SRSF2*, *CBL* y *RUNX1*. De hecho, algunas de ellas ya han sido incluidas en nuevos modelos de estratificación (Tabla 3)¹³⁻¹⁶.

Grupo Francés de SMD (GFS)

Itzykson y cols. (2013) demostraron que las mutaciones presentes en *ASXL1*, *SRSF2*, *CBL*, *IDH2*, *RUNX1* y *NRAS* conferían menor supervivencia global y/o

Tabla 2. Frecuencia de las mutaciones encontradas en LMMC

Gen mutado	Meggendorfer et al. 2012 ¹²	Itzykson et al. 2013 ¹⁴	Patnaik et al. 2014 ¹⁵	Wassie et al. 2014 ⁹	Elena et al. 2014 ¹⁶	Padrón et al. 2015 ¹³	Cui et al. 2015 ¹⁷	Medias
ASXL1	115/261 (44%)	125/312 (40%)	164/420 (39%)	146/387 (37%)	68/199 (34%)	561 (31%)	65/145 (45%)	39%
SRSF2	-	101/220 (46%)	177/414 (43%)	173/377 (46%)	85/199 (43%)	487 (42%)	26/145 (18%)	37%
SF3B1	-	13/220 (6%)	26/414 (6%)	22/328 (7%)	12/199 (6%)	-	-	6%
U2AF1	-	11/220 (5%)	29/414 (7%)	28/330 (8%)	10/199 (5%)	-	-	6%
SETBP1	-	-	21/414 (5%)	16/382 (4%)	14/199 (7%)	- (1%)	42/145 (29%)	5%
TET2	97/160 (61%)	151/262 (58%)	-	-	88/199 (44%)	369 (58%)	47/145 (32%)	51%
KRAS	28/266 (11%)	-	-	-	22/199 (11%)	-	-	11%
NRAS	43/273 (16%)	29/263 (11%)	-	-	20/199 (10%)	367 (12%)	-	12%
CUX1	-	-	-	-	20/199 (10%)	-	-	10%
CBL	51/274 (19%)	27/264 (10%)	-	-	18/199 (9%)	374 (12%)	-	12%
RUNX1	61/274 (22%)	39/263 (15%)	-	-	14/199 (7%)	377 (17%)	-	15%
JAK2	18/275 (7%)	-	-	-	12/199 (6%)	789 (4%)	-	6%
EZH2	20/208 (10%)	-	-	-	-	-	-	10%
ZRSF2	-	15/189 (8%)	-	-	-	-	-	8%
IDH2	-	13/229 (6%)	-	-	-	-	-	6%
Independientes para SV	-	ASXL1, SFRF2	ASXL1	-	ASXL1, SETBP1 y RUNX1*	ASXL1, CBL	ASXL1	
Independientes para evolución LMA	-	ASXL1, SFRF2	-	-	-	ASXL1, CBL y RUNX1	-	

*Análisis univariados.

Tabla 3. Principales índices pronósticos que incluyen variables genéticas

GFM		CPSS		MMM		CPSS-mol*	
Factores de riesgo y puntuación							
Leucocitos > 15 x 10 ⁹ /L	3	Leucocitos ≥ 13 x 10 ⁹ /L	1	AMC > 10 x 10 ⁹ /L	2	Leucocitos ≥ 13 x 10 ⁹ /L	1
Hb < 10 g/dL ♂ Hb < 11 g/dL ♀	2	Dependencia Transfusional o Hb < 7 g/dL	1	Hb < 10 g/dL	2	Dependencia Transfusional o Hb < 7 g/dL	1
Plaquetas < 100 x 10 ⁹ /L	2	LMMC-2	1	IMCs circulantes	2	LMMC-2	1
Edad > 65	2	citogenética riesgo intermedio	1	Plaquetas < 100 x 10 ⁹ /L	1,5	citogenética riesgo intermedio y mutaciones en ASXL1	1
Mutaciones en ASXL1	2	citogenética alto riesgo	2	Mutaciones en ASXL1	1,5	citogenética alto riesgo y mutaciones en SETBP1 y/o RUNX1	2
Grupos de riesgo							
Bajo: 0 - 4		Bajo: 0		Bajo: 0		Bajo: 0	
Interm-1: 5-7		Interm-1: 1		Interm-1: £ 2		Interm-1: 1	
-		Interm-2: 2-3		Interm-2: 2,5-4,5		Interm-2: 2-3	
Alto: 8-12		Alto: 4-5		Alto: > 5		Alto: 4-5	

*Pendiente de validación. GFM: Grupo Francés de SMD; CPPS: CMML-Prognostic Score System; MMM: Mayo Molecular Model; CPSS-mol: CPSS molecular.

mayor riesgo de evolución a LMA en su serie de 312 pacientes¹⁴. Además, las mutaciones en *ASXL1* (solo las mutaciones sin sentido y de cambio de pauta de lectura) mantenían un valor pronóstico independiente cuando se incluía junto a las variables clínicas de los pacientes. Este grupo propuso un nuevo modelo pronóstico que diferenciaba 3 grupos de riesgo que incluían las mutaciones de *ASXL1*, la edad > 65 años, los leucocitos, las plaquetas y la hemoglobina, y cuya estratificación pronóstica era aplicable tanto para la supervivencia global como para la evolución a LMA (Tabla 3)¹⁴. Además, las mutaciones en *ASXL1* mantenían su significación pronóstica en el subgrupo de pacientes tratados con agentes hipometilantes. Por otro lado, no encontraron efectos sobre la supervivencia de las mutaciones en *TET2* y las mutaciones en *SRSF2* se mantuvieron al límite en el multivariante ($P = 0,05$).

Modelo molecular de la Clínica Mayo (MMM)

Basándose en los resultados, GFS Patnaik y cols. (2014) proponen una modificación del modelo pronóstico de la Clínica Mayo. En este, al igual que en el GFS, se incluyen únicamente las mutaciones sin sentido y de cambio de pauta de lectura de *ASXL1* que, en su serie de 164 pacientes, tienen una incidencia del 39%, siendo la más frecuente la variación c.1934dupG; p.G646WfsX12¹⁵. Los pacientes con mutaciones en *ASXL1* mostraron una supervivencia de 24 meses, mientras que en los no mutados fue de 44 meses ($P > 0,0001$). Además, esta significación pronóstica se mantuvo en análisis multivariantes. De este modo, diferencian 4 grupos de riesgo para supervivencia global, otorgando 2 puntos a la cifra de monocitos, a la presencia de células inmaduras mieloides circulantes y a la hemoglobina y 1,5 puntos a las mutaciones en *ASXL1* y al recuento plaquetar¹⁵ (Tabla 3). En comparación con los modelos originales de la Clínica Mayo y el GFS, este modelo permitía identificar un subgrupo de pacientes con muy buen pronóstico, con medias de supervivencia de 97 meses vs. los 65 meses que presentaba el grupo de bajo riesgo de modelo del GFS.

CPSS molecular (CPSS-mol)

Elena y cols. (2014) realizaron un estudio de secuenciación masiva de genes implicados en cáncer en 199 pacientes incluidos en el CPSS con la finalidad de integrar los resultados dentro del modelo pronóstico. Encontraron que el 93% de los pacientes presentaban al menos 1 gen mutado y que los más frecuentes eran: *TET2* (44%), *SRSF2* (43%), *ASXL1* (34%), *KRAS* (11%), *NRAS* (10%), *CUX1* (10%), *CBL* (9%), *RUNX1* (7%) y *SETBP1* (7%)¹⁶. Además, se observó una relación con la supervivencia global en *ASXL1*, *RUNX1* y *SETBP1*.

Con ello propusieron un nuevo índice genético específico para LMMC en el que se incluían los grupos de riesgo citogenético descritos en el CPSS junto con las mutaciones de *ASXL1*, *SETBP1* y *RUNX1*. En el grupo de riesgo citogenético se incluirían las mutaciones de *ASXL1* y las mutaciones de *SETBP1* y *RUNX1* dentro del grupo de alto riesgo. Integrando este nuevo modelo en el CPSS original (CPSS-mol) también permitía estratificar 4 grupos de riesgo tanto para supervivencia global ($P < .001$) como para transformación a LMA ($P < .001$) (Tabla 3)¹⁶.

Viéndolos en conjunto, parece que se empiezan a afinar las herramientas para pronosticar el curso evolutivo de la LMMC (Tabla 3), aunque se debe hacer un esfuerzo por identificar el mejor modelo para poder establecer el mejor tratamiento. Actualmente, hay más de 8 modelos de estimación del pronóstico propuestos para esta enfermedad, siendo los factores clínicos, patológicos y genéticos que se incluyen en cada uno de ellos a menudo distintos. Recientemente se han comparado y validado 7 de ellos en una serie internacional de 1.832 pacientes: *IPSS*, *IPSS-R*, *MD Anderson Scoring System*, *MD Anderson Prognostic Score*, *Düsseldorf Score*, *Mayo* y *CPSS* mostrando que, aunque todos permiten separar a los pacientes en distintos grupos de forma muy significativa, el mayor poder predictivo lo tendrían tanto *IPSS-R* como *CPSS*¹³. Ambos permiten diferenciar 4 grupos de riesgo, lo que posibilita separar mejor los pacientes de bajo riesgo, en los que no se va a realizar una intervención terapéutica de inicio¹³. Sin embargo, aunque parece quedar demostrado que los datos citogenéticos y moleculares son un buen complemento que permitirá incrementar la precisión y el poder predictivo de los sistemas pronósticos actuales, el esfuerzo ahora se centra en incluir estas alteraciones genéticas dentro de los diferentes modelos pronósticos descritos. Esto es importante para que las nuevas estrategias terapéuticas específicas para la LMMC permitan mejorar la supervivencia de los pacientes.

Bibliografía

1. Xicoy B, Such E, Zamora L, Ballesteros M, Pérez-Rus G, Bonnad S, et al. Leucemia mielomonocítica crónica. Guías Españolas para el Diagnóstico y tratamiento de los SMD y la LMMC. Barcelona: Marketing farmacéutico & Investigación clínica. 2013. pp. 50-54.
2. Aul C, Gattermann N, Heyll A, Germing U, Derigs G, Schneider W. Primary myelodysplastic syndromes: analysis of prognostic factors in 235 patients and proposals for an improved scoring system. *Leukemia* 1992;6:52-9.
3. Onida F, Kantarjian HM, Smith TL, Brunning RD, Bain BJ, Thiele J. Prognostic factors and scoring systems in chronic myelomonocytic leukemia: a retrospective analysis of 213 patients. *Blood* 2002;99(3):840-9.
4. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997;89:2079.

5. Such E, Cervera J, Costa D, Solé F, Vallespí T, Luño E, et al. Cytogenetic risk stratification in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica* 2011;96:375-83.
6. Such E, Germing U, Malcovati L, Cervera J, Kuendgen A, Della Porta MG, et al. Development and validation of a prognostic scoring system for patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 2013;121(15):3005-15.
7. Tang G, Zhang L, Fu B, Hu J, Lu X, Hu S, et al. Cytogenetic risk stratification of 417 patients with chronic myelomonocytic leukemia from a single institution. *Am J Hematol* 2014;89(8):813-8.
8. Tang G, Fu B, Hu S, Lu X, Tang Z, Li S, et al. Prognostic impact of acquisition of cytogenetic abnormalities during the course of chronic myelomonocytic leukemia. *Am J Hematol* 2015. Epub ahead of print.
9. Wassie EA, Itzykson R, Lasho TL, Kosmider O, Finke CM, Hanson CA, et al. Molecular and prognostic correlates of cytogenetic abnormalities in chronic myelomonocytic leukemia: a Mayo Clinic-French Consortium Study. *Am J Hematol* 2014;89(12):1111-5.
10. Alsahlawi A, Alkhateeb H, Patnaik M, Begna K, Elliott M, Hogan WJ, et al. Monosomal karyotype predicts adverse prognosis in patients diagnosed with chronic myelomonocytic leukemia: a single-institution experience. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2015;15(2):e39-41.
11. Schanz J, Tüchler H, Solé F, Mallo M, Luño E, Cervera J, et al. Monosomal karyotype in MDS: explaining the poor prognosis? *Leukemia* 2013;27(10):1988-95.
12. Meggendorfer M, Roller A, Haferlach T, Eder C, Dicker F, Grossmann V, et al. SRSF2 mutations in 275 cases with chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Blood* 2012;120(15):3080-8.
13. Padron E, García-Manero G, Patnaik MM, Itzykson R, Lasho T, Nazha A, et al. An international data set for CMML validates prognostic scoring systems and demonstrates a need for novel prognostication strategies. *Blood Cancer J* 2015;5:e333.
14. Itzykson R, Kosmider O, Renneville A, Gelsi-Boyer V, Meggendorfer M, Morabito M, et al. Prognostic score including gene mutations in chronic myelomonocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2013;31(19):2428-36.
15. Patnaik MM, Itzykson R, Lasho TL, Kosmider O, Finke CM, Hanson CA, et al. ASXL1 and SETBP1 mutations and their prognostic contribution in chronic myelomonocytic leukemia: a two-center study of 466 patients. *Leukemia* 2014;28(11):2206-12.
16. Elena CH, Galli A, Such E, Germing U, Rizzo E, Cervera J, et al. Somatic Mutations of ASXL1, RUNX1 and SETBP1 Improve Prognostic Stratification of Patients with Chronic Myelomonocytic Leukemia. *Blood* 2014;124:1915.
17. Cui Y, Tong H, Du X, Li B, Gale RP, Qin T, et al. Impact of TET2, SRSF2, ASXL1 and SETBP1 mutations on survival of patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Exp Hematol Oncol* 2015;4:14.

Tratamiento actual de la leucemia mielomonocítica crónica

B. XICOY

Hematología Clínica. ICO-Badalona. Hospital Germans Trias i Pujol. Josep Carreras Leukemia Research Institute. Barcelona

Introducción

La leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) es una hemopatía maligna agresiva caracterizada por monocitosis en sangre periférica y hematopoyesis ineficaz con presencia de displasia. Ha sido clasificada históricamente como un subtipo de síndrome mielodisplásico (SMD), pero hoy en día existe evidencia suficiente para afirmar que la LMMC es una enfermedad con entidad e historia natural propia. Por ello la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS)¹ la incluyó dentro del grupo neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas. Sin embargo, en el tratamiento de la LMMC se extrapolan muchas de las recomendaciones desarrolladas en las guías de los SMD y, en este sentido, es importante discernir cuáles son aplicables a estos pacientes además de valorar la evidencia disponible de los estudios que específicamente se han diseñado para tratar esta enfermedad. Ello nos va a permitir hacer un tratamiento más dirigido y, a la vez, identificar las situaciones no cubiertas en el tratamiento de algunos subgrupos de pacientes.

Las opciones terapéuticas de la LMMC son todavía limitadas por la escasez de estudios especialmente diseñados para ella. En general, los avances en el tratamiento han progresado desde la quimioterapia, con elevada toxicidad y baja frecuencia de respuesta con fármacos como el etopósido y la hidroxiurea, a los fármacos hipometilantes, con mejores respuestas y menor toxicidad. A pesar de la eficacia de los fármacos hipometilantes, no existe un tratamiento que modifique la historia natural de la enfermedad, salvo el trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) alogénico. Desafortunadamente, muchos pacientes con LMMC no son candidatos a este procedimiento debido a la presencia de comorbilidades y/o edad avanzada, aunque el acondicionamiento no mieloablatoivo ha permitido ampliar el grupo de pacientes candidatos a esta modalidad de tratamiento.

Un aspecto diferenciador de la LMMC respecto de los SMD es la presencia de semiología mieloprolifera-

tiva en casi la mitad de los casos. Los pacientes con LMMC pueden presentar leucocitosis, síntomas constitucionales, esplenomegalia y síntomas derivados de ella como dolor abdominal o saciedad precoz, y afección extramedular. El tratamiento citorreductor puede mejorar esta semiología, pero en esta situación sería deseable tratar a los pacientes con fármacos en investigación, como los inhibidores de la vía JAK-STAT.

La eficacia de los nuevos fármacos ha sido tradicionalmente evaluada con los criterios de respuesta utilizados en los SMD porque no existen criterios de respuesta específicos para la LMMC, lo cual no es apropiado, al menos en la variedad mieloproliferativa². Recientemente, dos grupos de expertos internacionales han desarrollado documentos de consenso que pueden ser aplicables a la LMMC^{3,4}.

Criterios para inicio del tratamiento

Las guías NCCN (*National Comprehensive Cancer Network Guidelines*) y análisis retrospectivos establecieron que pacientes con SMD de bajo riesgo asintomáticos no se benefician de tratamiento con fármacos hipometilantes, mientras que los pacientes de alto riesgo deben ser tratados con azacitidina independientemente de los síntomas porque prolonga la supervivencia. Aunque existe poca evidencia, es tentador extrapolar este enfoque al algoritmo terapéutico de la LMMC. No obstante, dado que no se ha demostrado que ningún fármaco modifique la historia natural de la LMMC, la selección del tratamiento puede individualizarse con el objetivo de mejorar los síntomas y la calidad de vida del paciente, especialmente en pacientes de bajo riesgo. En esta situación, los dos aspectos que deben guiar la selección del tratamiento en la LMMC son los síntomas derivados de la mieloproliferación y los síntomas derivados de las citopenias. Así, los criterios de inicio de tratamiento son enfermedad de alto riesgo según el *CMML-specific prognostic scoring system* (CPSS), en concreto CPSS intermedio-2 o alto⁵, anemia sintomática, neutropenia $< 0,5 \times 10^9/L$ y semiología proliferativa (cifra de leuco-

citosis $> 30 \times 10^9/L$), esplenomegalia sintomática o enfermedad extramedular (por ejemplo, afección cutánea o ganglionar).

Fármacos para la LMMC

La actitud que se debe tomar en el tratamiento de soporte, como los antibióticos profilácticos para pacientes con neutropenia y la quelación en pacientes con sobrecarga férrica, es similar a la que se adopta en pacientes con SMD, pero no existen datos al respecto. Parece razonable el uso de agentes eritropoyéticos con los mismos criterios que utilizamos en pacientes con SMD⁶.

Cuando los pacientes tienen una leucocitosis importante ($> 100 \times 10^9/L$), esplenomegalia gigante, síntomas constitucionales u otras manifestaciones derivadas de la mieloproliferación se debe considerar iniciar tratamiento citorreductor. Este enfoque incluye la quimioterapia convencional y fármacos citotóxicos, como hidroxiurea, y deben escogerse en función del estado general, la edad y comorbilidades.

En el único estudio aleatorizado realizado en el ámbito de la LMMC, hidroxiurea fue claramente superior a etopósido en términos de supervivencia global⁷. Algunos estudios han evaluado la eficacia de citarabina, inhibidores de topoisomerasa (topotecán, 9-nitro-camptotecina), ácido transretinoico (diferenciador), ácido valproico (inhibidor de la deacetilación de histonas) y lonafarnib (inhibidor de farnesiltransferasa), ya sea en monoterapia o en combinación⁸⁻¹⁶. Los malos resultados y la toxicidad asociada descartaron seguir con el desarrollo de nuevos estudios en este campo. No obstante, estos fármacos podrían utilizarse de forma secuencial o en combinación tras fracaso a hidroxiurea. La quimioterapia de inducción con antraciclinas y citarabina ha sido utilizada especialmente cuando el número de blastos es elevado, pero existen pocos resultados de eficacia. No obstante, este esquema citorreductor puede ser útil como puente para la realización de un TPH alogénico, la única opción curativa en estos pacientes.

Actualmente se están desarrollando ensayos clínicos para controlar los síntomas de la enfermedad mieloproliferativa, en concreto con inhibidores de la vía JAK-STAT, como ruxolitinib.

La aparición de los fármacos hipometilantes ha cambiado el enfoque terapéutico de los pacientes con SMD y LMMC. Tres estudios aleatorizados establecieron la eficacia y seguridad de azacitidina y decitabina en esta población de pacientes y llevaron a su aprobación¹⁷⁻¹⁹. Sin embargo, en estos estudios se incluyeron solo 19 pacientes con LMMC. El estudio de Silverman et al.¹⁷ no demostró diferencias significativas en respuesta entre los pacientes con anemia refractaria y anemia refractaria sideroblástica y los pacientes con anemia refractaria con exceso de blastos y LMMC. Solo 1 de los 7 pacien-

tes con LMMC respondió a decitabina en el estudio aleatorizado de Kantarjian et al.¹⁸, mientras que 5 de 6 pacientes que recibieron azacitidina en el ensayo clínico AZA-001 respondieron. Los beneficios en supervivencia encontrados en el estudio AZA-001 no pueden extrapolarse a la LMMC por los pocos pacientes con LMMC incluidos¹⁹.

Estudios posteriores a la comercialización analizaron específicamente la eficacia de los fármacos hipometilantes en la LMMC²⁰⁻³². Las respuestas son comparables a las de los pacientes con SMD y oscilan entre el 25% y el 70%, con una mediana de supervivencia entre 12 y 37 meses. Debe todavía confirmarse que la respuesta al tratamiento se asocia a mejor supervivencia^{21,22}.

Los factores que pueden favorecer la respuesta a hipometilantes son la edad, la baja expresión del gen *CJUN*, una cifra de monocitos al diagnóstico $< 2 \times 10^9/L$ y la duplicación de la cifra de plaquetas tras el primer ciclo de tratamiento^{20,22,31,33}. Es posible que la respuesta pueda estar asociada a la hipermetilación localizada en regiones no promotoras del ADN³⁴. Los factores asociados a mejor supervivencia son la respuesta al tratamiento, cifra de blastos en médula ósea $> 10\%$ y esplenomegalia palpable, menor expresión de los genes *CJUN* y *CMYB* y cifra de monocitos $< 10 \times 10^9/L$ y de blastos en sangre periférica inferior al 5% al inicio del tratamiento^{21,22,31}.

Desafortunadamente, la naturaleza retrospectiva de estos estudios, así como la falta de una rama control, obliga a considerar sus conclusiones con precaución (Tabla 1). También es difícil extraer conclusiones en cuanto a superioridad de un hipometilante respecto al otro porque no se han hecho estudios comparativos.

Los fármacos hipometilantes pueden tener un papel en pacientes con semiología mieloproliferativa pero, ante una mieloproliferación rápida, es poco probable que azacitidina pueda controlarla, ya que a la dosis hipometilante es poco citoreductora y porque suele requerir varios ciclos de tratamiento para mostrar eficacia³⁵. Decitabina, por ser más mielotóxica, podría ser *a priori* una mejor opción. Existen datos de estudios, la mayoría de programas de uso compasivo, en los que se ha administrado azacitidina o decitabina en el subtipo mieloproliferativo y los resultados de eficacia no parecen ser inferiores^{21,23-25,29-30,32} (Tabla 2).

TPH alogénico

El TPH alogénico es la única opción terapéutica para pacientes con LMMC que puede mantener una remisión prolongada y, en ocasiones, la curación. La decisión de indicar un TPH alogénico y el momento de su realización en un paciente en concreto están todavía por definir. En los SMD parece claro que los pacientes de alto riesgo se benefician del TPH realizado de for-

Tabla 1. Principales estudios de tratamiento de la leucemia mielomonocítica crónica con hipometilantes

Autor	n	Fármaco	RG (%)	RC (%)	SG (mediana)
Fennaux et al.	11	AZA	-	-	-
Costa et al.	29	AZA	39	11	12
Silverman et al.	7	AZA	-	-	-
Kantarjian et al.	6	DEC	16	-	-
Wijermans et al.	31	DEC	26	10	15
Aribi et al.	19	DEC	69	58	19
Braun et al.	39	DEC	38	10	48 (a 24 meses)
Fianchi et al.	31	DEC	51	45	37
Thorpe et al.	10	AZA	60	40	20
Wong et al.	11	AZA	55	36	18
Adès et al.	76	AZA	43	17	29
Pleyer et al.	48	AZA	70	26	17
Ozbalak et al.	5	AZA	60	20	-
Drummond et al.	30	AZA	20	7	16

RG: respuesta global; RC: remisión completa; SG: supervivencia global; AZA: azacitidina; DEC: decitabina.

Tabla 2. Resultados de estudios con azacitidina en los subtipos mielodisplásico y mieloproliferativo

	Costa et al.	Ozbalak et al.	Thorpe et al.	Wong et al.	Fianchi et al.	Adès et al.	Pleyer et al.	Wijermans ¹ et al.
N	38	5	10	11	31	76	48	31
LMMC-MP (%)	69	20	40	36	35	43	58	23
Esplenomegalia RG (%)	28	-	40	-	-	30	19	-
MD	55	50	75	71	-	-	35	41
MP	32	100	50	25	-	-	68	67

¹Decitabina; LMMC-MP: leucemia mielomonocítica crónica subtipo mieloproliferativo; RG: respuesta global; MD: mielodisplásica; MP: mieloproliferativa.

ma precoz, mientras que los pacientes de bajo riesgo se benefician si se retrasa este procedimiento hasta la progresión. Estas premisas no tienen por qué ser aplicables a la LMMC porque, en general, es una enfermedad más agresiva que los SMD y, por ello, serían candidatos al TPH una mayor proporción de pacientes con LMMC que con SMD. En la práctica parece recomendable indicar el TPH alogénico a los pacientes con índice pronóstico CPSS intermedio-2 o alto si disponen de un donante, dado que la supervivencia mediana es inferior a 14 meses. Se aconseja tratamiento previo con azacitidina o quimioterapia (si hay citogenética de bajo riesgo) cuando existe alta carga tumoral o blastos > 10% en médula ósea. No existen recomendaciones sobre el mejor esquema de acondicionamiento, la fuente de progenitores o la profilaxis de enfermedad de injerto contra huésped. Toda la información disponible deriva de estudios retrospectivos. En las series más amplias se describe una probabilidad de supervivencia global a los 3 años del 30% y de supervivencia libre de recaída a los 10 años del 40%³⁶⁻³⁷ (Tabla 3). No existe ningún

factor con influencia clara en la supervivencia global y supervivencia libre de progresión³⁶⁻⁴⁴.

La Figura 1 resume una propuesta de algoritmo terapéutico para la LMMC.

Conclusiones

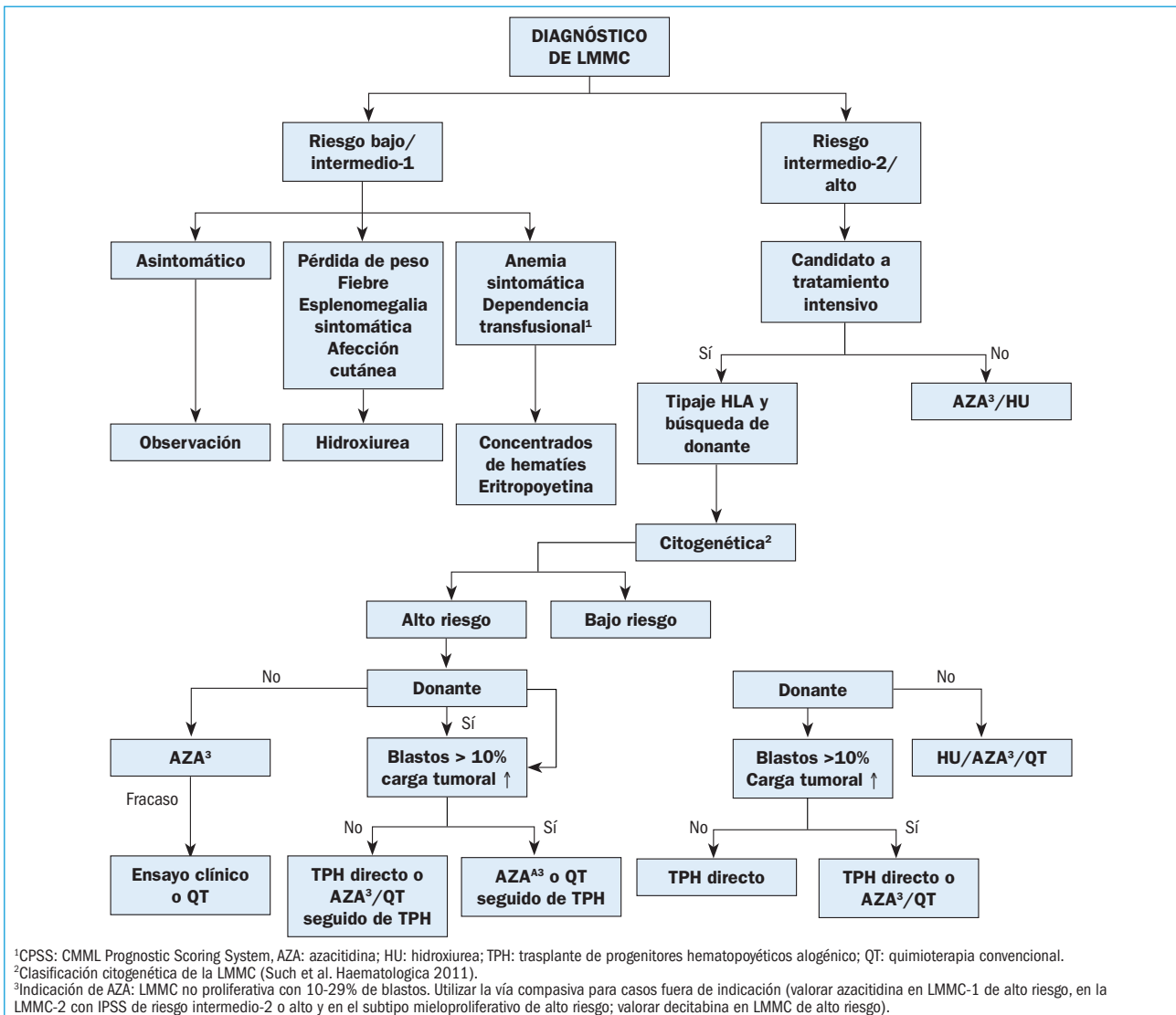
La LMMC es una hemopatía maligna con una historia natural característica. El enfoque terapéutico siempre ha derivado de los algoritmos desarrollados para los SMD y la evidencia disponible es extrapolable, en algunos aspectos, a la LMMC.

La actitud que se debe tomar en el tratamiento de soporte, como los antibióticos profilácticos para pacientes con neutropenia y la quelación en pacientes con sobrecarga férrica, es similar a la que se adopta en pacientes con SMD, pero no existen datos al respecto. Parece razonable el uso de agentes eritropoyéticos con los mismos criterios que utilizamos en pacientes con SMD. El papel del tratamiento citorreductor es limitado y la hidroxiurea sigue siendo el tratamiento de

Tabla 3. Principales estudios de trasplante de progenitores hematopoyéticos en la leucemia mielomonocítica crónica

	Periodo	n	Acondicionamiento	SLR (años)
Eissa et al.	86-08	85	MA = 58 IR = 27	40 (10)
Krishnamurthy et al.	98-07	18	MA = 1 IR = 17	47 (3)
Ocheni et al.	03-07	12	MA = 7 IR = 17	37 (2)
Elliot et al.	92-04	17	-	18 (3)
Kerbaudy et al.	-	43	MA = 37 IR = 6	41 (4)
Mittal et al.	91-04	8	-	25 (3)
Kröger et al.	88-00	50	MA = 43 IR = 7	18 (5)
Park et al.	92-09	73	MA = 30 IR = 43	SLE 29 (3 años)
Sánchez et al.	02-14	30	MA = 23 IR = 7	

SLR: supervivencia libre de recaída; MA; mieloablatoivo; IR: intensidad reducida; SLE: supervivencia libre de enfermedad.



¹CPSS: CMML Prognostic Scoring System, AZA: azacitidina; HU: hidroxiurea; TPH: trasplante de progenitores hematopoyéticos alogénico; QT: quimioterapia convencional.

²Clasificación citogenética de la LMMC (Such et al. Haematologica 2011).

³Indicación de AZA: LMMC no proliferativa con 10-29% de blastos. Utilizar la vía compasiva para casos fuera de indicación (valorar azacitidina en LMMC-1 de alto riesgo, en la LMMC-2 con IPSS de riesgo intermedio-2 o alto y en el subtipo mieloproliferativo de alto riesgo; valorar decitabina en LMMC de alto riesgo).

Figura 5. Algoritmo terapéutico de la leucemia mielomonocítica crónica.

elección para pacientes de bajo riesgo con semiología mieloproliferativa.

La eficacia de los fármacos hipometilantes en la LMMC justifica su uso en pacientes de alto riesgo y, aunque existen mutaciones que parecen tener influencia en la respuesta, los resultados son todavía preliminares, por lo que la aplicación del estudio mutacional en los protocolos de tratamiento está todavía por definir.

Los estudios específicos desarrollados para la LMMC son limitados y hacen falta estudios aleatorizados y de combinación y, en definitiva, que todo paciente con LMMC sea considerado para TPH alogénico o incluido en ensayos clínicos con nuevos fármacos. Los criterios de respuesta al tratamiento en el subtipo mieloproliferativo están todavía por definir.

Bibliografía

- Orazi A, Bennett J, Germing U, Brunning R, Bain B, Thiele J. Chronic myelomonocytic Leukaemia. En: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. S. Swerdlow, E. Campo, N. Lee Harris, ES Jaffe, SA Pileri, H Stein, J Thiele, J Vardiman, editores. Lyon, France: IARC Press; 2008. pp. 76-79.
- Cheson BD, Greenberg PL, Bennett JM, Lowenberg B, Wijermans PW, Nimer SD, et al. Clinical application and proposal for modification of the International Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia. *Blood* 2006;108:419-25.
- Onida F, Barosi G, Leone G, Malcovati L, Morra E, Santini V, et al. Management recommendations for chronic myelomonocytic leukemia: consensus statements from the SIE, SIES, GITMO groups. *Haematologica* 2013;98:1344-52.
- Savona MR, Malcovati L, Komrokji R, Tiu RV, Mughal TI, Orazi A, et al. MDS/MPN International Working Group. An international consortium proposal of uniform response criteria for myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms (MDS/MPN) in adults. *Blood* 2015;125:1857-65.
- Such E, Germing U, Malcovati L, Cervera J, Kuendgen A, Della Porta MG, et al. Development and validation of a prognostic scoring system for patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 2013;121:3005-15.
- Xicoy B, Germing U, Jimenez MJ, Garcia O, Pedro C, Schemenau J, et al. Feasibility of predictive model of response to erythropoietic stimulating agents from myelodysplastic syndromes, response and overall survival in a series of 99 patients with chronic myelomonocytic leukemia from the spanish registry of MDS and the MDS Registry of Düsseldorf, Germany. *Blood* 2013;121:2813 [Abstract].
- Wattel E, Guerci A, Hecquet B, Economopoulos T, Copplestone A, Mahé B, et al. Groupe Français des Myelodysplasies and European CMML Group. A randomized trial of hydroxyurea versus VP16 in adult chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 1996;88:2480-7.
- Weihrauch MR, Staib P, Seiberlich B, Hoffmann M, Diehl V, Tesch H. Phase I/II clinical study of topotecan and cytarabine in patients with myelodysplastic syndrome, chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2004;45:699-704.
- Gerhartz HH, Marcus R, Delmer A, Zwierzina H, Suciu S, Dardenne M, et al. A randomized phase II study of lowdose cytosine arabinoside (LD-AraC) plus granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF) in myelodysplastic syndromes (MDS) with a high risk of developing leukemia. EORTC Leukemia Cooperative Group. *Leukemia* 1994;8:16-23.
- Venditti A, Tamburini A, Buccisano F, Scimò MT, Del Poeta G, Maurillo L, et al. A phase-II trial of all trans retinoic acid and low-dose cytosine arabinoside for the treatment of high-risk myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol* 2000;79:138-42.
- Cambier N, Wattel E, Menot ML, Guerci A, Chomienne C, Fenaux P. All-trans retinoic acid in adult chronic myelomonocytic leukemia: Results of a pilot study. *Leukemia* 1996;10:1164-7.
- Quintas-Cardama A, Kantarjian H, O'Brien S, Jabbour E, Giles F, Ravandi F, et al. Activity of 9-nitrocamptothecin, an oral topoisomerase I inhibitor, in myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia. *Cancer* 2006;107:1525-9.
- Beran M, Estey E, O'Brien SM, Giles FJ, Koller CA, Kornblau S, et al. Results of topotecan single-agent therapy in patients with myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 1998;31:521-31.
- Beran M, Estey E, O'Brien S, Cortes J, Koller CA, Giles FJ, et al. Topotecan and cytarabine is an active combination regimen in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia. *J Clin Oncol* 1999;17:2819-30.
- Siitonen T, Timonen T, Juvonen E, Terävä V, Kutila A, Honkanen T, et al. Valproic acid combined with 13-cis-retinoic acid and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in the treatment of patients with myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2007;92:1119-22.
- Feldman EJ, Cortes J, DeAngelo DJ, Holyoake T, Simonsson B, O'Brien SG, et al. On the use of lonafarnib in myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia* 2008;22:1707-11.
- Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, Kornblith AB, Holland JC, Odchimar-Reissig R, et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: A study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol* 2002;20:2429-40.
- Kantarjian H, Issa JP, Rosenfeld CS, Bennett JM, Albitar M, DiPersio J, et al. Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: Results of a phase III randomized study. *Cancer* 2006;106:1794-803.
- Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, et al. International Vidaza High-Risk MDS Survival Study Group. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol* 2009;10:223-32.
- Adès L, Sekeres MA, Wolffromm A, Teichman ML, Tiu RV, Itzykson R, et al. Predictive factors of response and survival among chronic myelomonocytic leukemia patients treated with azacitidine. *Leuk Res* 2013;37:609-13.
- Costa R, Abdulhaq H, Haq B, Shadduck RK, Latsko J, Zenati M, et al. Activity of azacitidine in chronic myelomonocytic leukemia. *Cancer* 2011;117:2690-6.
- Fianchi L, Criscuolo M, Breccia M, Maurillo L, Salvi F, Musto P, et al. High rate of remissions in chronic myelomonocytic leukemia treated with 5-azacitidine: Results of an Italian retrospective study. *Leuk Lymphoma* 2013;54:658-61.
- Pleyer L, Germing U, Sperr WR, Linkesch W, Burgstaller S, Stauder R, et al. Azacitidine in CMML: matched-pair analyses of daily-life patients reveal modest effects on clinical course and survival. *Leuk Res* 2014;38:475-83.
- Thorpe M, Montalvão A, Pierdomenico F, Moita F, Almeida A. Treatment of chronic myelomonocytic leukemia with 5-Azacitidine: A case series and literature review. *Leuk Res* 2012;36:1071-3.
- Wong E, Seymour JF, Kenealy M, Westerman D, Herbert K, Dickinson M. Treatment of chronic myelomonocytic leukemia with azacitidine. *Leuk Lymphoma* 2013;54:878-80.

26. Kantarjian H, Oki Y, Garcia-Manero G, Huang X, O'Brien S, Cortes J, et al. Results of a randomized study of 3 schedules of low-dose decitabine in higher-risk myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 2007;109:52-7.
27. Beguin Y, Selleslag D, Meers S, Graux C, Bries G, Deeren D, et al. Safety and efficacy of azacitidine in Belgian patients with high-risk myelodysplastic syndromes, acute myeloid leukaemia, or chronic myelomonocytic leukaemia: results of a real-life, non-interventional post-marketing survey. *Acta Clin Belg* 2015;70:34-43.
28. Drummond MW, Pocock C, Boissinot M, Mills J, Brown J, Cauchy P, et al. A multi-centre phase 2 study of azacitidine in chronic myelomonocytic leukaemia. *Leukemia* 2014;28:1570-2.
29. Ozbalak M, Cetiner M, Bekoz H, Atesoglu EB, Ar C, Salihoglu A, et al. Azacitidine has limited activity in 'real life' patients with MDS and AML: a single centre experience. *Hematol Oncol* 2012;30:76-81.
30. Aribi A, Borthakur G, Ravandi F, Shan J, Davison J, Cortes J, et al. Activity of decitabine, a hypomethylating agent, in chronic myelomonocytic leukemia. *Cancer* 2007;109:713-7.
31. Braun T, Itzykson R, Renneville A, de Renzis B, Dreyfus F, Laribi K, et al.; Groupe Francophone des Myélodysplasies. Molecular predictors of response to decitabine in advanced chronic myelomonocytic leukemia: A phase 2 trial. *Blood* 2011;118:3824-31.
32. Wijermans PW, Rüter B, Baer MR, Slack JL, Saba HI, Lübbert M. Efficacy of decitabine in the treatment of patients with chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Leuk Res* 2008;32:587-91.
33. van der Helm LH, Alhan C, Wijermans PW, van Marwijk Kooy M, Schaafsma R, Biemond BJ, et al. Platelet doubling after the first azacitidine cycle is a promising predictor for response in myelodysplastic syndromes (MDS), chronic myelomonocytic leukaemia (CMML) and acute myeloid leukaemia (AML) patients in the Dutch azacitidine compassionate named patient programme. *Br J Haematol* 2011;155:599-606.
34. Meldi K, Qin T, Buchi F, Droin N, Sotzen J, Micol JB, et al. Specific molecular signatures predict decitabine response in chronic myelomonocytic leukemia. *J Clin Invest*. 2015;125:1857-72.
35. Tsai HC, Li H, Van Neste L, Cai Y, Robert C, Rassool FV, et al. Transient low doses of DNA-demethylating agents exert durable antitumor effects on hematological and epithelial tumor cells. *Cancer Cell* 2012;21:430-46.
36. Eissa H, Gooley TA, Sorrow ML, Nguyen F, Scott BL, Doney K, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for chronic myelomonocytic leukemia: Relapse-free survival is determined by karyotype and comorbidities. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;17:908-15.
37. Park S, Labopin M, Yakoub-Agha I, Delaunay J, Dhedin N, Deconinck E, et al. Allogeneic stem cell transplantation for chronic myelomonocytic leukemia: A report from the Societe Francaise de Greffe de Moelle et de Therapie Cellulaire. *Eur J Haematol* 2013;90:355-64.
38. Elliott MA, Tefferi A, Hogan WJ, Letendre L, Gastineau DA, Ansell SM, et al. Allogeneic stem cell transplantation and donor lymphocyte infusions for chronic myelomonocytic leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2006;37:1003-08.
39. Krishnamurthy P, Lim ZY, Nagi W, Kenyon M, Mijovic A, Ireland R, et al. Allogeneic haematopoietic SCT for chronic myelomonocytic leukaemia: A single-centre experience. *Bone Marrow Transplant* 2010;45:1502-7.
40. Kröger N, Zabelina T, Guardiola P, Runde V, Sierra J, Van Biezen A, et al. Allogeneic stem cell transplantation of adult chronic myelomonocytic leukaemia. A report on behalf of the Chronic Leukaemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Br J Haematol* 2002;118:67-73.
41. Mittal P, Saliba RM, Giralt SA, Shahjahan M, Cohen AI, Karandish S, et al. Allogeneic transplantation: A therapeutic option for myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and Philadelphia-negative/ BCR-ABL-negative chronic myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2004;33:1005-09.
42. Ocheni S, Kröger N, Zabelina T, Zander AR, Bacher U. Outcome of allo-SCT for chronic myelomonocytic leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2009;43:659-61.
43. Symeonidis A, van Biezen A, Mufti G, Finke J, Beelen D, Bornhauser M, et al. Allogeneic stem cell transplantation in patients with chronic myelomonocytic leukaemia: The impact of WHO classification and of the conditioning regimen on the transplantation outcome. *Bone Marrow Transplant* 2010;45:803[Abstract].
44. Sánchez, ME, Singh Abbi KK, Tamari R, Jakubowsky A, Papadopoulos EB, Devlin SM, et al. Allogeneic Transplantation for Chronic Myelomonocytic Leukemia (CMML) Is Associated with High Disease-Free Survival Even in the Setting of High-Risk Disease. *Blood* 2014;124:2575[Abstract].

Linfoproliferativos 1. Leucemia linfática crónica: de la genómica al tratamiento

COORDINADORES: **J. DELGADO GONZÁLEZ.** *Servicio de Hematología. IDIBAPS. Hospital Clínic. Barcelona*
M.J. TEROL CASTERÁ. *Servicio de Hematología y Oncología Médica. Área de Síndromes Linfoproliferativos. Hospital Clínico Universitario. Valencia*

Es indudable que la leucemia linfática crónica (LLC) ha sufrido un cambio muy profundo en el último lustro. Por un lado, la aparición de las técnicas de secuenciación masiva han permitido un análisis pormenorizado de las alteraciones genómicas, epigenómicas y transcriptómicas responsables de la transformación neoplásica, lo que nos ha permitido avanzar en el conocimiento de la enfermedad de una manera más global. Entre los grupos de investigación más prominentes en este campo destaca el capitaneado por Davide Rossi y Gianluca Gaidano en la Universidad del Piemonte Oriental, Novara, Italia. Muchas han sido las contribuciones originales de este grupo en el campo de la LLC, incluyendo los mecanismos moleculares de la transformación de Richter, la identificación de las mutaciones de *BIRC3* y la relevancia pronóstica de las mutaciones subclonales de *TP53*.

Si hablamos de los nuevos avances terapéuticos en la enfermedad, no cabe ninguna duda de que las aportaciones del Grupo Alemán de LLC (DCLLSG) han sido enormemente relevantes en los últimos años. Suyos han sido los ensayos clínicos que han permitido establecer fármacos como fludarabina, bendamustina, rituximab y obinutuzumab como tratamiento habitual de la enfermedad. Además, la envidiable disciplina del grupo alemán a la hora de recoger muestras de los pacientes incluidos en estos ensayos ha permitido validar de manera prospectiva la importancia de las alteraciones genómicas mencionadas previamente en cohortes homogéneas de pacientes. En este sentido, el liderazgo de Stephan Stilgenbauer, responsable de los estudios citogenéticos y moleculares asociados a los ensayos clínicos del grupo alemán, ha sido fundamental. Sin ir más lejos, es importante resaltar que el Prof. Stilgenbauer participó de manera muy destacada en la creación del modelo citogenético jerárquico vigente en la actualidad en todo el mundo. Suya también ha sido la observación del escaso papel del rituximab en los pacientes con mutación de *NOTCH1*.

Finalmente, el año 2015 quedará grabado en la memoria de los hematólogos españoles como “el año de la LLC”, en vista de la aprobación inminente de cuatro nuevos fármacos para su tratamiento por parte de la Agencia Española del Medicamento. No cabe duda de que estos cuatro fármacos, obinutuzumab, ofatumumab, ibrutinib e idelalisib, supondrán un gran avance para los pacientes que sufren dicha enfermedad. Sin embargo, una vez superada la alegría inicial nos queda una labor complicada, que es su incorporación a los algoritmos terapéuticos actuales de manera que se puedan emplear de manera racional, eficiente y sostenible. Para ello contamos con el Pau Abrisqueta del Hospital Universitario Vall d’Hebron, un centro de reconocidísima trayectoria en el estudio de la LLC y con amplia experiencia en el manejo de estos fármacos.

Indudablemente, estos avances, y otros que vendrán en un futuro muy próximo, serán definitivos para conseguir nuestro objetivo de prolongar la supervivencia y mejorar la calidad de vida de los pacientes con LLC.

The genetics of chronic lymphocytic leukemia

D. ROSSI

Division of Hematology. Department of Translational Medicine. Amedeo Avogadro University of Eastern Piedmont. Novara, Italy

Introduction

The chronic lymphocytic leukemia (CLL) genome carries ~1000 molecular lesions per tumor, including 10-20 non-synonymous mutations and ~5 gross structural abnormalities¹⁻³. At variance with other indolent B-cell lymphoproliferative disorders, where one predominant gene is molecularly altered in virtually all cases, CLL has a heterogeneous genetic profile and no unifying lesions have been so far identified. Few molecular alterations recur at a frequency > 5% in CLL, while a large number of biologically and clinically uncharacterized genes are mutated at lower frequencies¹⁻³. The most recurrent molecular lesions of CLL point to the deregulation of cellular programs of clinical importance, namely: i) apoptosis and cell cycle; ii) cell signaling; iii) mRNA splicing; iv) MYC network; and v) telomere function.

Apoptotic and cell cycle checkpoints

Deletion 13q14 is the most frequent genetic lesion of CLL occurring in 50-60% of cases⁴. The minimal deleted region on 13q14 contains the *miR15A* and *miR16A* microRNAs.⁵ In normal cells, *miR15A* and *miR16A* inhibit the expression of multiple genes, including *BCL2*, the cyclins *CCND1* and *CCND3*, and cyclin-dependent kinase 6 (*CDK6*)^{6,7}. Deletion of *miR15A* and *miR16A* abrogates this inhibitory effect, favors the constitutive survival and cycling of tumor B-cells, and causes CLL in mouse models.^{6,7} In a relevant fraction (~25%) of CLL patients, deletion of 13q14 occurs in the absence of any concomitant driver genetic lesion. Patients harboring solely 13q14 deletion have an excellent clinical outcome with a progression rate of less than 1% per year and an expected survival only slightly lower than that of the general population⁸. *BCL2* is one of the genes that are upregulated in CLL as a consequence of *miR15A*/*miR16A* deletion. Consistent with the central contribution of *BCL2* activation in the pathogenesis of CLL, selective inhibition of *BCL2* through the BH3 mimetic ABT-199 results into high response rates in relapsed or

refractory patients, including those harboring high-risk genetic abnormalities⁹.

TP53 codes for a central regulator of the DNA-damage-response pathway and, when functional, triggers CLL cell apoptosis in response to chemotherapy. *TP53* may be disrupted in CLL by deletions, mutations or a combination of both. The deletion of 17p13 always contains the *TP53* locus, and is found in 3-8% unselected CLL at diagnosis and in 8-12% CLL at the time of first line treatment^{4,10,11}. On the other hand, specific subgroups of patients affected by fludarabine-refractory CLL or Richter syndrome show a higher incidence of 17p13 deletion that may be detected in up to 30%-40% of cases^{12,13}. Mutations represent the most frequent form of *TP53* inactivation in CLL and are frequently (80-90% of the cases) accompanied by the loss of the second allele through 17p13 deletion. At diagnosis, the incidence of *TP53* mutation has been reported to be 4-8%¹⁴⁻¹⁶. As disease progresses, the incidence of *TP53* mutations raises to 10-12% at the time of first line treatment, 40% in fludarabine-refractory CLL, and 50-60% in Richter syndrome^{13,17-20}. Overall, 95% of mutations are localized within the central DNA-binding domain of TP53, impairing DNA binding and transactivation of target genes²¹.

The clinical importance of *TP53* abnormalities in CLL is tightly linked to the poor prognosis marked by this genetic lesion and its close association with chemorefractoriness, as documented by a number of observational studies and prospective trials led in both the chemotherapy and immunochemotherapy era. Among newly diagnosed CLL, patients harboring 17p13 deletion have the worst outcome, with an estimated median overall survival (OS) of 3-5 years (~30% of cases are alive at 10 years, accounting for a ~70% reduction of the expected survival compared to the general population)^{4,8}. This is consistent with the notion that newly diagnosed CLL with 17p13 deletion frequently harbor unmutated *IGHV* genes, present in advanced stage or show a rapidly progressive disease that requires treatment shortly after diagnosis (median time to first treat-

ment of 9 months). However, it is important to stress that there is a small subgroup of patients with 17p13 deletion (and mostly mutated *IGHV* genes) who may exhibit stable disease for years without treatment indications.

The outcome of patients with 17p13 deletion and need for treatment is poor and there are no definitive data on the most efficacious first-line treatment. Patients with 17p13 deletion will very rarely achieve complete response after chemo/chemoimmuno-therapy (Table 1), as demonstrated by: i) the German CLL Study Group CLL8 trial¹¹, in which CLL harboring 17p13 deletion had a complete response rate of only 2% compared to 21% and 44% among CLL lacking 17p13 deletion and treated with fludarabine-cyclophosphamide (FC) or fludarabine-cyclophosphamide-rituximab (FCR), respectively; and ii) the UK Leukemia Research Foundation CLL4 trial¹⁰, in which the group of patients with 17p13 deletion had a very low rate (5%) of complete/nodular partial responses. Such poor response to chemo+/- immunotherapy translates into an estimated OS in the range of 2 to 3 years from the time of front-line treatment for 17p13 deleted patients^{10,11}.

A number of retrospective studies suggest that, in addition to 17p13 deletion, also *TP53* mutations, even in the absence of 17p13 deletion, predict poor outcome in CLL. These observations have been confirmed within the frame of two large prospective studies conducted in the setting of previously untreated cases (Table 1). In the UK Leukemia Research Foundation CLL4 trial¹⁸, *TP53* mutated patients have a poorer response rate (27% vs. 83%), shorter progression free survival (PFS) (5-year PFS: 5% vs. 17%) and shorter OS (5-year OS: 20% vs. 59%) compared to *TP53* wild type patients. In the CLL8 trial of the German CLL study Group²⁰, the prognostic impact of *TP53* mutation is observed for all efficacy end points of the trial and is similarly evident in both treatment groups (FC and FCR), suggesting that the addition of rituximab to chemotherapy does not alleviate the negative impact of *TP53* lesions. Indeed, *TP53* mutated patients are less likely to respond (FC arm: 51% vs. 92%; FCR arm: 98% vs. 75%) and reach minimal residual disease (MRD) negativity (FC arm: 7% vs. 37%; FCR arm: 18% vs. 68%) compared to *TP53* wild type patients. Accordingly, *TP53* mutated patients show a significantly shorter PFS (FC arm: 12 months vs.

Table 1. Clinical outcome of CLL patients harboring high risk genetic lesions^a

	TFT	ORR	MRD neg	PFS	OS
Watch and wait¹⁶					
<i>TP53</i> mutation/deletion	34 months	-	-	-	-
<i>NOTCH1</i> mutation	39 months	-	-	-	-
<i>SF3B1</i> mutation	37 months	-	-	-	-
<i>11q</i> deletion	32 months	-	-	-	-
FC^{11,20}					
<i>17p</i> deletion	-	34%	0%	0% at 3 years	37% at 3 years
<i>TP53</i> mutation	-	51%	7%	12 months	30 months
<i>NOTCH1</i> mutation	-	87%	50%	33 months	85 months
<i>SF3B1</i> mutation	-	89%	23%	18 months	75 months
<i>11q</i> deletion	-	87%	23%	32% at 3 years	83% at 3 years
FCR^{11,20}					
<i>17p</i> deletion	-	68%	14%	18% at 3 years	38% at 3 years
<i>TP53</i> mutation	-	75%	18%	15 months	42 months
<i>NOTCH1</i> mutation	-	90%	46%	34 months	79 months
<i>SF3B1</i> mutation	-	96%	66%	42 months	NR
<i>11q</i> deletion	-	93%	64%	64% at 3 years	94% at 3 years
CLB, F, FC⁵¹					
<i>TP53</i> mutation/deletion	-	-	-	4 months	26 months
<i>NOTCH1</i> mutation	-	-	-	22 months	72 months
<i>SF3B1</i> mutation	-	-	-	27 months	58 months

^aFC: fludarabine, cyclophosphamide; FCR: fludarabine, cyclophosphamide, rituximab; F: fludarabine; CLB: chloramucil; NR: not reached; TFT: time to first treatment; ORR: overall response rate; MRD: minimal residual disease; PFS: progression free survival; OS: overall survival.

35 months; FCR arm: 15 months vs. 59 months) and OS (FC arm: 30 months vs. 89 months; FCR arm: median not reached vs. 42 months) than *TP53* wild type cases.

Combinations of alemtuzumab with steroids are amongst the most potent therapies for patients harboring *TP53* abnormalities, yielding response rates of 88% in previously untreated cases, with 65% of cases achieving a complete response²². The BTK inhibitor ibrutinib as single agent or combined to rituximab induces a response rate of response of 68-97% in patients with *TP53* abnormalities²³⁻²⁶. A similar proportion of responses is observed with the PI3K δ inhibitor idelalisib combined to rituximab²⁷. Although these results appear significantly better than every previous historical control in CLL with *TP53* abnormalities, alemtuzumab, ibrutinib and idelalisib *per se* do not promise long-lasting remissions. Therefore, these patients should be considered for alternative treatments within clinical trials whenever possible. Use of FCR, alemtuzumab-based regimens or new drugs may be considered as a de-bulking strategy, but allogeneic stem cell transplantation should still be offered and discussed in patients with sufficient physical fitness and an available donor²⁸.

Given their value as biomarkers of treatment resistance, current guidelines recommend to test 17p13 deletion and *TP53* mutations in CLL patients requiring therapy²⁹⁻³². Sanger sequencing is the currently recommended approach for *TP53* mutation analysis³⁰. However, due to its limited sensitivity, conventional Sanger sequencing misclassifies as wild type those CLL cases harboring *TP53* mutations of low clonal abundance (< 10% of the alleles). Such small *TP53* mutated subclones occur in a significant fraction of CLL, have the same unfavorable prognostic impact as clonal *TP53* defects, and anticipate the development of a chemorefractory phenotype among CLL patients requiring treatment³³. Thanks to its high sensitivity (down to 1-0.1%), deep next generation sequencing is capable of detecting these minor, but clinically relevant, *TP53* mutated subclones. Therefore, deep next generation sequencing should be considered as a useful tool for a comprehensive assessment of *TP53* disruption in CLL.

The *ATM* gene encodes a nuclear serine/threonine kinase whose activity is induced by chromosomal double-strand breaks that arise endogenously or after exposure to DNA-damaging agents, including chemotherapeutic drugs. *ATM* protects the integrity of the genome by regulating the cell-cycle arrest at G1/S and G2/M to prevent processing of damaged DNA, and by activating DNA-repair pathways or, alternatively, inducing apoptosis if the DNA damage cannot be repaired. As for *TP53*, the *ATM* gene is inactivated in CLL by both deletion and/or somatic mutations, which result in impaired DNA damage responses. Deletion of 11q22-23 always includes *ATM* and occurs in less than

10% newly diagnosed CLL, while its prevalence rises to ~20% at the time of first treatment^{4,10,11}. Deletion 11q22-23 co-occurs with *ATM* mutations in 30-40% of patients. *ATM* mutations generally consist in a mixture of missense substitutions distributed across the *ATM* coding sequence, with no clear hotspots, and have been observed in ~10-15% of newly diagnosed patients and in ~15% of progressive CLL requiring first treatment³⁴⁻³⁶. By combining mutations and deletions, genetic lesions of *ATM* occur in ~20% of diagnostic samples of CLL and in ~35% cases requiring first treatment.

From a clinical perspective, the presence of *ATM* deletion at the time of CLL presentation identifies a group of patients with intermediate-risk disease (~40% of cases are alive at 10 years, accounting for a ~50% reduction of the expected survival compared to the general population)⁸. Among CLL requiring treatment, the presence of 11q22-23 deletion alone or combined to *ATM* mutations associates with poor response to chemotherapy. In the UK Leukemia Research Found CLL4 trial,³⁶ where CLL were treated with various chemotherapy approaches not including an anti-CD20 monoclonal antibody, patients with both *ATM* mutation and 11q22-q23 deletion show a significantly reduced response rate and PFS (46% and 7 months, respectively) compared to those with wild type *ATM* (84% and 28 months, respectively), 11q22-q23 deletion alone (72% and 17 months, respectively), or *ATM* mutation alone (87% and 30 months, respectively). Consistently, in the same trial, the OS for patients with biallelic *ATM* alterations is significantly reduced compared to those with wild type *ATM* or *ATM* mutations alone (42 vs. 85 vs. 77 months, respectively). The addition of rituximab to chemotherapy significantly improves the outcome of CLL patients harboring *ATM* lesions. In the CLL8 trial of the German CLL study Group¹¹, treatment with FCR increases both the complete response rate (51% vs. 15%) and PFS (64% vs. 32% at 3 years) in CLL patients with 11q22-23 deletion compared to FC alone. However, even among CLL treated with FCR, 11q22-23 deletion still remains an adverse factor that, similar to unmutated *IGHV* genes, identifies a group of patients with intermediate-risk disease that are projected to progress in a relatively short time¹¹.

Signaling pathways

At variance with other B-cell tumors, genes encoding for components of the BCR signaling machinery are usually not targeted by somatic mutations in unselected CLL. The introduction of targeted drugs inhibiting BCR signaling is changing the genetics of the disease, and has disclosed the acquisition of previously unexpected drug resistant mutations in BCR pathway genes, including mutations affecting the *BTK* binding site of ibrutinib

or gain-of-function mutations in *PLCG2*^{37,38}. Ibrutinib resistant mutations of the BCR pathway are not detectable at the baseline before ibrutinib exposure, as well as in any ibrutinib naïve CLL, thus indicating that they are biologically irrelevant in the absence of selective pressures imposed by the drug³⁹.

The NOTCH receptor genes encode a family of heterodimeric transmembrane proteins (NOTCH1 to NOTCH4) that function as ligand-activated transcription factors. When the NOTCH receptors interact with their ligands through the extracellular subunit, two consecutive proteolytic cleavages of the NOTCH proteins are initiated and lead to pathway activation. Upon activation, the cleaved intracellular portion of the NOTCH receptors (ICN) translocates into the nucleus where it recruits a transcriptional complex to modify the expression of a number of target genes, including *MYC* and NF- κ B signaling components. The most prominent mechanism of NOTCH signal suppression is operated through its PEST domain of the ICN, which is recognized by the FBXW7 ubiquitin protein ligase and directed towards proteasomal degradation.

In CLL, two genes of the NOTCH pathway are recurrently mutated, namely *NOTCH1* and *FBXW7*. *NOTCH1* mutations characterize ~10% of unselected CLL and are mainly represented by frameshift or non-sense events clustering within exon 34, including the highly recurrent c.7544_7545delCT deletion (~80% of all mutations)^{1,13,16,40}. By taking advantage of this mutational spectrum, PCR based strategies not requiring DNA sequencing have been designed for the rapid detection of the c.7544_7545delCT mutation for diagnostic and prognostic purposes.

NOTCH1 mutations in CLL are selected to disrupt the PEST domain of the protein, resulting in NOTCH1 impaired degradation, stabilization of the active ICN, and deregulated NOTCH signaling¹. Consistent with this notion, a number of cellular pathways, including those controlling cell metabolism and cell cycle progression, are deregulated in CLL harboring *NOTCH1* mutations^{41,42}. *NOTCH1* is preferentially targeted in specific biological groups of CLL. In fact, *NOTCH1* mutations are significantly more common in CLL with unmutated *IGHV* genes, and are enriched in CLL harboring +12^{42,43}. Mutations of *FBXW7* have been detected in ~2% of unselected CLL and are predicted to cause loss of function by disrupting the WD40 domain of the protein. *FBXW7* mutations are likely to functionally mimic the PEST domain mutations of *NOTCH1*, thus resulting into constitutively active NOTCH signaling. Consistently, *FBXW7* mutations in CLL distribute in a mutually exclusive manner with *NOTCH1* mutations and, similar to *NOTCH1* mutations, cluster with cases harboring unmutated *IGHV* genes and +12³.

From a clinical perspective, the presence of *NOTCH1* mutations at the time of CLL presentation

identifies a group of patients with intermediate-risk disease (~40% of cases are alive at 10 years, accounting for a ~50% reduction of the expected survival compared to the general population) and those in whom CLL is more likely to transform into RS (cumulative incidence of transformation at 10 years of ~50%)^{3,40,41}. Among CLL requiring treatment, cases harboring *NOTCH1* mutation seem not to benefit from the addition of an anti-CD20 monoclonal antibody to chemotherapy. Indeed, among CLL harboring *NOTCH1* mutations, treatment with FCR does not result into the expected increase in MRD response (46% vs. 50%) nor into an improvement in PFS (median 34 months vs. 33 months) or OS (median 79 months vs. 85 months) compared to treatment with the sole FC (Table 1)²¹. Similarly, among *NOTCH1* mutated CLL, treatment with chlorambucil plus ofatumumab does not result into an improvement in PFS (median 17 months vs. 10 months) compared to treatment with the sole chlorambucil⁴⁴. Although lower efficacy of therapeutic anti-CD20 monoclonal antibodies in *NOTCH1* mutated CLL seems to be consistent across two independent trials, the precise biological mechanisms underlying this clinical observation still remain to be clarified. Elucidation of the mechanistic basis would strengthen the rationale for guiding treatment based on *NOTCH1* mutation status. Furthermore, it will be interesting to see if a similar observation can be made with other anti-CD20 monoclonal antibodies.

In CLL, NF- κ B signaling is generally upregulated through specific interactions between protective microenvironmental niches and CLL cells. At least in a fraction of cases, CLL gain active NF- κ B signaling by mutating NF- κ B genes. The non-canonical NF- κ B pathway is engaged by CD40 and BAFF receptors. Upon receptor binding, the TRAF3/MAP3K14-TRAF2/BIRC3 negative regulatory complex of non-canonical NF- κ B signaling is disrupted, allowing the cytoplasmic release and stabilization of MAP3K14, the central activating kinase of non-canonical NF- κ B signaling. The stabilized MAP3K14 activates the IKK α kinase, which in turns directly phosphorylates NF- κ B/p100, inducing partial proteolysis of p100 to p52 by the proteasome. The p52 protein dimerizes with RelB to translocate into the nucleus, where it regulates gene transcription.

The Baculoviral IAP repeat containing 3 (*BIRC3*) gene, which cooperates in the TRAF3/MAP3K14-TRAF2/BIRC3 negative regulatory complex of non-canonical NF- κ B signaling, is mutated in ~2% of unselected CLL^{16,45}. At the biochemical level, *BIRC3* mutations cause the truncation of the C-terminal RING domain of the BIRC3 protein, whose E3 ubiquitin ligase activity is essential for switching off MAP3K14 through proteasomal degradation, thus leading to constitutive non-canonical NF- κ B activation⁴⁵. From a clinical standpoint, *BIRC3* mutations identify a genetic subgroup of cases

characterized by poor risk disease⁴⁵. Also, *BIRC3* mutations, confer complete resistance to ibrutinib *in vitro* studies, consistent with the ability of mutant *BIRC3* to activate NF- κ B signaling downstream the BCR and in a BTK independent fashion⁴⁶.

NF- κ B comprises a small family of transcription factors, including the NF- κ B/Rel members RelA, RelB, c-Rel, NF- κ B1, and NF- κ B2. These proteins are kept inactive by cytoplasmic association with the I κ B inhibitory proteins. The NF- κ B inhibitor epsilon (NFKBIE) belongs to the I κ B inhibitory protein family and counteracts NF- κ B activation via cytoplasmic retention of the Rel proteins. The *NFKBIE* gene is affected by a recurrent 4bp deletion in ~5% unselected CLL^{47,48}. *NFKBIE* mutation results in protein truncation, reduced inhibitory interaction with the Rel transcription factor, and enhanced NF- κ B activation⁴⁸. Though the precise clinical implication of *NFKBIE* mutations remains to be clarified, their enrichment among CLL presenting in advanced stage suggests that they might be involved in disease progression.

In B-cells, Toll-like receptors (TLR) are central to the BCR-independent response to antigens by sensing a variety of pathogen-associated molecular patterns derived from bacteria, viruses, and fungi. Adaptor proteins, including the myeloid differentiation factor 88 (MYD88), are essential for initiating the TLR signaling. MYD88 has a modular structure with a death domain (DD) at the N terminus, and a Toll-IL-1 receptor (TIR) domain at the C terminus. The TIR domain of MYD88 is crucial for signal transduction since it mediates contacts with the intracellular TIR domains of the TLRs upon signaling activation. The DD domain allows oligomerization of the active MYD88 and its interaction with the respective DD of the serine-threonine kinases IRAK1-4, thus resulting in a multimeric complex. This complex propagates the signal and leads to activation of a series of cascades and transcription factors, such as NF- κ B, AP-1 and STAT3. Most *MYD88* mutations in CLL are represented by the L265P missense substitution, which affects the evolutionarily conserved beta-beta loop of the TIR domain of MYD88, suggesting that it has been selected to change the structure of MYD88 to allow spontaneous homodimerization and recruitment of IRAK1 and IRAK4⁴¹. Consistently, in B-cell tumors, mutant *MYD88* results in uncontrolled formation of the MYD88/IRAK complex, which translates into the recruitment of TRAF6, constitutive phosphorylation of TAK1 and, ultimately, the elevation of NF- κ B activity and cytokine secretion. *MYD88* gene mutations occur in ~3% of unselected CLL, while they are enriched in a specific clinical subgroup of patients characterized by young age at presentation, mutated *IGHV* genes and expected survival similar to that of the age-sex matched normal population⁴⁹.

Splicing

Splicing of precursor messenger RNA (pre-mRNA) and formation of mature mRNA through the removal of introns in protein-encoding genes is carried out in the nucleus by the spliceosome, a complex of five small nuclear ribonucleoproteins (snRNPs). These spliceosome components are required for normal constitutive and alternative splicing. Alternative splicing can generate numerous transcript variants for each gene, thus adding to genomic complexity and potentially contributing to tumorigenesis. *SF3B1* is a core component of the U2 snRNP, that recognizes the 3' splice site at the intron-exon junctions and orchestrates the excision of introns from pre-mRNA to form mature mRNA. Structurally, the SF3B1 protein has two well-defined regions: *i*) the N-terminal amino acid region, that contains several protein-binding motifs and functions as a scaffold to facilitate its interaction with other splicing factors such as U2AF65 and SF3B14; *ii*) the C-terminal region, that contains 22 non-identical tandem repeats of the HEAT motif that meander around the SF3b complex, enclosing SF3B14.

SF3B1 mutations occur with a prevalence that ranges from 7% to 10% of unselected CLL, are enriched in cases harboring unmutated *IGHV* genes, and tend to co-occur with *ATM* deletion or mutation^{2,3,50}. *SF3B1* mutations in CLL are generally represented by missense nucleotide changes that recurrently target hotspots (codons 662, 666, 700, 704, 742), with a single amino-acid substitution (K700E) accounting for ~50% of all *SF3B1* mutations.

The pathogenic role of *SF3B1* mutations is supported by their clustering in evolutionarily conserved hotspots within the inner surfaces of the HEAT structure at the supposed sites of interaction with RNA and cofactors². This observation suggests that mutation in *SF3B1* could possibly mediate alteration in its normal function through change in the physical interactions of the SF3B1 protein with its binding partners, thus leading to a defective spliceosome complex that is incapable of performing the correct splicing steps³.

From a clinical perspective, the presence of *SF3B1* mutations at the time of CLL presentation identifies a group of patients with intermediate-risk disease (40% of cases are alive at 10 years, accounting for a ~50% reduction of the expected survival compared to the general population)⁸. Among CLL requiring treatment, *SF3B1* mutations can potentially help refine prognostication of treatment relapse, though they do not represent a predictive biomarker for treatment tailoring (Table 1). Indeed, in the UK Leukemia Research Found CLL4 trial⁵¹, the *SF3B1* status does not impact on the chance of achieving responses to chemotherapy, though patients harboring *SF3B1* mutations show a shorter PFS

(29 months vs. 39 months) than *SF3B1* wild type cases. Consistently, in the CLL8 trial of the German CLL Study Group²⁰, the *SF3B1* status does not impact on the chance of achieving clinical or MRD responses, but strongly affects PFS, that is shorter in patients harboring *SF3B1* mutations than in wild type cases, independent of whether they received FC (28 months vs. 34 months) or FCR (42 months vs. 59 months).

MYC network

MYC is a transcription factor that lies at the crossroads of cell-cycle and cell growth by acting downstream of many signal transduction pathways. Functional studies have documented that *MYC* deregulation in CLL is part of a program of downstream events mainly driven by microenvironmental interactions. However, in a fraction of CLL, the *MYC* gene may be activated in a microenvironment-independent fashion by somatic structural lesions, including translocations with immunoglobulin and non-immunoglobulin loci (~1% of unselected CLL), gain/amplification at 8q24 (~5% of unselected CLL), and point mutations (~1% of unselected CLL)⁵²⁻⁵⁴. *MYC* lesions associate with progressive CLL and accumulate in the advanced phases of the disease. In addition, consistent with a more general role of *MYC* deregulation in driving the transformation from indolent to aggressive B-cell lymphoproliferations, *MYC* abnormalities are particularly enriched in ~30-40% of RS cases⁵⁵.

MYC belongs to a transcription regulating network that also includes *MAX*, a cofactor required for DNA binding by the various members of this network, as well as a group of putative *MYC* antagonists, namely *MNT*, *MXD1-4* and *MGA*. In physiological conditions, the *MYC* protein activates gene transcription through heterodimerization with *MAX* and then by binding to the E-box DNA recognition sequences in its target gene promoters. Conversely, heterodimers of *MAX* with *MNT*, *MXD1-4* and *MGA* antagonize *MYC*-dependent gene expression regulation by transcriptional repression of the same E-box sequences. On these bases, the *MYC* oncoprotein transforming ability depends also on the balance between the *MYC*-*MAX* and *MNT*/*MXD1-4*/*MGA*-*MAX* complexes. In CLL, this balance may be disrupted not only by *MYC* activating lesions, but also by alterations targeting *MYC* antagonists. Indeed, the *MYC* antagonist *MNT* is known to be recurrently affected by focal losses in a small proportion of CLL, as documented by high resolution SNP array⁵⁴. In addition, *MGA*, another *MYC* oncoprotein antagonist, is targeted by focal and recurrent gene deletions or truncating point mutations in a fraction of CLL patients⁵⁶. Though the clinical impact of these lesions needs to be formally defined in CLL, *MGA* abnormalities seem to be enriched in cases displaying high risk clinical fea-

tures, namely fludarabine-refractoriness or transformation into RS.

Overall, these findings suggest multiple genetic mechanisms of *MYC* activation in CLL that, albeit occurring at low frequency as single events, may account for a significant fraction of cases when integrated into a common pathway.

Telomere function

Telomeres are specialized DNA-protein structures that cap the ends of all eukaryotic chromosomes and have important roles in genome stability. They are maintained by the enzyme telomerase and protected by the shelterin complex, composed of the duplex telomere-binding proteins TRF1 and TRF2 and the single-stranded telomere-binding protein POT1. *POT1* mutations occur in 1-5% of unselected CLL, while are enriched in *IGHV* unmutated cases and in cases presenting in advanced stage, thus suggesting an association between *POT1* mutations and disease progression. POT1 contains two highly conserved oligonucleotide/oligosaccharide-binding (OB) folds through which it binds to the 3' terminus of the single-stranded overhang of the telomere. The majority of *POT1* mutations in CLL cluster within both OB folds, which abrogates the binding of POT1 to telomeric single-stranded DNA. As a consequence, *POT1* mutations induce a dysfunctional telomeric phenotype resulting into the accumulation of chromosomal alterations. On these bases, *POT1* mutations are postulated to be one of the mechanisms promoting the genomic instability observed in a fraction of CLL⁵⁷.

Conclusion and perspectives

In the era of personalized medicine, the challenges for the treatment of patients with CLL will involve correctly matching targeted therapies to the unique genetic and clonal composition of each individual tumor. Genomic studies have produced an unprecedented body of knowledge regarding the cellular programs involved in CLL pathogenesis and their implications as both prognostic/predictive factors and actionable targets. Next generation sequencing approaches have the potential to make testing of these genetic markers cheaper, faster and more widely available.

Clonal evolution studies have revealed those pathways that are altered by early genetic events in CLL and are conceivably responsible of driving the founder clone of the tumor, thus representing ideal therapeutic targets for treatments aiming at disease eradication. Technical advances including ultra-deep next generation sequencing have allowed to reach deep levels of resolution of the genetic portrait of CLL providing a precise definition

of its subclonal genetic architecture⁵⁸. This approach has shown that small subclones harboring drug resistant mutations may be admixed with a large number of wild type cells, thus being far below the levels of detection of conventional mutation assays. Treatments that do not take into account such clonal diversity and target only the dominant clone leave the possibility that one of these minor and resistant clones will then replicate and become dominant, leading to recurrence of the tumor. Thus, targeting both minor and dominant CLL clones through drug combinations incorporating novel agents could represent a pivotal strategy for treating CLL in the most efficient way.

Finally, beside the identification of actionable targets, genomic studies are also revealing new and previously unexpected mechanisms of targeted drug resistance in CLL, as exemplified by the discovery of mutations associated ibrutinib-refractoriness.

References

- Fabbri G, Rasi S, Rossi D, Trifonov V, Khiabani H, Ma J, et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med* 2011;208(7):1389-401.
- Quesada V, Conde L, Villamor N, Ordóñez GR, Jares P, Bassaganyas L, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 2011;44(1):47-52.
- Wang L, Lawrence MS, Wan Y, Stojanov P, Sougnez C, Stevenson K, et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2011;365(26):2497-506.
- Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000;343(26):1910-6.
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(24):15524-9.
- Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(39):13944-9.
- Klein U, Lia M, Crespo M, Siegel R, Shen Q, Mo T, et al. The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 2010;17(1):28-40.
- Rossi D, Rasi S, Spina V, Brusca A, Monti S, Ciardullo C, et al. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2013;121(8):1403-12.
- Seymour J. ABT-199 for Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Adv Hematol Oncol* 2014;12(10):698-700.
- Catovsky D, Richards S, Matutes E, Oscier D, Dyer MJ, Bezares RF, et al. Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 Trial): a randomised controlled trial. *Lancet* 2007;370(9583):230-9.
- Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2010;376(9747):1164-74.
- Stilgenbauer S, Zenz T, Winkler D, Bühler A, Schlenk RF, Groner S, et al. Subcutaneous alemtuzumab in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia: clinical results and prognostic marker analyses from the CLL2H study of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol* 2009;27(24):3994-4001.
- Rossi D, Spina V, Deambrogi C, Rasi S, Laurenti L, Stamatopoulos K, et al. The genetics of Richter syndrome reveals disease heterogeneity and predicts survival after transformation. *Blood* 2011;117(12):3391-401.
- Zenz T, Kröber A, Scherer K, Häbe S, Bühler A, Benner A, et al. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood* 2008;112(8):3322-9.
- Rossi D, Cerri M, Deambrogi C, Sozzi E, Cresta S, Rasi S, et al. The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness. *Clin Cancer Res* 2009;15(3):995-1004.
- Baliakas P, Hadzidimitriou A, Sutton LA, Rossi D, Minga E, Villamor N, et al. Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2015;29(2):329-36.
- Zenz T, Eichhorst B, Busch R, Denzel T, Häbe S, Winkler D, et al. TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2010;28(29):4473-9.
- González D, Martínez P, Wade R, Hockley S, Oscier D, Matutes E, et al. Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial. *J Clin Oncol* 2011;29(16):2223-9.
- Schnaiter A, Paschka P, Rossi M, Zenz T, Bühler A, Winkler D, et al. NOTCH1, SF3B1, and TP53 mutations in fludarabine-refractory CLL patients treated with alemtuzumab: results from the CLL2H trial of the GCLLSG. *Blood* 2013;122(7):1266-70.
- Stilgenbauer S, Schnaiter A, Paschka P, Zenz T, Rossi M, Döhner K, et al. Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: results from the CLL8 trial. *Blood* 2014;123(21):3247-54.
- Zenz T, Vollmer D, Trbusek M, Smardova J, Benner A, Soussi T, et al. TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations. *Leukemia* 2010;24(12):2072-9.
- Pettitt AR, Jackson R, Carruthers S, Dodd J, Dodd S, Oates M, et al. Alemtuzumab in combination with methylprednisolone is a highly effective induction regimen for patients with chronic lymphocytic leukemia and deletion of TP53: final results of the national cancer research institute CLL206 trial. *J Clin Oncol* 2012;30(14):1647-55.
- Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, Flinn IW, Burger JA, Blum KA, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2013;369(1):32-42.
- Burger JA, Keating MJ, Wierda WG, Hartmann E, Hoellenriegel J, Rosin NY, et al. Safety and activity of ibrutinib plus rituximab for patients with high-risk chronic lymphocytic leukaemia: a single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol* 2014;15(10):1090-9.
- Byrd JC, Brown JR, O'Brien S, Barrientos JC, Kay NE, Reddy NM, et al. Ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 2014;371(3):213-23.
- Farooqui MZ, Valdez J, Martyr S, Aue G, Saba N, Niemann CU, et al. Ibrutinib for previously untreated and relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with TP53 aberrations: a phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol* 2015;16(2):169-76.
- Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, Cheson BD, Pagel JM, Hillmen P, et al. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2014;370(11):997-1007.

28. Dreger P, Schetelig J, Andersen N, Corradini P, van Gelder M, Gribben J, et al. Managing high-risk CLL during transition to a new treatment era: stem cell transplantation or novel agents? *Blood* 2014;124(26):3841-9.
29. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, 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* 2008;111(12):5446-56.
30. Pospisilova S, Gonzalez D, Malcikova J, Trbusek M, Rossi D, Kater AP, et al. ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2012;26(7):1458-61.
31. Ghielmini M, Vitolo U, Kimby E, Montoto S, Walewski J, Pfreundschuh M, et al. ESMO Guidelines consensus conference on malignant lymphoma 2011 part 1: diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), follicular lymphoma (FL) and chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Ann Oncol* 2013;24(3):561-76.
32. Zelenetz AD, Gordon LI, Wierda WG, Abramson JS, Advani RH, Andreadis CB, et al. Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma, version 1.2015. *J Natl Compr Canc Netw* 2015;13(3):326-62.
33. Rossi D, Khiabani H, Spina V, Ciardullo C, Brusca A, Famà R, et al. Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2014;123(14):2139-47.
34. Guarini A, Marinelli M, Tavolaro S, Bellacchio E, Magliozzi M, Chiaretti S, et al. ATM gene alterations in chronic lymphocytic leukemia patients induce a distinct gene expression profile and predict disease progression. *Haematologica* 2012;97(1):47-55.
35. Ouillette P, Li J, Shaknovich R, Li Y, Melnick A, Shedden K, et al. Incidence and clinical implications of ATM aberrations in chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2012;51(12):1125-32.
36. Skowronska A, Parker A, Ahmed G, Oldreive C, Davis Z, Richards S, et al. Biallelic ATM inactivation significantly reduces survival in patients treated on the United Kingdom Leukemia Research Fund Chronic Lymphocytic Leukemia 4 trial. *J Clin Oncol* 2012;30(36):4524-32.
37. Furman RR, Cheng S, Lu P, Setty M, Pérez AR, Guo A, et al. Ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2014;370(24):2352-4.
38. Woyach JA, Furman RR, Liu TM, Ozer HG, Zapatka M, Ruppert AS, et al. Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *N Engl J Med* 2014;370(24):2286-94.
39. Famà R, Bomben R, Rasi S, Dal Bo M, Ciardullo C, Monti S, et al. Ibrutinib-naïve chronic lymphocytic leukemia lacks Bruton tyrosine kinase mutations associated with treatment resistance. *Blood* 2014;124(25):3831-3.
40. Rossi D, Rasi S, Fabbri G, Spina V, Fangazio M, Forconi F, et al. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012;119(2):521-9.
41. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez GR, Villamor N, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2011;475(7354):101-5.
42. Del Giudice I, Rossi D, Chiaretti S, Marinelli M, Tavolaro S, Gabrielli S, et al. NOTCH1 mutations in +12 chronic lymphocytic leukemia (CLL) confer an unfavorable prognosis, induce a distinctive transcriptional profiling and refine the intermediate prognosis of +12 CLL. *Haematologica* 2012;97(3):437-41.
43. Balatti V, Bottoni A, Palamarchuk A, Alder H, Rassenti LZ, Kipps TJ, et al. NOTCH1 mutations in CLL associated with trisomy 12. *Blood* 2012;119(2):329-31.
44. Tausch E, Beck P, Schlenk RF, Kless S, Galler C, Hillmen P, et al. NOTCH1 Mutation and Treatment Outcome In CLL Patients Treated With Chlorambucil (Chl) Or Ofatumumab-Chl (O-Chl): Results From The Phase III Study Complement 1 (OMB110911). *Blood* 2013;122(21):527.
45. Rossi D, Fangazio M, Rasi S, Vaisitti T, Monti S, Cresta S, et al. Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012;119(12):2854-62.
46. Rahal R, Frick M, Romero R, Korn JM, Kridel R, Chan FC, et al. Pharmacological and genomic profiling identifies NF-κB-targeted treatment strategies for mantle cell lymphoma. *Nat Med* 2014;20(1):87-92.
47. Damm F, Mylonas E, Cosson A, Yoshida K, Della Valle V, Mouly E, et al. Acquired initiating mutations in early hematopoietic cells of CLL patients. *Cancer Discov* 2014;4(9):1088-101.
48. Mansouri L, Sutton LA, Ljungstrom V, Bondza S, Armgarden L, Bhoi S, et al. Recurrent Mutations within the Nfkb gene: A Novel Mechanism for NF-κB Deregulation in Aggressive Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* 2014;124(21):297.
49. Martínez-Trillos A, Pinyol M, Navarro A, Aymerich M, Jares P, Juan M, et al. Mutations in TLR/MYD88 pathway identify a subset of young chronic lymphocytic leukemia patients with favorable outcome. *Blood* 2014;123(24):3790-6.
50. Rossi D, Brusca A, Spina V, Rasi S, Khiabani H, Messina M, et al. Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood* 2011;118(26):6904-8.
51. Oscier DG, Rose-Zerilli MJ, Winkelmann N, González de Castro D, Gómez B, et al. The clinical significance of NOTCH1 and SF3B1 mutations in the UK LRF CLL4 trial. *Blood* 2013;121(3):468-75.
52. Huh YO, Lin KI, Vega F, et al. MYC translocation in chronic lymphocytic leukaemia is associated with increased prolymphocytes and a poor prognosis. *Br J Haematol* 2008;142:36-44.
53. Brown JR, Hanna M, Tesar B, et al. Integrative genomic analysis implicates gain of PIK3CA at 3q26 and MYC at 8q24 in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2012;18:3791-802.
54. Edelmann J, Holzmann K, Miller F, et al. High-resolution genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia reveals new recurrent genomic alterations. *Blood* 2012;120:4783-94.
55. Fabbri G, Khiabani H, Holmes AB, et al. Genetic lesions associated with chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *J Exp Med* 2013;210:2273-88.
56. De Paoli L, Cerri M, Monti S, et al. MGA, a suppressor of MYC, is recurrently inactivated in high risk chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2013;54:1087-90.
57. Ramsay AJ, Quesada V, Foronda M, et al. POT1 mutations cause telomere dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 2013;45:526-30.
58. Landau DA, Carter SL, Stojanov P, McKenna A, Stevenson K, Lawrence MS, et al. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* 2013;152(4):714-26.

Leucemia linfática crónica: de la genómica al tratamiento. Tratamiento actual de la LLC

P. ABRISQUETA, F. BOSCH

Servicio de Hematología. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona

Introducción

Durante los últimos años hemos asistido al desarrollo creciente de nuevos fármacos que están cambiando el enfoque terapéutico de los pacientes con síndromes linfoproliferativos, siendo sin duda la leucemia linfática crónica (LLC) uno de los ejemplos más llamativos de este progreso. Hace ya una década, las combinaciones de inmunquimioterapia, particularmente rituximab junto con fludarabina y ciclofosfamida (FCR), revolucionaron el tratamiento de esta enfermedad al conseguir mejorar la tasa de respuestas y la calidad de las mismas, lo que se tradujo en mayores intervalos de supervivencia libre de progresión (SLP) y en una mayor supervivencia de los enfermos^{1,2}. Sin embargo, a pesar de la mejoría que ha supuesto el desarrollo de estos regímenes, un porcentaje importante de los pacientes con LLC no se van a beneficiar de estos tratamientos. En primer lugar, estas combinaciones resultan tóxicas para algunos enfermos. Además, estas combinaciones obtienen resultados claramente insatisfactorios en subgrupos de pacientes con características biológicas de alto riesgo, en especial en pacientes sin mutaciones de los genes de las inmunoglobulinas o alteraciones de *TP53*. Como consecuencia, en los últimos años se han desarrollado nuevas combinaciones de inmunquimioterapia con un perfil de toxicidad más tolerable, así como un conjunto de nuevos fármacos dirigidos contra dianas biológicas propias de la LLC, particularmente los inhibidores de cinasas capaces de bloquear las señales derivadas del receptor de célula B (*B-cell receptor*, BCR). Con ello se han ampliado las posibilidades terapéuticas disponibles en esta enfermedad y se ha permitido optimizar el tratamiento de los pacientes con LLC en función de sus características clínicas (comorbilidades) y biológicas (factores de riesgo). En este escenario es importante tener en cuenta diversos factores a la hora de la elección del tratamiento más adecuado: el estado de la enfermedad (estable vs. activa) y del tratamiento (respuesta vs. refractariedad al tratamiento previo), el estado general del paciente y sus comorbilidades, y factores de riesgo

biológicos de la enfermedad, en especial las alteraciones de *TP53*.

Pacientes asintomáticos en estadios iniciales de la enfermedad

En el momento actual, alrededor del 80-90% de diagnósticos de LLC se realizan en pacientes asintomáticos y en estadios iniciales (Binet A/Rai 0-I) de la enfermedad. Una gran parte de estos enfermos presentarán un curso clínico indolente y una esperanza de vida similar a la de la población general. El diagnóstico de LLC no conlleva necesariamente el inicio de un tratamiento. En este sentido, existe actualmente un consenso generalizado en mantener una conducta expectante en los pacientes asintomáticos y con enfermedad estable, con independencia de la presencia o no de factores biológicos de pronóstico adverso, incluyendo las alteraciones de *TP53*, hasta que se observen signos claros de actividad de la enfermedad³. Esta actitud se basa en que el tratamiento en estadios precoces con agentes quimioterápicos clásicos (clorambucilo) no ha demostrado suponer ningún cambio en la historia natural de la enfermedad ni en la expectativa de vida de los pacientes⁴. Cabe destacar, sin embargo, que se desconoce todavía el impacto que el tratamiento en estadios precoces de la enfermedad con nuevos fármacos con mecanismos diana más específicos, y con un perfil de toxicidad más favorable, podría tener en la evolución de los enfermos de LLC, particularmente en aquellos con factores de pronóstico adverso.

Tratamiento de primera línea

Paciente sin comorbilidades

Las combinaciones de inmunquimioterapia basadas en fludarabina, particularmente FCR, han obtenido las tasas de respuesta más altas publicadas hasta la fecha con una duración prolongada de las mismas^{1,2,5}, por lo que en el momento actual se consideran el tratamiento

estándar de primera línea en los pacientes con LLC que requieren tratamiento y presentan un estado físico adecuado para recibir este tratamiento. FCR obtiene tasas de respuesta global (RG) del 90-95% y de respuesta completa (RC) del 44-70%, sin detectarse enfermedad mínima residual (EMR) en una proporción significativa de ellas, con una mediana de duración de las respuestas de alrededor de 52-80 meses^{1,2}. Además, en el ensayo aleatorizado del grupo German CLL Study Group (GCLLSG) CLL8, donde se comparó FCR vs. FC, la rama de inmunoterapia demostró ser superior en términos de supervivencia global (SG) de los enfermos en comparación con la quimioterapia sola, 87% vs. 83% a los 3 años, respectivamente¹. La delección de 17p y las mutaciones de *TP53* fueron los dos factores con mayor impacto en la SLP y la SG de los pacientes, tanto tratados con FC como con FCR, con una evolución claramente desfavorable en comparación con todos los otros subgrupos de pacientes. Por el contrario, FCR parece abrogar el pronóstico adverso de la delección de 11q observado previamente con el uso de quimioterapia¹. El impacto de otras mutaciones, como *NOTCH1* y *SF3B1*, en la respuesta al tratamiento está menos establecido. Datos del estudio GCLLSG CLL8 sugieren que los pacientes con mutaciones de *NOTCH1* se beneficiarían en menor grado de la adición de rituximab a FC⁶. Sin embargo, tanto este estudio como el estudio inglés UK LRF CLL4 (FC vs. fludarabina vs. clorambucilo) solo han corroborado parcialmente el impacto pronóstico independiente de las mutaciones de *NOTCH1* y *SF3B1*, y estas mutaciones no definen en el momento actual subgrupos de pacientes que requieran una aproximación terapéutica alternativa al tratamiento estándar^{6,7}.

La toxicidad de FCR no es despreciable, en especial la toxicidad infecciosa y hematológica, toda vez que produce neutropenia grado 3-4 en alrededor de un tercio de los pacientes. Con el objetivo de reducir la toxicidad de estos regímenes se ha ensayado la combinación de otros agentes, como la bendamustina. En monoterapia, bendamustina es un fármaco eficaz en la LLC, con una mayor tasa de respuestas y SLP que el clorambucilo, mientras que bendamustina en combinación con rituximab (BR) obtuvo una tasa de RG del 88% y RC del 23%, con un perfil de toxicidad aparentemente más favorable que el observado con FCR⁸. Además, cabe destacar su buena tolerancia en pacientes con alteraciones de la función renal, a diferencia de lo que ocurre con las combinaciones de fludarabina. En función de estos resultados, el grupo GCLLSG inició en 2008 un estudio fase III (CLL10) con la finalidad de comparar la combinación de BR frente a FCR como tratamiento de primera línea en pacientes con LLC sin comorbilidades y sin delección de 17p⁹. Los resultados preliminares de este estudio apuntan a una mayor eficacia de FCR, tanto en la tasa de RC (41% vs. 32%, incluyendo también un

mayor porcentaje de EMR negativa) como en la SLP (mediana de 54 meses en el brazo de FCR vs. 43 meses en el de BR). No se detectaron diferencias en la SG, aunque cabe decir que el seguimiento para ello todavía es corto. Sin embargo, el tratamiento con FCR se asoció a una mayor toxicidad tanto hematológica como infecciosa. En este sentido, no se observaron diferencias en la SLP cuando se analizó el subgrupo de pacientes ≥ 65 años, donde la mayor toxicidad de FCR derivó frecuentemente en reducciones de dosis del tratamiento. Estos resultados refuerzan la combinación de FCR como tratamiento estándar en pacientes con LLC sin comorbilidades. Sin embargo, BR es una alternativa razonable que valorar en pacientes de mayor edad (≥ 65 años) y en pacientes con alteraciones de la función renal o con una mayor predisposición a padecer infecciones.

Paciente con comorbilidades

La LLC es una enfermedad que predomina en personas de edad avanzada, con lo que una proporción significativa de estos pacientes presentan comorbilidades que pueden condicionar una mayor toxicidad a determinados tratamientos. Por ejemplo, los enfermos con un aclaramiento de creatinina < 60 mL/min sufrirán una mayor toxicidad hematológica si reciben tratamiento con análogos de las purinas, fármacos que poseen una eliminación renal. Durante años el tratamiento de los pacientes no candidatos a recibir fludarabina se ha dirigido al control de los síntomas derivados de la enfermedad mediante el uso de agentes de quimioterapia menos tóxicos, principalmente el clorambucilo, aunque sin conseguir prácticamente ningún impacto sobre la historia natural de la enfermedad. Por ello, durante los últimos años se ha realizado un esfuerzo importante en el diseño de estudios dirigidos específicamente a este subgrupo de pacientes. En ellos se han explorado combinaciones menos tóxicas de inmunoterapia, particularmente la adición de anticuerpos monoclonales anti-CD20 con clorambucilo. Recientemente, dos amplios estudios aleatorizados han confirmado que esta aproximación es apropiada para esta población de enfermos y que mejora los resultados obtenidos con clorambucilo en monoterapia (Tabla 1). El primero de ellos, promovido por el GCLLSG (CLL11), exploró no solo si la combinación de clorambucilo con un anticuerpo anti-CD20 podría ser superior al clorambucilo, sino también si obinutuzumab (GA101), un nuevo anticuerpo anti-CD20 de tipo II, podría mejorar los resultados obtenidos con rituximab¹⁰. Cabe destacar que la mediana de edad de los pacientes en este estudio fue de 73 años, con una puntuación de 8 en la escala de medida de comorbilidades *Cumulative Illness Rating Scale* (CIRS). Tanto la combinación de obinutuzumab con clorambucilo (G-Clb) como la de rituximab con clo-

Tabla 1. Resumen de los ensayos clínicos aleatorizados publicados con los nuevos anticuerpos anti-CD20 junto con clorambucilo y los inhibidores del BCR en LLC

	Grupo de pacientes	Tratamiento	Tasa de RG	SLP	SG
GCLLSG- CLL11 Goede et al. ^{10,11}	Primera línea con comorbilidades (CIRS > 6) y/o aclaramiento de creatinina 30-69 mL/min N = 781	Clb vs. R-Clb vs. G-Clb	31% vs. 66% vs. 77%	Mediana 11 meses vs. 16 meses vs. 29 meses	R-Clb vs. Clb HR 0,60 (95% IC 0,38-0,94 p < ,05); G-Clb vs. Clb HR 0,47 (95% IC 0,29-0,76 p < ,05)
COMPLEMENT-1 Hillmen et al. ¹²	Primera línea no candidatos a fludarabina N = 447	Clb vs. O-Clb	69% vs. 82%	Mediana 13 meses vs. 22 meses	2-años SG: 87% vs. 89%
RESONATE Byrd et al. ²²	Recaída/refractarios N = 391	ofatumumab vs. Ibrutinib monoterapia	4% vs. 63%	6-meses SLP: 65% vs. 88%	1-año SG: 81% vs. 91%
Furman et al. ¹⁸	Recaída/refractarios no elegibles para tratamiento con quimioterapia N = 220	placebo + rituximab vs. Idelalisib + rituximab	13% vs. 81%	6-meses SLP: 46% vs. 93%	1-año SG: 80% vs. 92%

CIRS: Cumulative Illness Rating Scale; Clb: clorambucilo; R-Clb: rituximab + clorambucilo; G-Clb: obinutuzumab + clorambucilo; O-Clb: ofatumumab + clorambucilo; RG: tasa de respuesta global; SLP: supervivencia libre de progresión; SG: supervivencia global.

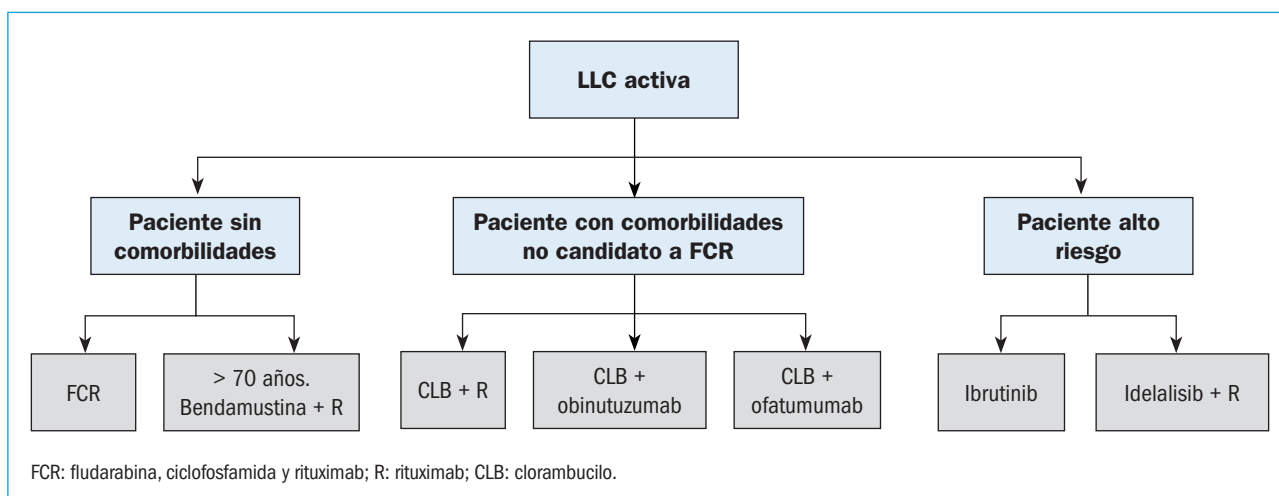


Figura 1. Algoritmo de las principales opciones de tratamiento en la LLC.

rambucilo (R-Clb) mejoraron la tasa de respuestas y la SLP en comparación con clorambucilo en monoterapia (mediana de 29 meses vs. 16 meses vs. 11 meses, respectivamente) con una toxicidad aceptable. Además, tanto G-Clb como R-Clb consiguieron una mejor SG de los enfermos en comparación con clorambucilo, lo que resalta la importancia de la eficacia del primer tratamiento recibido¹¹. Finalmente, cuando se compararon los resultados de ambos anti-CD20 entre sí, la combinación de obinutuzumab alcanzó una mayor tasa de respuestas y una mayor SLP en comparación con rituximab, pero sin hallarse diferencias significativas en la SG con el seguimiento actual. En el segundo

estudio, COMPLEMENT-1, se comparó la combinación de ofatumumab con clorambucilo (O-Clb) vs. clorambucilo en una población de pacientes no candidatos a recibir fludarabina. La mediana de SLP fue de 22 meses en el grupo de pacientes tratados con O-Clb, en comparación con 13 meses en el de clorambucilo, sin un aumento significativo de la toxicidad del tratamiento¹². Estos resultados han motivado la aprobación de ambas combinaciones, G-Clb y O-Clb, por la *US Food and Drug Administration* (FDA) y la *European Medicines Agency* (EMA) como tratamiento de primera línea en la LLC, y ayudan a consolidar el papel de la inmunoterapia como tratamiento de primera línea no solo

en los pacientes jóvenes, sino también en la población de pacientes mayores con comorbilidades asociadas. Finalmente, BR es otra combinación eficaz con un perfil de toxicidad razonable. No obstante, todavía no se dispone de estudios específicos de la combinación de BR en esta población de enfermos con comorbilidades, así como tampoco de datos sólidos que comparen BR con las combinaciones de clorambucilo y anti-CD20. Por lo tanto, actualmente la combinación de un anticuerpo monoclonal anti-CD20 (rituximab, ofatumumab o obinutuzumab) y quimioterapia (bendamustina o clorambucilo) puede considerarse como el tratamiento de elección en la gran mayoría de los pacientes con comorbilidades que requieran tratamiento.

Pacientes con delección de 17p o mutación de TP53

Los datos de diferentes estudios han demostrado de forma constante y repetida que los pacientes con disfunción de *TP53* presentan una respuesta claramente subóptima a los diferentes agentes quimioterápicos utilizados habitualmente en la LLC, incluyendo las combinaciones de inmunoquimioterapia. En el tratamiento de estos pacientes se han explorado diferentes estrategias basadas en agentes con mecanismos de acción independientes de la vía de *TP53*, principalmente alemtuzumab, anticuerpo monoclonal anti-CD52, y los esteroides a dosis altas. La combinación de ambos, alemtuzumab y esteroides, parece mejorar la tasa de respuestas obtenidas con agentes quimioterápicos (tasa de RG del 88-97% utilizados como estrategia de primera línea), aunque por lo general son de corta duración¹³. Además, estos regímenes se asocian a una toxicidad no despreciable, principalmente relacionada con la profunda inmunosupresión que producen. La irrupción de los inhibidores de la vía del BCR, principalmente ibrutinib (inhibidor de BTK), idelalisib (inhibidor de PI3K δ), y más recientemente del inhibidor de BCL2 venetoclax, están cambiando el enfoque terapéutico de estos enfermos. Aunque los datos disponibles son todavía limitados, estos fármacos han demostrado ser altamente activos en los pacientes con alteraciones de *TP53*. El ensayo inicial fase Ib/II de ibrutinib en LLC, donde 28 de los 85 pacientes incluidos presentaban delección de 17p, ya mostró que la respuesta obtenida era independiente de la presencia o no de esta alteración¹⁴. Posteriormente, dos estudios fase II han evaluado específicamente el papel de ibrutinib en esta población de enfermos. En el primero de ellos, que incluyó 51 pacientes con alteraciones de *TP53*, ibrutinib obtuvo en los pacientes previamente no tratados una tasa de RG del 97% (incluyendo respuestas parciales con linfocitosis), con una SLP estimada a los 24 meses del 91%, mientras que la tasa de RG fue del 80% con una SLP estimada a los 24 meses del 80% en pacientes en recaída¹⁵. Finalmente,

los datos preliminares del estudio RESONATE-17 que incluye 144 pacientes con delección de 17p en recaída o refractariedad, han demostrado una tasa de RG del 83% con una SLP estimada a los 12 meses del 79%¹⁶. Sin embargo, a pesar de estos excelentes resultados, la actualización del seguimiento del estudio fase I/II sugiere que la duración de las respuestas en estos enfermos es inferior a la de los otros subgrupos de pacientes, con una SLP estimada a los 30 meses del 48%, en comparación con un 74% en los pacientes con delección de 11q y un 87% en los pacientes sin ninguna de estas dos alteraciones^{14,17}. La combinación de idelalisib y rituximab también ha mostrado ser activa en este subgrupo de pacientes. En el estudio pivotal de idelalisib en LLC (idelalisib + rituximab vs. placebo + rituximab) un 44% de los 220 pacientes incluidos presentaba delección de 17p. La tasa de RG fue del 81% en la rama de idelalisib, con una SLP estimada a los 12 meses del 66%, sin observarse diferencias significativas en función de la presencia o no de delección de 17p¹⁸. Los resultados obtenidos con ibrutinib o idelalisib se comparan de forma claramente favorable con los datos históricos obtenidos tanto con los regímenes de inmunoquimioterapia como con las combinaciones de alemtuzumab en los pacientes con delección de 17p. Por todo ello, actualmente tanto ibrutinib como idelalisib + rituximab representan la mejor opción terapéutica en este subgrupo de enfermos y, en este sentido, tanto la FDA como la EMA han aprobado ibrutinib, y la EMA también idelalisib + rituximab, como tratamiento de primera línea en pacientes con delección de 17p/mutación de *TP53*.

Tratamiento de segunda línea de la LLC

En muchos aspectos la aproximación al paciente en recaída es similar a la del tratamiento inicial. Por lo tanto, el tratamiento debe iniciarse únicamente cuando el paciente desarrolla una enfermedad sintomática o progresiva. Actualmente no existe un tratamiento estándar en esta situación y deben considerarse varios aspectos, tales como la duración y tolerancia al tratamiento previo, el estado funcional y las comorbilidades del paciente, y la presencia o aparición de alteraciones genéticas, particularmente de *TP53*. En general, el tratamiento utilizado como primera línea puede repetirse si la duración de la respuesta a este último ha sido mayor de 2-3 años y su tolerancia ha sido aceptable. Sin embargo, tras un tratamiento inicial con FCR es importante valorar la toxicidad previa antes de un retratamiento con este régimen, prestando especial atención a la toxicidad medular y a las infecciones. La mediana de SLP obtenida con regímenes de inmunoquimioterapia como FCR como tratamiento de rescate es de alrededor de 28-31 meses, y de alrededor de 15-24 meses con combinaciones de bendamustina¹⁹⁻²¹. Sin embargo, es sin duda en la situa-

ción de enfermedad en recaída donde se están explorando un mayor número de nuevos fármacos que deben ampliar considerablemente las opciones de tratamiento en estos pacientes. En este sentido, dos nuevos fármacos, ambos inhibidores del BCR, ibrutinib e idelalisib, este último asociado a rituximab, han sido aprobados por la FDA y la EMA como tratamiento de rescate en la LLC. Ibrutinib fue el primero en recibir la aprobación a partir de los datos del ensayo fase II en pacientes con LLC en recaída/refractoriedad, donde obtuvo una tasa de RG del 91% (incluyendo respuestas parciales con linfocitosis) y una SLP y SG estimada a los 26 meses del 75% y el 83%, respectivamente. Posteriormente los datos del ensayo fase III RESONATE, en el que ibrutinib se comparó con ofatumumab en pacientes con LLC en situación de recaída o refractoriedad, refrendaron estos resultados²². La aprobación de idelalisib estuvo basada en el ensayo pivotal fase III en LLC, donde se comparó la combinación de idelalisib + rituximab vs. placebo + rituximab en pacientes en recaída/refractoriedad considerados no candidatos para un tratamiento de quimioterapia¹⁸. En ambos estudios, tanto la rama de ibrutinib como la de idelalisib + rituximab, fueron claramente superiores a las respectivas ramas control no solo en la tasa de respuestas y la SLP, sino también en la SG de los enfermos (Tabla 1). Los excelentes resultados obtenidos con ambos fármacos los posicionan como una excelente alternativa de rescate en la LLC y son actualmente la opción preferible en pacientes refractarios o con una recaída precoz tras un tratamiento de inmunoterapia.

Ambos tratamientos, ibrutinib e idelalisib + rituximab, fueron bien tolerados. En cuanto a los eventos adversos observados con ibrutinib cabe destacar la diarrea, que suele ser leve y transitoria, y los eventos hemorrágicos, que motivaron que los pacientes con warfarina fueran excluidos del ensayo fase III RESONATE. Con esta medida, la tasa de eventos hemorrágicos graves fue similar en los dos brazos de tratamiento (1% ibrutinib vs. 2% ofatumumab). Finalmente, también se observó un mayor número de eventos de fibrilación auricular en la rama de ibrutinib vs. ofatumumab (3% ibrutinib vs. 1% ofatumumab), aunque todavía no está claro cuál es su relación con ibrutinib^{14,22}. Entre los eventos adversos graves (grado 3-4) observados en la rama de idelalisib en comparación con la rama de placebo cabe destacar la diarrea (4% vs. 0%) y la transaminitis (5% vs. 1%)¹⁸.

Finalmente, el mal pronóstico asociado tanto a los pacientes con delección de 17p como a los pacientes refractarios a los análogos de las purinas o con una respuesta corta tras ellos ha conducido a considerarlos candidatos a un trasplante alogénico²³. En estas situaciones el trasplante alogénico de intensidad reducida consigue mantener respuestas a largo plazo en un 30-60% de los pacientes, según las diferentes series, con independen-

cia de la presencia de delección de 17p. Sin embargo, los buenos resultados obtenidos con los inhibidores del BCR han abierto el debate sobre la necesidad de este procedimiento que sigue asociado a una morbilidad no despreciable, donde a pesar de los avances obtenidos con los regímenes de intensidad reducida todavía se mantiene una mortalidad no asociada a la recaída de alrededor de un 20%. En el momento actual no pueden darse recomendaciones firmes a este respecto y en la valoración de una u otra opción deben tenerse en cuenta varios factores, tales como las características del paciente y el donante, la situación de la enfermedad (primera línea-recaída/refractoriedad) y la presencia de factores de riesgo biológico, como la delección de 17p.

Conclusiones

El desarrollo durante los últimos años de nuevas combinaciones de inmunoterapia con un perfil de toxicidad más favorable ha permitido ampliar la población candidata a beneficiarse de estos tratamientos, particularmente los pacientes de mayor edad y con comorbilidades, para los que las opciones de tratamiento disponibles eran realmente limitadas. Por otro lado, los resultados cada vez más consolidados con las nuevas terapias dirigidas a dianas específicas, particularmente los inhibidores del BCR, ha supuesto un avance muy importante en el tratamiento de esta enfermedad. Estos fármacos han demostrado ser altamente eficaces como tratamiento de rescate en la LLC, incluyendo los pacientes de alto riesgo, tales como los pacientes con delección de 17p o los refractarios al tratamiento de quimioterapia, para los cuales no disponíamos de opciones de tratamiento adecuadas hasta la fecha. Finalmente, se hallan en curso diversos estudios aleatorizados con estos nuevos fármacos como tratamiento inicial, tanto en la población de pacientes mayores de 65 años como en pacientes candidatos a las combinaciones con fludarabina, los cuales serán fundamentales para determinar su papel como tratamiento de primera línea en los pacientes con LLC.

Bibliografía

1. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2010;376(9747):1164-74.
2. Tam CS, O'Brien S, Wierda W, Kantarjian H, Wen S, Do KA, et al. Long-term results of the fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab regimen as initial therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008;112(4):975-80.
3. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia

- updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008;111(12):5446-56.
4. Dighiero G, Maloum K, Desablens B, Cazin B, Navarro M, Leblay R, et al. Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. *The New England Journal of Medicine* 1998;338(21):1506-14.
 5. Bosch F, Abrisqueta P, Villamor N, Terol MJ, González-Barca E, Ferra C, et al. Rituximab, fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone: a new, highly active chemoimmunotherapy regimen for chronic lymphocytic leukemia. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2009;27(27):4578-84.
 6. Stilgenbauer S, Schnaiter A, Paschka P, Zenz T, Rossi M, Dohner K, et al. Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: results from the CLL8 trial. *Blood* 2014;123(21):3247-54.
 7. Oscier DG, Rose-Zerilli MJ, Winkelmann N, González de Castro D, Gómez B, Forster J, et al. The clinical significance of NOTCH1 and SF3B1 mutations in the UK LRF CLL4 trial. *Blood* 2013;121(3):468-75.
 8. Fischer K, Cramer P, Busch R, Bottcher S, Bahlo J, Schubert J, et al. Bendamustine in combination with rituximab for previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase II trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2012;30(26):3209-16.
 9. Eichhorst B, Fink AM, Busch R, Kovacs G, Maurer C, Lange E et al. Frontline chemoimmunotherapy with fludarabine (F), cyclophosphamide (C), and Rituximab (R) (FCR) shows superior efficacy in comparison to bendamustine (B) and rituximab (BR) in previously untreated and physically fit patients (pts) with advanced chronic lymphocytic leukemia (CLL): final analysis of an international, randomized study of the German CLL Study Group (GCLLSG) (CLL10 Study). *Blood* 2014;124(Suppl; abstr 19).
 10. Goede V, Fischer K, Busch R, Engelke A, Eichhorst B, Wendtner CM, et al. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *The New England Journal of Medicine* 2014;370(12):1101-10.
 11. Goede V, Fischer K, Engelke A, Schlag R, Lepretre S, Montero LF, et al. Obinutuzumab as frontline treatment of chronic lymphocytic leukemia: updated results of the CLL11 study. *Leukemia* 2015. doi:10.1038/leu.2015.14
 12. Hillmen P, Robak T, Janssens A, Babu KG, Kloczko J, Grosicki S, et al. Chlorambucil plus ofatumumab versus chlorambucil alone in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukaemia (COMPLEMENT 1): a randomised, multicentre, open-label phase 3 trial. *Lancet* 2015;385(9980):1873-83.
 13. Pettitt AR, Jackson R, Carruthers S, Dodd J, Dodd S, Oates M, et al. Alemtuzumab in combination with methylprednisolone is a highly effective induction regimen for patients with chronic lymphocytic leukemia and deletion of TP53: final results of the national cancer research institute CLL206 trial. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2012;30(14):1647-55.
 14. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, Flinn IW, Burger JA, Blum KA, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine* 2013;369(1):32-42.
 15. Farooqui MZ, Valdez J, Martyr S, Aue G, Saba N, Niemann CU, et al. Ibrutinib for previously untreated and relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with TP53 aberrations: a phase 2, single-arm trial. *The Lancet Oncology* 2015;16(2):169-76.
 16. O'Brien S, Jones JA, Coutre S, et al. Efficacy and safety of ibrutinib in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia or small lymphocytic leukemia with 17p deletion: results from the phase II RESONATE-17 trial. *Blood* 2014;124(Suppl; abstr 327).
 17. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, Burger JA, Blum KA, Coleman M, et al. Three-year follow-up of treatment-naive and previously treated patients with CLL and SLL receiving single-agent ibrutinib. *Blood* 2015;125(16):2497-506.
 18. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, Cheson BD, Pagel JM, Hillmen P, et al. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine* 2014;370(11):997-1007.
 19. Robak T, Dmoszynska A, Solal-Celigny P, Warzocha K, Loscertales J, Catalano J, et al. Rituximab plus fludarabine and cyclophosphamide prolongs progression-free survival compared with fludarabine and cyclophosphamide alone in previously treated chronic lymphocytic leukemia. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2010;28(10):1756-65.
 20. Fischer K, Cramer P, Busch R, Stilgenbauer S, Bahlo J, Schweighofer CD, et al. Bendamustine combined with rituximab in patients with relapsed and/or refractory chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase II trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011;29(26):3559-66.
 21. Cortelezzi A, Sciume M, Liberati AM, Vincenti D, Cuneo A, Reda G, et al. Bendamustine in combination with ofatumumab in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia: a GIMEMA Multicenter Phase II Trial. *Leukemia* 2014;28(3):642-8.
 22. Byrd JC, Brown JR, O'Brien S, Barrientos JC, Kay NE, Reddy NM, et al. Ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphoid leukemia. *The New England Journal of Medicine* 2014;371(3):213-23.
 23. Dreger P, Corradini P, Kimby E, Michallet M, Milligan D, Scheitelig J, et al. Indications for allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: the EBMT transplant consensus. *Leukemia* 2007;21(1):12-7.

Gammopatías monoclonales

COORDINADORES: **A. ORIOL ROCAFIGUERA.** *Servicio de Hematología Clínica. Unidad de Ensayos Clínicos ICO-Hospital Germans Trias i Pujol. Badalona, Barcelona*
M.V. MATEOS MANTECA. *Servicio de Hematología. Hospital Universitario de Salamanca. IBSAL IBMCC (USAL-CSIC). Salamanca*

A pesar de que el evento oncogénico primario del mieloma múltiple sigue siendo objeto de controversia, el desarrollo de nuevas técnicas de estudio cromosómico, genómico y molecular ha permitido importantes avances en el estudio de esta entidad. El mieloma múltiple se caracteriza por una marcada inestabilidad genómica y por la acumulación de alteraciones genómicas de diversos tipos que incluyen traslocaciones, deleciones, ganancias y cambios epigenéticos. Aparentemente no existe un único mecanismo genético que explique la patogénesis del mieloma múltiple. La sobreexpresión de los genes *CCN1*, *CCN2* y *CCN3* está incrementada en la práctica totalidad de los pacientes con mieloma múltiple, pero el conocimiento de los mecanismos por los cuales distintos eventos oncogénicos primarios conducen a esta sobreexpresión, de los factores que influyen en que la gammapatía monoclonal de significado incierto se convierta en un mieloma clínicamente activo y del impacto de los eventos posteriores en la agresividad biológica y pronóstico del mieloma es todavía muy limitado. Cuatro años después de la publicación de la secuenciación completa del genoma, el desafío de integrar de forma coherente todos los datos generados sigue pendiente.

La variabilidad biológica y clínica en el mieloma no se ha traducido, por el momento, en la identificación de tratamientos específicos para distintos subgrupos de pacientes. En los últimos años se ha obtenido evidencia suficiente sobre el beneficio clínico de las combinaciones de fármacos con diferentes mecanismos de acción. En el paciente joven con buen estado general las combinaciones de inhibidores del proteasoma, agentes inmunomoduladores y corticoides seguidas de intensificación con altas dosis de melfalán han demostrado los mejores resultados; en particular, la combinación de bortezomib, talidomida y dexametasona ha obtenido la aprobación de la EMA como tratamiento de inducción previa al trasplante autólogo, esencialmente en función de los ensayos fase III de los grupos GIMEMA y GEM. Otras combinaciones están siendo exploradas en inducción, pero también se está definiendo el papel de esquemas de inducción y mantenimiento postrasplante que permitan curar, o al menos controlar de forma prolongada, a una proporción importante de pacientes con mieloma.

En los pacientes con mieloma múltiple que progresan tras la primera línea de tratamiento la supervivencia se ha incrementado de forma muy relevante en los últimos años, gracias a la incorporación de nuevos fármacos inmunomoduladores, nuevos inhibidores del proteasoma pero también nuevas generaciones de fármacos con mecanismos de acción distintos, entre los que destacan de forma sobresaliente los anticuerpos monoclonales. Estudios publicados recientemente y ensayos en curso determinarán qué fármacos y, sobre todo, qué combinaciones serán más valiosas en el tratamiento de rescate. Determinar las combinaciones más adecuadas es una necesidad especialmente urgente en pacientes de mal pronóstico y pacientes en etapas avanzadas ya refractarios a bortezomib y lenalidomida.

Los fármacos que ya se han incorporado definitivamente al tratamiento del mieloma en las dos últimas décadas empiezan a ser explorados también en otras gammapatías menos frecuentes con afectación orgánica, en particular en la más frecuente de ellas, la amiloidosis primaria. La menor frecuencia relativa de esta entidad, su variedad de presentaciones clínicas y en particular el infausto pronóstico asociado a la afectación cardíaca convierten en un reto demostrar qué fármacos y combinaciones son las más adecuadas en el tratamiento de los distintos subgrupos de pacientes.

Complejidad genómica en el mieloma múltiple

N.C. GUTIÉRREZ, I. MISIEWICZ-KRZEMINSKA, E. ROJAS, P. KRZEMINSKI, A.B. HERRERO, D. QUWAIDER, V. GUTIÉRREZ

Servicio de Hematología. Hospital Universitario de Salamanca. IBSAL, IBMCC (USAL-CSIC). Salamanca

Introducción

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia caracterizada por la acumulación de células plasmáticas (CP) clonales en la médula ósea que, generalmente, se asocia con la producción de una inmunoglobulina monoclonal y lesiones óseas líticas. El MM presenta una gran heterogeneidad en cuanto a su evolución y respuesta al tratamiento, de manera que se da el hecho paradójico de que aunque la consecución de la remisión completa sea un objetivo deseable para prolongar la supervivencia, hay pacientes que pueden convivir con el clon tumoral durante largo tiempo. Cada vez es más evidente que la heterogeneidad en el comportamiento clínico de esta neoplasia está íntimamente relacionada con los rasgos genéticos de la célula mielomatosa. A diferencia de lo que sucede en las leucemias y en algunos linfomas, en el MM no se han encontrado anomalías cromosómicas específicas, aunque sí se han descrito un número importante de alteraciones citogenéticas que recuerdan, por su complejidad, a las propias de los cánceres epiteliales. Esta complejidad presente en el ADN, tanto en el campo génico como cromosómico, se manifiesta también en el ARNm o transcriptoma.

Alteraciones en el ADN de la célula mielomatosa

Se pueden categorizar en alteraciones cromosómicas recurrentes y mutaciones.

Alteraciones cromosómicas

Las anomalías cromosómicas que definen el MM son las traslocaciones del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (*IGH*) y las ganancias y pérdidas cromosómicas¹. Las traslocaciones del gen *IGH* (14q32) a diferentes regiones del genoma se observan hasta en el 60% de los MM. Estas traslocaciones dan lugar a una desregulación de los oncogenes que se sitúan bajo el control del *enhancer* de *IGH*. Las más frecuentes son: la t(11;14), detectada en el 15-20% de los casos, que origina un aumento de la expresión de la ciclina D1; la t(4;14), que aparece aproximadamente en el 15% de los MM y que tiene como resultado la desregulación simultánea de 2 genes, el receptor 3 del factor de crecimiento fibroblástico (*FGFR3*) y el *myeloma SET domain* (MMSET); y la t(14;16), observada como mucho en el 5% de los MM, que conlleva un aumento de la expresión del oncogén *MAF*. Tanto la t(4;14) como la t(14;16) se incluyen en la mayoría de las estratificaciones pronósticas como marcadores genéticos de alto riesgo (Tabla 1)². La sobreexpresión del gen *MMSET* que está presente en todos los MM con t(4;14) conduce a cambios globales en la metilación de histonas que promueven la supervivencia de la célula mielomatosa, lo cual confirma su papel central en la patogénesis de este subtipo de MM.

Aunque en una proporción mucho menor que las traslocaciones del gen *IGH*, en el MM se detectan reordenamientos del oncogén *MYC* (15% de los casos) que

Tabla 1. Clasificación mSMART del mieloma múltiple

Alto riesgo	Riesgo intermedio	Riesgo estándar
del 17p	t(4;14)	t(11;14) y la
t(14;16)	Monosomía 13 en metafase	t(6;14)
t(14;20)	Hipodiploidía	Cualquier otra alteración citogenética
Firma de alto riesgo según los perfiles de expresión génica	Índice proliferativo > 3%	

no suelen implicar a los genes de las inmunoglobulinas. Las técnicas modernas de ultrasecuenciación detectan, hasta en la mitad de los MM, reordenamientos de *MYC* a una amplia variedad de *superenhancers* que inducen un aumento en la expresión de *MYC* que podría convertirlo en una diana terapéutica^{3,4}.

Habitualmente la célula mielomatosa gana y pierde cromosomas completos o regiones cromosómicas que hacen que casi todos los MM sean aneuploides. Los MM no hiperdiploides se caracterizan por una prevalencia muy elevada de traslocaciones de *IGH* y monosomía del cromosoma 13. Por el contrario, el grupo hiperdiploide está asociado con trisomías recurrentes, que afectan especialmente a los cromosomas impares, y con una frecuencia baja de alteraciones estructurales. Los MM hipodiploides se relacionan con una supervivencia más corta. El cromosoma que más se ve afectado por ganancias y pérdidas de material genómico es el cromosoma 1, en el que el brazo q se gana hasta en el 60% de los casos y regiones de 1p se pierden en un 30-40%, aproximadamente⁵. Las dos alteraciones se han asociado con menor supervivencia. Sin duda, la pérdida de material cromosómico más importante por su significado pronóstico desfavorable es la delección de 17p13 (*P53*) que aparece en un 8-10%⁶. En los pacientes con MM en estadios avanzados y en progresión, la frecuencia de pérdidas de *P53* es bastante más elevada. Además, parece que la delección de 17p se asocia con la invasión extramedular del MM⁷.

Se ha visto que existe una fuerte asociación entre las anomalías genéticas anteriormente descritas. La coexistencia de más de una alteración de alto riesgo supone un acortamiento significativo de la supervivencia respecto a la presencia de una alteración de alto riesgo de manera aislada. Así, los pacientes con una traslocación de *IGH* de mal pronóstico, una delección de 17p y una ganancia de 1q tienen tan solo una supervivencia global de 9 meses⁸.

Mutaciones

Las estrategias modernas de secuenciación masiva han detectado alrededor de 35 mutaciones no silentes por genoma de MM, un número superior al observado en leucemias agudas y muy inferior a los cientos de mutaciones presentes en los tumores sólidos. Por otro lado, no han descubierto apenas mutaciones genéticas recurrentes, salvo las ya conocidas mutaciones activadoras de los oncogenes *RAS*, fundamentalmente *KRAS* y *NRAS*. Las mutaciones de *FAM46C*, *DIS3* y *TP53* aparecen con una frecuencia de aproximadamente el 10%^{9,10}.

Alteraciones en el transcriptoma de la célula mielomatosa

La expresión génica del MM o, lo que es lo mismo, la abundancia de los diferentes ARNm es muy heterogé-

nea. No obstante, se ha demostrado que la expresión de los genes *CCND1*, *CCND2* y *CCND3* está incrementada en la práctica totalidad de los pacientes con MM, independientemente de las alteraciones citogenéticas. Este hecho podría considerarse como un potencial evento común en la patogénesis del MM¹¹. Se han propuesto diversas clasificaciones moleculares en función del perfil de expresión génica que generalmente se asocian a los diferentes tipos de traslocaciones de *IGH* y a la expresión de ciclinas D¹². Por otro lado, han surgido otras firmas génicas que integran la expresión de diferentes genes con la única finalidad de definir grupos pronósticos en el MM, pero con poco fundamento biológico y escasa utilidad práctica.

Como se ha demostrado en otros tumores, la mayoría de los cambios en la expresión génica no están aparentemente precedidos de alteraciones en el ADN en forma de mutaciones, anomalías cromosómicas o incluso modificaciones epigenéticas (metilación del ADN). De hecho, las alteraciones en los procesos de regulación postranscripcional se reconocen cada vez más como causantes de los niveles anormales de expresión génica en la ausencia aparente de cambios en el ADN. Sin duda, el mecanismo de regulación postranscripcional más ampliamente investigado han sido los microRNA (miRNA) que pueden controlar la actividad de más del 30% de todos los genes que codifican proteínas. Varios estudios han demostrado que los miRNA están implicados tanto en el desarrollo normal de la célula plasmática como en la patogenia del MM. En este sentido, se han descrito mecanismos de regulación positiva de *P53* a través de los miR-192, 194 y 215, y del miR-214, que originan una inhibición de la proliferación de la célula mielomatosa, de manera que una disminución en la expresión de estos miRNA puede contribuir a la génesis del MM^{13,14}. Además, se ha observado que la desregulación de la expresión de los miRNA está asociada con alteraciones cromosómicas específicas¹⁵.

Heterogeneidad intraclonal en el mieloma

Las modernas técnicas de análisis genómico han demostrado que en el MM, como sucede en otras neoplasias, la población tumoral está constituida por una mezcla de subclones genéticamente diferentes. El concepto de "evolución intraclonal" hace referencia a que los cambios genéticos propios de los diferentes subclones se producen dentro del mismo clon original definido por un reordenamiento VDJH inalterado durante la evolución de la enfermedad¹⁶. Aunque hay mielomas que no muestran cambios genéticos en la recaída respecto al diagnóstico, el resto siguen dos modelos de evolución genómica según han demostrado los estudios del número de copias cromosómicas y los análisis de mutaciones: uno integrado por los MM que en la recaída presentan

cambios adicionales en el subclón mayoritario del diagnóstico, y otro en el que las recaídas contienen subclones que derivan de poblaciones minoritarias en el momento del diagnóstico no detectadas por técnicas convencionales. Este último modelo se asemeja al esquema propuesto por Darwin para explicar el origen de las especies, de manera que las mutaciones se adquirirían al azar y serían seleccionadas en función de la ventaja proliferativa que confirieran (Figura 1)¹⁷. En este contexto de competición entre los distintos clones, la progresión del mieloma vendría definida por la expansión de un clon determinado que se convertiría en el dominante, bien por adaptarse mejor a nichos del microambiente o bien por resistir con mayor ventaja proliferativa las sucesivas estrategias terapéuticas. Los estudios de mutaciones mediante secuenciación en células mielomatosas individuales muestran una media de 3 a 6 subclones mayoritarios en el momento del diagnóstico del MM¹⁸.

El panorama genético complejo del MM ya está presente en las fase tempranas, premalignas, de la enfer-

medad, la GMSI y el MM quiescente, como lo demuestran los estudios de hibridación *in situ* fluorescente y, más recientemente, los análisis del número de copias mediante arrays de SNP y los estudios de ultrasecuenciación (Figura 1). De hecho, tanto la GMSI como el MM quiescente reproducen el espectro de alteraciones citogenéticas y de mutaciones del MM sintomático¹⁹. Por tanto, parece que la transición de GMSI a MM no se asocia con la aparición de nuevas alteraciones genéticas, sino más bien con una expansión del número de CP clonales genéticamente aberrantes que resulta en un cambio de la estructura clonal inicial⁵.

Impacto de la evolución intraclonal en el tratamiento del mieloma múltiple

La heterogeneidad intraclonal podría tener un impacto significativo en las diferentes estrategias terapéuticas (Figura 2)¹⁷. Por un lado, justificaría la escasa utilidad que han demostrado las terapias dirigidas, ya que solo

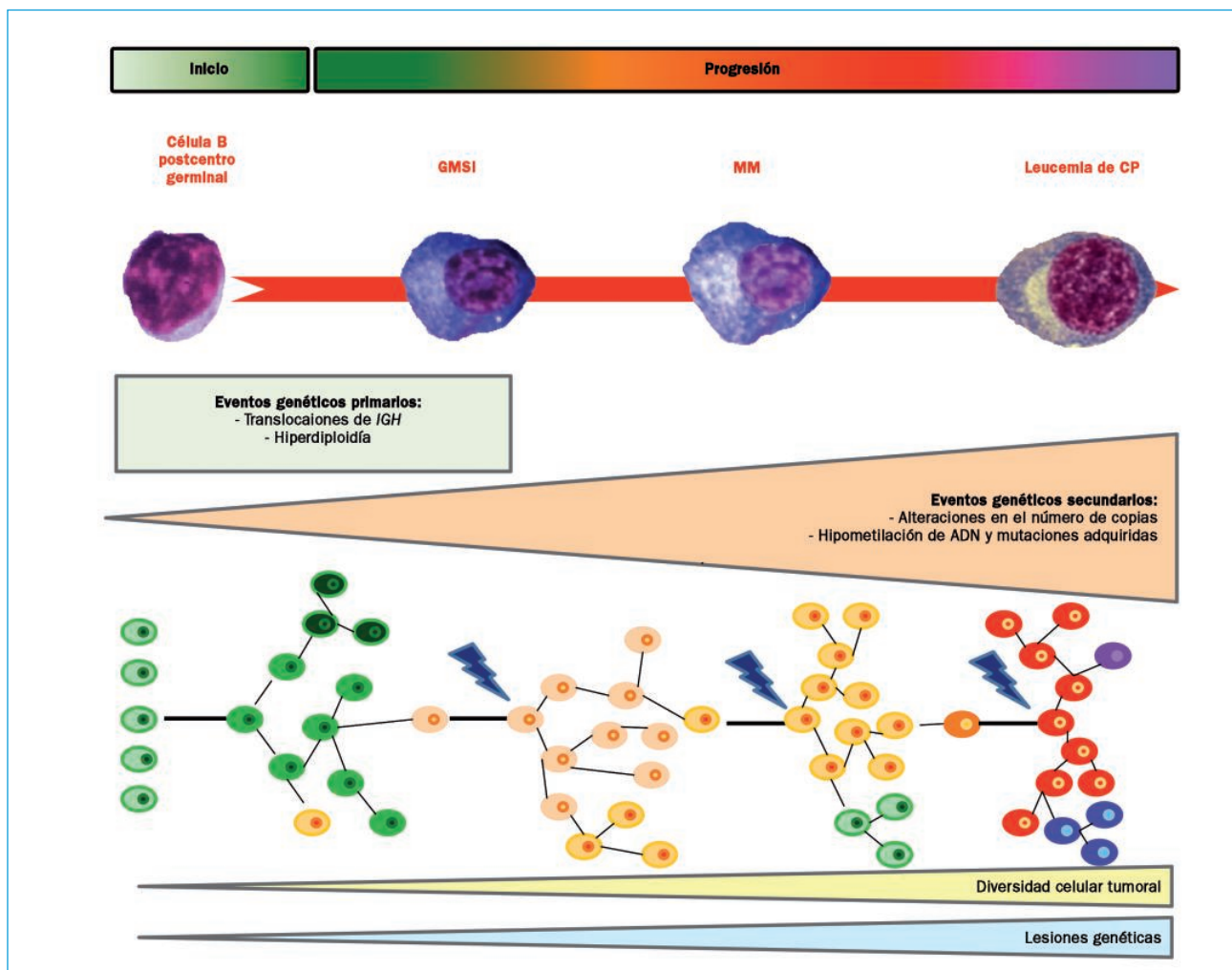


Figura 1. Modelo patogénico del mieloma múltiple en el que se muestra la aparición de los eventos genéticos desde la etapa premaligna de GMSI y la evolución clonal ramificada según las teorías de Darwin¹⁷.

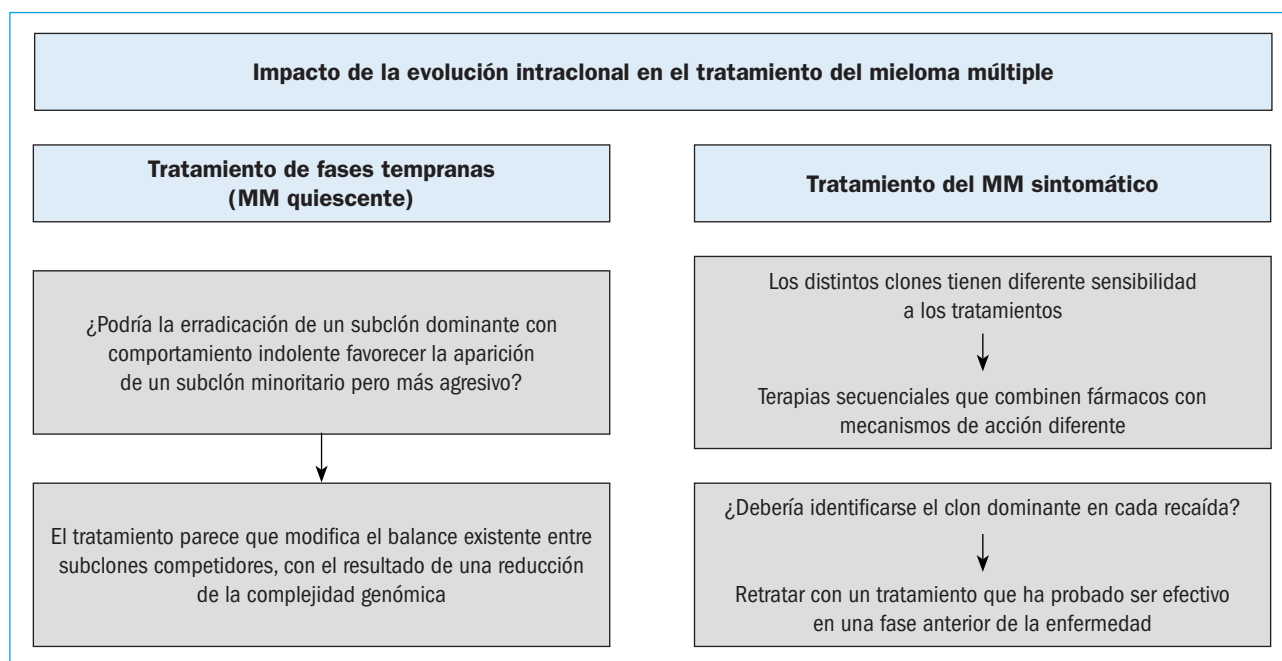


Figura 2. Consecuencias de la heterogeneidad intraclonal en el tratamiento del mieloma²⁰.

serían capaces de erradicar uno de los múltiples clones; por otro, sustentaría las tendencias que propugnan la combinación de varios fármacos con actividad sinérgica capaces de eliminar todas las subpoblaciones tumorales. Así, por ejemplo, los inhibidores de BRAF podrían aportar un beneficio clínico limitado si la mutación está presente en una población tumoral minoritaria⁹. En sentido contrario, la combinación de inhibidores del proteasoma y de fármacos inmunomoduladores conduce a una respuesta más profunda, probablemente relacionada con una mayor efectividad a la hora de eliminar subclones diferentes²⁰.

La competencia entre las diferentes poblaciones tumorales podría también influir en los resultados del tratamiento de fases más tempranas de la enfermedad, como es el MM quiescente. El tratamiento podría alterar el equilibrio existente entre los subclones en el sentido de reducir la complejidad clonal, hecho que sería favorable si se eliminan clones agresivos y se seleccionan los indolentes, o desfavorable si los subclones más sensibles al tratamiento son los indolentes y se deja el espacio libre para la proliferación de las poblaciones celulares más dañinas.

Consideraciones finales

Los continuos cambios en el genoma de la célula mielomatosa ponen de manifiesto la inestabilidad genómica a la que está sometida. Los mecanismos moleculares responsables de esta inestabilidad aún están mal definidos: las anomalías numéricas podrían generarse a través de

la amplificación del centrosoma o de alteraciones en el *checkpoint* del uso mitótico, y las anomalías estructurales como traslocaciones podrían originarse a partir de alteraciones en la reparación de cortes de la doble cadena del ADN. Aunque en los últimos años se ha avanzado en averiguar la contribución de las traslocaciones en el desarrollo del mieloma, apenas se conoce el papel de las aneuploidías en la patogenia. De hecho, aún sigue vigente el debate sobre si la aneuploidía es una causa o una consecuencia de la transformación maligna. De igual manera, así como los efectos en el transcriptoma y en el proteoma de las diferentes traslocaciones de *IGH* son relativamente patentes, no se sabe qué desequilibrios produce la aneuploidía en la expresión génica y proteica, es decir, si los cambios en la expresión son proporcionales al número de copias de ADN o si la célula desencadena respuestas para compensar el desequilibrio en la dosis génica.

Puesto que la heterogeneidad genética parece difícil de abordar terapéuticamente, el desafío está en conocer la repercusión de esta diversidad en el fenotipo de la célula mielomatosa, ya que podría darse el hecho favorable de que diferentes subclones convergieran en un fenotipo homogéneo con las mismas rutas biológicas alteradas, por ejemplo *RAS* o *P53*. Por otro lado, la investigación de las causas y consecuencias de la inestabilidad genómica, más que la mera descripción y cuantificación de los distintos subclones a lo largo de la evolución del MM, ayudará a diseñar nuevas estrategias terapéuticas basadas en atacar rutas génicas de las que la célula mielomatosa es irremediabilmente dependiente.

Este trabajo ha sido financiado en parte por el Instituto de Salud Carlos III (PI13/00111) y la Junta de Castilla y León (Gerencia Regional de Salud: GRS702/A/11, BIO/SA57/13 y BIO/SA35/14).

Bibliografía

- Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, Shaughnessy J, Gutiérrez N, Stewart AK, et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia* 2009;23(12):2210-21.
- Mikhael JR, Dingli D, Roy V, Reeder CB, Buadi FK, Hayman SR, et al. Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus guidelines 2013. *Mayo Clin Proc* 2013;88(4):360-76.
- Affer M, Chesi M, Chen WD, Keats JJ, Demchenko YN, Tamizhmani K, et al. Promiscuous MYC locus rearrangements hijack enhancers but mostly super-enhancers to dysregulate MYC expression in multiple myeloma. *Leukemia* 2014;28(8):1725-35.
- López-Corral L, Corchete LA, Sarasquete ME, Mateos MV, García-Sanz R, Ferriñán E, et al. Transcriptome analysis reveals molecular profiles associated with evolving steps of monoclonal gammopathies. *Haematologica* 2014;99(8):1365-72.
- López-Corral L, Sarasquete ME, Beà S, García-Sanz R, Mateos MV, Corchete LA, et al. SNP-based mapping arrays reveal high genomic complexity in monoclonal gammopathies, from MGUS to myeloma status. *Leukemia* 2012;26(12):2521-9.
- Avet-Loiseau H, Durie BGM, Cavo M, Attal M, Gutiérrez N, Haessler J, et al. Combining fluorescent in situ hybridization data with ISS staging improves risk assessment in myeloma: an International Myeloma Working Group collaborative project. *Leukemia* 2013;27(3):711-7.
- López-Anglada L, Gutiérrez NC, García JL, Mateos MV, Flores T, San Miguel JF. P53 deletion may drive the clinical evolution and treatment response in multiple myeloma. *Eur J Haematol* 2010;84(4):359-61.
- Boyd KD, Ross FM, Chiecchio L, Dagrada GP, Konn ZJ, Tapper WJ, et al. A novel prognostic model in myeloma based on co-segregating adverse FISH lesions and the ISS: analysis of patients treated in the MRC Myeloma IX trial. *Leukemia* 2012;26(2):349-55.
- Lohr JG, Stojanov P, Carter SL, Cruz-Gordillo P, Lawrence MS, Auclair D, et al. Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy. *Cancer Cell* 2014;25(1):91-101.
- Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC, Van Loo P, Alexandrov LB, Martincorena I, et al. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nat Commun* 2014;5:2997.
- Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F, Sawyer J, Barlogie B, Shaughnessy J. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood* 2005;106(1):296-303.
- Bergsagel PL, Kuehl WM. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2005;23(26):6333-8.
- Pichiorri F, Suh S-S, Rocci A, De Luca L, Taccioli C, Santhanam R, et al. Downregulation of p53-inducible microRNAs 192, 194, and 215 impairs the p53/MDM2 autoregulatory loop in multiple myeloma development. *Cancer Cell* 2010;18(4):367-81.
- Misiewicz-Krzeminska I, Sarasquete ME, Quwaider D, Krzeminski P, Ticona FV, Paño T, et al. Restoration of microRNA-214 expression reduces growth of myeloma cells through positive regulation of P53 and inhibition of DNA replication. *Haematologica* 2013;98(4):640-8.
- Gutiérrez NC, Sarasquete ME, Misiewicz-Krzeminska I, Delgado M, De Las Rivas J, Ticona FV, et al. Deregulation of microRNA expression in the different genetic subtypes of multiple myeloma and correlation with gene expression profiling. *Leukemia* 2010;24(3):629-37.
- Puig N, Conde I, Jiménez C, Sarasquete ME, Balanzategui A, Alcoceba M, et al. The predominant myeloma clone at diagnosis, CDR3 defined, is constantly detectable across all stages of disease evolution. *Leukemia* 2015;29(6):1435-7.
- Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer* 2012;12(5):335-48.
- Melchor L, Brioli A, Wardell CP, Murison A, Potter NE, Kaiser MF, et al. Single-cell genetic analysis reveals the composition of initiating clones and phylogenetic patterns of branching and parallel evolution in myeloma. *Leukemia* 2014;28(8):1705-15.
- Walker BA, Wardell CP, Melchor L, Brioli A, Johnson DC, Kaiser MF, et al. Intraclonal heterogeneity is a critical early event in the development of myeloma and precedes the development of clinical symptoms. *Leukemia* 2014;28(2):384-90.
- Brioli A, Melchor L, Cavo M, Morgan GJ. The impact of intra-clonal heterogeneity on the treatment of multiple myeloma. *Br J Haematol* 2014;165(4):441-54.

Controversias en el tratamiento de primera línea en pacientes con mieloma múltiple candidatos a trasplante autólogo

J. DE LA RUBIA^{1,2}, M.J. CEJALVO¹, P. RIBAS¹

¹Servicio de Hematología. Hospital Universitario Dr. Peset. Valencia. ²Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir. Valencia

Introducción

El mieloma múltiple (MM) es la segunda neoplasia hematológica más frecuente y se caracteriza por la proliferación de células plasmáticas clonales que producen una paraproteína monoclonal detectable en suero y/u orina y que tienen su origen en la diferenciación en estadios avanzados de la célula B post centro-germinal. La sintomatología clínica viene definida por la afectación esquelética (fracturas patológicas, dolores óseos e hipercalcemia), anemia, diferentes grados de insuficiencia renal y, con menor frecuencia, complicaciones neurológicas e hiperviscosidad¹. Aunque sigue considerándose una enfermedad incurable, su pronóstico ha mejorado significativamente en los últimos años especialmente entre los pacientes más jóvenes². Este hecho se debe a los importantes avances terapéuticos experimentados desde finales del siglo pasado, primero con la realización del trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (TAPH) como tratamiento estándar de consolidación y, más recientemente, con el empleo de fármacos con mecanismos de acción nuevos y diferentes a la quimioterapia convencional. Entre éstos, destacan los inhibidores del proteosoma (IP, bortezomib,) y los inmunomodulares (IMiDs, talidomida y lenalidomida).

Estos avances han generado una gran cantidad de información que ha ido acompañada, como no podría ser de otra manera, de la aparición de nuevas incógnitas muchas de las cuales no están todavía resueltas y que son motivo de una activa discusión entre los investigadores dedicados al manejo de los pacientes con MM. Nos encontramos, por tanto, en una encrucijada que plantea un cambio de paradigma en el tratamiento de primera línea en los pacientes jóvenes, dónde se está discutiendo cuáles pueden ser las mejores estrategias para garantizar un mejor y más prolongado control de la enfermedad con el fin último de conseguir, idealmente, la curación en un porcentaje cada vez más alto de estos pacientes. Entre los aspectos de debate destacan cuál es el régimen de inducción óptimo, qué papel juega en

la actualidad el TAPH, cuándo puede ser necesario la terapia post trasplante y, en tal caso, cuál es la mejor opción³. En esta revisión repasaremos, brevemente, los puntos más controvertidos en el tratamiento de primera línea para los pacientes con MM candidatos a trasplantes y hacia dónde puede ir la terapia en los próximos años.

La importancia de la remisión completa

Generalmente se acepta, de manera arbitraria, la edad de 65 años como punto de corte para considerar a un paciente candidato a terapia de inducción e intensificación con trasplante, si bien existe información abundante que apoya la ampliación esta edad perfectamente hasta los 70 años si el paciente no presentara comorbilidades importantes. Independientemente de la edad de selección, el objetivo en esta población de pacientes más jóvenes debe ser la obtención de la remisión completa (RC) duradera que se relaciona con mejores índices de supervivencia global (SG) y supervivencia libre de progresión (SLP)⁴. Hay que subrayar, no obstante, que la RC convencional, tal y como se define hoy en día, incluye un grupo heterogéneo de pacientes que incluye respuestas de excelente calidad sin prácticamente células clonales en la médula con otras en las que se detecta fácilmente enfermedad residual empleando técnica más sensibles de citometría de flujo o de biología molecular. Estos diferentes estatus de calidad dentro de la RC se deben a los distintos tipos de tratamiento aplicados y la biología particular de la célula mielomatosa en cada caso y tienen un impacto en la duración de la respuesta, como lo demuestra el hecho de que sólo el 28% de los pacientes trasplantados en RC la mantienen más allá de los 12 años⁵. El objetivo actual del tratamiento en estos pacientes sería, por tanto alcanzar la tasa más alta posible de remisiones de calidad, es decir, con enfermedad mínima residual negativa molecular o inmunofenotípica al ser éstas las que se han asociado a SLP y SG más prolongadas⁶.

Regímenes de inducción de primera línea

Desde la disponibilidad de fármacos como bortezomib o los IMiDs han sido varios los esquemas de inducción administrados y son numerosos los estudios que han comparado algunos de estos regímenes de inducción tanto frente a combinaciones de quimioterapia convencional como frente a combinaciones de estos fármacos entre sí⁷⁻¹¹ (Tabla 1).

Los regímenes más ampliamente usados en la práctica clínica habitual incluyen combinaciones de tres fármacos como bortezomib, talidomida y dexametasona (VTD), bortezomib, ciclofosfamida y dexametasona (VCD) o bortezomib, adriamicina y dexametasona (PAD). Dos estudios fase III han demostrado la superioridad de VTD frente a talidomida y dexametasona (TD), tanto en tasa de respuestas como en SLP. El grupo italiano GIMEMA administró inducción con VTD o TD

previo al trasplante (estudio MM-BO2005) y observó un mayor porcentaje de RC con el esquema triple tanto pre-trasplante (19% vs. 5%) como post-trasplante (42% vs. 30%). Posteriormente, el Grupo Español de Mieloma (GEM) en su estudio GEM2005 confirmó la superioridad de VTD frente a TD en términos de tasa de RC pre (35% vs. 14%; P=0,001) y posttrasplante (46% vs. 24%; P = 0,004). Además las RC alcanzadas en el estudio GEM2005 fueron más altas que las alcanzadas por el grupo italiano, probablemente debido al mayor número de ciclos de inducción administrado en el estudio español (6 frente a 3). El grupo francés IFM en el estudio 2005-01 demostró la superioridad en la tasa de respuestas con bortezomib y dexametasona (VD) cuando se comparó frente a quimioterapia tipo VAD (CR: 6% vs 1%; P = 0,012). Asimismo, este grupo comparó 4 ciclos de inducción con VTD frente a VD siendo el número de muy buenas respuestas parciales (MBRP)

Tabla 1. Esquemas de inducción pretrasplante de los principales ensayos fase III

Esquema de inducción	Núm. de pacientes	Antes TAPH (%)		Después TAPH (%)		Eventos (%)
		TRG	RC/≥ MBRP	TRG	RC/≥ MBRP	
IFM 2005-01⁷						
*VADx4 ± DCEP x 2	242	63	1/15	77	9/37 (MBRP)	§ SLP: 30 meses
*VD ± DCEP x 2	240	78	6/38	80	16/54 (MBRP)	§ SLP: 36 meses
GIMEMA MM-BO2005⁸						
*VTD x3	236	93	19/62	93	42/82	†3y- SLP: 68 3y-SG: 86
*TD x3	238	79	5/28	84	30/64	†3a- SLP: 56 3a-SG: 84
PETHEMA GEM05MENOS65⁹						
*TD x 6	127	62	14/29	NR	24/NR	SLP: 28 meses 4a-SG: 65
*VTD x 6	130	85	35/60	NR	46/NR	SLP: 56 meses 4a-SG: 74
*VBMCP/VBAD x 4/Bz x 2	129	75	21/36	NR	38/NR	SLP: 35 meses 4a-SG: 70
IFM 2007-02¹⁰						
*VD x 4	99	81	12/36	86	31/58	SLP: 30 meses
*VTD x 4	100	88	13/49	89	29/74	SLP: 26 meses
HOVON-65/GMMG-HD4¹¹						
*VAD x 3-CAD	414	54	2/14	75	9/36	†SLP: 28 meses †5a-SG: 55
*PAD x 3-CAD	413	78	4/42	88	21/62	†SLP: 35 meses †5a-SG: 61

TAPH: trasplante autólogo de progenitores de sangre periférica; TRG: tasa de respuesta global; RC: respuesta completa; MBRP: muy buena respuesta parcial; SLP: supervivencia libre de progresión; SG: supervivencia global; NR: no reportado; VAD: vincristina, doxorubicina, dexametasona; VD: bortezomib, dexametasona; DCEP: dexametasona, ciclofosfamida, etoposido, cisplatino; VTD: bortezomib, talidomida, dexametasona; TD: talidomida, dexametasona; VBMCP/VBAD/Bz: vincristina, BCNU, melfalan, ciclofosfamida, prednisona/vincristina, BCNU, doxorubicina, dexametasona/bortezomib; PAD: bortezomib, doxorubicina, dexametasona; CAD: ciclofosfamida, doxorubicina, dexametasona. †P < 0.05; §P > 0.05.

superior con el esquema triple (49% vs. 36%) pero sin diferencias en la tasa de RC (13% vs. 12%). En cuanto a otros esquemas de inducción, el estudio HOVON-65/GMMG-HD4 demostró la superioridad de PAD frente a VAD en porcentaje de RC antes y después del trasplante y un estudio de revisión reciente parece sugerir que VTD también es superior (y menos tóxico) que VCD en cuanto a tasa RC o casi completas (34% vs. 6%; $P = 0,002$)¹² (Tabla 1).

En ausencia de ensayos que comparen directamente los diferentes esquemas de inducción, un meta-análisis reciente que incluyó los datos procedentes de los distintos estudios fase III llevados a cabo en pacientes jóvenes con MM de nuevo diagnóstico (IFM 2005-01, HOVON-65/GMMG-HD4, GEM2005 y GIMEMA MM-BO2005) concluyó que los regímenes que incluían bortezomib mejoraban la tasa de respuestas globales (RC+cRC: 24% vs. 38%, $P < 0,001$), la SLP (28,6 meses vs. 35,9 meses; $P < 0,001$) y la SG (74,7% vs. 79,7%; $P = 0,0402$) a expensas de mayor neuropatía periférica (17% vs. 34%) y sin incrementar el riesgo de muerte durante la inducción¹³. No obstante, del mencionado estudio no puede deducirse si alguno de los esquemas empleados resultaba superior.

Actualmente diferentes grupos están evaluando la incorporación de los IP (carfilzomib) y/o IMiDS (lenalidomida) de segunda generación así como otros fármacos de reciente desarrollo en nuevos regímenes de inducción con resultados muy esperanzadores¹⁴⁻¹⁷. Hasta disponer de resultados sólidos con estos nuevos regímenes, con la información disponible, y de acuerdo a la tasa de respuestas y la duración de la SLP, la administración de 4-6 ciclos de inducción con un esquema triple basado en bortezomib se considera actualmente el tratamiento de inducción de elección para estos pacientes.

Acondicionamiento

En MM el régimen de acondicionamiento estándar consiste en 200 mg/m² de melfalan (MEL200)¹⁸ y, por el momento, ningún esquema alternativo ha demostrado una superioridad clara. Existen en marcha, no obstante, diferentes estudios con nuevos esquemas de acondicionamiento que incluyen bortezomib o busulfan y que contribuirán a confirmar si existe una alternativa superior al MEL200 actual¹⁹⁻²¹.

Trasplantar o no trasplantar: ¿es esta la cuestión?

Mientras algunos grupos buscan alternativas más eficaces a MEL200 para mejorar los resultados del TAPH, dadas las elevadas respuestas observadas con algunos de los esquemas de inducción más recientes¹⁶, otros

autores se plantean hasta qué punto es necesario realizar un TAPH a todos los pacientes tras la inducción o si resultaría igual de eficaz y menos tóxico demorar el procedimiento del trasplante para el tratamiento de una hipotética recaída.

Dirigidos a intentar resolver estas cuestiones, a finales del 2010 se publicaron los resultados del ensayo aleatorizado ECOG E4A03 que no halló diferencias en la SG a los 2 años cuando comparó los pacientes que habían recibido inducción con lenalidomida y dosis bajas de dexametasona (Rd) hasta progresión frente a aquellos que habían recibido 4 ciclos de inducción con Rd seguida de TAPH²². No obstante, en un análisis *post-hoc* publicado con mayor seguimiento, la SG fue del 94% en aquellos pacientes que recibieron un TAPH y del 78% en los pacientes que solo llevaron Rd²³ lo que parece apoyar el uso precoz del TAPH. En 2013 Palumbo *et al*, presentaron los resultados de un estudio que incluyó 389 pacientes que eran aleatorizados a recibir un TAPH o 6 ciclos de ciclofosfamida, lenalidomida y dexametasona tras una inducción común de 4 ciclos de lenalidomida y dexametasona. Con una mediana de seguimiento de 3 años, la mediana de la SLP fue superior en los pacientes que no recibieron trasplante (27 meses vs. no alcanzada; $P = 0,01$) pero sin diferencias en la SG (81% en el grupo sin trasplante vs. 84% en el de TAPH)²⁴. Posteriormente, este mismo grupo presentó los resultados de otro ensayo fase III en el que, tras una inducción con lenalidomida-dexametasona, se comparó de manera aleatorizada una intensificación con un TAPH en tándem o la administración de seis ciclos de consolidación con melfalan-prednisona-lenalidomida (MPR). Con un seguimiento de 51 meses, la mediana de SLP (43 meses vs. 22,4 meses; $P < 0,001$) y la SG a los 4 años (81,6% vs. 65,3%; $P = 0,02$) fueron significativamente superiores en el grupo que había recibido el trasplante precoz²⁵. A pesar de estos resultados que sugieren la superioridad del trasplante, hay que subrayar que en ambos trabajos, los esquemas de inducción no incluían bortezomib, lo que ha llevado a algunos autores a considerar que se trataba de inducciones subóptimas y, por tanto, la cuestión del TAPH precoz o tardío no está todavía resuelta. En este sentido, actualmente hay dos estudios en marcha (EMN02 e IFM/DFCI 2009) que han incluido 1000 y 1500 pacientes cuyos resultados preliminares probablemente estén disponibles antes de fin de 2015 y que esperamos contribuyan a resolver esta cuestión.

Trasplante en tándem

De manera simultánea al debate sobre la conveniencia o no de la realización del TAPH en la primera línea de tratamiento, otros autores han analizado la utilidad potencial de efectuar un doble autotrasplante al menos

para ciertos subgrupos de pacientes. La potencial utilidad de este procedimiento se apoya en los resultados de un meta-análisis de 1894 pacientes procedentes de 4 grandes estudios europeos que mostraron que el trasplante en tándem mejoraba la SG a los 5 años (75% vs. 63%; $P = 0,002$) y la SLP (50 meses vs. 39 meses; $P = 0,001$)²⁶ siendo el procedimiento especialmente útil en los pacientes de más alto riesgo de progresión (t (4; 14) y / o del (17p) y los que no alcanzan RC tras la inducción)²⁷. Adicionalmente, al analizar los pacientes que habían recibido regímenes de inducción basados en bortezomib, la SLP y SG resultó significativamente superior en aquellos que habían recibido la modalidad en tándem. Aunque estos datos requieren confirmación en estudios prospectivos no hay que olvidar que en la práctica habitual el trasplante en tándem puede verse limitada por diversas razones, como pueden ser la toxicidad del procedimiento o el número de células recolectadas. Hasta que se aporten datos adicionales de ensayos prospectivos se recomienda un solo trasplante limitando la estrategia tándem en aquellos pacientes que no logren alcanzar al menos una MBRP tras la inducción.

Más allá del TAPH: consolidación y mantenimiento

Consolidación

Puesto que en la mayoría de los pacientes persiste enfermedad detectable después del TAPH, y con intención de mejorar la eficacia de la terapia anti-MM, se está analizando la utilidad de diferentes alternativas de tratamiento post trasplante para conseguir una mayor erradicación del clon maligno²⁸. Entre estas alternativas, la consolidación consiste en la administración de una

terapia con baja toxicidad y durante un periodo corto de tiempo. El grupo cooperativo italiano GIMEMA comparó dos ciclos de consolidación con VTD o TD después de un doble TAPH²⁹ (Tabla 2). Esta serie demostró la superioridad de VTD en la tasa de RC y en la SLP post consolidación pero sin diferencias en la SG. Además, se observó una reducción relativa en el riesgo de progresión del 63% después de VTD en comparación con TD en pacientes con citogenética de alto riesgo (t (4; 14) y/o del (17p)). Por otra parte, la curva de SLP grupo de alto riesgo fue casi paralela a la del grupo de riesgo estándar lo que sugiere que VTD no sólo podría mejorar sino también superar el pronóstico adverso asociado con estas anomalías citogenéticas³⁰.

En otro estudio, el grupo nórdico administró consolidación con bortezomib como monoterapia (20 dosis de 1,3 mg/m² durante 21 semanas) o placebo con un incremento del 12% en la tasa de MBRP y una mejoría de la SLP de 7 meses pero, como en el estudio anterior, sin diferencias en la SG³¹ (Tabla 2). Por último, en el estudio australiano ALLG MM6 III se comparó un año de talidomida y prednisolona frente a prednisolona sola hasta progresión. Con una mediana de seguimiento de 5,4 años se observó una prolongación con el tratamiento combinado de la SLP (15% vs. 27%, respectivamente; $P = 0,0054$) y SG (47% y 66%, respectivamente; $P = 0,0072$), sin impacto negativo en las respuesta a las terapias posteriores ni en las tasas de supervivencia³².

Actualmente, la consolidación se ha incluido dentro de las recomendaciones de tratamiento nacionales en algunos países europeos como Francia, con indicación especial para los pacientes que no logran una MBRP después del TAPH o bien o para grupos de riesgo específicos. No obstante, el papel último de la consolidación está por definir y existen diferentes estudios en marcha encaminados a conseguir informa-

Tabla 2. Resultados de los principales estudios que incluyen consolidación después del TAPH

Estudio	Consolidación	Núm. de pacientes	Tasa de respuesta (%)				Eventos (%)
			Pre TAPH		Tras consolidación		
Cavo-2012 ²⁹	TD (70 días) vs. VTD x 2	161 160	TD (70 días)	VTD x 2	TD (70 días)	VTD x 2	†3 años-SLP: 48 vs. 60 SG: ND
			RC: 40	49	47	61	
			RC+cRC: 55	63	61	73	
			> MBRP: 81	86	88	92	
Mellqvist-2013 ³¹	Placebo vs. Bz semanal (20 infusiones)	183 187	Placebo	Bz	Placebo	Bz	†SLP: 20 vs. 27 meses 2 años-SG: 90 vs. 90
			≥ cRC: 21	20	35	45	
			≥ MBRP: 39	40	57	71	

TAPH: trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos; RC: respuesta completa; RM: remisión molecular; MBRP: muy buena respuesta parcial; cCR: casi respuesta completa; SLP: supervivencia libre de progresión; SG: supervivencia global; ND: no disponible; VTD: bortezomib, talidomida, dexametasona; RVD: lenalidomida, bortezomib, dexametasona; TD: talidomida, dexametasona; Bz: bortezomib.

† $P < 0,05$; § $P > 0,05$.

ción adicional acerca de su utilidad y cuál podría ser el esquema más adecuado.

Mantenimiento

El mantenimiento consiste en la administración de un tratamiento no intensivo de manera prolongada con el objetivo de mantener la respuesta alcanzada con las terapias previas. La talidomida fue el primero de los nuevos fármacos que se probó en este campo. Seis ensayos mostraron que su uso tenía un impacto positivo en la SLP⁽³³⁻³⁸⁾ y en tres también se observó un beneficio en la SG³³⁻³⁵ (Tabla 3). Sin embargo, su administración se asociaba a una elevada tasa de abandonos por efectos

adversos especialmente neuropatía ($P = 0,02$) y eventos tromboembólicos ($P = 0,07$)³⁹. Además, no se observó ningún beneficio en términos de SG en los pacientes con citogenética de alto riesgo³⁷ por lo que actualmente no se considera el agente más adecuado para la terapia de mantenimiento.

Bortezomib como terapia de mantenimiento ha sido analizado en dos estudios, uno del grupo holandés y otro del GEM¹¹⁻⁴⁰. En el primero se comparó mantenimiento con bortezomib bisemanal frente a talidomida (50 mg/día). En ambos brazos, la duración prevista del tratamiento fue de dos años. La tasa de RC y cRC, la SLP y la SG fueron superiores en grupo tratado con bortezomib. Sin embargo, el diseño del estudio con regí-

Tabla 3. Resultados de los principales estudios que incluyen mantenimiento después del TAPH

Estudio	Núm. de pacientes	Mantenimiento	Tasa de respuestas (%)		Eventos (%)	Beneficio
			Antes del mantenimiento	Después del mantenimiento		
Talidomida						
Barlogie ³³	668	TT2+ T/TT2	RC: NR	64/43	†5-a SLE: 52/41 §8-a SG: 57/44	SLE+
IFM 99-02 ³⁴	597	T+Pam/Pam/ Ninguno	≥ MBRP: 50/47/47	67/55/57	†3-a SLE: 52/37/36 †5-a SG: 82/80/80	SLE+ SG+
ALLG-MM6 ³⁵	269	T+PD/PD	MBRP: NR	65/44	†5-a PFS: 27/15 †5-a SG: 66/47	PFS+ SG+
HOVON-50 ³⁶	556	T/IFN	RC: 14/12 ≥ MBRP : 54/44	31/23 66/54	†SLP 34/25 meses †SLE: 43/22 meses §SG: 73/60 meses	SLP+ SLE+
MRC IX ³⁷	493	T/Ninguno	NR		†PFS: 30/23 meses §3-a SG: 75/80	PFS+
NCIC-CTG-Ma10 ³⁸	332	T+PD/Ninguno	ND		†SLP: 32/14 meses §4-a SG: 68/60	SLP +
Bortezomib						
HOVON-65/ GMMG ¹¹	613	V/T (2 años)	≥ cRC: 30/16 RC: 21/9	50/38 65/61	†1-a SLP: 45/38 †5-a SG: 61/55	SLP+ SG+
PETHEMA GEM2005 ⁴⁰	266	VT/T/IFN (3 años)	RC: 52/49/50	23/11/19	†2-a SLP: 78/63/49 SG: no diferencias	SLP+
Lenalidomida						
CALGB ⁴²	460	Lena/placebo	RC: 29/34	ND	†SLP: 50/27 meses †3-a SG:88/80	SLP+ SG+
IFM 2005-02 ⁴¹	614	Lena/placebo	≥ MBRP: 61/59 RC: 5/8	84/76 29/27	†SLP:41/23 meses §4-a SG: 75/73	SLP+
GIMEMA ²⁵	402	Lena/placebo	ND		†SLP: 42/21 meses †3a-SG mantenimiento: 81/72 4a-SG diagnóstico: 76/68	SLP+ 3a-SG+

TAPH: trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos; RC: remisión completa; MBRP: muy buena respuesta parcial; ND: no disponible; cRC: casi respuesta completa; sRC: respuesta completa estricta; SLE: supervivencia libre de evento; SG: supervivencia global; SLP: supervivencia libre de progresión; TTP: tiempo a la progresión; IFN: interferón; T; talidomida; Pam: pamidronato; PD: prednisona; TT2: terapia total 2; V: bortezomib; TD: talidomida, dexametasona; VT: bortezomib, talidomida.

†P < 0.05, §P > 0.05

menes de inducción diferentes no permite concluir si el beneficio observado se debe solo a la fase de mantenimiento o al efecto de la inducción o el mantenimiento. Por último, en este estudio se observó también un beneficio especial con bortezomib en los pacientes con creatinina > 2 mg/dL y con del (17p)¹¹. El GEM comparó el tratamiento de mantenimiento con bortezomib y talidomida frente a talidomida o alfa-interferón solos durante 3 años. Los resultados demostraron superioridad con la combinación tanto en tasa de RC como en duración de la SLP. El esquema trimestral usado no se acompañó de un incremento significativo de la toxicidad con el régimen doble⁴⁰ (Tabla 3).

Debido a su mejor perfil de toxicidad y fácil administración, lenalidomida parece el mejor candidato como fármaco de mantenimiento y, de hecho, es con el que hay una mayor experiencia. Tres han sido los estudios que la han utilizado con esta finalidad^{25,41,42} y los tres ensayos mostraron PFS y tiempo prolongados hasta la progresión (TTP), aunque solo uno ha mostrado beneficio en SG⁴². El ensayo del *Cancer and Leukemia Group B* administraba lenalidomida (10 mg/día) como agente único o placebo a partir de 3 meses después del trasplante hasta la progresión. En la última actualización y con una mediana de seguimiento de 65 meses, persistía la ventaja en la SLP (53 meses frente a 27 meses; $P < 0,0001$) y en la SG ($P = 0,001$) en los pacientes tratados con lenalidomida. En el grupo de lenalidomida, hubo un aumento del riesgo de incidencia acumulada de segundos cánceres primarios ($P = 0,005$)⁴³. Un segundo estudio, esta vez del grupo francés, aleatorizó a los pacientes a recibir mantenimiento con lenalidomida (10 mg/día) o placebo hasta la progresión después de dos ciclos de consolidación con lenalidomida (25 mg/día). Con una mediana de seguimiento de 45 meses tras la aleatorización, la SLP fue mayor en el brazo de mantenimiento con lenalidomida (41 vs. 24 meses; $P < 0,0001$) pero sin diferencias en la SG (73% frente a 75%, respectivamente; $P = 0,7$)⁴⁴. En este estudio también se observó una mayor incidencia de segundas neoplasias primarias entre los pacientes tratados con lenalidomida lo que motivó la reducción en la duración del tratamiento de mantenimiento a dos años⁴¹. El último estudio incluía una doble aleatorización. En la primera, se comparaba consolidación con un TAPH en tándem frente a 6 ciclos de MPR y la segunda randomización comparaba mantenimiento con lenalidomida frente a no tratamiento con una mediana de la SLP de 41,9 meses en la rama de mantenimiento y de 21,6 meses en la rama de observación ($P < 0,001$) pero sin diferencias en la SG a los 3 años (88% frente a 79,2%; $P = 0,14$)²⁵.

En conclusión, los resultados de los diferentes ensayos muestran de forma casi uniforme, una prolongación

significativa de la SLP con la terapia de mantenimiento pero con resultados contradictorios en cuanto a su impacto en la SG. Además, este tratamiento no está exento de efectos secundarios y ni el esquema, ni la dosis óptima ni la duración de las diferentes estrategias disponibles han sido definitivamente establecidas por lo que, a falta de ensayos que comparen las diferentes alternativas disponibles es difícil concluir cuál de ellas puede considerarse la mejor opción.

Líneas futuras

De lo discutido en las páginas previas puede observarse que las alternativas terapéuticas que pueden considerarse más intervencionistas, es decir, las que contemplan el uso regímenes de inducción con esquemas triples, la realización de intensificación con TAPH y la administración de algún tipo de tratamiento post trasplante (consolidación y/o mantenimiento) son las que se han asociado aun mayor incremento en el porcentaje de RC y una SLP más prolongada. Por tanto, no parece descabellado considerar en la actualidad la combinación de todas estas opciones dentro de una misma línea de tratamiento. Esta aproximación ya ha sido probada en un estudio fase II del IFM que asoció una inducción con bortezomib, lenalidomida y dexametasona seguida de un TAPH, consolidación con el mismo esquema y mantenimiento con lenalidomida durante un año sin ningún fallecimiento y con un 58% de RC (el 68% con EMR negativa)⁴⁴. Con una mediana de seguimiento de 39 meses, la SLP y la SG a los 3 años fue del 77% y 100%, respectivamente. Resultados similares han sido también publicados por el grupo de Arkansas con esquemas como el *Total Therapy III*.

No obstante, la realidad de la práctica clínica diaria es habitualmente otra, ya que muchos de estos tratamientos no pueden administrarse fuera de ensayos clínicos lo que puede originar cierta frustración entre los profesionales que tratan estos pacientes. No obstante, y mientras muchos de los resultados se consolidan (o confirman), el esquema de tratamiento de primera línea para los pacientes jóvenes con MM debe incluir un esquema triple con bortezomib y una intensificación con TAPH. Los pacientes de alto riesgo (citogenética de mal pronóstico) o con respuestas subóptimas tras el TAPH (respuesta parcial o menos) probablemente se beneficien de algún tratamiento de consolidación, bien un segundo TAPH o una terapia triple similar a la administrada en la inducción. En cuanto al tratamiento de mantenimiento, debe discutirse de manera individual con el paciente teniendo en cuenta que ninguna de las diferentes alternativas (bortezomib o IMiDs) se ha comparado entre sí y que, para algunos autores, no puede considerarse un tratamiento estándar⁴⁵.

Bibliografía

1. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014;15:e538-48.
2. Brenner H, Gondos A, Pulte D. Expected long-term survival of patients diagnosed with multiple myeloma in 2006-2010. *Haematologica* 2009;94:270-5.
3. Moreau P, Attal M, Facon T. Frontline therapy of multiple myeloma. *Blood* 2015;125:3076-84.
4. Harousseau JL, Attal M, Avet-Loiseau H. The role of complete response in multiple myeloma. *Blood* 2009;114:3139-46.
5. Martínez-López J, Blade J, Mateos MV, Grande C, Alegre A, García-Larana J, et al. Long-term prognostic significance of response in multiple myeloma after stem cell transplantation. *Blood* 2011;118:529-34.
6. Lahuerta JJ, Mateos MV, Martínez-López J, Rosinol L, Sureda A, de la Rubia 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;26:5775-82.
7. Harousseau JL, Attal M, Avet-Loiseau H, Marit G, Caillot D, Mohty M, et al. Bortezomib plus dexamethasone is superior to vincristine plus doxorubicin plus dexamethasone as induction treatment prior to autologous stem-cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma: results of the IFM 2005-01 phase III trial. *J Clin Oncol* 2010;28:4621-9.
8. Cavo M, Tacchetti P, Patriarca F, Petrucci MT, Pantani L, Galli M, et al. Bortezomib with thalidomide plus dexamethasone compared with thalidomide plus dexamethasone as induction therapy before, and consolidation therapy after, double autologous stem-cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma: a randomised phase 3 study. *Lancet* 2010;376:2075-85.
9. Rosinol L, Oriol A, Teruel AI, Hernández D, López-Jiménez J, de la Rubia J, et al. Superiority of bortezomib, thalidomide, and dexamethasone (VTD) as induction pretransplantation therapy in multiple myeloma: a randomized phase 3 PETHEMA/GEM study. *Blood* 2012;120:1589-96.
10. Moreau P, Avet-Loiseau H, Facon T, Attal M, Tiab M, Hulin C, et al. Bortezomib plus dexamethasone versus reduced-dose bortezomib, thalidomide plus dexamethasone as induction treatment before autologous stem cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* 2011;118:5752-8; quiz 5982.
11. Sonneveld P, Schmidt-Wolf IG, van der Holt B, El Jarari L, Bertsch U, Salvender H, et al. Bortezomib induction and maintenance treatment in patients with newly diagnosed multiple myeloma: results of the randomized phase III HOVON-65/GMMG-HD4 trial. *J Clin Oncol* 2012;30:2946-55.
12. Leiba M, Kedmi M, Duek A, Freidman T, Weiss M, Leiba R, et al. Bortezomib-cyclophosphamide-dexamethasone (VCD) versus bortezomib-thalidomide-dexamethasone (VTD)-based regimens as induction therapies in newly diagnosed transplant eligible patients with multiple myeloma: a meta-analysis. *Br J Haematol* 2014;166:702-10.
13. Sonneveld P, Goldschmidt H, Rosinol L, Blade J, Lahuerta JJ, Cavo M, et al. Bortezomib-based versus nonbortezomib-based induction treatment before autologous stem-cell transplantation in patients with previously untreated multiple myeloma: a meta-analysis of phase III randomized, controlled trials. *J Clin Oncol* 2013;31:3279-87.
14. Richardson PG, Weller E, Lonial S, Jakubowiak AJ, Jagannath S, Raju NS, et al. Lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone combination therapy in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* 2010;116:679-86.
15. Kumar S, Flinn I, Richardson PG, Hari P, Callander N, Noga SJ, et al. Randomized, multicenter, phase 2 study (EVOLUTION) of combinations of bortezomib, dexamethasone, cyclophosphamide, and lenalidomide in previously untreated multiple myeloma. *Blood* 2012;119:4375-82.
16. Jakubowiak AJ, Dytfeld D, Griffith KA, Lebovic D, Vesole DH, Jagannath S, et al. A phase 1/2 study of carfilzomib in combination with lenalidomide and low-dose dexamethasone as a frontline treatment for multiple myeloma. *Blood* 2012;120:1801-9.
17. Moreau P, Mateos MV, Bladé J. An Open-Label, Multicenter, Phase 1b Study of Daratumumab in Combination with Backbone Regimens in Patients with Multiple Myeloma [abstract]. 56th ASH Annual Meeting and Exposition 2014; San Francisco, CA.
18. Bleeker JS, Gertz MA, Pellikka PA, Larson DR, Buadi F, Dingli D, et al. Evaluation of pretransplant factors predicting cardiac dysfunction following high-dose melphalan conditioning and autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Eur J Haematol* 2012;89:228-35.
19. Roussel M, Moreau P, Huynh A, Mary JY, Danho C, Caillot D, et al. Bortezomib and high-dose melphalan as conditioning regimen before autologous stem cell transplantation in patients with de novo multiple myeloma: a phase 2 study of the Intergroupe Francophone du Myelome (IFM). *Blood* 2010;115:32-7.
20. Blanes M, Lahuerta JJ, González JD, Ribas P, Solano C, Alegre A, et al. Intravenous busulfan and melphalan as a conditioning regimen for autologous stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma: a matched comparison to a melphalan-only approach. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;19:69-74.
21. Bayraktar UD, Bashir Q, Qazilbash M, Champlin RE, Ciurea SO. Fifty years of melphalan use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;19:344-56.
22. Rajkumar SV, Jacobus S, Callander NS, Fonseca R, Vesole DH, Williams ME, et al. Lenalidomide plus high-dose dexamethasone versus lenalidomide plus low-dose dexamethasone as initial therapy for newly diagnosed multiple myeloma: an open-label randomized controlled trial. *Lancet Oncol* 2010;11:29-37.
23. Siegel D, Jacobus S, Rajkumar SV, et al. Outcome with lenalidomide plus dexamethasone followed by early autologous stem cell transplantation in the ECOG E4A03 randomized clinical trial [abstract 38]. 53rd Annual Meeting and Exposition 2013; New Orleans, LA.
24. Palumbo A, Gay F, Spencer A, Di Raimondo F, Zdenek A, Larocca A, et al. A phase III study of ASCT vs cyclophosphamide-lenalidomide-dexamethasone and lenalidomide maintenance vs lenalidomide alone in newly diagnosed myeloma patients [abstract]. 55rd ASH Annual Meeting and Exposition 2015; New Orleans, LA.
25. Palumbo A, Cavallo F, Gay F, Di Raimondo F, Ben Yehuda D, Petrucci MT, et al. Autologous transplantation and maintenance therapy in multiple myeloma. *N Engl J Med* 2014;371:895-905.
26. Cavo M, Sonneveld P, Moreau P, Blade J, Goldschmidt H, San Miguel J, et al. Impact of Bortezomib Incorporated Into Autotransplantation On Outcomes of Myeloma Patients with High-Risk Cytogenetics: An Integrated Analysis of 1894 Patients Enrolled in Four European Phase 3 Studies [abstract]. 54rd ASH Annual Meeting and Exposition 2012; Atlanta, GA.
27. Cavo M, Salvender H, Rosinol L, Moreau P, Petrucci MT, Blau IW, et al. Double vs. single autologous stem cell transplantation after bortezomib-based induction regimens for multiple myeloma: an integrated analysis of patient-level data from phase European III studies [abstract]. 55rd ASH Annual Meeting and Exposition 2013; New Orleans, LA.
28. Keats JJ, Chesi M, Egan JB, Garbitt VM, Palmer SE, Braggio E, et al. Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood* 2012;120:1067-76.

29. Cavo M, Pantani L, Petrucci MT, Patriarca F, Zamagni E, Donnarumma D, et al. Bortezomib-thalidomide-dexamethasone is superior to thalidomide-dexamethasone as consolidation therapy after autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* 2012;120:9-19.
30. San-Miguel JF. Consolidation therapy in myeloma: a consolidated approach? *Blood* 2012;120:2-3.
31. Mellqvist UH, Gimsing P, Hjertner O, Lenhoff S, Laane E, Remes K, et al. Bortezomib consolidation after autologous stem cell transplantation in multiple myeloma: a Nordic Myeloma Study Group randomized phase 3 trial. *Blood* 2013;121:4647-54.
32. Kalf J, Kennedy N, Smiley A. Thalidomide and prednisolone versus prednisolone alone as consolidation therapy after autologous stem-cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma: final analysis of the ALLG MM6 multicentre, open-label, randomised phase 3 study. *The Lancet Haematology* 2014;1(3):e112-e119.
33. Barlogie B, Pineda-Roman M, van Rhee F, Haessler J, Anaisie E, Hollmig K, et al. Thalidomide arm of Total Therapy 2 improves complete remission duration and survival in myeloma patients with metaphase cytogenetic abnormalities. *Blood* 2008;112:3115-21.
34. Attal M, Harousseau JL, Leyvraz S, Doyen C, Hulin C, Benboubker L, et al. Maintenance therapy with thalidomide improves survival in patients with multiple myeloma. *Blood* 2006;108:3289-94.
35. Spencer A, Prince HM, Roberts AW, Prosser IW, Bradstock KF, Coyle L, et al. Consolidation therapy with low-dose thalidomide and prednisolone prolongs the survival of multiple myeloma patients undergoing a single autologous stem-cell transplantation procedure. *J Clin Oncol* 2009;27:1788-93.
36. Lokhorst HM, van der Holt B, Zweegman S, Vellenga E, Croockewit S, van Oers MH, et al. A randomized phase 3 study on the effect of thalidomide combined with adriamycin, dexamethasone, and high-dose melphalan, followed by thalidomide maintenance in patients with multiple myeloma. *Blood* 2010;115:1113-20.
37. Morgan GJ, Gregory WM, Davies FE, Bell SE, Szubert AJ, Brown JM, et al. The role of maintenance thalidomide therapy in multiple myeloma: MRC Myeloma IX results and meta-analysis. *Blood* 2012;119:7-15.
38. Stewart K. A randomized phase III trial of thalidomide and prednisone as maintenance therapy following autologous stem cell transplantation (ASCT) in patients with multiple myeloma (MM): the NCIC CTG MY10 Trial. *Blood* 2010;116:abstract 39.
39. Hahn-Ast C. Improved progression-free survival and overall survival with thalidomide maintenance therapy after autologous stem cell transplantation in multiple myeloma: a meta-analysis of five randomized trials. *Proceedings of 16rd EHA Congress of the European Haematology Association; 2011, June 12-15; London.*
40. Rosiñol L, Cibeira MT, Mateos MV, Martínez J, Oriol A, Teruel AI, et al. A phase III PETHEMA/GEM randomised trial of post-transplant maintenance in multiple myeloma: superiority of bortezomib/thalidomide compared with thalidomide and alfa-2b interferon [abstract]. *53rd ASH Annual Meeting and Exposition 2011; San Diego, CA.*
41. Attal M, Lauwers-Cances V, Marit G, Caillot D, Moreau P, Facon T, et al. Lenalidomide maintenance after stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med* 2012;366:1782-91.
42. McCarthy PL, Owzar K, Hofmeister CC, Hurd DD, Hassoun H, Richardson PG, et al. Lenalidomide after stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med* 2012;366:1770-81.
43. Holstein SA, Owzar K, Richardson PG, et al. Updated analysis of CALGB/ECOG/BMT CTN 100104: Lenalidomide (Len) vs. placebo (PBO) maintenance therapy after single autologous stem cell transplant (ASCT) for multiple myeloma (MM). *J Clin Oncol* 2015;(Suppl33):abstr 8523.
44. Roussel M, Lauwers-Cances V, Robillard N, Hulin C, Leleu X, Benboubker L, et al. Front-line transplantation program with lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone combination as induction and consolidation followed by lenalidomide maintenance in patients with multiple myeloma: a phase II study by the Intergroupe Francophone du Myelome. *J Clin Oncol* 2014;32:2712-7.
45. Ludwig H, Sonneveld P, Davies F, Blade J, Boccadoro M, Cavo M, et al. European perspective on multiple myeloma treatment strategies in 2014. *Oncologist* 2014;19:829-44.

Nuevos fármacos y combinaciones para el tratamiento del MM refractario

E.M. OCIO, J. DÁVILA, V. GONZÁLEZ-DE LA CALLE Y M.V. MATEOS

Complejo Asistencial Universitario de Salamanca (IBSAL) y Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC-CSIC).
Universidad de Salamanca. Salamanca

Introducción

A pesar de la mejora en la supervivencia observada en los pacientes en las últimas décadas,¹ el mieloma múltiple (MM) continúa siendo considerado una enfermedad incurable, lo que implica la necesidad de disponer de diferentes tratamientos para poder ser utilizados en las diferentes recaídas que se van a presentar en la evolución de cada paciente. Esta necesidad se ha traducido en una importante investigación de nuevos fármacos y nuevos mecanismos de actuación que puedan ser eficaces para eliminar las células plasmáticas tumorales responsables de la aparición de esta enfermedad². De hecho, en los últimos años hemos asistido a una revolución en el tratamiento del MM. Así, 15 años atrás el únicamente disponíamos de fármacos quimioterápicos como el melfalán, esteroides y combinaciones de quimioterapia, junto con el trasplante autólogo que también se basaba en el empleo de altas dosis de melfalán. Posteriormente, a principios de

este siglo se aprobaron por primera vez fármacos con dos nuevos mecanismos de actuación: inhibidores del proteasoma con el bortezomib, y los fármacos inmunomoduladores como la talidomida y la lenalidomida. Tuvimos que esperar diez años para que las agencias reguladoras aprobaran la segunda generación de estas familias farmacológicas, representadas por carfilzomib y pomalidomida respectivamente. Por último, en este año, se ha aprobado por primera vez un fármaco con un mecanismo de actuación diferente a los ya mencionados: panobinostat, un inhibidor de histonas deacetilasas, en combinación con bortezomib y dexametasona. Es previsible, que en los próximos meses, tengamos también disponibles para su uso otros mecanismos de actuación, fundamentalmente anticuerpos monoclonales dirigidos frente a diferentes antígenos importantes para la patología tumoral.

A continuación se revisarán los principales estudios con los nuevos fármacos disponibles para el tratamiento de los MM en recaída o refractarios (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen de los principales estudios con fármacos nuevos en MM

Ensayo	Fase	Tratamiento	≥ RP (%)	SLP (meses)	SG (meses)
Focus ⁵	III	K vs. BSC (ciclofosfamida + prednisona)	19 vs. 11	3.7 vs. 3.3	10.2 vs. 10
Endeavor ⁶	III	Kd vs. Bd	77 vs. 63	18.7 vs. 9.4	NR vs. 24.3
Aspire ⁷	III	KRd vs. Rd	87 vs. 67	26 vs. 17.6	73% vs. 65% a los 2 años
MM003 ¹⁰	III	Pom-Dex vs. Dex	31 vs. 10	4 vs. 1.9	13.1 vs. 8.1
MM010 (Stratus) ¹¹	II	Pom-Dex	35	4.2	11.9
Panorama-1 ¹⁵	III	Panob-Bd vs. Bd	61 vs. 55	12 vs. 8.1	34 vs. 30
Eloquent-2 ¹⁶	III	Elo-Rd vs. Rd	79 vs. 66	19.4 vs. 14.9	ND
MMY1001 ¹⁷	I	Daratumumab	36*	5.6*	65% a 1 año**
MMY2002 (Sirius) ¹⁸	II	Daratumumab	29	3.7	65% a 1 año
TED10893 ¹⁹	I	Isatuximab (SAR650984)	33***	ND	ND

K: carfilzomib; BSC: mejor tratamiento de soporte (best supportive care); d: dexametasona a dosis bajas; B: bortezomib; R: lenalidomida; Pom: pomalidomida; Dex: dexametasona; Panob: panobinostat; Elo: elotuzumab; RP: respuesta parcial; SLP: supervivencia libre de progresión; SG: supervivencia global; ND: no disponible.

*En la cohorte de 16 mg/kg. **En los respondedores. ***En los pacientes que recibieron ≥ 10 mg/kg.

Nuevos inhibidores de proteasoma

Tras la actividad de bortezomib, otros nuevos inhibidores de proteasoma, con diferentes propiedades biológicas y vías de administración, han sido sintetizados y desarrollados. Entre estos cabe destacar el carfilzomib que en los estudios iniciales llevados a cabo en monoterapia indujo una tasa de respuestas de un 52% en pacientes no expuestos a bortezomib³, y, en torno a un 20% de respuestas en pacientes refractarios a este fármaco⁴. De hecho, estos resultados condicionaron su aprobación por la FDA para el tratamiento de pacientes con MM que han recibido al menos dos líneas previas de tratamiento, incluyendo bortezomib y un IMiD y que son refractarios a la última línea. Posteriormente, el estudio FOCUS comparó su eficacia en monoterapia frente al mejor tratamiento de soporte, que consistía en esteroides con la posibilidad de añadir ciclofosfamida (que de hecho fue añadida en un 95% de los pacientes de ese brazo control) en pacientes con MM en fases muy avanzadas sin otras opciones terapéuticas⁵. En este estudio carfilzomib no demostró ventaja en supervivencia (objetivo principal) frente a ciclofosfamida y prednisona (OS 10.2 vs. 10 meses; $p = 0,4$) posiblemente por la buena supervivencia de los pacientes del brazo control. Sin embargo sí fue claramente positivo el estudio ENDEAVOR que comparó carfilzomib + dexametasona frente a bortezomib + dexametasona en términos de supervivencia libre de progresión (SLP) (18,7 vs. 9,4. HR 0,53 (0,44-0,65) $p < 0,0001$)⁶. Carfilzomib también indujo una mayor tasa de respuestas (\geq PR 77% vs. 63%; $p < 0,0001$) y una tendencia a mejor supervivencia que aún no es estadísticamente significativa. Por último, carfilzomib también se ha estudiado en combinación con lenalidomida y dexametasona y comparado con lenalidomida y dexametasona (estudio ASPIRE) en pacientes que habían recibido entre 1 y 3 líneas de tratamiento previas⁷. Esta combinación ha producido los mejores resultados disponibles hasta la fecha en pacientes con MM en recaída y refractarios, con una SLP de 26,3 meses en comparación con 17,6 para lenalidomida y dexametasona (HR (95% CI) 0,69 (0,57-0,83) $p < 0,0001$). La tasa de respuestas fue de 87,1 vs. 66,7 ($p < 0,001$) y la mediana de supervivencia global, aunque no alcanzada en ninguna de las dos ramas, fue superior para la combinación carfilzomib + lenalidomida + dexametasona (HR (95% CI) 0,79 (0,63-0,99) $p = 0,018$). Con respecto a su perfil de seguridad, el carfilzomib es un fármaco bien tolerado, siendo la principal toxicidad hematológica con algunos casos reportados de toxicidad cardiopulmonar o renal. Además, a diferencia de bortezomib, no produce neuropatía periférica.

Oprozomib es un análogo estructural de carfilzomib que tiene como principal peculiaridad su biodisponibilidad oral. Aunque los resultados preliminares parecen prometedores, su desarrollo está más retrasado.

Otro exponente de este grupo de fármacos que también es de administración oral es ixazomib (MLN9708). Este fármaco ha sido evaluado en dos esquemas diferentes en pacientes previamente expuestos a bortezomib, con una tasa de respuestas entre 15-20% y un perfil de toxicidad similar al del bortezomib: gastrointestinal, exantema cutáneo y neuropatía periférica^{8,9}. Actualmente se está evaluando en diferentes combinaciones como con melfalán y prednisona y fundamentalmente con lenalidomida y dexametasona, cuyos resultados ya se ha anunciado que son positivos, pero no han sido reportados hasta la fecha.

Nuevos agentes inmunomoduladores

Pomalidomida ha surgido como un nuevo fármaco inmunomodulador que, tras demostrar eficacia en combinación con dexametasona, en varios estudios fase 2 en pacientes refractarios a lenalidomida, fue evaluado en un estudio fase 3 en pacientes que han fracasado tanto lenalidomida como bortezomib y refractarios a la última línea (MM-003)¹⁰. En este ensayo los pacientes fueron randomizados a recibir pomalidomida + dosis bajas de dexametasona frente a altas dosis de dexametasona. Pomalidomida + dexametasona, en este grupo de pacientes de muy mal pronóstico, indujo un 31% de respuestas con una SLP de 4 meses y una SG de 13,1 meses (frente a 3%, 1,9 meses y 8,1 meses en el brazo control). De hecho, basado en estos datos, esta combinación ha sido ya aprobada por la FDA y la EMA con la misma indicación mencionada previamente para el carfilzomib. Posteriormente se ha llevado a cabo otro estudio confirmatorio de estos datos con esta misma combinación en la misma población de pacientes pero de brazo único (MM-010. Estudio STRATUS) que ha demostrado unos resultados muy semejantes (\geq PR 35%, SLP de 4,2 y SG de 11,9 meses)¹¹. El perfil de seguridad es similar al de lenalidomida, siendo los efectos adversos hematológicos la principal causa de toxicidad. Como sucede con carfilzomib, varios ensayos en pacientes en recaída se están llevando a cabo con varias combinaciones con este fármaco, como por ejemplo con ciclofosfamida o con bortezomib que han mejorado los resultados de la combinación.

Inhibidores de histonas deacetilasas (DACi)

Las deacetilasas son proteínas sobreexpresadas en varios tumores, incluido el MM, que mediante su acción sobre las histonas y otras proteínas no-histonas tienen un efecto pro-oncogénico¹². Varios fármacos perteneciendo a diferentes grupos químicos y con diferente especificidad frente a estas proteínas han sido desarrollados y evaluados en oncología. Los más importantes evaluados en MM son panobinostat, vorinostat, romidepsina, givi-

nostat y rocilinoestat. Las expectativas levantadas por esta familia de fármacos han experimentado numerosos vaivenes a lo largo de su desarrollo. Así, a pesar de su prometedora actividad en los estudios preclínicos, la actividad clínica de todos ellos en monoterapia en diferentes estudios piloto fue muy modesta, sin observarse prácticamente ninguna respuesta. Sin embargo, estos fármacos no fueron abandonados, basándose en el sinergismo esperado de su combinación con inhibidores del proteasoma, derivado de la simultánea inhibición que el proteasoma con finergismo derivado de la simultánea inhibición de givinostat y rocilinoestat. Este complejo catalítico (mediante los inhibidores del proteasoma) y la inhibición de la formación del agregoma (con los DACi). Sin embargo, tras varios estudios piloto combinando bortezomib con vorinostat o panobinostat que presentaron resultados prometedores, el primer estudio randomizado reportado que comparó bortezomib + vorinostat frente a bortezomib (Vantage-088) no fue positivo. De hecho, a pesar de mostrar una mejora en la tasa de respuestas (ORR 56% vs. 41%, $p < 0,0001$) y diferencias significativas en la SLP (7,6 vs. 6,8 meses, $p = 0,010$), estas diferencias fueron solo de 24 días por lo que no se consideró clínicamente relevante¹³. Por último, recientemente se han reportado los resultados del otro estudio randomizado llevado a cabo (Panorama-1) que a diferencia del anterior, se basa en la utilización de panobinostat y que asocia dexametasona en ambos brazos. Este estudio mostró ventajas en la tasa de respuestas completas (28% vs. 16%) así como diferencias estadística y clínicamente significativas en la SLP (12,0 vs. 8,1 meses HR (95% CI) 0,63 (0,52-0,76), $p < 0,0001$)¹⁴. Además, en pacientes de peor pronóstico, como son los que han sido expuestos previamente a inhibidores del proteasoma y a IMiDs y que han recibido al menos 2 líneas de tratamiento, los resultados son claramente superiores al grupo control -SLP de 12,5 vs. 4,7 meses, HR (95% CI) 0,47 (0,31-0,72)-¹⁵. Sin embargo, la combinación ha mostrado una toxicidad significativa, fundamentalmente con diarrea, astenia y trombopenia, que ha llevado a numerosas discontinuaciones, por lo que una asignatura pendiente es la optimización del esquema y de las dosis para conseguir mantener a los pacientes en tratamiento y así poder mejorar estos resultados. Además, estos fármacos han sido también capaces de vencer la resistencia a bortezomib en dos estudios diseñados específicamente para esta población de pacientes.

Anticuerpos monoclonales e inmunoterapia

La activación del sistema inmune frente al tumor es uno de los campos donde se está llevando a cabo una investigación más activa en la oncología. En este sentido, uno de los grupos de fármacos más prometedores

son los anticuerpos monoclonales, que además son un paradigma de la terapia dirigida, ya que van específicamente dirigidos frente a dianas de la célula tumoral.

Elotuzumab es un anticuerpo frente a SLAMF7 (*Signaling Lymphocyte Activation Molecule-1*), también llamada CS-1. Esta molécula es una glicoproteína de membrana presente en células plasmáticas, NK y células T CD8+. Aunque los resultados en monoterapia han sido muy modestos (con enfermedad estable como mejor respuesta), la combinación con lenalidomida y dexametasona ha producido resultados excelentes. Así, el ensayo ELOQUENT-2 comparó esta combinación frente a lenalidomida y dexametasona con resultados favorables para la adición de elotuzumab. Tasa de respuestas de 79% vs. 66%, $p = 0,0002$ y SLP de 19,4 vs. 14,9 meses HR 0,70 (95% CI: 0,57-0,85; $p = 0,0004$)¹⁶. El mecanismo de acción propuesto es un efecto sinérgico de activación del sistema inmune frente a la célula tumoral.

Otro antígeno de la célula plasmática que ha demostrado ser una diana terapéutica eficaz en MM es el CD38. Varios anticuerpos monoclonales están siendo evaluados frente a este antígeno, siendo los que más avanzados están en el desarrollo daratumumab e isatuximab (SAR650984). Con respecto al primero de ellos, daratumumab, los resultados de su estudio “first in human” (MMY1001) ya han sido publicados con una tasa de respuestas en monoterapia de un 35% y una SLP de 5 meses en pacientes con una mediana de 6 líneas de tratamiento previas¹⁷. Estos resultados parece que van a ser la base para su aprobación acelerada. Un estudio confirmatorio se está llevando a cabo con este anticuerpo con pacientes prácticamente todos ellos dobles refractarios a IMiDs e inhibidores del proteasoma (MMY2002-Sirius)¹⁸ con un 29% de respuestas y una duración de las mismas de 9,3 meses. Isatuximab ha producido resultados similares en los estudios iniciales con un 32% de \geq PR a dosis superiores a 10 mg/kg¹⁹. El perfil de toxicidad es excelente y ya están siendo utilizados en diferentes combinaciones con diversos estándares de tratamiento, fundamentalmente con lenalidomida y dexametasona.

Dentro de este apartado de la inmunoterapia, otro de los tratamientos más prometedores está representado por los inhibidores de los “check-points inmunes”. Estos puntos de control inmune son mecanismos de regulación de la respuesta inmunológica y se encuentran sobreexpresados en las células tumorales, evitando ser descubiertas por el sistema inmunológico. Uno de los principales representantes de estas moléculas es el eje PD1/PD-L1. Así, dos anticuerpos monoclonales frente a PD1, encaminados a bloquear este mecanismo se han evaluado en MM. Sin embargo, la combinación con otros fármacos como los IMiDs aparece como especialmente interesante.

Por último, recientemente se han publicado casos de pacientes con MM que han respondido a la infusión de (CAR-T cells), es decir, linfocitos T del paciente, modificados *ex vivo* y reinducidos para inducir una respuesta inmune antitumoral²⁰. Aunque son datos esporádicos, junto con los buenos resultados mostrados previamente con anticuerpos monoclonales, ponen de manifiesto el potencial de la inmunoterapia en los pacientes con MM.

Fármacos dirigidos frente a otros mecanismos específicos de la célula tumoral

Entre este grupo de fármacos misceláneo hay que destacar varios mecanismos específicos con buenas expectativas en el futuro del MM: Filanesib (ARRY-520), un inhibidor específico de las “kinesin spindle proteins” que son unas proteínas necesarias para separación del centrosoma y la formación del huso mitótico bipolar. Este fármaco ha demostrado un porcentaje de respuestas de en torno a un 15% tanto solo como en combinación con dexametasona en pacientes con una mediana de líneas de tratamiento de 6 y 9 respectivamente. Se están llevando a cabo numerosas combinaciones fundamentalmente con inhibidores de proteasomas o con pomalidomida y dexametasona en el contexto del grupo español de MM.

Otro mecanismo que se está evaluando es la inhibición de las exportinas (XPO-1) que son proteínas que trasladan fuera del núcleo diferentes elementos, como por ejemplo proteínas supresoras tumorales. Selinexor es un inhibidor específico de estas proteínas que, en combinación con dexametasona, ha mostrado un 60% de respuestas en pacientes muy tratados.

Varios miembros de la familia de la vía de RAS/MEK/Erk aparecen como unos de los más frecuentemente mutados en MM y de hecho, esta vía está implicada en la patogenia del MM y de resistencia a fármacos. Por ello su inhibición numerosas estrategias dirigidas a bloquearla, como la utilización del inhibidor de MEK trametinib, se están probando actualmente.

Por último, dentro de este grupo, otras proteínas que parecen especialmente interesantes son las Pim-quinasas, que están involucradas en la vía de mTOR y se encuentran sobreexpresadas, especialmente la PIM-2 en MM. Un inhibidor específico de estas proteínas, PIM-447, se ha utilizado en un estudio “first in man” en MM con buenos resultados. Además los estudios preclínicos, sugieren que se trata de un buen fármaco para combinar con las estrategias convencionales.

Los inhibidores de las “Heat-shock proteins 90” (Hsp-90) parecían tener un futuro prometedor hace algunos años, fundamentalmente en combinación con bortezomib, pero esos buenos resultados no se confirmaron en estudios fase 3. Por último, dentro de los inhibidores de vías de señalización, quizá aquellos con

más futuro son los inhibidores de la vía de PI3K/AKT/mTOR, pero, de nuevo, aún no disponemos de resultados sólidos sobre estas moléculas.

Conclusiones

La aparición de estos nuevos tratamientos nos sitúa en un escenario completamente diferente, ya que ahora tendremos muy variadas opciones terapéuticas para nuestros pacientes y tendremos que decidir cuál de ellas utilizar en cada momento en los pacientes en recaída. Esta decisión se deberá basar en diferentes parámetros, como los fármacos que nos quedan disponibles para su utilización en un paciente particular, la eficacia y toxicidad previa a cada uno de los tratamientos, el tipo de recaída y, por supuesto, las preferencias de los pacientes. Así podremos conseguir, de hecho, ya lo hemos conseguido en gran medida, prolongar la supervivencia de los pacientes con MM, y convertirla en una enfermedad crónica. Por último, podríamos soñar, que la combinación de estos nuevos tratamientos entre sí, podría eliminar de forma definitiva el clon tumoral y conseguir la, tan ansiada, curación de nuestros pacientes.

Bibliografía

1. Kumar SK, Dispenzieri A, Lacy MQ, et al. Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients. *Leukemia* 2014;28(5):1122-8.
2. Ocio EM, Richardson PG, Rajkumar SV, et al. New drugs and novel mechanisms of action in multiple myeloma in 2013: a report from the International Myeloma Working Group (IMWG). *Leukemia* 2014;28(3):525-42.
3. Vij R, Wang M, Kaufman JL, et al. An open-label, single-arm, phase 2 (PX-171-004) study of single-agent carfilzomib in bortezomib-naïve patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma. *Blood* 2012;119(24):5661-70.
4. Siegel DS, Martin T, Wang M, et al. A phase 2 study of single-agent carfilzomib (PX-171-003-A1) in patients with relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood* 2012;120(14):2817-25.
5. Ludwig H, Masszi T, Petrucci MT, et al. LBA28 carfilzomib (K) VS low-dose corticosteroids and optional cyclophosphamide (CY) in patients (PTS) with relapsed and refractory multiple myeloma (RRMM): Results from a phase 3 study (FOCUS). *Annals of Oncology* 2014;25(Supl. 4).
6. Dimopoulos MA, Moreau P, Palumbo A, et al. Carfilzomib and dexamethasone (Kd) vs bortezomib and dexamethasone (Vd) in patients (pts) with relapsed multiple myeloma (RMM): Results from the phase III study ENDEAVOR. *ASCO Meeting Abstracts* 2015;33(15_supl.):8509.
7. Stewart AK, Rajkumar SV, Dimopoulos MA, et al. Carfilzomib, lenalidomide, and dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med* 2015;372(2):142-52.
8. Kumar SK, Bensinger WI, Zimmerman TM, et al. Phase 1 study of weekly dosing with the investigational oral proteasome inhibitor ixazomib in relapsed/refractory multiple myeloma. *Blood* 2014;124(7):1047-55.
9. Richardson PG, Baz R, Wang M, et al. Phase 1 study of twice-weekly dosing of investigational oral proteasome inhibitor ixazomib in patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma. *Blood* 2014; 124(7):1038-46.

10. San Miguel J, Weisel K, Moreau P, et al. Pomalidomide plus low-dose dexamethasone versus high-dose dexamethasone alone for patients with relapsed and refractory multiple myeloma (MM-003): A randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2013;14(11):1055-66.
11. Dimopoulos MA, Palumbo A, Weisel K, et al. Safety and efficacy in the stratus (MM-010) trial, a single-arm phase 3b Study evaluating pomalidomide + low-dose dexamethasone in patients with refractory or relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood* 2014;124(21):80-80.
12. Ocio EM, San Miguel JF. The DAC system and associations with multiple myeloma. *Invest New Drugs* 2010;28(Supl. 1):S28-35.
13. Dimopoulos MA, Jagannath S, Yoon S-S, et al. Vantage 088: Vorinostat in combination with bortezomib in patients with relapsed/refractory multiple myeloma: Results of a global, randomized phase 3 trial. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2011;118(21):811.
14. San-Miguel JF, Hungria VT, Yoon SS, et al. Panobinostat plus bortezomib and dexamethasone versus placebo plus bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: A multicentre, randomised, double-blind phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2014;15(11):1195-206.
15. San Miguel JF, Hungria VT, Yoon S-S, et al. Panobinostat plus bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma who received prior bortezomib and IMiDs: A predefined subgroup analysis of PANORAMA 1. *ASCO Meeting Abstracts* 2015;33(15_Supl.):8526.
16. Lonial S, Dimopoulos M, Palumbo A, et al. Elotuzumab Therapy for relapsed or refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 2015;373(7):621-31.
17. Lokhorst HM, Plesner T, Laubach JP, et al. Targeting CD38 with daratumumab monotherapy in multiple myeloma. *N Engl J Med* 2015;373(13):1207-19.
18. Lonial S, Weiss BM, Usmani SZ, et al. Phase II study of daratumumab (DARA) monotherapy in patients with ≥ 3 lines of prior therapy or double refractory multiple myeloma (MM): 54767414MMY2002 (Sirius). *ASCO Meeting Abstracts* 2015;33(15_Supl.):LBA8512.
19. Martin TG, Hsu K, Strickland SA, et al. A phase I trial of SAR650984, a CD38 monoclonal antibody, in relapsed or refractory multiple myeloma. *ASCO Meeting Abstracts*. 2014;32(15_Supl.):8532.
20. Garfall AL, Maus MV, Hwang WT, et al. Chimeric antigen receptor T cells against CD19 for multiple myeloma. *N Engl J Med* 2015;373(11):1040-7.

Controversia en el diagnóstico y en el tratamiento de la amiloidosis de cadenas ligeras (AL)

M.T. CIBEIRA, J. BLADÉ

Unitat d'Amiloidosi i Mieloma. Institut de Malalties Hemato-Oncològiques. Servei d'Hematologia. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS). Hospital Clínic. Barcelona

Introducción

Las amiloidosis son un grupo de enfermedades caracterizadas por el depósito extracelular de amiloide, una sustancia aparentemente amorfa que se tiñe con el rojo Congo. Se diferencian entre sí por el tipo de proteína precursora de la sustancia amiloide, que en la amiloidosis de cadenas ligeras (AL, antes conocida como “primaria”) es una cadena ligera de las inmunoglobulinas monoclonal, lambda en la mayoría de casos (70-80%), producida por una población clonal de células plasmáticas¹. Las fibrillas amiloides pueden depositarse en cualquier tejido excepto en el sistema nervioso central, dando lugar a las manifestaciones clínicas propias de la enfermedad y la disfunción de los órganos afectados. Por tratarse de una enfermedad rara y de expresividad clínica muy variada, es frecuente que se diagnostique de forma tardía y con afección orgánica ya en fase avanzada, lo que en casos con amiloidosis cardiaca condicionará de forma muy importante el pronóstico de la enfermedad. La asociación de un cuadro clínico característico y una gammapatía monoclonal, junto con la demostración del depósito amiloide tisular y su caracterización (kappa o, más frecuentemente, lambda), nos permitirá establecer el diagnóstico de amiloidosis AL y valorar las diferentes opciones terapéuticas.

Manifestaciones clínicas

La edad mediana de presentación es de 65 años y dos tercios de los pacientes son varones². Astenia y pérdida de peso constituyen los síntomas más habituales. La afección orgánica más frecuente es la renal (70-80% de casos), que suele presentarse en forma de proteinuria glomerular y, más raramente, en una insuficiencia renal progresiva. El depósito cardiaco está presente en un 50-70% de pacientes y da lugar a una miocardiopatía restrictiva, generalmente de instauración brusca y rápida evolución. La insuficiencia cardiaca se presenta en el 15-20% de los casos en el momento del diagnóstico. Aunque la afección histopatológica hepática es también

frecuente, solo existe hepatomegalia palpable en alrededor del 20% de los casos, típicamente acompañada de una fosfatasa alcalina elevada, y debe hacerse el diagnóstico diferencial con la hepatomegalia por estasis en pacientes con afección cardiaca. Una pequeña proporción de casos (2%) presentan ictericia colostática, dato que comporta un pronóstico ominoso con una mediana de supervivencia inferior a 1 mes cuando la bilirrubina es superior a 5 mg/dL³. En ocasiones, la forma de presentación de la AL consiste en una hepatomegalia masiva que simula una hepatopatía crónica evolucionada o sugiere la existencia de metástasis hepáticas. Por otro lado, aunque los depósitos de material amiloide en el tracto gastrointestinal son prácticamente constantes, las manifestaciones clínicas son infrecuentes⁴. Sin embargo, en algunos casos la infiltración gastrointestinal puede ser una manifestación prominente y dar lugar a hemorragia digestiva recidivante, síndrome de malabsorción o incluso estenosis colónica debida a una colitis isquémica por afección vascular. También se han referido casos en los que la manifestación inicial ha sido una ruptura espontánea del bazo con *shock* hipovolémico. En una cuarta parte de los casos existe hipoesplenismo, que se traduce en la presencia de cuerpos de Howell-Jolly en las extensiones de sangre periférica². Alrededor del 15% de los casos presentan una neuropatía periférica en el momento del diagnóstico que afecta con mayor frecuencia a las extremidades inferiores y es de predominio sensitivo, distal, simétrico y progresivo. El examen histopatológico muestra una degeneración axonal. La neuropatía disautonómica se manifiesta en forma de inestabilidad o síncope por hipotensión ortostática, presente en el 15% de los casos, y que puede llegar a ser lo suficientemente intensa como para impedir la deambulación; también puede provocar trastornos gastrointestinales (diarrea) y, en ocasiones, impotencia. El síndrome del túnel carpiano se presenta en una cuarta parte de los casos². Otras manifestaciones menos frecuentes, pero muy típicas de la enfermedad, son la macroglosia, el aumento de estructuras submandibulares y la sequedad de boca por afección de glándulas

salivales, la claudicación mandibular por depósito amiloide vascular, el déficit de factor X de la coagulación, la pseudohipertrofia muscular o el signo de la hombrera por depósito en estructuras periarticulares². La afección cutánea más característica son las equimosis periorbitarias, pero también pueden aparecer pápulas, nódulos y lesiones bullosas con frecuente sangrado superficial o engrosamiento de la piel simulando una esclerodermia. Los depósitos amiloides en vítreo pueden dar lugar a trastornos visuales, aunque la opacidad vítrea es más característica de la amiloidosis familiar que de la AL. De forma excepcional, grandes tumores amiloides (amiloidomas) pueden dar lugar a lesiones osteolíticas e incluso fracturas patológicas, masas mediastínicas o retroperitoneales, o grandes masas cutáneas. En este último caso se debe considerar la posibilidad de efectuar una resección quirúrgica.

Caracterización de la gammapatía monoclonal

Tanto por lo que se refiere a la cuantía del componente monoclonal (M) como a la proporción de células plasmáticas en medula ósea, la clona plasmocelular en la amiloidosis AL es generalmente similar a la que se observa en la gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI). La electroforesis sérica muestra una banda homogénea de moderada cuantía en la mitad de los casos e hipogammaglobulinemia en una cuarta parte. El estudio cualitativo por inmunofijación detecta componente M sérico en el 70% de pacientes, cuyo isotipo es: IgG (32%), IgA (10%), cadenas ligeras (24%), IgM (5%) o IgD (1%). En el 90% de los casos se encuentra proteinuria. El uroproteinograma muestra un patrón glomerular con eliminación predominante de albúmina y, en el 83% de los casos, la inmunofijación pone de manifiesto la existencia de cadenas ligeras monoclonales. La inmunofijación sérica y urinaria permiten detectar un componente M en el 95% de los casos. La determinación de cadenas ligeras libres en suero mediante nefelometría (FREELITE™; The Binding Site Ltd.), combinada con la inmunofijación sérica/urinaria, permite detectar clonalidad hasta en el 99% de los casos⁵. La mediana de células plasmáticas en medula ósea se sitúa alrededor del 7%, pero casi un 20% de los pacientes presentan una infiltración medular plasmocelular igual o superior al 20%. En un estudio reciente la citometría de flujo demostró una sensibilidad del 97% en la detección de la clona plasmocelular de la médula ósea⁶. Poco se sabe en cuanto a los factores genéticos involucrados en la etiopatogenia de la enfermedad. En general, las alteraciones citogenéticas descritas en la amiloidosis AL son similares a las observadas en la GMSI y el mieloma, pero son diferentes las frecuencias en las que dichas alteraciones aparecen⁷. El diagnóstico diferencial con el mieloma múltiple debe establecerse en función de la

expresividad clínica de la enfermedad, con independencia del grado de infiltración medular por células plasmáticas. Así, el paciente con amiloidosis AL presenta un cuadro clínico dominado por la afección orgánica debida al depósito amiloide en ausencia de manifestaciones clínicas propias del MM (anemia, hipercalcemia, dolores óseos o plasmocitomas).

Demostración y tipificación del depósito amiloide

En presencia de un cuadro clínico sugestivo y un componente M sérico y/o urinario se debe sospechar una amiloidosis AL. El diagnóstico se confirmará mediante la demostración del depósito amiloide rojo Congo positivo en un tejido y la posterior caracterización de la proteína amiloidogénica. El procedimiento diagnóstico inicial consistirá en una punción de la grasa subcutánea, que es positiva en el 80% de los casos. La biopsia de medula ósea es positiva en más del 50% de los pacientes. Si estas dos localizaciones son negativas, el siguiente paso puede consistir en una biopsia rectal (positiva en el 70% de los casos), una biopsia de glándula salival o la biopsia de un órgano presumiblemente afecto, la cual es positiva en la práctica totalidad de los casos². En este sentido, se debe tener en cuenta que la realización de una biopsia hepática puede dar lugar a una hemorragia e incluso a ruptura hepática, mientras que una biopsia endomiocárdica conlleva escaso riesgo y es casi siempre positiva.

Una vez demostrado el depósito amiloide, este debe tipificarse con el fin de realizar el diagnóstico diferencial con otras formas de amiloidosis prevalentes en nuestro medio. Para ello se llevará a cabo un estudio inmunohistoquímico utilizando un panel de anticuerpos frente a las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas (kappa y lambda), la transtirretina y la proteína amiloide sérica A, cuya interpretación debe ser realizada por un patólogo con experiencia en el diagnóstico de esta enfermedad. Aunque la espectrometría de masa se ha considerado la técnica *gold standar* para la tipificación amiloide⁸, su uso está restringido a centros altamente especializados (Clínica Mayo de Rochester y Centro de Amiloidosis de Pavia) y asistencialmente se requerirá solo en casos de diagnóstico complejo. Por último, la inmunomicroscopía electrónica en muestras de grasa abdominal constituye una alternativa válida a la inmunohistoquímica en centros con experiencia en esta técnica diagnóstica⁹.

Estudio de la afección orgánica

Tras establecer el diagnóstico de amiloidosis AL es fundamental determinar la extensión de la afección orgánica. Para ello se debe realizar una anamnesis dirigida, exploración física completa, análisis que incluya

proteinuria de 24 horas (además del estudio proteico ya descrito previamente en suero y orina), perfil hepático y un estudio exhaustivo del ámbito cardiaco. Así, resultan indispensables los biomarcadores cardíacos, electrocardiograma y ecocardiograma, pudiendo ser también de gran ayuda la resonancia magnética y el Holter¹⁰. En cuanto a los biomarcadores cardíacos, es crucial la determinación en suero de la troponina (T o I) y el péptido natriurético cerebral (BNP) o su péptido inactivo N-terminal (NT-proBNP), este último con una sensibilidad del 100% en la detección de la afección cardíaca¹¹. El electrocardiograma muestra con frecuencia voltajes bajos, arritmias y, a veces, un patrón que remeda un infarto anteroseptal en ausencia de enfermedad coronaria. El ecocardiograma es una exploración muy valiosa y suele mostrar un patrón restrictivo con una hipertrofia concéntrica del ventrículo izquierdo y un aumento del grosor del tabique interventricular (> 12 mm), con fracción de eyección generalmente conservada y solo reducida en fases muy avanzadas de la enfermedad. La resonancia magnética cardíaca muestra un patrón de realce tardío del gadolinio típico, aunque no exclusivo, de las miocardiopatías infiltrativas. En los últimos años también se ha explorado el papel de la medicina nuclear en la detección del depósito amiloide del ámbito cardiaco. En este sentido, la gammagrafía cardíaca con ^{99m}TcDPD ha demostrado su utilidad en el diagnóstico diferencial entre la cardiopatía amiloidótica por cadenas ligeras y la producida por transtirretina.

Clasificación pronóstica

El grado de afección cardíaca constituye el factor pronóstico fundamental en la amiloidosis AL. En un estudio clásico se observó que los pacientes con un tabique interventricular de grosor superior a 15 mm tenían una mediana de supervivencia inferior a 6 meses¹². En 2004, tras haberse demostrado el valor pronóstico de los biomarcadores cardíacos, se estableció un sistema de estadificación cardíaco (estadios I, II, III) basado en los niveles de troponina y NT-proBNP¹³. En 2012 se añadió a este *score* la diferencia entre el nivel sérico de cadena ligera libre involucrada frente a la no involucrada (reflejo de la carga tumoral de la enfermedad), estableciéndose 4 estadios pronósticos con medianas de supervivencia que oscilan desde los 94 meses para el estadio I hasta los 6 meses para el estadio IV¹⁴. Recientemente, se ha sugerido que existe un subgrupo de pacientes con especial mal pronóstico, definido como aquellos con un NT-proBNP > 8.500 ng/L y presión arterial sistólica < 100 mmHg, que tendrían una supervivencia mediana de 3 meses¹⁵. Así, la elección del tratamiento en los pacientes con amiloidosis AL debe adaptarse al riesgo.

Tratamiento

El tratamiento de la amiloidosis AL tiene como objetivo eliminar la población clonal de células plasmáticas que produce la proteína amiloidogénica. Para ello, el primer régimen utilizado fue melfalán y prednisona (MP), de eficacia muy limitada. La poliquimioterapia no fue superior a MP en un estudio aleatorizado; sin embargo, la administración endovenosa de dosis elevadas de melfalán (200 mg/m²) seguida de autotrasplante de progenitores hematopoyéticos supuso el primer tratamiento realmente prometedor para los pacientes menores de 65 años. Se han publicado diversas series de pacientes trasplantados, destacando por su mayor experiencia las de los grupos de Boston y de la Clínica Mayo, con tasas de respuesta completa (RC) hematológica del 34-39%, respuesta orgánica del 50% y una supervivencia global (SG) mediana de 13,2 años para los pacientes que alcanzaron una RC frente a 5,9 años para los que no la obtuvieron¹⁶. Sin embargo, la principal limitación de este tratamiento es la elevada mortalidad relacionada con el trasplante, que en algunas series fue de hasta el 30-40%, y que en los últimos años ha disminuido hasta un aceptable 6-7% gracias a una cuidadosa selección de pacientes y a su manejo especializado¹⁷. La reducción de la dosis de melfalán (140 mg/m²) puede extender esta opción terapéutica a un mayor número de pacientes, si bien a costa de disminuir su eficacia¹⁶. En definitiva, solo una cuarta parte de pacientes son candidatos a trasplante, por lo que es necesario explorar otras opciones terapéuticas.

El tratamiento de elección para los pacientes que no son candidatos a autotrasplante es la asociación de melfalán y dexametasona (MD), aunque dicho tratamiento se ha mostrado menos eficaz en pacientes con afección cardíaca grave a causa de la elevada tasa de mortalidad precoz¹⁸. Como tratamiento alternativo se han utilizado esquemas basados en los denominados “nuevos fármacos”. El primero fue la talidomida, del que se publicaron resultados y tolerancia aceptables en combinación con dexametasona y un agente alquilante (ciclofosfamida o melfalán)¹⁹. La lenalidomida es un fármaco inmunomodulador (IMiD) más potente que la talidomida y con mejor perfil de seguridad. En 2 estudios la asociación de lenalidomida y dexametasona se mostró muy prometedora, con una tasa de respuestas hematológicas de hasta el 67% incluyendo un 29% de RC^{20,21}, lo que ha llevado a explorar combinaciones triples añadiendo un agente alquilante. Resultados preliminares de un IMiD de segunda generación, la pomalidomida combinada con dexametasona, son también prometedores. Finalmente, el inhibidor del proteasoma bortezomib, solo o asociado a dexametasona, también se ha mostrado eficaz en pequeñas series de pacientes con tasas elevadas de respuesta hematológica y rápida obtención de la misma. Cabe destacar los excelentes resultados referidos inicialmente

con el esquema CyBorD (ciclofosfamida, bortezomib y dexametasona); sin embargo, en un estudio reciente con 230 pacientes dicho tratamiento no permitió cambiar el pronóstico de aquellos que tenían afección cardíaca avanzada¹⁵. CyBorD podría también tener un papel relevante como tratamiento de inducción pretrasplante. En pacientes no candidatos a trasplante está en marcha un ensayo clínico internacional comparando MD frente a MD asociado a bortezomib como tratamiento de primera línea.

El papel del trasplante de órgano sólido en la amiloidosis AL requiere una mención especial. En los pacientes con insuficiencia renal avanzada el tratamiento sustitutivo con diálisis constituye una excelente medida paliativa. En este caso, debe considerarse la posibilidad de un trasplante renal en pacientes que hayan alcanzado una RC tras el autotrasplante. Por otro lado, alrededor del 10% de los pacientes tienen una afección cardíaca grave predominante con poca afección de otros órganos o sistemas. En estos pacientes se debe considerar la posibilidad de efectuar un trasplante cardíaco, con el fin de intentar el autotrasplante en un segundo tiempo.

Conclusiones

En la amiloidosis AL es esencial el diagnóstico precoz, antes de que el daño orgánico ya se haya establecido. El tratamiento debe ser individualizado, adaptándose a las características del paciente (edad, comorbilidad) y al riesgo de la enfermedad, determinado principalmente por el grado de afección cardíaca. Dicho tratamiento debe reducir la carga tumoral de forma rápida, eficaz y duradera, con el fin de evitar la progresión del daño cardíaco y a su vez permitir su progresiva recuperación. Con todo, la respuesta orgánica suele ser tardía, por lo que son fundamentales el tratamiento de soporte y el manejo multidisciplinar del paciente, en especial en los casos con afección renal o cardíaca. Por último, queda aún por saber si nuevas aproximaciones terapéuticas, como CyBorD, serán capaces de aumentar el número de pacientes elegibles para autotrasplante o si las respuestas hematológicas obtenidas con dichos tratamientos tendrán la misma calidad que las obtenidas con las dosis altas de melfalán. Será necesaria la colaboración internacional para llevar a cabo ensayos clínicos lo suficientemente amplios y con suficiente seguimiento para poder contestar a estas y otras preguntas.

Este trabajo ha sido posible gracias en parte a las becas FIS PI12/01290 y JR14/00035 del Plan Nacional I+D+I apoyado por el Instituto de Salud Carlos III y Fondo Europeo de Desarrollo Regional FEDER.

Bibliografía

- Merlini G, Bellotti V. Molecular mechanisms of amyloidosis. *N Engl J Med* 2003;349(6):583-96.
- Kyle RA, Gertz MA. Primary systemic amyloidosis: clinical and laboratory features in 474 cases. *Semin Hematol* 1995;32:45-59.
- Gertz MA, Kyle RA. Hepatic amyloidosis (primary -AL-, immunoglobulin light chain): the natural history in 80 patients. *Am J Med* 1988;85:73-80.
- Sattianayagam P, Hawkins P, Gillmore J. Amyloid and the GI tract. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2009;3(6):615-30.
- Katzmann JA, Abraham RS, Dispenzieri A, Lust JA, Kyle RA. Diagnostic performance of quantitative kappa and lambda free light chain assays in clinical practice. *Clin Chem* 2005;51(5):878-81.
- Paiva B, Vidriales MB, Pérez JJ, López-Berges MC, García-Sanz R, Ocio EM, et al. The clinical utility and prognostic value of multiparameter flow cytometry immunophenotyping in light-chain amyloidosis. *Blood* 2011;117(13):3613-6.
- Weinhold N, Försti A, da Silva Filho MI, Nickel J, Campo C, Hoffmann P, et al. Immunoglobulin light-chain amyloidosis shares genetic susceptibility with multiple myeloma. *Leukemia* 2014;28(11):2254-6.
- Vrana JA, Gamez JD, Madden BJ, Theis JD, Bergen HR 3rd, Dogan A. Classification of amyloidosis by laser microdissection and mass spectrometry-based proteomic analysis in clinical biopsy specimens. *Blood* 2009;114(24):4957-9.
- Fernández de Larrea C, Verga L, Morbini P, Klersy C, Lavatelli F, Folli A, et al. A practical approach to the diagnosis of systemic amyloidosis. *Blood* 2015;125(14):2239-44.
- Mohty D, Damy T, Cosnay P, Echahidi N, Casset-Senon D, Viro P, et al. Cardiac amyloidosis: updates in diagnosis and management. *Arch Cardiovasc Dis* 2013;106(10):528-40.
- Palladini G, Campana C, Klersy C, Balduini A, Vadacca G, Perfetti V, et al. Serum N-terminal pro-brain natriuretic peptide is a sensitive marker of myocardial dysfunction in AL amyloidosis. *Circulation* 2003;107(19):2440-5.
- Cueto-García L, Reeder GS, Kyle RA, Wood DL, Seward JB, Naessens J, et al. Echocardiographic findings in systemic amyloidosis: spectrum of cardiac involvement and relation to survival. *J Am Coll Cardiol* 1985;6:737-43.
- Dispenzieri A, Gertz MA, Kyle RA, Lacy MQ, Burritt MF, Therneau TM, et al. Serum cardiac troponins and N-terminal pro-brain natriuretic peptide: a staging system for primary systemic amyloidosis. *J Clin Oncol* 2004;22:3751-7.
- Kumar S, Dispenzieri A, Lacy MQ, Hayman SR, Buadi FK, Colby C, et al. Revised prognostic staging system for light chain amyloidosis incorporating cardiac biomarkers and serum free light chain measurements. *J Clin Oncol* 2012;30(9):989-95.
- Palladini G, Sachchithanatham S, Milani P, Gillmore J, Folli A, Lachmann H, et al. A European collaborative study of cyclophosphamide, bortezomib and dexamethasone in upfront treatment of systemic AL amyloidosis. *Blood* 2015 (Epub ahead of print).
- Cibeira MT, Santhorawala V, Seldin DC, Quillen K, Berk JL, Dember LM, et al. Outcome of AL amyloidosis after high-dose melphalan and autologous stem cell transplantation: long-term results in a series of 421 patients. *Blood* 2011;118(16):4346-52.
- Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Kumar SK, Dingli D, Leung N, et al. Refinement in patient selection to reduce treatment-related mortality from autologous stem cell transplantation in amyloidosis. *Bone Marrow Transplant* 2013;48(4):557-61.
- Palladini G, Milani P, Folli A, Obici L, Lavatelli F, Nuvolone M, et al. Oral melphalan and dexamethasone grants extended survival with minimal toxicity in AL amyloidosis: long-term results of a risk-adapted approach. *Haematologica* 2014;99(4):743-50.
- Wechalekar AD, Goodman HJ, Lachmann HJ, Offer M, Hawkins PN, Gillmore JD. Safety and efficacy of risk-adapted cyclophosphamide, thalidomide, and dexamethasone in systemic AL amyloidosis. *Blood* 2007;109(2):457-64.
- Santhorawala V, Wright DG, Rosenzweig M, Finn KT, Fennessey S, Zeldis JB, et al. Lenalidomide and dexamethasone in the treatment of AL amyloidosis: results of a phase 2 trial. *Blood* 2007;109:492-496.
- Dispenzieri A, Lacy MQ, Zeldenrust SR, Hayman SR, Kumar SK, Geyer SM, et al. The activity of lenalidomide with or without dexamethasone in patients with primary systemic amyloidosis. *Blood* 2007;109:465-47.

Leucemia mieloide crónica

COORDINADORES: **F. CERVANTES REQUENA.** *Servicio de Hematología. IDIBAPS. Hospital Clinic i Provincial. Barcelona*

F. SÁNCHEZ-GUIJO MARTÍN. *Servicio de Hematología. IBSAL-Hospital Universitario de Salamanca. Salamanca*

La consolidación del tratamiento de la leucemia mieloide crónica (LMC) con inhibidores de tirosina cinasa (ITC) ha transformado también las preguntas que el hematólogo práctico se plantea ahora sobre el futuro del tratamiento de la enfermedad y sus consecuencias. A tres de estas nuevas preguntas de máximo interés se pretende dar respuesta en el presente simposio, en el que intervendrán los doctores García Gutiérrez, Mahon y Hernández Boluda, reconocidos expertos en la enfermedad.

En primer lugar, el Dr. García Gutiérrez centrará su exposición en el papel que tiene el sistema inmune en el control de la enfermedad y en cómo diferentes estrategias de inmunoterapia pueden resultar atractivas para el control de la LMC a largo plazo. Así, resumirá las nuevas opciones que proporcionan en este sentido algunos fármacos clásicos como el interferón (evaluado en tratamientos combinados con ITC por su acción sobre el sistema inmune y la célula stem leucémica) pasando por las estrategias de vacunación frente a antígenos tumorales hasta el uso de células T con receptores quiméricos de antígenos (*CAR-T cells*) o el empleo de los nuevos fármacos que modulan los *checkpoints* claves de la respuesta inmune como CTLA-4 o PD-1. Estos últimos han mostrado notable eficacia en tumores sólidos metastásicos, pero también se está evaluando su potencial en la LMC.

A continuación, el Dr. Mahon desarrollará los conocimientos actuales y su visión acerca de la discontinuación del tratamiento con ITC, una estrategia de la que ha sido pionero en representación de todo el grupo francés. Ellos han introducido el nuevo concepto de remisión libre de tratamiento (TFR: *treatment-free remission*), un nuevo objetivo para un número creciente de pacientes, que nos aproxima a la curación de la enfermedad. Son sus resultados previos y los datos preliminares de los estudios en marcha sobre los que nos actualizará los que han provocado el cambio más importante acaecido recientemente en la forma de afrontar en el tratamiento de la LMC. La discontinuación es sin duda un campo de máximo interés para los clínicos, las autoridades sanitarias y también para los pacientes, por motivos diferentes en cada caso pero fácilmente entendibles.

Enlazando con este mismo interés general sobre la evolución a largo plazo del tratamiento de la enfermedad se encuadra la última ponencia del simposio, en la que el Dr. Hernández Boluda analizará de forma pormenorizada los efectos graves favorecidos por el tratamiento con ITC, otro de los temas de máxima actualidad. Nos mostrará que existen limitaciones notables para extraer la prevalencia real y la intensidad de estos efectos a partir de la información disponible de los grandes ensayos clínicos pivotaes debido, por una parte, al cierre de las bases de datos tras 5 o 10 años de seguimiento, y por otra a la ausencia de un seguimiento adecuado de los enfermos que discontinúan por toxicidad. Existe además un desconocimiento de los mecanismos exactos por los que algunos ITC favorecen el desarrollo de determinadas toxicidades, sobre todo en el ámbito cardiovascular. La corrección de factores de riesgo clásicos y un correcto equilibrio riesgo-beneficio se presentan como elementos clave en la toma de decisiones clínicas para el hematólogo que afronta el tratamiento de la LMC.

Por todo ello, estamos convencidos de que el presente simposio proporcionará una visión integradora para el médico práctico de todos estos aspectos relacionados con algunos de los temas más candentes relacionados con el tratamiento presente y futuro de la enfermedad.

Papel de la inmunoterapia en la leucemia mieloide crónica (LMC): del interfón a las nuevas moléculas

V. GARCÍA GUTIÉRREZ, C. BOTELLA GARCÍA

Servicio de Hematología. Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid

Introducción

La inmunoterapia como nueva arma terapéutica contra el cáncer está viviendo una época de gran esplendor. Si bien la posibilidad de tratar el cáncer mediante estrategias basadas en inmunoterapia es ya conocida desde hace décadas, no ha sido hasta los últimos años cuando hemos comenzado a ver resultados esperanzadores en el tratamiento de algunos tumores. Estos últimos avances se deben, sin duda, a un mejor conocimiento de la intensa relación que juegan la célula tumoral, su estroma y el sistema inmune (que facilitará la denominada inmunoterapia activa), así como a la posibilidad de identificación de antígenos tumorales frente a los que dirigir nuevas generaciones de anticuerpos monoclonales o incluso células T con receptores quiméricos de antígeno (la denominada “inmunoterapia pasiva”)¹.

Dentro de las neoplasias hematológicas, por algún motivo aún desconocido, la leucemia mieloide crónica (LMC) es una de las patologías que más ha demostrado beneficiarse de estrategias basadas en inmunoterapia. Sabemos que en la LMC, al igual que en otras neoplasias, la respuesta inmune contra el cáncer se encuentra comprometida, lo que permite un mecanismo de escape de la célula tumoral favoreciendo la proliferación cancerígena. Así, se ha comprobado que en pacientes de nuevo diagnóstico existe una menor proporción de células NK, e incluso dichas células parecen ser disfuncionales. Tras el inicio de tratamiento estas alteraciones parecen continuar, desapareciendo tras alcanzar una respuesta citogenética completa (RCC)². Pero en la LMC no únicamente encontramos una disminución de las células NK, sino que también se encuentra comprometida la regulación del sistema inmune (lo que sin duda deja una importante ventana abierta para tratamiento basado en inmunoterapia)³. Christiansson y cols., publicaron que las células T reguladoras (Treg) se encuentran en mayor proporción en pacientes de alto riesgo medido por índice de Sokal, e incluso las células supresoras mieloides (MDSC) identificadas, como CD11B+, CD 14-, CD33+, estarían aumentadas. Las MDSC son un grupo hetero-

géneo de células que están incrementadas en pacientes con cáncer. Estas células utilizan diferentes mecanismos para inhibir la respuesta inmune, mediante la inhibición de células T y otras células que intervienen en el sistema inmune, incluyendo regulación de arginasa 1 (Arg1)⁴.

La susceptibilidad de la LMC a la inmunoterapia fue comprobada inicialmente tras observarse que en pacientes sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos la positivización postrasplante de BCR-ABL no se correlacionaba con la recaída de la enfermedad, postulándose que una inmunoterapia adoptiva pueda controlar pequeña carga tumoral⁵. Hoy en día conocemos que un porcentaje importante de pacientes que alcanzan y mantienen una respuesta molecular profunda pueden abandonar el tratamiento de forma segura sin que esto suponga una pérdida de respuesta, a pesar de detectarse en estos pacientes de forma mantenida transcritos de BCR-ABL⁶. Recientemente se ha comunicado que en el momento de la discontinuación del tratamiento el porcentaje de células NK, así como la secreción de interleucinas tipo th1, pudiera identificar una población de pacientes con menor probabilidad de discontinuar el tratamiento, postulándose por tanto el tratamiento inmunoterápico como arma fundamental para incrementar la posibilidad de éxito de la discontinuación del tratamiento⁷.

En esta revisión repasaremos algunas de las estrategias basadas en inmunoterapia que consideramos pudieran tener un papel más relevante en el manejo de la LMC (Figura 1).

Inmunoterapia e inhibidores de tirosina cinasa (ITC)

Los ITC son en la actualidad el tratamiento de elección para el manejo de la LMC. Desde la llegada de imatinib, y posteriormente los denominados ITC de segunda generación (ITC2G) dasatinib, nilotinib y bosutinib, y de tercera generación (ITC3G) ponatinib, los pacientes con LMC tienen una supervivencia actual similar a la de la población general. A pesar de los excelentes

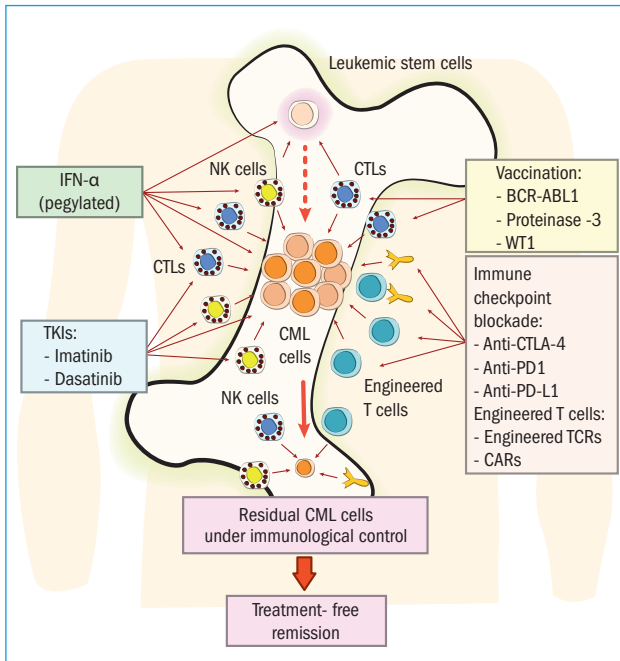


Figura 1. La LMC se considera una de las patologías más susceptibles de ser tratada con inmunoterapia. Intervenciones con tratamientos combinados con ITC junto con IFN y vacunas, los denominados “inhibidores checkpoint” o terapia celular dirigida frente a antígenos específicos, pudieran llevar no únicamente a un mejor control de la enfermedad, sino también a una hipotética erradicación de la célula madre tumoral.

resultados obtenidos con los ITC, la recomendación de los expertos es administrar el fármaco de forma indefinida, ya que parece que las células leucémicas quiescentes serían insensibles a estos tratamientos⁹. Los ITC inhiben la oncoproteína quimérica Bcr-Abl1, así como otras cinasas, siendo estas distintas inhibiciones las responsables de los diferentes efectos secundarios que observamos con cada fármaco. Se postula también que la inhibición de otras cinasas, como Src, podría estar relacionada con el control de la enfermedad por vías diferentes a Bcr-Abl1⁹. Hoy en día conocemos que los ITC tendrán también efecto en la respuesta inmune. Ya hemos comentado anteriormente como Christiansson y cols., demostraron un aumento de MDSC en pacientes con LMC, lo cual juegan un papel fundamental en la inhibición del sistema inmune. Recientemente, este mismo grupo ha comprobado cómo los ITC, imatinib y dasatinib, disminuyen en número de MDSC e inhiben citocinas como Arg1, MPO e IL10, conocidas por jugar un importante papel en la respuesta inmune mediante la inhibición de este último⁴. Dasatinib inhibe una amplia familia de cinasas que incluyen la familia SRC (FGR, FYN, SRC, YES, BLK, HCK, LCK, LYN) y la familia TEC (BMX, BTK, ITK, TEC, TXK) y SYK (SYK y ZAP-70). De estas, algunas son conocidas por su efecto inmune.

Por ejemplo, ZAP70, LCK, FYN y ITK son esenciales en la señalización T, mientras que LYN, SYK, y BTK en la señalización B. Debido a este amplio efecto inhibitorio, dasatinib inhibe también cinasas en células sanas como linfocitos, lo que podría estar probablemente en relación con el conocido efecto inmunomodulador de dasatinib¹¹. En 2009 Mustjoki y cols., publicaron la aparición de una expansión clonal de linfocitos T o células NK en pacientes con LMC tras la toma de dasatinib¹². Más tarde, Paydas y cols., publicaron que la aparición de dicha linfocitosis estaría en relación con la respuesta al tratamiento y los efectos secundarios autoinmunes¹³. Aún no se conoce el mecanismo por el que dasatinib produciría esta linfocitosis, ni si mecanismos de movilización linfocitaria estarían involucrados. En este congreso nuestro grupo comunicará por primera vez cómo dasatinib disminuye la capacidad de migración linfocitaria hacia órganos linfoides secundarios mediante la disminución de la secreción de CCR7 y CCR4 en células CD4+ y CD8+, y aumenta del porcentaje de CXCR3 en células T. Tras dividir a pacientes entre movilizadores y no movilizadores, observamos que la migración de CCL19+21 y CXCL10 en CD4+ y CD8+ fue significativamente inferior únicamente en el grupo de movilizadores. Posteriormente observamos que diferencias en la movilización linfocitaria inducidas tras el tratamiento con dasatinib podrían estar relacionadas con la respuesta molecular. Por último, se observó que los pacientes respondedores mostraron una menor capacidad migratoria hacia CCL19+21 en comparación con los no respondedores.

Inmunoterapia pasiva

Conocemos que los ITC erradican de forma muy eficaz la mayor parte de las células leucémicas, si bien parece que son incapaces de erradicar aquellas células tumorales más primitivas consideradas como quiescentes. El potencial beneficio de erradicar estas células parece fundamental para la curación de la enfermedad. Al igual que se ha conseguido ya en otras neoplasias oncohematológicas y tumores sólidos, la identificación de antígenos específicos de la célula madre leucémica, que no estuvieran presentes en células hematopoyéticas sanas u otros tejidos, es sin duda una opción terapéutica muy atractiva, ya que podrían ser atacados mediante distintas opciones terapéuticas basadas en inmunoterapia.

Posibilidad de tratamiento mediante anticuerpos monoclonales dirigidos a antígenos específicos

Recientemente, se ha descrito que el receptor accesorio de proteína IL-1 (IL1RAP) puede diferenciar células madre leucémicas de las sanas. Se ha comprobado que células leucémicas de leucemia mielocítica aguda (LMA) expresan

ILIRAP, y un anticuerpo monoclonal frente ILIRAP se encuentra en fase de investigación¹⁴. Con respecto a la identificación de la célula madre leucémica en la LMC, históricamente ha existido una tremenda dificultad para poder diferenciarla de la célula madre hematopoyética. Recientemente Herrman y cols., han publicado que la enzima de superficie CD26 es un biomarcador específico de las células madre leucémicas de la LMC CD34+CD38-. Estos autores han demostrado que las células BCR-ABL+ se detectan únicamente en células CD34+CD38-CD26+, pero no en las células CD34+CD38-CD26-. Finalmente, demostraron cómo las células madre con este marcador CD26 disminuyen en pacientes con respuesta adecuada a imatinib y no en pacientes con fallo al tratamiento. Se postula, por tanto, que estrategias terapéuticas dirigidas frente al marcador CD26 podrían ser de utilidad para la erradicación de la enfermedad¹⁵.

Tratamiento mediante células T con receptores quiméricos de antígeno

El tratamiento mediante la infusión de células T con receptores antigénicos (CARS) es un procedimiento en expansión. Existe ya evidencia de cómo puede ser una opción eficaz en el tratamiento de leucemias agudas refractarias, siendo aún un campo de experimentación para el tratamiento de otras neoplasias oncohematológicas. En la **Figura 2** se muestra la evolución en el desarrollo de los CARS durante los últimos años. Existen algunos aspectos importantes a la hora de plantear esta opción terapéutica en pacientes con LMC:

- La necesidad de realizar una depleción linfocitaria, lo que implica administración de ciclo de quimioterapia similar a la de un acondicionamiento para trasplante alogénico de médula ósea.
- La elevada incidencia de efectos adversos graves relacionados con la aplasia de células B, como síndrome de lisis tumoral (que puede incluso producirse pasados 30 días de la infusión), síndrome de aumento de citocinas o la activación macrófágica.

Dado que la mayoría de los pacientes afectados de LMC tendrían buena calidad de vida con larga esperanza de vida, el tratamiento basado en CARS frente a antígenos específicos de la LMC (que aún estarían pendientes de identificar) tendría únicamente papel en pacientes en fases avanzadas de la enfermedad¹⁶.

Inmunoterapia activa

Interferón

Los interferones (IFN) son moléculas con actividad antiviral, antilinfoproliferativa y efectos inmunomoduladores.

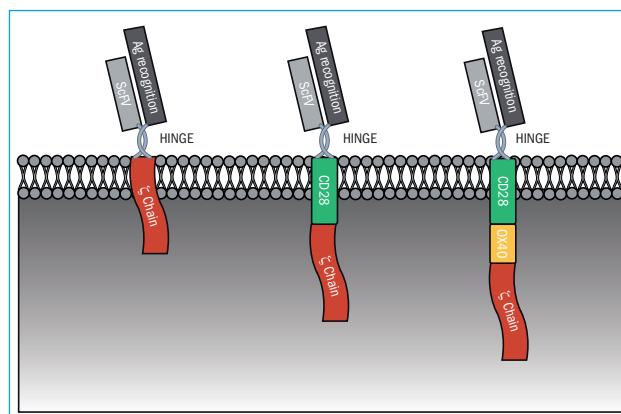


Figura 2. Evolución de los CARS para aumento de la eficacia. La primera generación de CARS unió un solo fragmento de la cadena variable de un anticuerpo a los dominios de señalización intracelular de la cadena de TCR CD3 ζ a través de una región bisagra y una región transmembrana de diversos orígenes. Cuando se expresa en las células T, esta molécula favorece la muerte de las células tumorales reconocidas por el dominio del anticuerpo, pero a menos que la célula tumoral exprese moléculas coestimuladoras no se facilitará su proliferación. Como la mayoría de los tumores no expresan dominios coestimuladores, la segunda generación de CAR introduce los dominios de señalización intracelular de CD28 para proporcionar un segundo nivel de coestimulación. Una tercera generación de CAR suma un tercer nivel de coestimulación al añadir moléculas como OX40 o 4-1BB.

Existen dos grandes clases de interferones humanos en función de la afinidad del receptor: tipo I (IFN- α , IFN- β , IFN- ω , etc.) y tipo II (IFN- γ).

El IFN- α se compone de un grupo de 12 moléculas y únicamente el IFN- α 2a/b es usado en práctica clínica como molécula recombinante. El IFN- α puede regular a la baja la expresión de BCR-ABL1 y activar factores de transcripción que regularían la proliferación celular, la maduración y la apoptosis, e intervenir en el reconocimiento y la eliminación de células tumorales por el sistema inmune. El IFN- α también actuaría en el ciclo normal de las células madre hematopoyéticas quiescentes. Se postula que un mecanismo similar tendría lugar en células tumorales, lo que induciría el ciclo de estas células y por tanto su exposición (**Figura 3**). Con respecto al efecto inmunomodulador, conocemos que el IFN- α tiene un efecto antitumoral mediante la inmunidad innata y adaptativa. El tratamiento con IFN induce la proliferación, expansión y supervivencia de células T citotóxicas en respuesta a antígenos que reconocen específicamente BCR-ABL1 y antígenos dependientes de BCR-ABL1. Uno de los antígenos dependientes de BCR-ABL1 es el antígeno asociado a la serina proteasa, proteinasa-3. Linfocitos T citotóxicos PR1 reconocen el péptido proteinasa 3 de forma restringida para HLA-A2, siendo capaces de eliminar de forma específica proge-

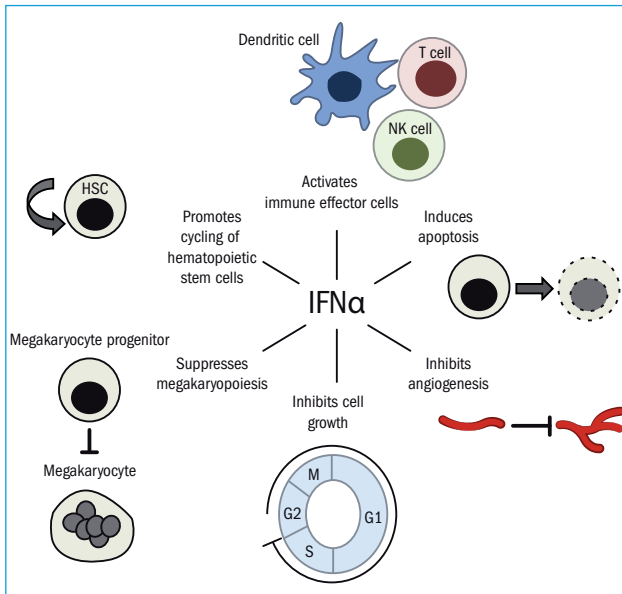


Figura 3. Mecanismos de acción del interferón.

nitores de LMC. Esta capacidad de los IFN de inducir una respuesta PR1 específica se ha correlacionado con la respuesta al tratamiento. Igualmente, se ha comprobado cómo el IFN mejora la actividad de las células NK controlando la respuesta antitumoral mediada por estas células. Las células dendríticas son otro mediador de gran importancia en los efectos inmunomoduladores de IFN, habiéndose observado en estudios *in vitro* cómo el IFN- α induce una proliferación de células mononucleadas a células dendríticas. Parece no existir duda de que la interacción entre el IFN y las células dendríticas es esencial para una respuesta inmune antitumoral, si bien también será la probable causa de los frecuentes efectos secundarios¹⁷.

El IFN, durante la década de 1990 y hasta la llegada del primer ITC (imatinib), fue considerado el tratamiento estándar en pacientes con LMC no candidatos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos, siendo aprobado en el tratamiento de primera línea en 1995 tras demostrar beneficio en supervivencia con respecto al uso de quimioterapias convencionales. Tras el uso de IFN recombinante α -2a (Hoffman La Roche, Basel, Switzerland) y α -2b (Merck, formerly Schering Plough, Whitehouse Station, NJ, USA) se unió el IFN- α pegilado, con las ventajas añadidas de aumentar la vida media y disminuir la inmunogenicidad. La incorporación del IFN al arsenal terapéutico de la LMC permitió no únicamente mejorar la supervivencia global (SG) de los pacientes, sino también obtener remisiones citogenéticas completas (RCC) en un bajo número de pacientes (25-30% aproximadamente), comprobando que la negativización del cromosoma Filadelfia se correlacionaría posteriormente con un marcado incremento de la

supervivencia libre de progresión (SLP) y SG. Hoy en día sabemos que en un porcentaje aún más reducido de pacientes el tratamiento con IFN puede incluso conseguir respuestas moleculares indetectables, respuestas que han permitido la posibilidad de abandonar el tratamiento, definiéndose lo que hoy se conoce como "cura funcional" de la LMC¹⁸. Conocido el potencial beneficio del IFN en el tratamiento de la LMC, distintos grupos han intentado optimizar el tratamiento de esta patología mediante la adición de IFN a imatinib. Se han realizado estudios prospectivos comparando el uso de imatinib frente a imatinib más IFN con resultados no siempre satisfactorios. El estudio alemán CML-IV, que seleccionó aleatoriamente a 1.551 pacientes para recibir imatinib 400 mg, imatinib 400 mg + IFN- α , imatinib + citarabina o imatinib 800 mg, mostró una mayor incidencia de respuesta molecular (RMM) en la rama de imatinib 800 mg que en las otras ramas¹⁹. Un mayor seguimiento del estudio mostró que los pacientes asignados a imatinib a altas dosis alcanzaron respuestas moleculares profundas en menor tiempo que el resto de las ramas, con la excepción de los pacientes tratados con imatinib + IFN- α ²⁰. El estudio francés SPIRIT seleccionó aleatoriamente a 636 pacientes a recibir imatinib 400 mg, imatinib 600 mg, imatinib + citarabina o imatinib + IFN- α pegilado (PegIFN- α), demostrando un mayor porcentaje y precocidad de respuestas moleculares en la rama de imatinib + PegIFN- α . El IFN (como viene siendo la norma en otros estudios) no fue bien tolerado, precisando disminución de la dosis o interrupción del tratamiento en la mayoría de los pacientes. Existen estudios en marcha en los que se está evaluando la eficacia de IFN con ITC de segunda generación, nilotinib y dasatinib (NCT01220648, NCT01294618, NCT01392170, NCT00573378, NCT01657604), incluyendo algunos de estos estudios la posibilidad de consolidación de tratamiento con IFN previa a la discontinuación del tratamiento¹⁸.

Vacunas frente la LMC

La oncoproteína BCR-ABL es una diana terapéutica muy atractiva en la LMC, y prueba de ellos son los diversos estudios con vacunas frente a esta oncoproteína que están siendo realizados en este momento. Existe una secuencia única de aminoácidos específica para células de LMC en la región de unión de activación tirosina cinasa. En general, podemos encontrar 2 grupos antigénicos específicos para la LMC: péptidos de unión Bcr-Abl1 y antígenos de sobreexpresión (antígeno tumoral de Wilms 1, WT1, y proteinasa-3). Se han publicado estudios prometedores con vacunas frente a péptidos BCR-ABL1 en combinación con imatinib. WT1 se encuentra sobreexpresado en la mayoría de las leucemias y tumores sólidos, sin encontrarse en las célu-

las somáticas y sí en las células hematopoyéticas de la médula ósea. En pacientes con LMA se han mostrado resultados prometedores de combinación de vacunas frente a WT1 y proteinasa-3 junto con imatinib. Además de de WT1, otros antígenos, como proteinasa 3, hTERT o PRAME, se han mostrado como una diana terapéutica de interés para el tratamiento de la LMC. Por tanto, el tratamiento mediante vacunas de la LMC junto con ITC y/o IFN se postula como una posibilidad terapéutica para poder llevar a cabo la erradicación de la célula madre leucémica²¹.

Checkpoint inhibitors

Respecto a las posibilidades de tratamientos basados en inmunoterapia, en los últimos años se han unido al arsenal terapéutico para tumores sólidos fármacos capaces de inhibir moléculas cohibidoras que expresan algunos tumores sólidos, como PD-1, PD-L1 o CTLA-4. En condiciones fisiológicas, el sistema inmune cuenta con mecanismos moleculares y celulares que mantienen la tolerancia y evitan el daño derivado de las respuestas inmunes efectoras. En el cáncer estos mecanismos actúan de manera concertada, contrarrestando la inmunidad antitumoral y permitiendo el crecimiento del tumor, y suponen uno de los principales inconvenientes para una inmunoterapia efectiva.

El arsenal inmunosupresor del microambiente tumoral incluye diversos tipos celulares (por ejemplo, células T reguladoras o células supresoras de estirpe mieloide), moléculas solubles (TGF- β , IL-10, IL-3, SCF), moléculas supresoras celulares (arginasa, IDO) y un conjunto de receptores/ligandos cohibidores que se expresan en las células efectoras residentes en el tumor (CTLA-4, PD-1, Tim-3, Lag-3 y BTLA). Estos últimos se denominan comúnmente “inmuno checkpoints”. Las estrategias terapéuticas dirigidas al bloqueo de estos “inmuno checkpoints” pueden restaurar la proliferación linfocitaria y sus funciones efectoras, superando la resistencia tumoral frente a la respuesta inmune.

Las moléculas más estudiadas han sido los inhibidores de CTLA-4, una proteína expresada en la membrana de los linfocitos T que actúa como freno de activación de la célula T e inhibe la respuesta al reconocimiento de un antígeno mediante el TCR. Han sido desarrollados anticuerpos que bloquean CTL-4, resultando en una liberación de la respuesta inmune que logra una actividad antitumoral con resultados sorprendentes. Desafortunadamente, también se han visto asociados efectos secundarios en relación con daño tisular por autoinmunidad.

Otra de la vía más prometedora es la de PD-1, que actúa en estados más tardíos de la respuesta inmune. Esta proteína es expresada en linfocitos T activados y en células NK y B activadas. Su función es limitar la

actividad de las células T en tejidos durante un proceso inflamatorio y limitar la autoinmunidad. Se han descrito dos ligandos: PDL-1 y PDL-2, que se expresan en los tejidos (sanos y tumorales) como respuesta a señales inflamatorias. Las células tumorales sobreexpresan PDL-1 y PDL-2 de manera constitutiva a través de oncogenes, o inducidas por células reactivas antitumorales. De este modo se establece una retroalimentación negativa por la cual la unión de PD-1 con su ligando inhibe la respuesta inmunológica antitumoral²². En este caso, también han sido desarrollados anticuerpos dirigidos contra el receptor PD-1 y sus ligandos PDL-1 y PDL-2, que permitirían dar vía libre a la respuesta inmunológica iniciada por el reconocimiento de células aberrantes neoplásicas. Se ha visto una fuerte asociación del nivel de sobreexpresión de PDL-1 a la respuesta obtenida. Por otro lado, los efectos adversos autoinmunes parecen ser menos graves que los observados bloqueando CTLA-4. El tratamiento con inhibidores de dichas moléculas cohibitoras (anti-CTLA-4, PD-1 o PDL-1) en monoterapia o combinados con otros agentes antineoplásicos han supuesto una importante mejora del pronóstico de patologías como melanoma metastático, carcinoma renal, cáncer de próstata y, recientemente, cáncer no microcítico de pulmón, consolidándose de esta forma como tratamiento real y eficaz para una buena parte de los tumores sólidos²³.

Tras demostrar una sobreexpresión de algunos de estos marcadores en enfermedades oncohematológicas como síndromes linfoproliferativos o síndromes mielodisplásicos, el tratamiento con estas moléculas está siendo evaluado, con resultados preliminares muy satisfactorios.

Con respecto a la LMC, la sobreexpresión de PD-1 ha sido ya demostrada en modelos de ratón, así como en pacientes afectados de LMC al compararse con sujetos sanos²⁴. De igual forma, se ha demostrado cómo una mayor sobreexpresión de PD-1 podría estar relacionada con una peor evolución de la enfermedad⁴. Hoy en día está evaluándose en un ensayo clínico fase I la seguridad de la combinación de nivolumab (inhibidor de PD-1) junto con dasatinib en pacientes con LMC resistentes o intolerantes a ITC previos (NCT01592370).

Conclusiones

El pronóstico de la LMC ha mejorado drásticamente tras la llegada de los ITC. No obstante, aún continuamos viendo pacientes resistentes a ITC en los que la única posibilidad para evitar la progresión de la enfermedad sería el trasplante alogénico de médula ósea. Hemos revisado evidencias claras de cómo la LMC es una enfermedad claramente susceptible a inmunoterapia, si bien la mejor estrategia terapéutica fuera del trasplante alogénico (con la elevada morbimortalidad que

supone) está aún por definir. En caso de que algunas de las estrategias revisadas demostraran seguridad y eficacia, la combinación junto con ITC sería una opción que plantear no únicamente en pacientes resistentes a ITC, sino a todos los pacientes afectos de LMC, con la posibilidad de incrementar el porcentaje de pacientes que pudieran interrumpir definitivamente el tratamiento.

Bibliografía

1. Melero I, Grimaldi AM, Pérez-Gracia JL. Clinical development of immunostimulatory monoclonal antibodies and opportunities for combination. *Clin Cancer Res* 2013;19(5):997-1008.
2. Chen CI, Koschmieder S, Kerstiens L, et al. NK cells are dysfunctional in human chronic myelogenous leukemia before and on imatinib treatment and in BCR-ABL-positive mice. *Leukemia* 2012;26:465-74.
3. Mette Ilander, Can Heki, Satu Mustjoki. Immunology and immunotherapy in chronic myeloid leukemia. *Curr Hematol Malig Rep* 2014;9:17-23.
4. Christiansson L, Soderlund S, Svensson E, et al. Increased level of myeloid-derived suppressor cells, programmed death receptor ligand 1/programmed death receptor 1, and soluble CD25 in Sokal high risk chronic myeloid leukemia. *PLoS One* 2013;8:e55818.
5. Gratwohl A, Baldomero H, Passweg The role of hematopoietic stem cell transplantation in chronic myeloid leukemia. *J Ann Hematol* 2015;94(Suppl2):S177-86.
6. Mahon FX. Discontinuation of tyrosine kinase therapy in CML. *Ann Hematol* 2015;94(Suppl2):S187-93.
7. Mizoguchi I, Yoshimoto T, Katagiri S, et al. Sustained upregulation of effector natural killer cells in chronic myeloid leukemia after discontinuation of imatinib. *Cancer Sci* 2013; 104(9):1146-53.
8. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood* 2013;122:872-84.
9. Steegmann JL1, Cervantes F, le Coutre P. Off-target effects of BCR-ABL1 inhibitors and their potential long-term implications in patients with chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2012;53(12):2351-61.
10. Salih J, Hilpert J, Placke T. The BCR/ABL-inhibitors imatinib, nilotinib and dasatinib differentially affect NK cell reactivity. See comment in PubMed Commons below. *Int J Cancer* 2010;127:2119-28.
11. Hantschel O, Rix U, Superti-Furga G. Target spectrum of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib and dasatinib. *Leuk Lymphoma* 2008;49:615-9.
12. Mustjoki S, Auvinen K, Kreutzman A, Rousselot P, Hernesniemi S, Melo T, et al. Rapid mobilization of cytotoxic lymphocytes induced by dasatinib therapy. *Leukemia* 2013;27:914-24.
13. Paydas S. Dasatinib, large granular lymphocytosis, and pleural effusion: useful or adverse effect? *Crit Rev Oncol Hematol* 2014;89:242-7.
14. Jaras M, Johnels P, Hansen N, et al. Isolation and killing of candidate chronic myeloid leukemia stem cells by antibody targeting of IL-1 receptor accessory protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:16280-5.
15. Herrmann H, Sadovnik I, Cerny-Reiterer S. Dipeptidylpeptidase IV (CD26) defines leukemic stem cells (LSC) in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2014;123(25):3951-62.
16. Maus MV, Grupp SA, Porter DL, June CH. Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies. *Blood* 2014;123(17):2625-35.
17. Talpaz M, Mercer J, Hehlmann R. The interferon-alpha revival in CML. *Ann Hematol* 2015;94(Suppl2):S195-S207.
18. Hehlmann R, Lauseker M, Jung-Munkwitz S. Tolerability-adapted imatinib 800 mg/d versus 400 mg/d versus 400 mg/d plus interferon-alpha in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol: Off J Am Soc Clin Oncol* 2011;29(12):1634-42.
19. Hehlmann R, Muller MC, Lauseker M. Deep molecular response is reached by the majority of patients treated with imatinib, predicts survival, and is achieved more quickly by optimized high-dose imatinib: results from the randomized CML-study IV. *J Clin Oncol: Off J Am Soc Clin Oncol* 2014;32(5):415-23.
20. Preudhomme C, Guilhot J, Nicolini FE. Imatinib plus peginterferon alfa-2a in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010;363(26):2511-21.
21. Rohon P. Biological therapy and the immune system in patients with chronic myeloid leukemia. *Int J Hematol* 2012;96(1):1-9.
22. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012;12(4):252-61.
23. Pennock GK, Chow LQ. The Evolving Role of Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Treatment. *Oncologist* 2015. pii: theoncologist.2014-0422.
24. Schwaller J, Solenthaler M, Ochsenbein AF. Programmed death 1 signaling on chronic myeloid leukemia-specific T cells results in T-cell exhaustion and disease progression. *Blood* 2009;114(8):1528-36.

Discontinuation of tyrosine kinase inhibitors: Current situation

F.-X. MAHON

University of Burdeos. Burdeos, France

Over the past decade, a broad array of drugs designed to selectively inhibit protein tyrosine kinases (tyrosine kinase inhibitors or TKIs) have emerged as novel therapies for cancer patients. Chronic myeloid leukaemia (CML) is one of the best examples of successful targeted therapy with a TKI. The overall survival of CML patients who respond to treatment is close to that of the healthy population. The response in many patients is so profound that it is possible to consider stopping their

treatment and with time, the number of patients in this group has increased to the point where the issue of treatment cessation has become of utmost importance. This has led to the development of a new concept in the evaluation of CML entitled treatment-free remission. It will be the criterion to evaluate the success of future clinical trials, especially if we want to improve the management of the disease to the point where we can claim to have cured CML.

Efectos a largo plazo de los inhibidores de tirosina cinasa: ¿qué sabemos?

J.C. HERNÁNDEZ BOLUDA

Servicio de Hematología y Oncología Médica. Hospital Clínico Universitario, INCLIVA. Valencia

Introducción

Con la introducción en la clínica de los inhibidores de la tirosina cinasa (ITC) BCR-ABL, el pronóstico de los pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) ha mejorado sustancialmente, hasta el punto de que su supervivencia global se aproxima a la de la población general^{1,2}. Sin embargo, la mayoría de los enfermos tiene que recibir tratamiento diariamente durante años, quizá de forma indefinida. Por ello, la posible aparición de nuevos efectos adversos o la persistencia de toxicidad a largo plazo suscitan un interés creciente entre pacientes y profesionales. Una limitación importante a la hora de obtener esta información deriva del cierre programado de los ensayos clínicos tras 5 o 10 años de seguimiento. Tampoco resulta fácil conocer con precisión la prevalencia a largo plazo de los efectos adversos más comunes, dado que en general suele referirse su incidencia total o acumulada en el tiempo, sin precisar si siguen presentes en el último control evolutivo.

En la presente ponencia se resume la información disponible acerca de la toxicidad a medio y largo plazo asociada al uso de los inhibidores de BCR-ABL aprobados en nuestro medio (imatinib, nilotinib, dasatinib, bosutinib y ponatinib). Cabe recordar, no obstante, que los datos de seguridad de imatinib se basan en una serie considerablemente más amplia de pacientes con seguimiento prolongado que los referidos al resto de ITC.

Mecanismos implicados en la toxicidad de los ITC

De forma práctica, resulta útil clasificar la toxicidad derivada del tratamiento con ITC en función de los mecanismos potencialmente implicados en su aparición. Con todo, la patogénesis de muchos efectos adversos no está bien establecida, no siendo infrecuente que algunos ITC con similar espectro de acción presenten un perfil de toxicidad distinto.

Toxicidad derivada del bloqueo de la diana terapéutica (on target)

En el caso concreto de la LMC, la diana terapéutica de los ITC es la proteína BCR-ABL anómala, si bien todos inhiben la enzima ABL normal. De esta forma, los efectos sistémicos derivados del bloqueo de ABL son efectos de clase (*class effects*), que pueden aparecer con cualquiera de ellos. La proteína ABL participa en la señalización celular regulando los procesos de proliferación, supervivencia, adhesión y migración³. Existe evidencia experimental de que el bloqueo prolongado de ABL podría inducir cardiotoxicidad⁴, daño endotelial⁵ e inestabilidad genómica⁶. Sin embargo, la relevancia clínica de estos hallazgos de laboratorio es incierta, dada la baja frecuencia de toxicidad de este tipo registrada en los pacientes tratados con imatinib durante más de 10 años².

Toxicidad derivada del bloqueo no intencionado de otras moléculas (off-target)

Los inhibidores de BCR-ABL aprobados son ATP-miméticos que inhiben la actividad enzimática de la diana impidiendo la unión del ATP al dominio catalítico. Sin embargo esta unión no es específica, de forma que pueden también bloquear en distinto grado (dependiendo de su selectividad) otras enzimas, generalmente tirosina cinasas. Los efectos sistémicos derivados de la inactivación de esas moléculas es lo que se denomina "toxicidad *off-target*"^{7,8}. Ejemplos de toxicidad asociada de forma consistente al bloqueo selectivo de ciertas cinasas serían los cambios en la pigmentación cutánea y las citopenias (c-KIT), la hipertensión arterial (VEGFR) o la retención hídrica (PDGFR).

En general, la intensidad de los efectos adversos más comunes registrados con los inhibidores de BCR-ABL (edema periférico, alteraciones cutáneas, diarrea, calambres y mielosupresión) suele disminuir con el tiempo, siendo infrecuente que aparezcan *de novo* de forma tardía². A pesar de ello, esta toxicidad puede persistir a

largo plazo⁹, lo que va en detrimento de la calidad de vida de los pacientes¹⁰.

Por el contrario, existen efectos adversos clínicamente relevantes que pueden presentarse en cualquier momento evolutivo, lo que obliga a una monitorización continuada. Así, la incidencia acumulada de derrame pleural asociado a dasatinib sigue aumentando de forma discreta conforme se amplía el seguimiento de los pacientes, siendo del 24% y del 28% a los 5 y 7 años del inicio del tratamiento, respectivamente (estudio CA180-034, rama de 100 mg/día)¹¹. Asimismo, la hipertensión arterial pulmonar puede ponerse de manifiesto tardíamente tras años de exposición a dasatinib (mediana de tiempo hasta su aparición de 34 meses, en el registro francés)¹², si bien su incidencia global es baja. Las complicaciones vasculares isquémicas observadas con algunos ITC (nilotinib, ponatinib) merecen mención especial, dado que se desconoce por el momento tanto su patogénesis como su incidencia real a largo plazo. En la última actualización del estudio ENESTnd, con 6 años de seguimiento, un 10% de los enfermos tratados de entrada con nilotinib a la dosis estándar (300 mg/12 h) presentaron alguna complicación isquémica¹³. A su vez, en el estudio PACE, alrededor de un 30% de los pacientes tratados con ponatinib por fracaso previo a múltiples ITC sufrieron fenómenos trombóticos (arteriales y venosos) tras una mediana de seguimiento de solo 3 años¹⁴. Los datos disponibles de ambos estudios indican que la incidencia acumulada de complicaciones isquémicas aumenta con el tiempo, si bien el riesgo relativo por año de exposición no parece incrementarse. Por otro lado, los pacientes con factores de riesgo cardiovascular no controlados serían los más susceptibles de presentar complicaciones isquémicas. Por ese motivo, en la actualidad se recomienda tener en cuenta esta información a la hora de seleccionar el ITC de elección, así como realizar un control estricto de los factores de riesgo cardiovascular durante el tratamiento¹⁵.

Por último, cabe mencionar que el impacto clínico a largo plazo de la persistencia de determinadas alteraciones inducidas por los ITC, como la hipofosfatemia sobre el metabolismo óseo¹⁶ o el efecto inmunomodulador sobre distintas poblaciones celulares (linfocitos B y T, células dendríticas, células NK)¹⁷, es aún incierto. En este sentido, no existe por el momento evidencia clínica de que el tratamiento con ITC se asocie a un incremento en el riesgo de desarrollar neoplasias secundarias^{18,19}.

Toxicidad por interacciones medicamentosas

Los ITC aprobados en la actualidad para el tratamiento de la LMC tienen metabolización hepática, lo que conlleva un riesgo potencial de interacción con fármacos inductores o inhibidores del citocromo CYP3A4 admi-

nistrados de forma concomitante. Asimismo, todos ellos pueden prolongar la repolarización cardíaca, si bien es infrecuente que induzcan intervalos QT superiores a 500 ms a las dosis habituales. Sin embargo, este efecto puede potenciarse cuando se administran junto a otros agentes capaces de alargar el intervalo QT, con el consecuente riesgo de inducir arritmias.

Conclusiones

En general, los efectos adversos asociados al tratamiento de la LMC con ITC suelen ser leves o moderados y mejoran con el tiempo. A pesar de ello, los pacientes con LMC refieren tener peor calidad de vida en relación con su salud que la población general.

Las complicaciones vasculares descritas recientemente con determinados ITC son motivo de preocupación. Su patogénesis no está bien establecida, pero su incidencia es mayor en pacientes con factores de riesgo cardiovascular, lo que debe tenerse en cuenta a la hora de individualizar el tratamiento.

Bibliografía

1. Gambacorti-Passerini C, Antolini L, Mahon FX, et al. Multicenter independent assessment of outcomes in chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib. *J Natl Cancer Inst* 2011;103(7):553-61.
2. Kalmanti L, Saussele S, Lauseker M, et al. Safety and efficacy of imatinib in CML over a period of 10 years: data from the randomized CML-study IV. *Leukemia* 2015;29(5):1123-32.
3. Greuber EK, Smith-Pearson P, Wang J, Pendergast AM. Role of ABL family kinases in cancer: from leukaemia to solid tumours. *Nat Rev Cancer* 2013;13(8):559-71.
4. Kerkela R, Grazette L, Yacobi R, et al. Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate. *Nat Med* 2006;12(8):908-16.
5. Chislock EM, Ring C, Pendergast AM. Abl kinases are required for vascular function, Tie2 expression, and angiopoietin-1-mediated survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110(30):12432-7.
6. Fabarius A, Giehl M, Frank O, et al. Induction of centrosome and chromosome aberrations by imatinib in vitro. *Leukemia* 2005;19(9):1573-8.
7. Steegmann JL, Cervantes F, le Coutre P, Porkka K, Saglio G. Off-target effects of BCR-ABL1 inhibitors and their potential long-term implications in patients with chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2012;53(12):2351-61.
8. Giles FJ, O'Dwyer M, Swords R. Class effects of tyrosine kinase inhibitors in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2009;23(10):1698-1707.
9. Phillips KM, Pinilla-Ibarz J, Sotomayor E, et al. Quality of life outcomes in patients with chronic myeloid leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors: a controlled comparison. *Support Care Cancer* 2013;21(4):1097-103.
10. Efficace F, Bacarani M, Breccia M, et al. Health-related quality of life in chronic myeloid leukemia patients receiving long-term therapy with imatinib compared with the general population. *Blood* 2011;118(17):4554-60.
11. Shah NP. Seven-year follow-up of patients with imatinib-resistant or -intolerant chronic phase chronic myeloid leukemia receiving dasatinib in study CA180-034: final study results. *Blood* 2014;Abst 520.

12. Montani D, Bergot E, Gunther S, et al. Pulmonary arterial hypertension in patients treated by dasatinib. *Circulation* 2012;125(17):2128-37.
13. Larson RA. Efficacy and safety of nilotinib vs. imatinib in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase: long-term follow-up of ENESTnd. *Blood* 2014;Abst 4541.
14. Cortes J. Long-term follow-up of ponatinib efficacy and safety in the phase 2 PACE trial. *Blood* 2014;Abst 3135.
15. Rea D. Management of adverse events associated with tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia. *Ann Hematol* 2015;94(Suppl2):S149-58.
16. Berman E, Nicolaidis M, Maki RG, et al. Altered bone and mineral metabolism in patients receiving imatinib mesylate. *N Engl J Med* 2006;354(19):2006-13.
17. Hantschel O, Rix U, Schmidt U, et al. The Btk tyrosine kinase is a major target of the Bcr-Abl inhibitor dasatinib. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(33):13283-8.
18. Verma D, Kantarjian H, Strom SS, et al. Malignancies occurring during therapy with tyrosine kinase inhibitors (TKIs) for chronic myeloid leukemia (CML) and other hematologic malignancies. *Blood* 2011;118(16):4353-8.
19. Gunnarsson N, Stenke L, Hoglund M, et al. Second malignancies following treatment of chronic myeloid leukaemia in the tyrosine kinase inhibitor era. *Br J Haematol* 2015;169(5):683-8

Hemoterapia e inmunohematología. Simposio medicina transfusional

COORDINADORES: **C. FERNÁNDEZ ÁLVAREZ.** *Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital de Cabueñes. Gijón, Asturias*

J.R. GRIFOLS RONDA. *Banc de Sang i Teixits. Hospital Germans Trias i Pujol. Badalona, Barcelona*

En este simposio sobre medicina transfusional hemos tratado de seleccionar varios temas cuyo nexo común es la consideración del receptor de componentes sanguíneos como sujeto individual, cuyas necesidades específicas, basadas en una situación clínica particular, deben guiar la toma de decisiones terapéuticas.

Las guías y recomendaciones, centradas generalmente en el uso de cada grupo de componentes sanguíneos, resultan de gran utilidad, pero frecuentemente nos falta integrar esta información en el proceso y la situación específica que presenta cada paciente cuando nos surge el dilema de si debemos transfundir o no, o cuándo y cuánto debemos transfundir.

Resulta imprescindible reflexionar sobre quiénes son los pacientes que reciben una transfusión y cuál es su perfil demográfico y clínico. Además, tanto los clínicos como los hemoterapeutas desearían disponer de datos fiables que les permitieran adaptar la práctica a cada patología o grupos de patologías, así como a la situación evolutiva, al pronóstico de la enfermedad del paciente y al resto de tratamientos concomitantes que se empleen en el mismo. El tratamiento transfusional no por habitual y rutinario merece menos estudio que el del empleo de otros medicamentos o recursos empleados en el paciente. Sobre este interesante tema nos hablará el Dr. Joan Grifols Ronda en la primera ponencia de este simposio.

En la segunda exposición reivindicaremos la necesidad de no perder los lazos de unión entre los hematólogos que practican la hematología clínica y aquellos que dedican su labor a la medicina transfusional. No cabe duda de que tanto el área clínica como la transfusional han experimentado importantes avances en los últimos años, haciéndose cada vez más complejas y exigiendo una subespecialización de los profesionales. Esto ha reportado grandes ventajas, pero también algunos inconvenientes, especialmente si unos y otros no mantenemos una buena comunicación cuyo objetivo primordial sea responder a las necesidades de cada paciente en particular. Así, la Dra. Carmen Fernández, en la segunda charla, tratará de exponer cómo clínico y transfusor pueden colaborar tanto para mejorar la atención a los pacientes como para hacer un mejor uso de los recursos.

Finalmente, el Dr. Arturo Pereira hará una revisión sobre un tema del que no existen demasiadas evidencias y que habitualmente genera dudas u opiniones encontradas en los clínicos. El uso de plaquetas en patologías infrecuentes y graves, como las microangiopatías trombóticas, se ha desaconsejado o contraindicado. Veremos que esto no siempre se ha realizado basándose en evidencias o estudios contrastados que hayan analizado en profundidad la repercusión que tanto su empleo como su no uso han tenido en los resultados. Así mismo, el envejecimiento de la población y la incidencia de patología cardiovascular es responsable de que un significativo porcentaje de la población mayor de 60 años tome algún fármaco antiagregante. Esta población es igualmente sujeto de intervenciones y procedimientos, algunos de alto riesgo hemorrágico, que deben realizarse con carácter urgente. El uso de las transfusiones de plaquetas en estos escenarios clínicos será sin duda materia de discusión y debate.

La transfusión de componentes sanguíneos. ¿Conocemos el perfil de nuestros pacientes?

J.R. GRIFOLS RONDA

Banc de Sang i Teixits. Hospital Germans Trias i Pujol. Badalona, Barcelona

La transfusión de componentes sanguíneos es un pilar fundamental en el soporte asistencial de muchos pacientes, ya que incide directamente en su supervivencia y calidad de vida. Además, es un procedimiento terapéutico habitual en la práctica asistencial diaria en el llamado primer mundo, ya que más del 10% de los pacientes ingresados en nuestros centros son transfundidos, siendo este uno de los procedimientos empleados con mayor frecuencia entre los códigos de alta registrados. A pesar de este uso tan habitual, la práctica transfusional sigue estando envuelta en múltiples controversias.

Mientras que la donación de componentes sanguíneos, los centros y los servicios de transfusión están muy regulados, la transfusión, como parte integral de una estrategia terapéutica de soporte a determinados pacientes en ciertas situaciones clínicas o quirúrgicas, sus indicaciones, monitorización y estudio son elementos históricamente relacionados con el llamado “cuidado del paciente” e incomprensiblemente al margen de este entorno regulatorio. A pesar del riesgo potencial de la transfusión de componentes sanguíneos, se estima que dicha terapia ha salvado millones de vidas en todo el mundo desde mediados del siglo XX, representando uno de los mayores logros en la atención al paciente en toda la historia. Sin embargo, la decisión de transfundir o no sigue siendo una de las más complejas planteadas a los profesionales de la medicina, pues los componentes sanguíneos son un bien escaso y no están totalmente exentos de riesgo, por lo que solo deben administrarse estrictamente cuando sean necesarios.

En nuestro país se realizan anualmente unos 2 millones de transfusiones al año; de estas transfusiones en un 20% su indicación sería cuestionable. Por todo ello, cada indicación debería ser considerada como una decisión clínica, basada en datos analíticos y con una adecuada valoración del riesgo-beneficio que ello puede comportar al paciente.

En las cuatro últimas décadas hemos focalizado muchos los esfuerzos y los recursos invertidos para disponer de existencias de componentes sanguíneos lo más seguras y de excelente calidad posible. Se han

establecido unos criterios de selección de los donantes cada vez más precisos y selectivos; en la extracción de los componentes sanguíneos se han extremado los protocolos para una correcta limpieza y desinfección de la zona de punción, la especificidad de los test serológicos de detección de enfermedades transmisibles son cada vez más precisos, las soluciones de conservación y las condiciones de almacenamiento permiten mantener una excelente viabilidad de los componentes extraídos. Pocas son las especialidades médicas tan normativizadas o legisladas como la donación o la transfusión sanguínea. Los diferentes estados de la Unión Europea (UE) han realizado esfuerzos en el transcurso de los últimos años para armonizar ambas en todos los países Miembro, considerando que homogeneizar un territorio de casi 4 millones de km² con 446,6 millones de habitantes es ciertamente difícil, incorporando además elementos de gestión de la calidad para los centros y servicios de transfusión. La UE ha contribuido a minimizar dichos riesgos adoptando las medidas legislativas necesarias respecto a calidad, seguridad y eficacia de los componentes sanguíneos promoviendo proyectos de investigación en dichos ámbitos, tanto si el destino final de estos proyectos es la elaboración de otras sustancias como si lo es para la práctica transfusional. Además, dichas medidas establecen el modelo de red transfusional básica que debe existir en los estados, los centros y los servicios de transfusión.

Disponemos pues de unos productos de altísima calidad y seguridad pero, ¿conocemos realmente el perfil y las necesidades de los receptores de estos productos?

Nos hemos pasado décadas intentando justificar los efectos nocivos que podía comportar una transfusión y hemos publicado infinidad de trabajos sobre ello. Los efectos positivos de la transfusión deberían ser incluidos en los programas de hemovigilancia, para así dar una visión más real y equilibrada del valor de los mismos. Actualmente la hemovigilancia solo refleja una visión parcial, negativa para que podamos establecer medidas de mejora, unilateral, de las consecuencias de una

transfusión, cuantificando solo los efectos adversos de estas consecuencias y no las vidas salvadas o los buenos resultados obtenidos en el uso de los componentes sanguíneos. Hemos sido muy buenos creando una conciencia social de que la transfusión puede tener consecuencias indeseables, pero no lo hemos sido tanto en demostrar que la transfusión es efectiva.

Históricamente muchos estudios acerca de la correcta prescripción de componentes sanguíneos se han centrado en el análisis comparativo entre prácticas transfusionales conservadoras frente a liberales, centrándose por lo general en la clásica pregunta de cuantas deberían ser las unidades que transfundir sin tener en absoluto en cuenta las características y particularidades del paciente cuando. En realidad, la administración de cada componente debería ser una decisión clínica independiente. La indicación transfusional, en lugar de fundamentarse en criterios de evidencia clínica, se basa a menudo en números, en un marco regulatorio muy restrictivo y punitivo, en el recelo del prescriptor contra posibles reclamaciones y en un exceso de las expectativas en cuanto a seguridad y calidad que entre todos hemos generado en la sociedad en caso de tener que transfundir.

La decisión del prescriptor para indicar correctamente una transfusión no solo debe basarse en números (cifras de hemoglobina, hematocrito, recuento de plaquetas, etc.), debe tener en cuenta también las características individuales del paciente para el cual se requiere la transfusión, como su edad, sexo, peso, comorbilidad, estado general, volemia, tolerancia a la infusión de líquidos, medicaciones asociadas, antecedentes de reacciones adversas a la donación, etc., todo ello para evaluar correctamente la relación riesgo-beneficio en la que esta indicación concreta en este paciente específico pueda comportar en términos de administración de componentes sanguíneos. Esta decisión es compleja e importante y se deben sopesar los riesgos y beneficios asociados a la transfusión frente a aquellos derivados del contexto clínico del paciente relacionados con la anemia, plaquetopenia o coagulopatía que pudiera presentar, en caso de no ser transfundido.

En espera de disponer de unos criterios de actuación más uniformes, las guías de consenso serán el elemento en el que basar nuestra decisión transfusional. Por ello es necesaria la creación de guías y manuales basados en la evidencia y centrados en el paciente con el fin de definir claramente las indicaciones sobre el uso de componentes sanguíneos y para identificar y reducir aquellas situaciones que comporten una mala indicación o un uso inadecuado de los mismos.

Una transfusión correcta y segura debería fundamentarse en:

- Una decisión individualizada centrada en un paciente específico.

- Una indicación basada en la situación clínica del paciente.
- La selección del componente sanguíneo más idóneo según los requerimientos del paciente.
- La dosificación adecuada del componente sanguíneo indicado.
- La administración correcta y segura por personal capacitado y entrenado para ello.

Estos factores apoyan la necesidad de promover una práctica clínica transfusional segura y basada en la evidencia. La introducción del *patient blood management* (PBM), definido en términos académicos como la aplicación idónea de los conceptos médicos y quirúrgicos basados en la evidencia diseñados para mantener los niveles de concentración de la hemoglobina, optimizar la hemostasia y reducir al mínimo la pérdida de sangre en un esfuerzo para mejorar la clínica del paciente, o, definido en términos menos profesionales, como el uso científico de técnicas médicas y quirúrgicas seguras y eficaces para prevenir la anemia y disminuir el sangrado en un esfuerzo para mejorar la clínica del paciente, muestra que la necesidad de transfusión puede ser minimizada en muchos pacientes mediante la implementación de procesos reflexivos comenzando días, o incluso semanas, antes que la decisión real de transfundir se haya realizado. La implementación de dichos programas de PBM mediante el manejo adecuado de los pacientes se ha traducido en muchos países en una reducción sustancial de hasta un 30% de los componentes sanguíneos administrados. Ahora bien, los aspectos quizá más controvertidos de estos programas son la reducción del número de componentes sanguíneos transfundidos, las reacciones o efectos adversos inherentes a su administración y los costes asociados a la transfusión, pero no el aumento en la incidencia de las transfusiones apropiadas.

La evolución de la medicina transfusional ha transcurrido de un énfasis en la seguridad de los componentes a la toma de decisiones centradas en los pacientes, focalizándose actualmente en el manejo del paciente de forma integral, incluyendo los métodos necesarios para reducir al mínimo la necesidad de transfusión y, por lo tanto, minimizar el riesgo de los eventos adversos relacionados con ella. En este contexto, la balanza de la ecuación riesgo-beneficio de la transfusión se ha desplazado al lado del beneficio. ¿Son los supuestos beneficios de la transfusión universales, o están limitados solamente a una población bien definida de pacientes? ¿Qué cifras dintel deben utilizarse como indicadores de la necesidad de transfundir y cuándo deben realizarse las transfusiones? ¿Qué dosis de componente sanguíneo es suficiente y/o necesaria para conferir un beneficio clínico? Las respuestas a estas preguntas se han buscado en múltiples ensayos clínicos aleatorizados. El siguiente

paso de este proceso es traducir esta información en práctica ampliamente adoptada y consistente a través del desarrollo de guías de práctica clínica que puedan convertirse en una parte integral del PBM.

Hay relativamente pocos estudios centrados en las características epidemiológicas de los receptores de componentes sanguíneos y estos podrían mejorar la utilización de los recursos transfusionales:

- Determinar el perfil detallado de las características demográficas y clínicas de los receptores de componentes sanguíneos.
- Conocer la utilización relativa de los componentes sanguíneos según la clínica del paciente, o los procedimientos diagnósticos o terapéuticos a los que puede ser sometido.
- Facilitar la predicción de las necesidades transfusionales a largo plazo.
- Proporcionar información que pueda ser útil en la elaboración de planes de contingencia en caso de escasez de sangre.
- Permitir la evaluación del impacto de las nuevas técnicas de conservación de los componentes sanguíneos o cambios en la casuística de los pacientes transfundidos que pudieran incidir en la demanda futura las necesidades transfusionales.
- Referenciar con otros servicios transfusionales.

Es importante conocer los siguientes datos de los pacientes que transfundimos:

- Características demográficas y clínicas.
- Criterio médico principal ante un requerimiento transfusional.
- Historial transfusional previo.
- Identificar las prácticas de transfusión susceptibles de mejora.
- Las estimaciones en la población, útiles tanto para predecir la demanda futura de la transfusión como para caracterizar mejor el impacto en la salud pública de las medidas de seguridad de la misma.

Los perfiles epidemiológicos son una fotografía fija de la transfusión de componentes sanguíneos. Sería necesario repetir periódicamente estos estudios transversales para tener una visión dinámica de la utilización de dichos componentes y capturar con ello las tendencias más relevantes. Mientras tanto, debería ser necesario evaluar la correcta indicación clínica de las transfusiones de forma individualizada, pues sería muy valioso para mejorar las prácticas transfusionales. Las predicciones de las necesidades de transfusión futura pueden llegar a ser

una ayuda valiosa para garantizar una correcta autosuficiencia en componentes sanguíneos.

Bibliografía recomendada

1. Ansari S, Szallasi A. Blood management by transfusion triggers: when less is more. *Blood Transfus* 2012;10(1):28-33.
2. Bosch MA, Contreras E, Madoz P, Ortiz P, Pereira A, Pujol MM. The epidemiology of blood component transfusion in Catalonia. *Transfusion* 2011;51:105-16.
3. de Vries RR, Faber JC, Strengers PF. Board of the International Haemovigilance Network. Haemovigilance: an effective tool for improving transfusion practice. *Vox Sang* 2011;100(1):60-7.
4. Ditomasso J, Liu Y, Heddle NM. The Canadian Transfusion Surveillance System: what is it and how can the data be used? *Transfus Apher Sci* 2012;46(3):329-35.
5. Engelbrecht S, Wood EM, Cole-Sinclair MF. Clinical transfusion practice update: haemovigilance, complications, patient blood management and national standards. *Med J Aust* 2013;199(6):397-401.
6. Epstein JS. Alternative strategies in assuring blood safety: An overview. *Biologicals* 2010;38(1):31-5.
7. Goodnough LT, Levy JH, Murphy ME. Concepts of blood transfusion in adults. *Lancet* 2013;381(9880):1845-54.
8. Goodnough LT, Shieh L, Hadhazy E, Cheng N, Khari P, Maggio P. Improved blood utilization using real-time clinical decision support. *Transfusion* 2014;54(5):1358-65.
9. Hillyer CD, Blumberg N, Glynn SA, Ness PM, NHLBI Working Group in Transfusion Recipient Epidemiology and Outcomes Research. Transfusion recipient epidemiology and outcomes research: possibilities for the future. *Transfusion* 2008;48(8):1530-7.
10. Hohmuth B, Ozawa S, Ashton M, Melseth RL. Patient-centered blood management. *J Hosp Med* 2014;9(1):60-5.
11. Klein HG. How safe is blood, really? *Biologicals* 2010;38(1):100-4.
12. Kuehn BM. Guideline tightens transfusion criteria. *JAMA* 2012;307(17):1788-9.
13. Leahy MF, Mukhtar SA. From blood transfusion to patient blood management: a new paradigm for patient care and cost assessment of blood transfusion practice. *Intern Med J* 2012;42(3):332-8.
14. Roback JD. Evidence-based guidelines for blood transfusion. *J Infus Nurs* 2012;35(3):187-90.
15. Shander A, Gross I, Hill S, Javidroozi M, Sledge S. A new perspective on best transfusion practices. *Blood Transfus* 2013;11(2):193-202.
16. Spahn DR, Shander A, Hofmann A. The chiasm: transfusion practice versus patient blood management. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2013;27(1):37-42.
17. Szczepiorkowski ZM, Dunbar NM. Transfusion guidelines: when to transfuse. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2013;2013:638-44.
18. Vamvakas EC, Blajchman MA. Blood still kills: six strategies to further reduce allogeneic blood transfusion-related mortality. *Transfus Med Rev* 2010;24:77-124.
19. Venkatesh V, Khan R, Curley A, New H, Stanworth S. How we decide when a neonate needs a transfusion. *Br J Haematol* 2013;160(4):421-33.
20. Vincent JL. Transfusion triggers: getting it right! *Crit Care Med* 2012;40(12):3308-9.

Medicina transfusional y hematología clínica: una visión centrada en el paciente

C. FERNÁNDEZ ÁLVAREZ, R. FERNÁNDEZ ÁLVAREZ

Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital de Cabueñes. Gijón, Asturias

Introducción

Los servicios de hematología clínica son el primero o uno de los primeros clientes internos de los servicios de transfusión hospitalarios, aunque esto depende del grado de complejidad del hospital y de su cartera de servicios.

En nuestro país, un estudio llevado a cabo en 2007 en Cataluña y las Islas Baleares evidenció que las enfermedades de la sangre eran el principal motivo clínico de transfusión, suponiendo el 23% del total del consumo de componentes y el 61,5% del consumo de plaquetas^{1,2}.

Estos datos ponen de manifiesto que la administración de componentes sanguíneos es un elemento básico del tratamiento integral de los pacientes con enfermedades de la sangre y que la incidencia de las mismas está aumentando por el envejecimiento de la población.

La transfusión de componentes sanguíneos es, generalmente, un tratamiento de soporte que permite realizar otras intervenciones terapéuticas sobre el paciente, tales como la administración de quimioterapia o la realización de un trasplante de progenitores hematopoyéticos, pero en otros casos constituye en sí misma el único o principal elemento terapéutico del paciente. Esto hace a muchos pacientes altamente dependientes del tratamiento transfusional durante periodos concretos de su proceso o durante periodos más prolongados, que pueden extenderse hasta el final de su vida.

La seguridad transfusional, tanto en lo que respecta al producto como al proceso, es muy elevada, y las reacciones transfusionales son poco frecuentes. Sin embargo, los pacientes hematológicos son especialmente susceptibles a sufrir determinados tipos de complicaciones que presentan alta morbimortalidad.

Medicina transfusional centrada en el paciente y basada en el uso racional de los recursos

En los últimos años han surgido importantes iniciativas en el campo de la gestión clínica y el uso racional de los

recursos. Estas se aplican en el ámbito hematológico, y más concretamente en el tratamiento transfusional. El *patient blood management*³, traducido habitualmente como “transfusión centrada en el paciente”, o el movimiento *choosing wisely* o “elección de tratamiento basado en el sentido común”, son ejemplos de ello⁴.

Ambos conceptos pretenden llegar más allá de donde nos dirigen las recomendaciones encontradas en las guías de uso adecuado, basadas más en el concepto tradicional de “transfusión basada en los componentes”, ofreciendo una visión más global e interdisciplinar del abordaje terapéutico y reforzando el papel del clínico en el uso de los recursos sanitarios. Recientemente las guías clínicas han empezado a incorporar estos elementos.

Inicialmente estas líneas estratégicas tuvieron más predicamento entre los profesionales del área de producción de componentes (centros de transfusión) o los responsables de la gestión sanitaria, preocupados ambos por la escasez de la materia prima, la donación y los crecientes costes de su procesamiento. Los hematólogos clínicos, especialmente en los hospitales de tercer nivel, muy centrados en otros aspectos del manejo clínico del paciente, es posible que no hayan prestado suficiente atención a estos movimientos o cambios.

Los pacientes hematológicos presentan situaciones clínicas muy diversas. Transfusión en hematología basada en la evidencia

El uso adecuado de los componentes sanguíneos, definido en términos de beneficio clínico para el paciente, ha sido y es objeto de investigación y discusión. En los últimos años se han publicado importantes estudios clínicos que han permitido mejorar nuestro conocimiento y elaborar guías y recomendaciones basadas en estos resultados. La aplicación clínica derivada de este nuevo conocimiento se ha materializado en dos vertientes principales:

- La promoción de una práctica transfusional cada vez más restrictiva formulada para su aplicación

en escenarios clínicos concretos, donde se ha probado su seguridad y eficacia.

- La elaboración de protocolos más completos e intensivos para el tratamiento transfusional de la hemorragia masiva.

Los pacientes con patologías hematológicas presentan características clínicas muy distintas y muchos de los procesos son de muy larga evolución. La investigación se ha centrado principalmente en la transfusión en momentos concretos de un proceso, tales como la fase de inducción de tratamiento o el periodo peritrasplante. Es difícil extrapolar los resultados obtenidos a procesos que pueden durar muchos años o toda una vida.

También se ha publicado extensamente sobre el uso de tratamientos alternativos con factores de crecimiento hematopoyético, principalmente eritropoyetina (Epo), y más recientemente se empiezan a conocer resultados sobre el uso de los agonistas del receptor de la trombopoyetina, siendo prometedor su papel en el manejo de la trombopenia del paciente hematológico en diferentes situaciones clínicas.

A pesar de la mejora de la cantidad y calidad de la información disponible, persisten todavía muchas incertidumbres sobre el mejor abordaje del tratamiento transfusional en los pacientes hematológicos^{5,6}. En la [tabla 1](#) mostramos, sin tratar de ser exhaustivos y a modo de resumen, los aspectos que más frecuente o reciente-

mente han sido estudiados, así como la información o recomendaciones generadas por dichos trabajos.

Características que hacen de los pacientes hematológicos receptores “especiales” de sangre

Existen varias razones por las que podemos considerar a los pacientes hematológicos como pacientes con necesidades o requerimientos “especiales”, y son las que se detallan a continuación

Dependencia transfusional; politransfusión, transfusión multicomponente

Los procesos hematológicos hacen que muchos pacientes sean dependientes del soporte transfusional. Si el paciente presenta un proceso agudo grave requerirá un soporte transfusional intensivo con multicomponentes (hematíes y plaquetas), durante el tiempo necesario para recibir el tratamiento de base de su patología. Si presenta un proceso crónico incurable requerirá la administración regular de componentes, incluso durante toda la vida. La politransfusión conlleva un incremento de todos los riesgos asociados a la misma.

Una circunstancia que consideramos digna de mención es la diversidad de dispositivos asistenciales en los que se atiende a los pacientes a lo largo de su proceso:

Tabla 1

Situaciones clínicas	Aspectos de interés y áreas de controversia	Problemas, estudios y recomendaciones
Anemias congénitas (talasemia, anemia de células falciformes, etc.)	<ul style="list-style-type: none"> - Aloinmunización - Sobrecarga de hierro - Transfusión frente a tratamiento de hidroxiurea - Hipertransfusión frente a transfusión basada en clínica del paciente 	<ul style="list-style-type: none"> - Población pediátrica, falta de estudios clínicos aleatorizados - Establecimiento de recomendaciones o guías de transfusión en algunas patologías como la drepanocitosis - Guías del manejo de la sobrecarga de hierro
Síndromes mielodisplásicos	<ul style="list-style-type: none"> - Aloinmunización - Sobrecarga de hierro - Resultados clínicos y umbral de hemoglobina transfusional - Transfusión frente a Epo - Tratamientos con análogos del receptor de la trombopoyetina 	<ul style="list-style-type: none"> - Recomendaciones para la selección de unidades isofenotipo - Recomendaciones sobre tratamiento quelante del hierro - Indicaciones de Epo en los SMD
Leucemias agudas	<ul style="list-style-type: none"> - Umbral de plaquetas para la transfusión profiláctica en tratamientos de inducción - Eficacia del tratamiento con plaquetas tratadas con riboflavina o amotosaleno 	<ul style="list-style-type: none"> - Reducción de los umbrales transfusionales para la administración profiláctica en los pacientes clínicamente estables - Datos sobre seguridad y eficacia de plaquetas sometidas a tratamiento
Trasplante progenitores hematopoyéticos	<ul style="list-style-type: none"> - Umbral de plaquetas para la transfusión profiláctica de plaquetas - Administración de plaquetas con intención profiláctica versus transfusión solo terapéutica 	<ul style="list-style-type: none"> - Reducción de los umbrales transfusionales para la administración profiláctica en los pacientes clínicamente estables - Mantenimiento de la recomendación de profilaxis a los pacientes gravemente trombopénicos o con factores de riesgo clínico

hospitalización convencional, unidades de vigilancia intensiva, unidad de trasplante, hospital de día o incluso domicilio. Esto exige que en todos ellos haya personal especializado, que conozca las peculiaridades y necesidades de estos pacientes y que la institución sanitaria se organice para procurar accesibilidad y confortabilidad en sus instalaciones.

Requerimientos específicos de los componentes

Los pacientes hematológicos en régimen transfusional crónico presentan con mayor frecuencia complicaciones que requieren un manejo especial, y que pueden dificultar el aprovisionamiento del componente más adecuado. Se precisa una especial atención a la aparición de estas complicaciones y la aplicación de estrategias preventivas para evitar o minimizar estos riesgos.

Aloinmunización frente a antígenos eritrocitarios: la incidencia de aloinmunización en pacientes en régimen transfusional crónico es más alta que en la población general de receptores. Así, frente a las tasas del 1-2% encontradas en la población general, se observan frecuencias de aloinmunización que pueden alcanzar un 15-20% en determinados grupos de pacientes. Esta circunstancia obliga a la selección de unidades compatibles, cuya disponibilidad depende de los aloanticuerpos encontrados. Por ello, y teniendo en cuenta la patología del paciente, se ha planteado la necesidad de establecer estrategias preventivas de la aloinmunización eritrocitaria, mediante la selección de hematíes con una mayor grado de identidad antigénica que el requerido para la compatibilidad ABO y RhD⁷.

Refractariedad a la transfusión de plaquetas: los pacientes con antecedentes de politransfusión, y especialmente si se trata de mujeres multíparas, pueden desarrollar estados de refractariedad clínica a la transfusión de plaquetas mediados por anticuerpos anti-HLA o anti-HPA. En estas circunstancias se requiere la realización de estudios inmunológicos específicos y, en caso de confirmación o alta sospecha de etiología inmune, la selección de componentes de donantes HLA compatibles o con pruebas de compatibilidad *in vitro* negativas. Esto aumenta la dificultad del manejo de estos pacientes⁸. El bajo rendimiento de las transfusiones de plaquetas no debe asumirse como algo habitual o inevitable, siendo preciso un diálogo entre el médico clínico y el hemoterapeuta para identificar y tratar estas situaciones.

Riesgo de desarrollo de enfermedad de injerto contra huésped por transfusión: los pacientes sometidos a trasplante de progenitores, diagnosticados de linfoma de Hodgkin y los que reciben tratamiento con determinados fármacos (análogos de las purinas, etc.) constituyen el principal grupo de riesgo para desarrollar esta rara complicación⁹.

La demanda de componentes irradiados ha aumentado de manera significativa en los últimos años y se

prevé un constante crecimiento. Esto requiere que el centro proveedor, así como el responsable del servicio de transfusión, deban estar atentos a la previsión de la demanda, y esto exige una buena comunicación con el ámbito clínico. Los diferentes sistemas de hemovigilancia recogen como error transfusional frecuente el no cumplimiento de los protocolos de prevención de esta complicación, generalmente por un error en la prescripción¹⁰.

Riesgos asociados al trasplante alogénico ABO no idéntico: el manejo del paciente con incompatibilidad ABO, menor o mayor, con el grupo del injerto de progenitores exige una monitorización específica. Ambos ámbitos asistenciales deben trabajar de manera coordinada para la selección del componente con el grupo ABO más idóneo según el momento del proceso de trasplante en el que se encuentre el paciente.

Requerimientos de información y comunicación con el receptor

Se ha señalado que es importante informar al paciente hematológico sobre cuáles son sus requerimientos transfusionales específicos mediante la entrega de documentación informativa. Se debe informar al paciente de los aloanticuerpos clínicamente significativos que se hayan identificado, de la necesidad de recibir componentes irradiados o de antecedentes de reacción grave que requieran alguna medida preventiva o de vigilancia. Igualmente, es importante notificar al paciente que ha sido sometido a trasplante cuando el grupo ABO/D postrasplante no coincida con el que presentaba en los registros previos.

El paciente no siempre acude a su centro de referencia y ello puede ocasionar problemas o errores.

Haciendo partícipe al paciente de toda esta información contribuimos a que participe activamente en su propio proceso de seguridad transfusional.

Hemovigilancia del paciente hematológico: otros riesgos específicos

Además de lo anteriormente señalado, se sabe que los pacientes hematológicos son susceptibles de sufrir otras complicaciones transfusionales con mayor frecuencia, aunque no todas ellas puedan ser prevenidas mediante una adecuada selección de los componentes.

Hemosiderosis postranfusal

Esta complicación es característica de algunos de nuestros pacientes. Si bien es inherente a la propia transfusión, debe ser conocida, reconocida y tratada por el clínico, pudiendo desde el servicio de transfusión contribuir a su manejo mediante el establecimiento de alertas o notificaciones¹¹.

TRALI (daño pulmonar agudo relacionado con la transfusión) y TACO (sobrecarga circulatoria)

Los pacientes hematológicos pertenecen al colectivo de mayor riesgo. Los clínicos a su cargo deben estar especialmente alerta ante su posible aparición y, en el caso de la sobrecarga circulatoria, indicar las medidas preventivas pertinentes. El TRALI puede confundirse con otros cuadros de patología pulmonar aguda por lo que es importante no olvidarse de la existencia de esta entidad¹². Se han sugerido medidas universales de reducción de riesgo de TRALI consistente en la transfusión de plasma y plaquetas de aféresis procedentes de donante varón no transfundido. En caso de no haber disponibilidad de estos componentes habría que considerar a los pacientes hematológicos como destinatarios preferentes de los componentes de más bajo riesgo.

Desarrollo de procesos infecciosos transmitidos por la sangre

Aunque es muy poco frecuente la transmisión de infecciones por la sangre, existen dos agentes infecciosos cuyo escrutinio no es obligatorio en las donaciones que pueden ocasionar problemas graves en los pacientes inmunodeprimidos. El parvovirus B19 ocasiona generalmente una infección asintomática, pero en el paciente hematológico puede producir cuadros de eritroblastopenia grave. Lo mismo puede decirse del virus de la hepatitis E, que en los pacientes inmunocompetentes pasa clínicamente desapercibida pero en el paciente inmunodeprimido puede producir hepatitis aguda, crónica o incluso formas fulminantes¹³. Debe tenerse conocimiento de ambas entidades para incluirlas en el diagnóstico diferencial de los cuadros clínicos que puedan presentar nuestros pacientes.

Síndrome hiperhemolítico

Esta infrecuente complicación se produce casi exclusivamente en pacientes con procesos hematológicos crónicos¹⁴. Es fundamental que el médico clínico conozca esta entidad para que, junto con el médico del servicio de transfusión, se realicen los estudios oportunos y se tomen las medidas terapéuticas adecuadas. Sin las medidas terapéuticas necesarias, que en este caso implican el cese del tratamiento transfusional, los índices de mortalidad de esta complicación son muy altos.

Reacciones transfusionales diferidas en domicilio

Muchas de las transfusiones que reciben los pacientes se realizan en el hospital de día, de modo que algunas reacciones de tipo retardado pueden producirse en el domicilio del paciente. Los pacientes deben recibir

información sobre los síntomas o signos que deben alarmarle y cómo debe proceder en ese caso.

El soporte transfusional del paciente hematológico terminal

Apenas disponemos de estudios o artículos de opinión que aborden este importante asunto. Dado que los pacientes hematológicos en situación terminal presentan frecuentemente anemia y trombopenia, la transfusión periódica forma parte del paquete de medidas de soporte que se les aplica. La transfusión se sigue indicando, incluso cuando otros tratamientos proactivos se han abandonado, siendo generalmente el último elemento que se retira en el proceso de cese del esfuerzo terapéutico¹⁵.

En qué medida el tratamiento es útil para mejorar la calidad de vida de los pacientes es algo que el médico debe valorar con carácter individual. No disponemos de suficiente información o herramientas adecuadas para la evaluación del pronóstico vital que nos permitan determinar cuál es la actuación más correcta y cuándo es razonable y benéfico para el paciente suspender el soporte transfusional. Algunos estudios demuestran que los pacientes terminales reciben transfusiones en los últimos días u horas de sus vidas, obteniendo escaso beneficio y permaneciendo hospitalizados en unidades de agudos, obviando otras medidas de atención mucho más necesarias.

La formación del hematólogo como prescriptor de componentes

El médico que habitualmente trata a los pacientes con enfermedades de la sangre es un especialista en hematología y hemoterapia. Como la terapia transfusional es un elemento básico de los planes de cuidados, la emplea con carácter rutinario.

La mayoría de los hematólogos han recibido, durante su periodo de especialización, formación específica en medicina transfusional. En estas circunstancias, cabría esperar que la calidad de la prescripción del especialista hematólogo sea siempre excelente. Sin embargo, tal y como se ha publicado en la literatura, el resultado de las auditorías muestra que la prescripción de componentes, y sobre todo la de plaquetas, no se ajusta siempre a las recomendaciones de las guías o protocolos locales o nacionales¹⁶. Generalmente se pone de manifiesto cierto grado de sobretransfusión de plaquetas, sobre todo cuando se utilizan con intención profiláctica. La infratransfusión, en nuestro ámbito de actuación, es probablemente un hallazgo poco frecuente. La no administración de una transfusión o el retraso de la misma es una situación que empieza a preocupar en otros ámbitos clínicos. Debemos permanecer atentos para que este problema no afecte a un colectivo de pacientes tan sensible como el que habitualmente tratamos.

Comunicación entre los especialistas de la cadena transfusional

La complejidad que ha alcanzado nuestra especialidad hace que la medicina transfusional se desenvuelva en tres niveles: centro de transfusión, servicio de transfusión y servicio clínico de hematología, que muchas veces no tienen una comunicación fluida o adecuada¹⁷.

No es infrecuente que el clínico reciba escasa información, o formación de primera mano, cuando se cambian los sistemas de procesamiento y tratamiento de los componentes o se introducen nuevas pruebas de cribado. A veces estos cambios originan otros en las características del producto o en los riesgos asociados al mismo. Muchas veces el médico clínico no conoce la situación real de las existencias locales o regionales, o no es informado regularmente de los índices de consumo y sus costes.

Tampoco es un hecho inusual que el hematólogo clínico resuelva por sí mismo una situación de una posible reacción transfusional sin comunicarlo al servicio de transfusión, lo que afecta negativamente a la trazabilidad del proceso.

Es muy importante que exista una comunicación fluida entre todos los niveles y que no se aisle al hematólogo clínico de los programas de formación continua en medicina transfusional.

Conclusiones

- Los pacientes hematológicos presentan unas características clínicas muy específicas que condicionan un aumento de los riesgos y que exigen, en determinados casos, requerimientos de componentes especiales.
- La prescripción de los componentes debe realizarse en función de la mejor evidencia disponible. La complejidad de las patologías hace que la información que manejamos no sea completa o de alta calidad, o que no sea aplicable fuera del contexto clínico donde se haya analizado. Se deben actualizar periódicamente los conocimientos y aplicarlos en la práctica diaria.
- Todas las transfusiones que se administren a los pacientes hematológicos deben estar sujetas al control del sistema de hemovigilancia, con especial atención a los efectos raros o de difícil diagnóstico.
- Se debe evitar la sobreexposición a componentes sanguíneos abusando de las transfusiones profilácticas, pero se debe estar igualmente atento a posibles situaciones de infratransfusión.
- Es fundamental que la institución, el centro proveedor, el hematólogo clínico y el del servicio de transfusión se comuniquen y organicen en torno a las necesidades del paciente.

- Es necesario hacer partícipe al paciente de su propio proceso de seguridad transfusional ofreciéndole información sobre sus requerimientos específicos.

Bibliografía

1. Contreras E. Evolución del consumo de componentes sanguíneos en España y otros países europeos. Como incidir en el consumo. Libro de ponencias y comunicaciones 20 Congreso Nacional de la Sociedad Española de Transfusión Sanguínea y Terapia Celular. 2009. pp. 13-16.
2. Bosch MA. Un análisis crítico de a quién y cuándo transfundimos. Libro de ponencias y comunicaciones 20 Congreso Nacional de la Sociedad Española de Transfusión Sanguínea y Terapia Celular. 2009. pp. 134-138.
3. Hofmann A, Farmer S, Shaner A. Five drivers shifting the paradigm from product-focused transfusion practice to patient blood management. *The Oncologist* 2011;16(Suppl3): 3-11.
4. Callum JL, Waters JH, Shaz BH, Sloan SR, Murphy MF. The AABB recommendations for the Choosing Wisely campaign of the American Board of Internal Medicine. *Transfusion* 2014;54(9):2344-52.
5. Stanworth SJ, Estcourt LJ. When to transfuse and how much in hematologic malignancies. *Haematologica* 2014;8:421-6.
6. Heddle NM. Clinical trials on platelet transfusion: successes and failures. *ISBT Science Series* 2013;195-200.
7. Sanz C, Nomdedeu M, Belkaid M, Martínez I, Nomdedeu B, Pereira A. Red blood cell alloimmunization in transfused patients with myelodysplastic syndrome or chronic myelomonocytic leukemia. *Transfusion* 2013;53(4):710-5.
8. Murphy MF. Managing the platelet refractory patient. *ISBT Science Series* 2014;9(1):234-8.
9. Treleaven J, Gennery A, Marsh J, Norfolk D, Page L, Parker A, et al. Guidelines on the use of irradiated blood components prepared by the British Committee for Standards in Haematology blood transfusion task force. *British Journal of Haematology*. *Br J Haematol* 2011;152(1):35-51.
10. Informe de Hemovigilancia 2013. Ministerio de Sanidad, Servicios sociales e igualdad. Accesible en: <http://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/medicinaTransfusional/esquema-Hemo/hemovigilancia.htm>
11. Remacha A, Sanz C, Contreras E, Díaz de Heredia C, Grifols JR, Lozano M, et al. Guidelines on haemovigilance of post-transfusional iron overload. *Blood Transfus* 2013;11(1):128-39.
12. Silliman CC, Ambruso DR, Boshkov LK. Transfusion-related acute lung injury. *Blood* 2005;105(6):2266-73.
13. Hepatitis E Virus (HEV) and Blood Transfusion Safety. FDA Blood products advisory committee. Accesible en: <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/BloodVaccinesandOtherBiologics/BloodProductsAdvisoryCommittee/UCM319542.pdf>
14. Win N, New H, Lee E, de la Fuente J. Hyperhemolysis syndrome in sickle cell disease: case report (recurrent episode) and literature review. *Transfusion* 2008;48(6):1231-8.
15. Blood transfusion for anaemia in patients with advanced cancer. *Revisión Cochrane*. Accesible en: http://www.cochrane.org/CD009007/SYMPT_blood-transfusion-for-anaemia-in-patients-with-advanced-cancer
16. Niscola P, Tendas A, Scaramucci L, Giovannini M. End of life care in hematology: still a challenging concern. *Ann Palliat Med* 2014;3(1):7-11.
17. Global Forum for Blood Safety: Patient. Blood Management. WHO. Accesible en: http://www.who.int/bloodsafety/collaboration/who_gfbs_2011_03_priorities_for_action.pdf

La transfusión de plaquetas en situaciones especiales: el paciente antiagregado, la cirugía sobre órganos críticos y la microangiopatía trombótica

A. PEREIRA SAAVEDRA

Servicio de Hemoterapia y Hemostasia. Hospital Clínic. Barcelona

Introducción

La transfusión de plaquetas es una terapéutica transfusional sólidamente establecida desde hace décadas. No obstante, sigue habiendo aspectos controvertidos, algunos de ellos bien conocidos pues son objeto de frecuentes publicaciones, como es el caso de la dosis óptima, la actitud profiláctica frente a la terapéutica o la calidad y eficacia del producto final según se haya obtenido por aféresis o por el fraccionamiento de la sangre total.

Junto a estos temas clásicos, cuya discusión cae con frecuencia en el academicismo y se aleja de la práctica clínica, existen otros menos conocidos pero de mayor repercusión en el día a día de la hemoterapia. Son ejemplos de ello el paciente portador de un stent coronario y doble medicación antiagregante plaquetaria que acude por una hemorragia o que ha de someterse a una intervención quirúrgica no programada, la punción lumbar en el paciente con leucemia aguda linfoblástica y un recuento de plaquetas de $40 \times 10^9/L$, o más infrecuente pero no más sencillo, el paciente con púrpura trombocitopénica trombótica y plaquetopenia grave al que ha de implantarse un catéter yugular para iniciar el tratamiento con recambio plasmático.

En esta ponencia se pasará revista a la evidencia científica sobre la transfusión de plaquetas en esas situaciones especiales y, ante la escasez de datos publicados, se procurará suplirlos con el conocimiento clínico y el mejor sentido común.

Transfusión de plaquetas en el paciente antiagregado

En los últimos años ha aumentado considerablemente el empleo de antiagregantes plaquetarios en la prevención secundaria de la enfermedad aterotrombótica, sobre todo en pacientes portadores de prótesis endoarteriales (stent) coronarias o en vasos periféricos, así como en los afectos de enfermedad cerebrovascular o los diagnosticados de estenosis carotídea o claudicación intermitente. No es raro, pues, que el hematólogo se vea invo-

lucrado en la decisión de revertir o no el tratamiento antiagregante en pacientes candidatos a intervenciones quirúrgicas o que se presentan con hemorragia.

Los antiagregantes plaquetarios empleados con más frecuencia son la aspirina a dosis bajas (75-100 mg/d), los inhibidores del receptor plaquetario del ADP (clopidogrel, prasugrel, ticagrelol) y los inhibidores de la GP IIb/IIIa (abxicimab, eptifibatide, tirofiban)¹.

La decisión de suspender temporalmente la antiagregación ante una intervención quirúrgica es difícil y debe personalizarse, siempre tras considerar el motivo de la antiagregación y el riesgo hemorrágico que comporte la intervención. Como norma general, debe considerarse que el riesgo trombótico es casi siempre superior al hemorrágico, sobre todo en pacientes portadores de stent coronario reciente. Lo habitual es posponer la cirugía programada, suspender los inhibidores del receptor del ADP unos 5-7 días antes de la intervención y mantener la aspirina a bajas dosis salvo que el riesgo hemorrágico sea muy elevado^{2,3}. Algunos inhibidores de la GPIIb/IIIa pueden provocar trombocitopenia de causa inmunoalérgica⁴.

La transfusión de plaquetas rara vez está indicada para revertir los antiagregantes plaquetarios de modo profiláctico en este contexto quirúrgico. Solo debe recurrirse a ella en el caso de hemorragia grave. Ha de tenerse en cuenta que la transfusión de plaquetas revierte con eficacia el efecto de la aspirina, algo menos el del clopidogrel y el prasugrel, pero no revierte en absoluto el del ticagrelol⁵. No hay datos que apoyen la utilidad de los análisis de función plaquetaria en la toma de decisiones sobre transfundir o no a pacientes concretos.

La transfusión de plaquetas estará indicada en el caso de hemorragia grave o cuando se estime que el riesgo hemorrágico supera al trombótico (por ejemplo, neurocirugía en paciente de bajo riesgo trombótico). No obstante, algunos estudios muestran que la transfusión de plaquetas puede resultar inútil para mejorar el pronóstico de la hemorragia cerebral en los pacientes antiagregados⁶, probablemente porque tal pronóstico queda ya determinado en los primeros minutos de la hemorragia.

Transfusión profiláctica de plaquetas en el paciente con trombocitopenia central sometido a intervenciones agresivas sobre órganos críticos

Punción lumbar

Es una intervención muy frecuente en pacientes afectos de hemopatías malignas con trombocitopenia de origen central, tanto con intención diagnóstica como terapéutica (quimioterapia intratecal). La evidencia publicada sobre el riesgo hemorrágico de la punción lumbar en este tipo de pacientes es escasa, de baja calidad (estudios observacionales retrospectivos) y no permite definir un recuento mínimo de plaquetas que pueda considerarse seguro. La AABB recomienda la transfusión profiláctica siempre que el recuento sea inferior a $50 \times 10^9/L$, aunque admite que esta es una cifra arbitraria, fruto del consenso entre expertos⁷.

Cirugía sobre el sistema nervioso central

También aquí la evidencia publicada es escasa, de baja calidad e insuficiente para establecer dinteles de seguridad del recuento plaquetario. La AABB recomienda de nuevo la cifra de $50 \times 10^9/L$ como desencadenante de la transfusión profiláctica en función solo del criterio de expertos⁷. No obstante, tras considerar el bajo riesgo de la transfusión en la actualidad y las consecuencias catastróficas que pueden tener pequeñas hemorragias en el sistema nervioso central (SNC), algunos autores aconsejan mantener el recuento por encima de $80-100 \times 10^9/L$ durante la intervención y los primeros días del postoperatorio⁸.

Intervenciones sobre otras regiones anatómicas críticas

La cirugía ocular y sobre las vías urinarias comparte con la del SNC el riesgo de lesiones graves secundarias a hemorragias mínimas. Tampoco aquí existe experiencia publicada que ayude en la toma de decisiones, por lo que serían aplicables los mismos criterios que se han mencionado en los párrafos anteriores. En el caso de las vías urinarias el riesgo principal consiste en la obstrucción del uréter por coágulos y el consiguiente riesgo de hidronefrosis si tal obstrucción pasase desapercibida.

El ácido tranexámico puede resultar útil para prevenir la hemorragia por trombocitopenia en los casos mencionados, pero no existe ninguna prueba sobre su eficacia y la guía clínica de la AABB no lo menciona. En la cirugía urológica deberían evitarse los antifibrinolíticos pues, como se ha comentado, el principal peligro deriva precisamente de la formación de coágulos.

Transfusión profiláctica de plaquetas en la púrpura trombocitopénica trombótica

La púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) es una enfermedad producida por el déficit de la enzima ADAMTS13, cuya función biológica es degradar los multímeros de muy alto peso molecular del factor von Willebrand. La persistencia de esos multímeros en el endotelio vascular provoca la agregación plaquetaria diseminada en el interior de las arteriolas, lo que se traduce en una microangiopatía en la que coexisten fenómenos trombóticos con manifestaciones hemorrágicas debidas a la trombocitopenia por consumo. El tratamiento de elección de la PTT es el recambio plasmático masivo con infusión de plasma fresco.

Como en cualquier otra trombocitopenia de causa periférica, la transfusión profiláctica de plaquetas es inútil o poco eficaz debido a la rápida desaparición de las plaquetas transfundidas⁹. En el caso de la PTT existe además alguna evidencia de que la transfusión de plaquetas podría acelerar los fenómenos trombóticos y producir un agravamiento brusco de la enfermedad¹⁰. Tal evidencia es de baja calidad, pues se basa solo en casos clínicos o en estudios epidemiológicos muy poco específicos¹¹. Además, no se reproduce en series más amplias de pacientes y podría explicarse por un sesgo del tipo "selección por indicación", es decir, que se transfundiera preferentemente a los pacientes que ya están más graves antes de recibir las plaquetas^{12,13}.

La duda sobre transfundir o no de modo profiláctico al paciente con PTT suele plantearse ante la necesidad de implantar accesos venosos centrales para iniciar el recambio plasmático. En la experiencia de este autor cuentan algunos casos de hematomas cervicales rápidamente disecantes, con compromiso de la vía aérea, después de intentar canalizar la vena yugular. A falta de datos bibliográficos de calidad deberá recurrirse al sentido común: emplear la vena femoral cuando sea posible y no administrar plaquetas de modo profiláctico sin haber transfundido inmediatamente antes plasma fresco (por ejemplo, 1.000 mL) por cualquier vía periférica.

Bibliografía

1. Alonso-Coello P, Sergi Bellmunt S, McGorrian C, et al. Anti-thrombotic therapy in peripheral artery disease. *Chest* 2012;141(Suppl):e669S-e690S.
2. Darvish-Kazem S, Gandh Mi, Marcucci M, Douketis JD. Perioperative management of antiplatelet therapy in patients with a coronary stent who need noncardiac surgery: a systematic review of clinical practice guidelines. *Chest* 2013;144:1848-56.
3. Oprea AD, Popescu WM. Perioperative management of antiplatelet therapy. *Br J Anaesthesia* 2013;111 (S1):i3-i17.
4. Bougie DW, Wilker PR, Wuitschick ED, et al. Acute thrombocytopenia after treatment with tirofiban or eptifibatide is associated with antibodies specific for ligand-occupied GPIIb/IIIa. *Blood* 2002;100:2071-6.

5. Scharbert G, Wetzel L, Schrottmaier WC, Kral JB, Weber T, Assinger A. Comparison of patient intake of ticagrelor, prasugrel, or clopidogrel on restoring platelet function by donor platelets. *Transfusion* [published ahead of print: 15 Jan 2015]. doi: 10.1111/trf.12977.
6. Batchelor JS, Grayson A. A metaanalysis to determine the effect on survival of platelet transfusions in patients with either spontaneous or traumatic antiplatelet medication-associated intracranial haemorrhage. *BMJ Open* 2012;2:e0003588.
7. Kaufman RM, Djulbegovic B, Gernsheimer T, et al. Platelet transfusion: a clinical practice guideline from the AABB. *Ann Intern Med* 2015;162:205-13.
8. Petz LD. Platelet Transfusion. En: Petz LD, Swisher SN, Kleinman S, Spence RK, Strauss RG (eds) *Clinical practice of transfusion medicine*. 3.ª ed. Churchill Livingstone: Edinburgh; 1996. pp. 359-412.
9. Otrrock ZK, Liu C, Grossman BJ. Platelet transfusion in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Vox Sang* (Epub ahead of print: 20 Apr 2015. doi: 10.1111/vox.12274)
10. Riviere E, Saint-Leger M, James C et al. Platelet transfusion and catheter insertion for plasma exchange in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura and a low platelet count. *Transfusion* [Epub ahead of print: 20 FEB 2015. doi: 10.1111/trf.13041).
11. Goel R, Ness PM, Takemoto CM, Krishnamurti L, King KE, Tobian AAR. Platelet transfusions in platelet consumptive disorders are associated with arterial thrombosis and in-hospital mortality. *Blood* 2015;125:1470-6.
12. Zhou A, Mehra RS, Smith RE. Outcomes of platelet transfusion in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura: a retrospective case series study. *Ann Hematol* 2015;94:467-72.
13. Del Río J, Pereira A, de la Rubia J, García-Erce JA, Arbona C, Contreras E, Lozano M. Platelet transfusion as a proxy for more severe thrombotic thrombocytopenic purpura [eLetter]. *Blood* 2015.

Laboratorio de diagnóstico hematológico básico. Actualización en el laboratorio general de hematología

COORDINADORES: **J. VILLARRUBIA ESPINOSA.** *Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid*

T. MOLERO LABARTA. *Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín. Las Palmas de Gran Canaria*

En este simposio hemos tratado de recopilar las novedades en el laboratorio básico de hematología contando con ponentes expertos en todas sus áreas, desde la hematimetría hasta el inmunofenotipo, pasando por el estudio de las anemias y de la hemostasia/trombosis.

El Dr. Diego Velasco repasa en su ponencia las novedades incluidas en los autoanalizadores de última generación y lo que supone la ayuda de estos nuevos parámetros cualitativos y cuantitativos en el diagnóstico hematológico, señalando la necesidad de una buena preparación hematológica para su interpretación. Centrándose en el estudio de los pacientes o portadores de talasemias y hemoglobinopatías estructurales, explica las diferencias de los valores del hemograma, tanto nuevos como clásicos, para su diagnóstico diferencial y con la ferropenia en caso de microcitosis, que se completará con otras técnicas imprescindibles como la electroforesis, el isoelectroenfoque, la cromatografía líquida de alta resolución y estudios moleculares.

La aportación del laboratorio general al estudio de hipercoagulabilidad la desarrollará el Dr. F. Javier Rodríguez Martorell partiendo del “modelo celular de la hemostasia” en equilibrio, cuya ruptura producida por factores genéticos, adquiridos o transitorios causará la aparición de complicaciones hemorrágicas o trombóticas. En cuanto a la necesidad de la realización de test para el diagnóstico de las trombofilias, complejos y costosos, y que pueden causar daño psicológico, señala la importancia de seleccionar cuidadosamente a los pacientes a los que realizar las pruebas para lograr una mayor utilidad y eficiencia. No existe un acuerdo en las guías, sociedades o expertos sobre cuándo y qué testar, si bien todas coinciden en realizar las pruebas fuera del proceso agudo y excluyendo interferencias de fármacos anticoagulantes que puedan artefactar los resultados.

El profesor Alberto Orfao centrará su ponencia en cómo detectar poblaciones celulares clonales, profundizando en la manera de diferenciarlas de la malignidad por métodos citofluorométricos.

Como colofón, la Dra. Isabel de la Villa comentará las normas de acreditación ISO 15.189, que aplica a los laboratorios clínicos generales y en particular al hematológico, así como los logros conseguidos en los últimos diez años en nuestro país y en Europa desde que se instauró la norma.

Aportación de la hematimetría al estudio de talasemias y hemoglobinopatías estructurales

D. VELASCO-RODRÍGUEZ¹, F. A. GONZÁLEZ FERNÁNDEZ^{2,3}, J.M. ALONSO-DOMÍNGUEZ³,
M. SOPEÑA³, L. ABALO³, J. VILLARRUBIA^{2,3}, F. CAVA³

¹Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid. ²Hospital Clínico San Carlos. Madrid. ³Laboratorio Central de la Comunidad de Madrid BR Salud. Madrid

Introducción

El laboratorio clínico contribuye en un 70% al diagnóstico médico, siendo esta aportación aún mayor en el laboratorio de hematología¹. La disponibilidad de unos datos exactos y rápidos de laboratorio contribuye a un tratamiento temprano y eficaz. Durante los últimos 20 años los analizadores hematológicos han sufrido una enorme evolución tecnológica, aumentándose considerablemente la información que proporcionan². Además de los resultados tradicionales del hemograma de 9 parámetros y el diferencial leucocitario, hoy en día nos proporcionan nuevos valores, tanto cuantitativos como cualitativos, muchos de ellos de gran ayuda en el diagnóstico clínico. Esto hace que cada vez sea necesaria una mayor preparación para su conocimiento y correcta interpretación, y evitar así la petición de pruebas innecesarias o, lo que es peor, un diagnóstico tardío o equivocado.

Los analizadores hematológicos, en general, miden de forma directa el número de hematíes, su volumen (VCM), su ancho de distribución (ADE) y la hemoglobina (Hb), siendo calculados el resto de parámetros eritrocitarios (hematocrito, hemoglobina corpuscular media [HCM] y concentración de hemoglobina corpuscular media [CHCM]). A partir de 1990, con la incorporación de nuevas tecnologías en los analizadores hematológicos, empiezan a aparecer nuevos parámetros que mejoran el diagnóstico de forma considerable.

Las hemoglobinopatías constituyen las alteraciones monogénicas más frecuentes en el mundo. Se producen por mutaciones puntuales, deleciones o inserciones en los genes que codifican las cadenas de globina que pueden determinar una alteración cualitativa en la expresión de dichos genes, en el caso de las hemoglobinopatías estructurales, o una disminución o ausencia de la expresión de las cadenas de globina, en el caso de las talasemias³.

Las talasemias se clasifican en función de la cadena o cadenas de globina deficitarias.

Hasta la actualidad se han descrito más de 1.500 variantes estructurales de la hemoglobina. En más del

95% de estas variantes la alteración estructural consiste en la sustitución de un solo aminoácido. Dependiendo de la naturaleza y la localización del aminoácido sustituido se van a determinar cambios en la estabilidad, la solubilidad y la función (afinidad por el oxígeno) de la molécula de hemoglobina, que son finalmente los responsables de las manifestaciones clínicas de las hemoglobinopatías⁴.

A pesar de que en la mayoría de ellas la alteración estructural no condiciona ningún cambio significativo, por lo que cursan de forma silente o asintomática, las hemoglobinopatías estructurales y las talasemias constituyen uno de los problemas de salud pública más importantes en el mundo⁵. No obstante presentan una incidencia muy variable de unas regiones a otras, de forma que en algunos países, como los del norte de Europa, su prevalencia es muy baja y en otros son tan comunes que la mayoría de la población es portadora de al menos una anomalía genética que afecta a la estructura o a la síntesis de la hemoglobina⁶.

La alta prevalencia en algunas regiones de las denominadas “hemoglobinopatías comunes” (α y β talasemias, Hb S, Hb C y Hb E) viene determinada fundamentalmente por la protección que determinan a los sujetos portadores frente a la infección por la malaria, originándose una selección natural responsable de estas altas y mantenidas prevalencias.

Para el diagnóstico de hemoglobinopatías disponemos de varias técnicas. La más sencilla y barata, que nos proporciona un diagnóstico de presunción y es por tanto esencial en el cribado, es el hemograma. Para identificar el tipo de talasemia o hemoglobinopatía estructural el siguiente paso sería realizar una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Dependiendo del valor de HbA₂ y HbF, diagnosticaremos β -talasemia heterocigota (β -T) (HbA₂ elevada), $\delta\beta$ -talasemia heterocigota ($\delta\beta$ -T) (HbA₂ normal y HbF elevada) o α -talasemia (α -T) (HbA₂ y HbF normales). Para el diagnóstico de hemoglobinopatía estructural, además de la HPLC, se emplean otras técnicas como la electroforesis a pH alcalino y ácido en acetato de celulosa, la electroforesis capilar o el isoelec-

troenfoque. Se recomienda la realización de 2 de estas técnicas para su diagnóstico. Por último, el grado de certeza diagnóstica (*gold standard*) se obtiene mediante estudios de biología molecular. Por su mayor complejidad y coste, no se realiza en todos los pacientes, solo en determinadas circunstancias⁷.

Aportación de la hematimetría al estudio de talasemias

Un paciente con microcitosis, ¿tiene ferropenia o talasemia?

El déficit de hierro y la talasemia son las dos principales causas de microcitosis y, dado que su manejo clínico es tan diferente, el hecho de poder discriminar entre ambas entidades tiene implicaciones importantes.

Los parámetros de laboratorio más clásicos se han utilizado desde hace años como cribado preliminar de estas entidades, siendo esta estrategia especialmente útil en áreas geográficas donde la prevalencia de talasemia y ferropenia es alta. Aquellos individuos portadores de un rasgo talasémico presentan habitualmente un recuento de hematíes totales mayor, niveles más altos de Hb y CHCM y, por el contrario, menor VCM y ADE que los pacientes con déficit de hierro⁸. Sin embargo, en ocasiones puede no ser tan sencillo realizar este primer diagnóstico diferencial de anemia microcítica, sobre todo cuando coexisten otras causas carenciales o en casos de anemia de trastorno crónico (que en ocasiones también puede cursar con microcitosis).

Debido a esto, en los últimos años se han desarrollado nuevos parámetros de laboratorio como las poblaciones eritrocitarias en función del volumen y la concentración de hemoglobina de los hematíes: porcentaje de hematíes macrocíticos (%macro), microcíticos (%micro), hipercrómicos (%hiper) e hipocrómicos (%HIPO). De estos 4, el que mejor discrimina entre ferropenia y talasemia es %micro (es significativamente mayor en portadores de rasgo talasémico). Además del valor numérico de dichos parámetros, los analizadores que emplean la difracción óptica proporcionan eritogramas con patrones típicos tanto de anemia ferropénica como de talasemia, permitiendo un sencillo diagnóstico de presunción a primera vista⁸.

Algunos autores han desarrollado índices para discriminar de forma rápida ambas patologías, basados en ciertos parámetros de laboratorio de los hematíes que se obtienen de forma automática de los analizadores hematológicos⁹⁻¹¹. A pesar de tener buena sensibilidad y especificidad, tienen limitaciones: por un lado, fueron desarrollados para discriminar entre anemia ferropénica y β -talasemia heterocigota (por lo que su aplicabilidad está limitada en áreas geográficas donde otros tipos de talasemias, como la alfa, sean muy prevalentes) y, por

otro lado, prácticamente todos ellos hay que calcularlos salvo uno, el cociente %microcíticos/%hipocrómicos (calculado de forma automática por los analizadores hematológicos de Siemens).

Además de los mencionados análisis de parámetros aislados o combinaciones de los mismos, se han publicado algunos trabajos en los que se han diseñado funciones matemáticas algo más complejas basadas en parámetros del hemograma para identificar portadores de rasgo talasémico^{12,13}. La novedad respecto a estudios previos es que han sido capaces de identificar tanto α -talasemia como β -talasemia, discriminando portadores de las mismas de aquellos pacientes con anemia ferropénica.

Deltabetatalasemia

A pesar de ser menos frecuente que la β -talasemia heterocigota (β -T), en determinadas áreas geográficas (como España) la $\delta\beta$ -talasemia heterocigota ($\delta\beta$ -T) no es una entidad rara y con frecuencia se infradiagnostica, ya que ambas entidades se confunden con cierta frecuencia. Por eso es crucial disponer de herramientas diagnósticas que nos permitan distinguir las y poder así dar a los portadores un consejo genético adecuado. Los parámetros clásicos del hemograma son muy similares en ambas entidades, con la excepción del ADE¹⁴. Por razones que se desconocen, la HbF se expresa solo en una parte de los hematíes en adultos sanos, y esa distribución heterogénea de la HbF es la responsable de que los portadores de $\delta\beta$ -T tengan dos poblaciones diferentes de hematíes y, en consecuencia, un ADE elevado. En un trabajo recientemente publicado, se observó que el 84,9% de β -T y el 90,2% de $\delta\beta$ -T fueron correctamente identificados al aplicar un punto de corte del 17,35% para el ADE¹⁵. En ese mismo trabajo se demostró que el ADE tiene una fuerte correlación con el porcentaje de HbF, de forma que un portador de β -T o $\delta\beta$ -T con niveles elevados de HbF tendrá una mayor anisocitosis que aquel con niveles normales de HbF¹⁵.

En portadores de $\delta\beta$ -T, el aumento en la síntesis de cadenas γ compensa en parte el déficit de síntesis de cadena β . Por tanto, la hemoglobinización de los precursores eritroides es mayor (lo que explica que tengan además una CHCM ligeramente más elevada) y, consecuentemente, sufren menos divisiones, por lo que tienen un VCM ligeramente mayor que los portadores de β -T.

Alfatalesmia

La principal aportación de los índices corpusculares del hemograma en sujetos con sospecha de α -T es el diagnóstico de presunción del número de genes alfa delecionados. En un estudio realizado en España se

observaron diferencias estadísticamente significativas tanto en VCM como en HCM entre aquellos individuos con 1, 2 y 3 genes deletados¹⁶. Los portadores de α^+ talasemia heterocigota presentaron VCM medio de 75 fl y HCM media de 26 pg, mientras que en aquellos con pérdida de 2 genes alfa los valores medios fueron 69-70 fl y 22-23 pg. Entre los grupos de α^0 talasemia heterocigota y α^+ talasemia homocigota (ambos con pérdida de 2 genes alfa) no se encontraron diferencias significativas. Estudios posteriores han confirmado estos hallazgos: hay más microcitosis e hipocromía en sujetos con pérdida de 2 genes alfa que en aquellos con pérdida de 1 solo gen¹⁷.

Aportación de la hematimetría al estudio de hemoglobinas estructurales

Las corrientes migratorias desde países con elevada prevalencia de hemoglobinopatías estructurales a países desarrollados han contribuido a la expansión de estas patologías por todo el mundo, por lo que los programas de cribado son cada vez más necesarios.

Debido a este aumento de prevalencia, los médicos (y especialmente los hematólogos) debemos ser capaces de identificar correctamente a los portadores de Hb variantes y de darles un consejo genético adecuado, con el fin de evitar en la medida de lo posible la aparición de homocigotos y dobles heterocigotos. Cuando no consigamos evitar su aparición, si al menos conseguimos que sean diagnosticados precozmente el tratamiento podría iniciarse antes y se podrían evitar o reducir las complicaciones clínicas a largo plazo de los homocigotos y dobles heterocigotos.

Portadores frente a sujetos sanos

En los pocos estudios que han comparado los parámetros del hemograma de portadores de Hb variante con controles sanos se ha observado que los portadores de hemoglobinopatía estructural presentan una leve microcitosis. Además de la coexistencia de α -talasemia en algunos de estos sujetos, parece existir un efecto del fenotipo de cadenas de globina de estos individuos en el VCM¹⁸.

Además de una muy leve microcitosis, también se han reportado CHCM ligeramente aumentadas en individuos HbAS, HbAC y HbAD en comparación con controles HbAA¹⁸. Los valores más altos de CHCM se observaron en HbAC, seguidos HbAD y HbAS, respectivamente¹⁸.

Todavía falta por definir bien el papel que podrían desempeñar tanto los parámetros clásicos del hemograma como los nuevos parámetros en el diagnóstico de presunción de portadores de defectos estructurales de la hemoglobina.

HbAS frente a HbAC

En nuestro medio, las 2 hemoglobinopatías estructurales más prevalentes son la hemoglobina S heterocigota (HbAS) y la hemoglobina C heterocigota (HbAC).

A pesar de que los parámetros clásicos del hemograma se han comparado en numerosos estudios entre homocigotos (HbSS, HbCC) y dobles heterocigotos (HbSC), apenas hay datos en la literatura sobre cuál de estos parámetros puede discriminar mejor entre HbAS y HbAC. Solo hay un estudio en el que ambas entidades se comparan entre sí, y el único parámetro que se evaluó fue el VCM¹⁹. En dicho estudio se observó un VCM ligeramente inferior en los individuos HbAC (84,2 fl vs. 86,2 fl), pero no se alcanzó significación estadística, y además ni el estudio de hierro ni la existencia de α -talasemia asociada fueron analizados, por lo que estos hallazgos no son concluyentes.

En cuanto a los nuevos parámetros, tras analizar 124 HbAS y 40 HbAC hemos observado diferencias significativas entre ambas entidades en %hiper (0,58% vs. 2,75% respectivamente, $p = 0,014$) y %hipo (5,7% vs. 1,7%, $p = 0,002$), pero en %macro y %micro no hubo diferencias significativas (datos aún no publicados). El área bajo la curva de %hiper para diferenciar entre HbAS y HbAC fue de 0,874, siendo el mejor punto de corte 0,95% (S = 80%, E = 79,8%) (datos aún no publicados).

Coexistencia de alftalasemia asociada

La asociación de la hemoglobinopatía S y α -T es muy frecuente, estando presente en aproximadamente de la mitad de los casos²⁰. Se ha demostrado que los sujetos que presentan esta asociación tienen un porcentaje de HbS inferior (< 35%), así como valores significativamente menores de VCM, HCM y CHCM que los individuos HbAS sin pérdida de genes alfa²⁰. Esto es debido a que la disminución de síntesis de cadenas alfa determina una menor probabilidad de que las cadenas β S de globina, que son menos negativas que las cadenas β A, se unan a las cadenas alfa y, por tanto, se formen menos dímeros α/β S que α/β A. Hallazgos similares se han descritos en individuos HbAC con α -T asociada, quienes presentan un porcentaje de HbC inferior (< 37%) y también menor VCM, HCM y CHCM²¹.

Conclusiones

- El hemograma es una herramienta sencilla, barata y de gran utilidad en el diagnóstico de presunción de hemoglobinopatías, aunque en ningún caso debe sustituir a otras técnicas diagnósticas.
- Los portadores de rasgo talasémico tienen más hematíes totales que los pacientes con ferropenia

y más microcitosis que hipocromía (al contrario que los hematíes en la anemia ferropénica, que son más hipocromos que microcíticos). Esta discriminación es sencilla gracias a patrones específicos en los eritogramas y a parámetros aislados (%micro, por ejemplo) o combinaciones de los mismos (cociente % micro/%hipo).

- Si un sujeto con alta sospecha de talasemia tiene un ADE elevado, muy probablemente tendrá una $\delta\beta$ -T (especialmente si el ADE es $\geq 17,35\%$), aunque la posibilidad de una β -T con HbF elevada también debe ser considerada.
- El ADE está fuertemente correlacionado con el porcentaje de HbF en portadores de β -T y $\delta\beta$ -T, de forma que será mayor cuanto más HbF tenga el sujeto.
- Los portadores de α -talasemia tendrán más microcitosis e hipocromía cuanto mayor sea el número de genes alfa delecionados.
- Aunque los portadores de hemoglobinopatía estructural parecen tener un VCM levemente inferior y una CHCM levemente superior a los individuos no portadores, el papel de los parámetros del hemograma en el cribado de estas patologías aún no está bien definido.
- Los sujetos HbAC tienen hematíes levemente más pequeños e hiperocrómicos que los HbAS, siendo %hiper el mejor parámetro para discriminar entre ambos tipos de hemoglobinopatía.
- La presencia de α -talasemia asociada se debe sospechar en los casos de HbAS y HbAC con microcitosis y porcentajes de Hb variante menores de lo esperado.

Bibliografía

1. Report of the review of NHS pathology services in England. An independent review for the Department of Health. London: Department of Health; 2006.
2. Briggs C. Quality counts: new parameters in blood cell counting. *Int J Lab Hem* 2009;31:277-97.
3. Huisman THJ. The structure and function of normal and abnormal haemoglobins. *Baillier Clin Haematol* 1993;6(1):1-30.
4. Hardison RC, Chui DH, Giardine B, et al. HbVar: A relational database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations at the globin gene server. *Hum Mutat* 2002;9(3):225-33.
5. Bunn HF, Forget BG. Hemoglobin: molecular, genetic and clinical aspects. Filadelfia: WB Saunders; 1986.
6. Modiano G, Morpurgo G, Terrenato L, et al. Protection against malaria morbidity: near fixation of the α thalassaemia gene in Nepalese population. *Am J Hum Genet* 1991;48:390-7.
7. Ryan K, Bain BJ, Worthington D, James J, Plews D, Mason A, et al; British Committee for Standards in Haematology. Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis. *Br J Haematol* 2010;149(1):35-49.
8. Urrechaga E. Red blood cell microcytosis and hypochromia in the differential diagnosis of iron deficiency and β -thalassaemia trait. *Int J Lab Hematol* 2009;31:528-34.
9. England JM, Bain BJ, Fraser PM. Differentiation of iron deficiency from thalassaemia trait. *Lancet* 1973;1:1514.
10. Mentzer WC Jr. Differentiation of iron deficiency from thalassaemia trait. *Lancet* 1973;1:882.
11. Urrechaga E. Discriminant value of % microcytic/% hypochromic ratio in the differential diagnosis of microcytic anemia. *Clin Chem Lab Med* 2008;46(12):1752-8.
12. Eldibany MM, Totonchi KE, Joseph NJ, Rhone D. Usefulness of certain red blood cell indices in diagnosing and differentiating thalassaemia trait from iron-deficiency anemia. *Am J Clin Pathol* 1999;111(5):676-82.
13. Urrechaga E, Aguirre U, Izquierdo S. Multivariable discriminant analysis for the differential diagnosis of microcytic anemia. *Anemia* 2013;2013:457834.
14. Juncá Piera J, Farré Guerrero V, Gaspar CR, et al. Hematometric values in δ - β thalassaemia minor: special importance of the erythrocyte distribution in comparison with β thalassaemia and iron deficiency [in Spanish]. *Sangre (Barc)* 1990;35:134-6.
15. Velasco-Rodríguez D, Alonso-Domínguez JM, González-Fernández FA, et al. Delta-Beta Thalassaemia Trait: How can we discriminate it from Beta Thalassaemia Trait and Iron Deficiency Anemia? *Am J Clin Pathol* 2014;142(4):567-73.
16. Villegas A, Porres A, Sánchez J, et al. Red blood cell phenotypes in alpha-thalassems in the Spanish population. *Haematologica* 1998;83(2):99-103.
17. Akhavan-Niaki H, Youssefi Kamangari R, Banihashemi A, et al. Hematologic features of alpha thalassaemia carriers. *Int J Mol Cell Med* 2012;1(3):162-7.
18. Hinchliffe RF, Norcliffe D, Farrar LM, et al. Mean cell haemoglobin concentration in subjects with haemoglobin C, D, E and S traits. *Clin Lab Haematol* 1996;18(4):245-8.
19. Sheehan RG, Frenkel EP. Influence of hemoglobin phenotype on the mean erythrocyte volume. *Acta Haematol* 1983;69(4):260-5.
20. Atáulfo González F, Blázquez C, Ropero P, et al. Association of hemoglobinopathy and alpha thalassaemia. Study of 45 patients. *Med Clin (Barc)* 2005;124(19):726-9.
21. Couto FD, De Albuquerque AB, Adorno EV, et al. Alpha-Thalassaemia 2, 3.7 kb deletion and hemoglobin AC heterozygosity in pregnancy: a molecular and hematological analysis. *Clin Lab Haematol* 2003;25(1):29-34.

Estudio de hipercoagulabilidad en el Laboratorio General de Hematología

J. RODRÍGUEZ MARTORELL

UGC Intercentros de Hematología y Hemoterapia. Hospital Universitario Virgen del Rocío-Virgen Macarena. Sevilla

Introducción

La hemostasia es un proceso complejo integrado en el que intervienen múltiples sistemas proteicos que se ensamblan sobre la superficie de algunas células sanguíneas (plaquetas, monocitos) y son regulados por la interacción con la superficie endovascular de las células endoteliales. Este complejo proceso biológico es conocido como “modelo celular de la hemostasia”¹ y define un sistema que se mantiene en equilibrio dinámico para mantener la integridad del sistema circulatorio, así como para mantener la sangre en estado líquido para que pueda cumplir con sus múltiples funciones. La ruptura de este equilibrio en una u otra dirección va a causar la aparición de complicaciones hemorrágicas o trombóticas (Figura 1).

La patogenia de la trombosis ya fue descrita por Virchow a finales del siglo XIX y se basa en la acción conjunta de tres pilares (conocidos como “la tríada de Virchow”): la estasis sanguínea, la lesión de la pared vascular y las alteraciones en la composición de la sangre que hacen que esta tenga una mayor capacidad procoagulante. Este último componente de la tríada es lo que fue definido por Schafer en 1985 como “estados de hipercoagulabilidad”² y consiste en “situaciones de alteración o desequilibrio del sistema hemostático, congénitas o adquiridas, que condicionan una tendencia trombótica superior a la de sujetos normales en las situaciones de riesgo o incluso de manera espontánea”. Algunas de estas situaciones son cambios en múltiples componentes de la hemostasia como consecuencia de una enfermedad subyacente (neoplasias, enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome nefrótico, neoplasias mieloproliferativas, hemoglobinuria paroxística nocturna, drepanocitosis, etc). Sin embargo, el descubrimiento en 1965 del déficit de antitrombina³ puso de manifiesto que alteraciones moleculares únicas podían favorecer una mayor incidencia de complicaciones tromboembólicas. Estas situaciones de predisposición “primaria” a la trombosis constituyen las trombofilias.

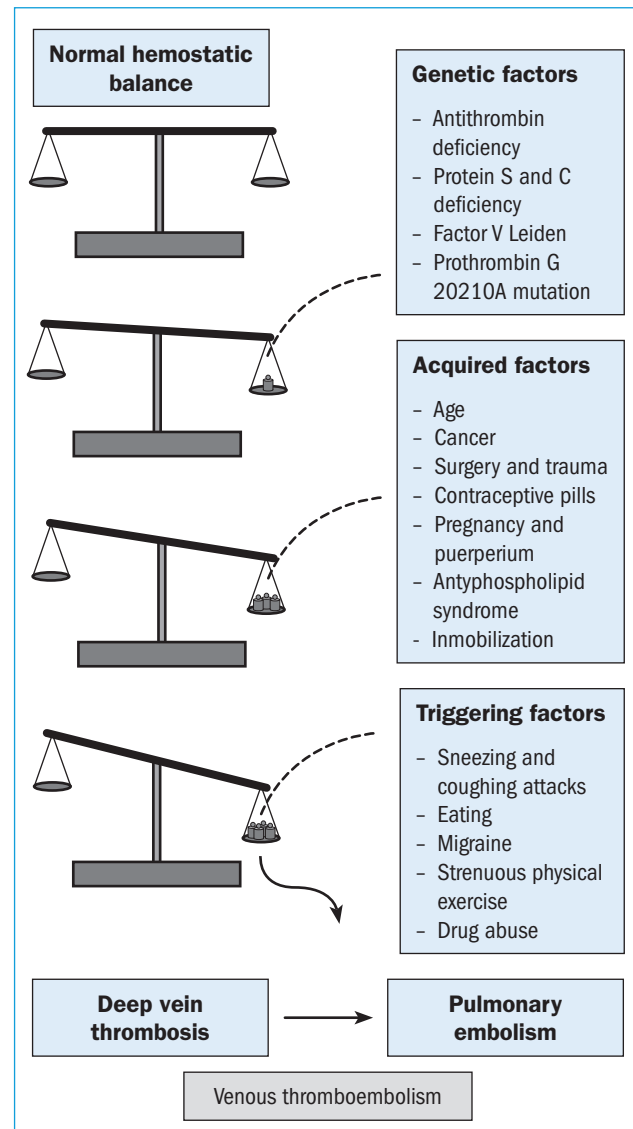


Figura 1. Acción de factores genéticos predisponentes, ambientales y desencadenantes en la ruptura del equilibrio hemostático y la génesis de la ETEV (tomada de: Lippi G. Thrombophilia testing. Useful or hype? Clin Chem Lab Med 2014;52:467-9).

Estudio biológico de trombofilia

El estudio biológico de trombofilia es una cuestión claramente no resuelta en la actualidad. Solo en un 40-50% de las situaciones clínicas sugestivas de una posible trombofilia subyacente, según los criterios recomendados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) en 1996⁴, se va a encontrar una alteración biológica de las actualmente reconocidas como patogénicas para el desarrollo de trombosis. Esto hace presuponer que hay otras múltiples posibles alteraciones aún no identificadas y que afectarían a proteínas que no están presentes en el plasma o, incluso, a genes reguladores o moduladores que no codifican directamente para proteínas implicadas en la hemostasia, lo que complicaría enormemente su investigación y su posible abordaje diagnóstico. Por otra parte, el “estudio biológico de trombofilia” es una determinación compleja y costosa, ya que requiere realizar múltiples pruebas analíticas con reactivos y equipamientos caros, lo que está llevando en los últimos años a diferentes expertos y sociedades científicas a evaluar cuál es la verdadera utilidad y eficiencia del mismo⁵⁻⁹, con posturas tanto a favor¹⁰ como en contra¹¹ de su realización por parte de expertos de prestigio.

Un punto en el que, en la actualidad, coinciden todas las guías y expertos es que no está justificada la realización indiscriminada de estudios de trombofilia, ya que no solo no es coste-efectivo, sino que puede causar más daños (ansiedad, estrés psicológico, sensación de culpabilidad, profilaxis innecesarias en caso de diagnósticos erróneos, etc.) que beneficios cuando se realiza en población general^{7,11,12}. Incluso la Sociedad Americana de Hematología (ASH) ha puesto en marcha una campaña institucional para señalar cinco situa-

ciones diagnóstico-terapéuticas no justificadas¹³, entre las que se encontraría la realización de un estudio de trombofilia en pacientes con un evento tromboembólico venoso (ETE) tras un factor de riesgo transitorio (cirugía, traumatismo o inmovilización). Lo que, a día de hoy, debe estar claro es que el estudio de trombofilia es solo efectivo para aquellos pacientes que se vayan a beneficiar de una profilaxis dirigida o de un manejo diferente (anticoagulación prolongada, contraindicación de anticonceptivos hormonales, etc.) en situaciones clínicas o ambientales concretas¹².

Selección de pacientes: ¿a quién testar?

No existe acuerdo entre las diferentes guías, sociedades y expertos sobre a quién se le debería realizar un estudio de trombofilia. Sí coinciden en señalar que no se debe realizar en pacientes no seleccionados en los que carece de valor clínico⁵⁻⁷ y, como ya hemos referido, incluso la ASH no recomienda su realización en pacientes con un ETE tras un factor de riesgo transitorio¹³.

Sin embargo, existen tres razones legítimas para considerar el estudio de trombofilia en la práctica clínica en un paciente que ha tenido un evento trombótico¹⁴⁻¹⁵:

- El paciente desea comprender por qué ha sufrido una trombosis.
- Predecir el riesgo de recurrencia que pueda influir en la duración del tratamiento anticoagulante.
- Las implicaciones para los familiares portadores asintomáticos.

Un número relevante de situaciones de trombofilia puede contribuir a la aparición de un primer ETE (Tabla 1), pero el objetivo del estudio debería ser detectar una trombofilia “fuerte”, que tenga un impacto en

Tabla 1. Riesgo de un primer ETEV y de recurrencia tras un primer evento de las diferentes trombofilias congénitas (adaptada de Moll S. *Thrombophilia: Clinical-practical aspects. J Thromb Thrombolysis* 2015;39:367-78)

Trombofilia	RR de un primer ETEV	RR de recurrencia tras un primer ETEV
Sin trombofilia	1	1
FV Leiden heterocigoto	4,9 (IC-95%: 4,1-5,9)	1,56 (IC-95%: 1,42-2,12)
F2-G202110A heterocigoto	3,8 (IC-95%: 3,0-4,9)	1,45 (IC-95%: 0,96-2,21)
FV Leiden homocigoto	18,0 (IC-95%: 4,1-41,0)	1,2 (IC-95%: 0,50-2,26) a 4,81 (IC-95%: 0,50-46,3)
F2-G202110A homocigoto	Datos insuficientes	Datos insuficientes
Doble heterocigoto (FVL+ F2-G202110A)	20,0 (IC-95%: 11,1-36,1)	1,0 (IC-95%: 0,60-1,90) a 4,81 (IC-95%: 0,50-46,3)
Déficit de antitrombina	28,2 (IC-95%: 13,5-58,6)	Aumentado, pero datos insuficientes
Déficit de proteína C	24,1 (IC-95%: 13,7-42,4)	Aumentado, pero datos insuficientes
Déficit de proteína S	30,6 (IC-95%: 26,9-55,3)	Aumentado, pero datos insuficientes
Ac. antifosfolípido	Aumentado, pero datos insuficientes	Aumentado, pero datos insuficientes (1,41-2,83)

el riesgo de recurrencia y, así, en la decisión de la duración de la anticoagulación, o bien, que recomiende la profilaxis primaria en los familiares detectados como portadores asintomáticos. En este sentido, se pueden considerar “trombofilias fuertes” los déficit de anticoagulantes naturales (antitrombina, proteína C, proteína S), los sujetos homocigotos o dobles heterocigotos para las mutaciones factor V Leiden y/o G20210A del gen de la protrombina y la presencia de anticuerpos antifosfolípido a título moderado-alto persistentes¹⁴.

La dificultad radica en seleccionar en qué pacientes con un ETEV previo podría modificar la duración de la anticoagulación la detección de una trombofilia subyacente (Figura 2). Así, los pacientes en que dicho evento ha sido desencadenado por un factor de riesgo transitorio mayor (cirugía mayor, inmovilización, traumatismo) solo deberían ser anticoagulados durante 3 meses y la detección de una trombofilia no modificaría la actitud¹³. Por otra parte, los pacientes con un ETEV espontáneo, sobre todos los varones, tienen un alto riesgo de recurrencia, por lo que se suele recomendar la anticoagulación a largo plazo, sobre todo si el paciente la tolera bien y la encuentra aceptable, por lo que aquí tampoco la detección de una trombofilia es de ayuda en su manejo. El estudio de trombofilia sí podría ser útil en un paciente con un ETEV espontáneo pero que tiene un alto riesgo hemorrágico, o bien que no acepta la anticoagulación a largo plazo, o en los pacientes en que el

ETEV se asoció a un factor de riesgo transitorio menor (anticonceptivos, terapia hormonal sustitutiva, cirugía menor, inmovilización corta), ya que, si se encuentra una trombofilia “fuerte” sería un argumento para proponer la anticoagulación a largo plazo por el mayor riesgo de recurrencia¹⁴.

En cuanto a realizar el estudio de los familiares en primer grado asintomáticos, aunque la presencia de una trombofilia aumenta el riesgo de ETEV ante circunstancias concurrentes (cirugía, inmovilización, anticonceptivos), se debería individualizar en cada caso el impacto que la detección de una trombofilia subyacente tendría sobre las recomendaciones médicas que se ofrecerían¹⁴. Una aproximación de su utilidad se recoge en la Tabla 2.

Respecto a la trombosis arterial, las trombofilias juegan un papel menos importante, ya que la arteriosclerosis es la causa predominante. La excepción es el síndrome antifosfolípido y, hoy día, se debate el papel que pueda tener un déficit de los anticoagulantes naturales en su génesis ante los resultados de un amplio estudio familiar que sugiere una asociación del déficit de proteína C o proteína S con las mismas¹⁶. Sin embargo, la baja prevalencia de estos déficit hace difícil un estudio prospectivo que lo aclare.

Por último una razón esgrimida es su impacto en las mujeres en edad reproductiva⁸. La presencia de una trombofilia aumenta el riesgo de ETEV en la gestación, tanto en el periodo antenatal como en el puerperio, así como durante las técnicas de reproducción asistida, por lo que deberían usarse medidas de profilaxis antitrombótica según las guías actuales¹⁷. Mucho más controvertido es el papel que las trombofilias puedan tener en los abortos recurrentes, los tardíos o en las complicaciones vasculares placentarias (preeclampsia, síndrome CIR, desprendimiento de placenta), o si la profilaxis antitrombótica podría ser beneficiosa en estos cuadros¹⁸.

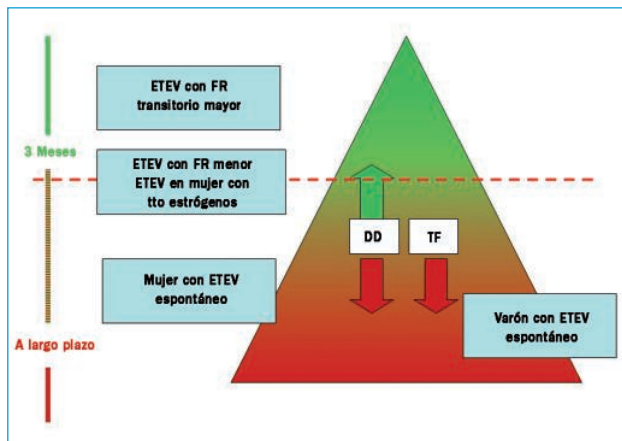


Figura 2. Triángulo de la recurrencia de la ETEV (adaptada de Moll S. Thrombophilia: clinical-practical aspects. *J Thromb Thrombolysis* 2015;39:367-78). Los ETEV espontáneos tienen un alto riesgo de recurrencia y los pacientes que los sufren deben ser anticoagulados a largo plazo. Los pacientes con ETEV tras factores de riesgo transitorios fuertes solo deberían ser anticoagulados durante 3 meses, porque el riesgo de recurrencia es muy bajo. En los pacientes con ETEV tras factores de riesgo débiles (cirugía menor, anticonceptivos, etc.) el riesgo de recurrencia es intermedio y la duración de la anticoagulación se puede ver modificada por la detección o no de una trombofilia fuerte.

Selección de pruebas: qué test realizar y cuándo

Los test diagnósticos de trombofilia deberían cumplir los siguientes requisitos:

- Aportar información sobre la etiología del evento.
- Influir sobre la conducta terapéutica.
- Influir sobre futuras situaciones de riesgo del paciente y/o sus familiares.

Por ello, debería incluir aquellas pruebas que, desde el punto de vista epidemiológico, sean frecuentes y relevantes para la toma de decisiones clínicas. Las pruebas habitualmente recomendadas se recogen en la Tabla 3.

Respecto al momento oportuno para su realización, todas las guías^{5-7,14} coinciden en hacerlo fuera del momento agudo para evitar artefactos (falsos positivos, sobre

Tabla 2. Utilidad del estudio de familiares asintomáticos en las diferentes trombofilias congénitas (adaptada de Moll S. *Thrombophilia: Clinical-practical aspects. J Thromb Thrombolysis* 2015;39:367-78)

Tipo de trombofilia	Hijos (varones)	Hermanos (varones)	Hijas (mujeres)	Hermanas (mujeres)
Heterocigoto factor V Leiden o F2-G20210A	No	No	No	No
Homocigoto factor V Leiden o F2-G20210A	No	Razonable	No	Sí
Doble heterocigoto factor V Leiden y F2-G20210A	Razonable	Razonable	Sí	Sí
Déficit de AT, PC o PS	Razonable	Razonable	Sí	Sí

Factor V Leiden: mutación factor V Leiden; F2-G20210A: mutación G20210A del gen de la protrombina; AT: antitrombina; PC: proteína C; PS: proteína S.

No: se sugiere no hacer porque no modificará la actitud a seguir.

Razonable: se puede considerar ofrecer el test, porque en los positivos se recomendaría profilaxis de ETEV en situaciones de bajo riesgo (cirugía menor, viajes prolongados, inmovilizaciones ortopédicas) o profilaxis prolongada tras cirugía mayor.

Sí: se debe recomendar el test, porque un positivo desaconsejará el uso de anticonceptivos hormonales o terapia hormonal y recomendará el uso de profilaxis de ETEV en la gestación (antenatal y puerperal).

Tabla 3. Pruebas recomendadas en el estudio de trombofilia en función de su prevalencia y su repercusión en la toma de decisiones terapéuticas (tomada de Moll S. *Thrombophilia: Clinical-practical aspects. J Thromb Thrombolysis* 2015;39:367-78)

Pruebas que realizar en el estudio de trombofilia

- Mutación del factor V Leiden
- Mutación G20210A del gen de la protrombina
- Proteína C funcional
- Proteína S funcional y antigénica libre
- Antitrombina funcional
- Anticuerpos antifosfolípido:
 - Anticoagulante lúpico
 - Anticuerpos anticardiolipina isotipos IgG e IgM
 - Anticuerpos anti- β 2-glicoproteína-I isotipos IgG e IgM
- En grupos seleccionados de pacientes:
 - Detección de HPN mediante citometría de flujo si citopenias o trombosis del área esplácnica
 - Mutación JAK2-V617F si alteraciones del hemograma sugestivas de neoplasia mieloproliferativa o trombosis del área esplácnica
 - Homocisteína en paciente joven con trombosis arterial o venosa inexplicada

todo falsos déficit de anticoagulantes naturales). Habitualmente se recomienda administrar anticoagulación al paciente durante 3 meses y, transcurrido este periodo, suspender la anticoagulación y realizar 4 semanas más tarde el estudio convencional de trombofilia junto a un control de dímeros-D¹⁴. Si el resultado de alguno de estos test modifica el riesgo de recurrencia percibido se reiniciaría la anticoagulación “a largo plazo”. El uso de HBPM desde la suspensión de la anticoagulación oral y hasta disponer de los mismos es controvertido y, si se realiza, algunos autores recomiendan suspenderla 48 horas antes de la extracción analítica para asegurar la no interferencia en algunas de las pruebas¹⁴.

A la hora de interpretar los resultados se deberían tener en cuenta las posibles causas de déficit adquiridos

de anticoagulantes naturales (hepatopatía crónica, síndrome nefrótico, enteropatías pierde-proteínas, colagenosis o enfermedades inflamatorias crónicas) y siempre se debe estar seguro de excluir la posible interferencia de fármacos anticoagulantes que artefacten los mismos (Tabla 4).

De cara al futuro, y dado el carácter de enfermedad compleja de la ETEV¹⁹, en la que interactúan múltiples factores de predisposición genética con múltiples situaciones ambientales desencadenantes, se está proponiendo el uso de chips de ADN genómico que permitan evaluar múltiples polimorfismos genéticos y calcular probabilidades de riesgo²⁰. Estos métodos podrían simplificar el estudio genético de la trombofilia hereditaria y podrían ser más coste-efectivos²¹ que la determinación de múltiples polimorfismos de manera aislada por los métodos convencionales (PCR en tiempo real o métodos equivalentes).

Conclusiones

Las situaciones de trombofilia son relativamente frecuentes, pero las indicaciones eficientes de su estudio están lejos de estar aceptadas de forma unánime. No se recomienda su realización de manera indiscriminada, sino que se deben seleccionar los candidatos en función de que les aporte beneficio clínico a ellos o a sus familiares. Es muy importante realizarlo fuera de la fase aguda y asegurarse de que el paciente no recibe fármacos anticoagulantes para evitar falsos positivos que puedan causar diagnósticos erróneos. Por último, se están introduciendo nuevos métodos genómicos que podrían simplificar y abaratar los estudios en este campo en un futuro cercano.

Agradecimientos

Al Dr. José Manuel Soria de la Unitat de Genòmica de Malalties Complexes del Hospital Santa Creu i Sant Pau de Barcelona, por la revisión crítica del manuscrito y sus aportaciones.

Tabla 4. Influencia del evento trombotico agudo y de los diferentes anticoagulantes en los resultados de las pruebas del estudio de trombofilia (adaptada de Moll S. Thrombophilia: Clinical-practical aspects. *J Thromb Thrombolysis* 2015;39:367-78)

Test	TA	HNF	HBPM	AVK	AOD
F V Leiden	Seguro	Seguro	Seguro	Seguro	Seguro
RPCa	Seguro ¹	???? ⁴	???? ⁴	Seguro ¹	Inseguro ⁶
F2-G20210A	Seguro	Seguro	Seguro	Seguro	Seguro
PC-func	???? ²	Seguro	Seguro	Falso bajo	Falso alto ⁷
PC-Ag	???? ²	Seguro	Seguro	Falso bajo	Seguro
PS-func	Puede bajo	Seguro	Seguro	Falso bajo	Falso alto ⁷
PS-Ag	Puede bajo	Seguro	Seguro	Falso bajo	Seguro
AT-func	Puede bajo	Puede bajo	Puede bajo	Seguro-alto	Falso alto ⁸
AL	Fiable ³	???? ⁵	???? ⁵	???? ⁵	Falso positivo
ACA	Fiable ³	Seguro	Seguro	Seguro	Seguro
Anti-β2	Fiable ³	Seguro	Seguro	Seguro	Seguro
Hcy	Seguro	Seguro	Seguro	Seguro	Seguro

TA: trombosis aguda; F V Leiden: mutación factor V Leiden; RPCa: test de resistencia a la proteína C activada; F2-G20210A: mutación G20210A del gen de la protrombina; PC-func: proteína C funcional; PC-Ag: proteína C antigénica; PS-func: proteína S funcional; PS-Ag: proteína S antigénica; AT-func: antitrombina funcional; AL: anticoagulante lúpico; ACA: anticuerpos anticardiolipina; Anti-β2: anticuerpos anti-β2-glicoproteína-I; Hcy: homocisteína.

¹Seguro si el test es realizado prediluido en plasma deficiente en factor V.

²Posiblemente seguro, pero hay pocos datos en la literatura.

³A veces hay elevaciones transitorias que después desaparecen.

⁴Dependiendo del método utilizado puede ofrecer datos seguros o no.

⁵Algunos test incluyen sustancias neutralizantes de HNF y HBPM en el reactivo. Debe consultarse con el laboratorio.

⁶Puede originar falsos negativos (falsos valores normales del test).

⁷Puede originar falsos negativos (valores normales de PC o de PS en pacientes con déficit de los mismos).

⁸El efecto de los anti-IIa o los anti-Xa sobreestima la medida funcional de la antitrombina.

Bibliografía

- Hoffman M, Monroe DM 3rd. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost* 2001;85:958-65.
- Schafer AI. The hypercoagulable states. *Ann Intern Med* 1985;102:814-28.
- Egeberg O. Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrhag* 1965;116:754-61.
- Inherited thrombophilia: Memorandum from a joint WHO/International Society on Thrombosis and Haemostasis meeting. *WHO bulletin* 1997;75:177-89.
- Baglin T, Gray E, Greaves M, Hunt BJ, Keeling D, Machin S, et al. Clinical guidelines for testing for heritable thrombophilia. *Br J Haematol* 2010;149:209-20.
- Middeldorp S. Evidence-based approach to thrombophilia testing. *J Thromb Thrombolysis* 2011;31:275-81.
- NICE clinical guideline 144. Venous thromboembolic diseases: the management of venous thromboembolic diseases and the role of thrombophilia testing. June 2012. Disponible en: www.guidance.nice.org.uk/cg144/djhd
- Piazza G. Thrombophilia testing, recurrent thrombosis, and women's health. *Circulation* 2014;130:283-7.
- Kyrle PA. Venous thrombosis: who should be screened for thrombophilia in 2014? *Pol Arch Med Wewn* 2014;124:65-9.
- Franchini M. The utility of thrombophilia testing. *Clin Chem Lab Med* 2014;52:495-7.
- Favaloro EJ. The futility of thrombophilia testing. *Clin Chem Lab Med* 2014;52:499-503.
- Lippi G. Thrombophilia testing. Useful or hype? *Clin Chem Lab Med* 2014;52:467-9.
- Hicks LK, Bering H, Carson KR, Kleinerman J, Kukreti V, Ma A, et al. The ASH Choosing Wisely® campaign: five hematologic tests and treatments to question. *Blood* 2013;122:3879-83.
- Moll S. Thrombophilia: clinical-practical aspects. *J Thromb Thrombolysis* 2015;39:367-78.
- De Stefano V, Rossi E. Testing for inherited thrombophilia and consequences for antithrombotic prophylaxis in patients with venous thromboembolism and their relatives. A review of the Guidelines from Scientific Societies and Working Groups. *Thromb Haemost* 2013;110:697-705.
- Mahmoodi BK, Brouwer JLP, Veeger NJGM, van der Meer J. Hereditary deficiency of protein C or protein S confer increased risk of arterial thromboembolic events at a young age. Results from a large family cohort study. *Circulation* 2008;118:1659-67.
- ACOG Practice Bulletin N° 138: inherited thrombophilias in pregnancy. *Obstet Gynecol* 2013;122:706-17.
- Middeldorp S. Anticoagulation in pregnancy complications. *Hematology* 2014. American Society of Hematology Education Program. pp. 393-399.
- Van Boven HH, Vandenbroucke EB, Rosendaal FR. Gene-gene and gene-environment interactions determine risk of thrombosis in families with inherited antithrombin deficiency. *Blood* 1999;94:2590-4.
- Soria JM, Morange PE, Vila J, Souto JC, Moyano M, Trégouët DA, et al. Multilocus genetic risk scores for venous thromboembolism risk assessment. *J Am Heart Assoc* 2014; 3:e001060 doi: 10.1161/JAHA.114.001060
- Rubio-Terrés C, Soria JM, Morange PE, Souto JC, Suchon P, Mateo J, et al. Economic analysis of Thrombo inCode, a clinical-genetic function for assessing the risk of venous thromboembolism. *Appl Health Econ Health Policy* 2015;13:233-42.

Rastreo diagnóstico de poblaciones clonales por citometría de flujo: distinción entre clonalidad y malignidad

A. ORFAO, A. LÓPEZ, I. CRIADO, E. BLANCO, S. BARRENA, L. SANTOJA, J. FLORES-MONTERO, J. CIUDAD, N. PUIG, B. VIDRIALES, M. PÉREZ-ANDRÉS, A. RODRÍGUEZ-CABALLERO, M.V. MATEOS, R. GARCÍA-SANZ, M. GONZÁLEZ, J. ALMEIDA

Departamento de Medicina. Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC-CSIC/USAL), Instituto Biosanitario de Salamanca (IBSAL). Salamanca. Servicio de Citometría-NUCLEUS. Universidad de Salamanca. Salamanca. Servicio de Hematología. Hospital Universitario de Salamanca. Salamanca

Concepto de clonalidad frente a malignidad

La identificación de clonalidad de poblaciones celulares que se sospecha están alteradas se ha considerado clásicamente como una estrategia clave para el diagnóstico de hemopatías malignas, siendo especialmente útil en el rastreo diagnóstico de neoplasias linfoides¹. No obstante, hoy sabemos que el concepto de clonalidad y malignidad, aunque con frecuencia coincidentes, están lejos de ser sinónimos. Así, la “clonalidad” es un concepto fundamentalmente biológico que hace referencia a un grupo de células derivadas de una misma célula con la que comparten, además de un origen común, otras características, pudiendo asociarse la presencia de células clonales con comportamientos clínicos muy heterogéneos (por ejemplo, benigno e indolente vs. maligno)¹. Por el contrario, el concepto de malignidad en hematología es un concepto estrictamente clínico, aunque con base biológica; en este sentido, el concepto de malignidad está habitualmente asociado a la expansión de uno (monoclonalidad) o más (multiclonalidad) clones de células tumorales relacionadas (ontogénicamente) entre ellas y que muestran un comportamiento clínicamente agresivo, que podría llegar a poner en riesgo la vida del individuo si no se adoptan las medidas terapéuticas adecuadas¹. Dado que el concepto de clonalidad está casi siempre subyacente al de malignidad, hoy por hoy la identificación de clonalidad sigue siendo un paso clave en el rastreo diagnóstico de hemopatías clonales, incluyendo las hemopatías malignas¹.

Marcadores de clonalidad

Desde el punto de vista práctico, la demostración de la naturaleza clonal de una población celular suele basarse, en último término, en la comprobación de la presencia de marcadores genéticos/moleculares compartidos entre todas las células de esa población celular. Así, en las expansiones clonales de células T y B, ya sean precursores de linfocitos, linfocitos maduros o células efectoras terminalmente diferenciadas (por ejemplo células plasmáticas), las células clonales suelen compartir un

reordenamiento idéntico de los genes del receptor de célula T (por ejemplo *TCRG* y/o *TCRB*) y de las inmunoglobulinas (por ejemplo *IGH*), respectivamente². Ello presupone también que, en caso de reordenamientos funcionales, las células clonales compartan la expresión de proteínas del receptor de célula T (TCR) y B (BCR) que habrían seleccionado y expresado segmentos V(D) J del receptor antigénico idénticos². En este sentido, la demostración de clonalidad podría llevarse a cabo también desde el punto de vista fenotípico mediante la demostración de un uso restringido por parte de las células clonales de un receptor de una familia concreta de TCRV β , TCRV γ /TCRV δ (3, 4, 5) o de un isotipo de cadena pesada (IgM y/o IgD, o IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IGA2 o IgE) y de cadena ligera (κ o λ) de las inmunoglobulinas (Ig) (Figura 1)⁶. En otras células,

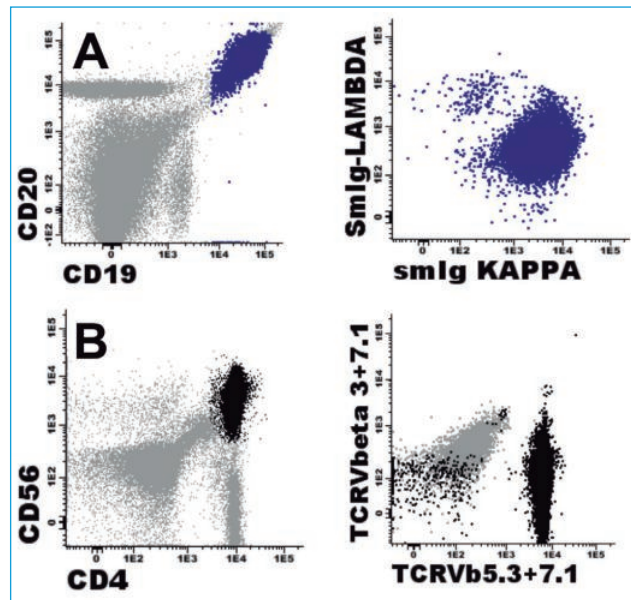


Figura 2. Identificación de poblaciones clonales de células B (A) y T (B) con uso restringido de cadena ligera de las inmunoglobulinas o de TCRV β , respectivamente, asociado a un fenotipo aberrante.

en las que no ocurre reordenamiento de los genes *TCR* y/o *IG*, la demostración de clonalidad se realiza habitualmente mediante la demostración de la presencia de alteraciones genéticas primarias (del inglés *driver*) compartidas entre todas las células tumorales y, en su ausencia, mediante test diversos en los que se analiza, por ejemplo, la existencia o no de un patrón común de inactivación del cromosoma X en mujeres⁷. Si consideramos que detrás de todas (o casi todas) las hemopatías clonales existe una alteración genética, aunque esta permanezca sin ser identificada, es de suponer que habitualmente esta alteración conllevaría otra de los patrones normales de expresión de proteínas, es decir, a perfiles de expresión proteica e inmunofenotipos alterados/aberrantes, detectables en el ámbito de células individuales mediante citometría de flujo⁸. A su vez, la presencia de alteraciones citogenéticas secundarias suele ocurrir únicamente en una parte de todas las células del clon, originando la formación de subclones que pueden ser clínicamente silentes o conllevar un comportamiento clínico distinto (por ejemplo, progresión de la enfermedad), asociado también a cambios fenotípicos⁸.

Rastreo diagnóstico de clonalidad por citometría de flujo

La expresión restringida de isotipos de cadena pesada y ligera de Ig o de familias *TCRVβ/α*, *TCRVγ/δ* en determinada población celular, constituye un marcador indirecto de clonalidad cuya evaluación por citometría de flujo multiparamétrica resulta muy útil en el rastreo diagnóstico de hemopatías malignas que afectan a los compartimentos de células linfoides maduras³⁻⁶. En este sentido, el éxito del empleo 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 de sangre periférica (SP), médula ósea (MO)⁹ y tejido linfóide¹⁰ u otros líquidos corporales como el líquido cefalorraquídeo (LCR)^{11,12}. Además, cuando la detección de fenotipos aberrantes se utiliza como marcador indirecto de clonalidad, la utilidad diagnóstica de la citometría de flujo multiparamétrica se amplía a un espectro aún más amplio de hemopatías linfoides y mieloides, incluidas las leucemias agudas linfoblásticas y mieloblásticas¹³, la hemoglobinuria paroxística nocturna¹⁴, los síndromes mielodisplásicos¹⁵ y algunos subtipos concretos de enfermedades mieloproliferativas como las mastocitosis sistémicas o la leucemia mieloide crónica¹⁶, entre otras hemopatías. A continuación revisaremos los aspectos más relevantes del diagnóstico de clonalidad en los SLPC-B, T y NK, haciendo especial hincapié en su relación con el comportamiento clínico (indolente vs. maligno) de la enfermedad.

Rastreo de clonalidad B por citometría de flujo en el diagnóstico de SLPC

Clásicamente, las técnicas de inmunofenotipado por citometría de flujo han demostrado ser de gran utilidad en el rastreo diagnóstico de clonalidad B⁹⁻¹². Así, durante años el diagnóstico inmunofenotípico de clonalidad B ha estado basado 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) $\kappa+$ o $\text{Ig-}\lambda+$ (cociente entre células B $\kappa+$ y $\lambda+$ alterado: $< 0,3$ o > 3 , por ejemplo)⁹. 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 > 4 fluorescencias diferentes, han permitido la identificación de aberraciones fenotípicas en la práctica totalidad de los SLPC-B, modificando las estrategias empleadas para la identificación de clonalidad B¹⁷. Con ello, el fenotipado por citometría de flujo multiparamétrica se ha convertido en una técnica fundamental en el rastreo diagnóstico de este grupo de hemopatías^{9,12,17}. Además, en el proceso de rastreo diagnóstico de clonalidad B, la inclusión de marcadores dirigidos a identificar las aberraciones fenotípicas más frecuentes en los SLPC-B más habituales permite alcanzar una gran sensibilidad, situándose en la rutina diagnóstica en niveles de 10^{-4} - 10^{-5} ¹⁸. Este incremento de la sensibilidad de los estudios inmunofenotípicos ha ido asociada a un notable aumento de la tasa de infiltración de SP, MO y LCR observada en los linfomas no Hodgkin^{10-12,18}; en paralelo, mediante esta aproximación también se ha demostrado la presencia de linfocitosis B monoclonal (MBL), sobre todo de tipo leucemia linfática crónica (LLC), en un elevado porcentaje ($> 10\%$) de los adultos sanos mayores de 40 años¹⁸. Pese a que la LLC y la MBL de tipo LLC comparten características fenotípicas y genéticas comunes, el hallazgo de una MBL tipo LLC en sujetos aparentemente sanos no parece que tenga un significado clínico relevante, al menos a medio plazo¹⁸. Por el contrario, los pequeños clones de células B de tipo MBL con un fenotipo característico de otros SLPC-B diferentes de la LLC, como la tricoleucemia o el linfoma del manto, aunque suelen mostrar un comportamiento indolente, terminan progresando a un SLPC-B clínicamente manifiesto^{12, Almeida et al.}

Merece destacar el hecho de que, debido a la elevada sensibilidad de la citometría de flujo multiparamétrica, es relativamente frecuente (aproximadamente 5% de los casos) detectar multiclonalidad (presencia de 2 o más clones diferentes de células B no relacionados en un mismo paciente), alcanzando su frecuencia en algunos subtipos de SLPC-B como la tricoleucemia, una proporción relativamente elevada (20%) de los casos^{18,19};

la verdadera repercusión clínica de estos hallazgos, está aún por dilucidar¹⁹.

Rastreo de clonalidad T por citometría de flujo en el diagnóstico de SLPC

Durante décadas hemos carecido de marcadores clonotípicos T similares a las cadenas ligeras de las Ig de las células B para la demostración fenotípica 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 aberrantes¹²; de ellos merece destacar: a) la ausencia o pérdida de expresión de 1 o más moléculas pan-T (por ejemplo, CD7 en células de Sezary); b) la sobreexpresión de un antígeno asociado a células T (por ejemplo, TCL1 en la leucemia prolinfocítica T), c) los asincronismos madurativos (coexpresión de 2 o más marcadores, ausentes en linfocitos T normales, como la expresión asincrónica de CD3 y TCR en la superficie celular); y d) la coexpresión de CD4 e CD8, la positividad para CD30 y CD279 o la ausencia de expresión de CD5 en una proporción importante de linfocitos T¹². Estos criterios, aunque útiles en la rutina, solo están presentes en cerca de 60-75% de los SLPC-T¹². 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 (por ejemplo, Southern blot) como el método de referencia para diagnóstico de clonalidad T.

Tal como ocurre con los linfocitos T maduros normales, las células neoplásicas de los SLPC-T expresan en su mayoría TCR $\alpha\beta$ o TCR $\gamma\delta$. 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, respectivamente³⁻⁵. Así, en el caso de las técnicas inmunofenotípicas, hoy disponemos de una amplia batería de anticuerpos dirigidos frente a gran parte de las distintas familias TCR β , TCR γ , TCR δ y en menor medida también, TCR α . Estudios recientes³⁻⁵ 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 del TCR (Figura 1). 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 normal²⁰, detectándose también multiclonalidad en una proporción significativa de estos casos. En tal caso, el diagnóstico diferencial requiere habitualmente de la identificación de aberraciones fenotípicas en el clon expandido, ya que en sujetos sanos pueden encontrarse expansiones de una o más familias del TCR, especialmente entre los linfocitos T efectores de individuos de edad avanzada, o en sujetos que padecen algunas enfermedades de naturaleza infecciosa, tumoral o autoinmune en las que existen expansiones oligoclonales T^{3,4}. No obstante lo anterior, en estos casos las expansiones TCRV β no suelen superar el 40% de las células T CD4+ y/o CD8+ de SP^{3,4}.

Aun 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 beta del TCR en más de 60% de las células T^{3,4}. Sin embargo, la observación de una expansión clonal T no está directamente asociada a malignidad. Un claro ejemplo de ello lo representan la expansiones monoclonales de linfocitos grandes granulares T CD4+ que, pese a alcanzar cifras elevadas en SP (> 15 x 10⁹ linfocitos/L), se ha demostrado que están asociadas a la expresión en las células T expandidas (mono)clonales de TCR específicos de péptidos de citomegalovirus (Figura 2), en ausencia de otras manifestaciones clínicas, o progresión a enfermedad clínicamente manifiesta²¹.

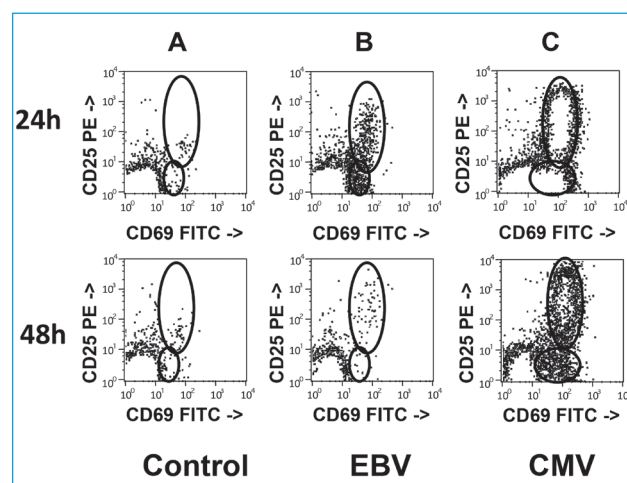


Figura 2. Expresión de marcadores de activación (CD69 y CD25) en la membrana de células T CD4+ (mono)clonales tras 24 y 48 horas en cultivo en ausencia de estímulo (panel A) frente a presencia de lisados de virus de Epstein-Barr (EBV; panel B) o citomegalovirus (hCMV; C).

Rastreo de clonalidad NK por citometría de flujo en el diagnóstico de SLPC-NK

A diferencia de lo que ocurre en pacientes que presentan expansiones de linfocitos T o B maduros, en aquellos sujetos que muestran aumento de células NK la demostración de clonalidad sigue resultando difícil, si exceptuamos una pequeña proporción de: a) pacientes en los que se detectan alteraciones citogenéticas omoleculares o b) se demuestra la integración clonal de secuencias genómicas de origen vírico, y c) las mujeres en las que se comprueba la existencia de un patrón clonal de inactivación del cromosoma X sobre células NK previamente purificadas⁷. No obstante, estudios recientes sugieren que tanto el patrón de expresión de receptores KIR (en especial de CD158a y CD58b) como la demostración de la existencia de perfiles fenotípicos aberrantes y/o poco habituales de las células NK (por ejemplo, coexpresión HLADR y CD94 intenso, expresión débil de CD7) podrían constituir marcadores indirectos de clonalidad NK^{12,22,23}. Sin embargo, ya en estos estudios preliminares se reconocen limitaciones en cuanto a la sensibilidad y la especificidad de ambas aproximaciones, en especial cuando la población clonal de células NK está presente sobre un fondo mayoritario de células NK policlonales residuales.

Bibliografía

- Gazzola A, Mannu C, Rossi M, Laginestra Ma, Sapienza Mr, Fuligni F, et al. The evolution of clonality testing in the diagnosis and monitoring of hematological malignancies. *Ther Adv Hematol* 2014;5:35-47.
- Langerak Aw, Groenen Pj, Bruggemann M, Beldjord K, Bellan C, Bonello L, et al. Euroclonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia* 2012;26:2159-71.
- Lima M, Almeida J, Santos AH, Teixeira MA, Alguero MC, Queiros ML, et al. Immunophenotypic analysis of TCR-Vbeta repertoire in 98 persistent expansions of CD3+/TCRalpha-beta+ large granular lymphocytes: utility in assessing clonality and insights into the pathogenesis of the disease. *Am J Pathol* 2001;159:1861-68.
- Langerak AW, van Den Beemd R, Wolvers-Tettero IL, Boor PP, van Lochem EG, Hoojikaas H, et al. Molecular and flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire for clonality assessment in mature TCRalpha-beta T-cell proliferations. *Blood* 2001;98:165-73.
- 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 TCR-gamma-delta+ T-cells. *Leukemia* 2006;20:505-13.
- 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. *Clin Cytometry* 2007;2B:S5-S13.
- 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;9:337-44.
- Orfao A, Schmitz G, Brando B, Ruiz-Arguelles A, Basso G, Braylan R, et al for the Standardization Committee on Clinical Flow Cytometry of the International Federation of Clinical Chemistry. Clinically useful information provided by the flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies: current status and future directions. *Clinical Chemistry* 1999;45:1708-17.
- Costa Es, Arroyo ME, Pedreira C, García-Marcos MA, Tabernero MD, Almeida J, Orfao A. 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;20:1221-30.
- Barrena S, Almeida J, García-Macías MC, López A, Rasillo A, Sayagués JM, et al. Flow cytometry immunophenotyping of fine-needle aspiration specimens: utility in the diagnosis and classification of non-Hodgkin lymphomas. *Histopathology* 2011;58:906-18.
- Quijano S, López A, Sancho JM, Panizo C, Deben G, Castilla C, et al. Identification of leptomeningeal disease in aggressive B-cell Non-Hodgkin lymphoma: improved sensitivity of flow cytometry. *Journal of Clinical Oncology* 2009;27:1462-9.
- Van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van Der Velden VHJ, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* 2012;26:1908-75.
- Ortuño FJ, De Santiago M, Orfao A. Flow cytometry in the diagnosis and follow-up of acute leucemia: the state of the art. En: *Frontiers in Cancer Research*. Jeffries LP, editor. Nueva Cork: Nova Science Publishers Inc; 2006;33:1-52.
- Borowitz MJ, Craig FE, Digiuseppe JA, Illingworth AJ, Rosse W, Sutherland DR, et al for the Clinical Cytometry Society: Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2010;78:211-30.
- Van Loorecht A, 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 Leukemia-NET working conference on flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2009;94:1124-34.
- Teodosio C, García Montero A, Jara-Acevedo M, Sánchez-Muñoz L, Álvarez Twose I, Núñez R, et al. Mast cells from different molecular and prognostic subtypes of systemic mastocytosis display distinct immunophenotypes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2010;125:719-26.
- 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;16:1460-9.
- Nieto WG, Almeida J, Romero A, Teodosio C, López A, Henriques AF, et al. Increased frequency (12%) of circulating chronic lymphoid leukemia-like B-cell clones in healthy individuals using a highly sensitive multicolor flow cytometry approach. *Blood* 2009;114:33-7.
- Sánchez ML, Almeida J, González D, González M, García-Marcos MA, Balanzategui A, et al. Incidence and clinico-biologic characteristics of leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders with more than one B-cell clone. *Blood* 2003;102:2994-3002.
- 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;40:336-45.
- Rodríguez-Caballero A, García Montero A, Barcena P, Almeida J, Ruiz-Cabello F, Tabernero MD, et al. Expanded cells in monoclonal TCR-alpha-beta+/CD4+/Nka+/CD8-/-dim T-LGL lymphocytosis recognize hCMV antigens. *Blood* 2008;112:4609-16.
- Scquizzato E, Teramo A, Miorin M, Facco M, Piazza F, Noventa F, et al. Genotypic evaluation of killer immunoglobulin-like receptors in NK-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Leukemia* 2007;21:1060-9.
- Lima M, Almeida J, García Montero A, Teixeira MA, Queiros ML, Santos AH, et al. Clinico-biological, immunophenotypic and molecular characteristics of monoclonal CD56-/+dim chronic NK-cell large granular lymphocytosis. *American Journal of Pathology* 2004;165:1117-27.

10 años de acreditación de laboratorios clínicos con la norma ISO 15189

I. DE LA VILLA PORRAS

Departamento de Sanidad. Entidad Nacional de Acreditación. Madrid

Han pasado ya más de 10 años desde que en 2003 se aprobara la primera versión de la norma UNE-EN ISO 15189. Esta norma vino a cubrir la demanda existente entre los profesionales de laboratorios clínicos de todo el mundo de disponer de una norma específica que contemplara requisitos para demostrar la competencia. En su elaboración participaron profesionales de laboratorios clínicos de todas las especialidades y se tomaron como referencia las normas ISO 17025 e ISO 9001. La norma UNE-EN ISO 15189 contempla todos los procesos de un laboratorio clínico: preanalíticos, analíticos y postanalíticos, y está especialmente enfocada al paciente como eje central de la actividad del laboratorio clínico.

En el año 2012 se editó la primera gran revisión de la norma (se había producido una revisión menor en el año 2007), cuya versión española se publicó en el año 2013 (UNE-EN ISO 15189:2013). Esta nueva versión, sin incorporar grandes cambios en lo referente a requisitos, aporta una mayor claridad en su contenido y está mejor estructurada, por lo que facilita su interpretación e implantación en los laboratorios clínicos. Es destacable la incorporación de un nuevo requisito, gestión del riesgo, dirigido específicamente a la seguridad del paciente.

A lo largo de estos años, la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC) ha puesto en marcha una serie de actividades para el desarrollo de este esquema de acreditación. Para ello, además de participar en actividades internacionales (participación en Grupos de Trabajo en EA e ILAC para garantizar la homogeneidad entre organismos de acreditación) se promovió la colaboración con las sociedades científicas de todas las especialidades como forma de incorporar el más alto nivel de conocimiento técnico y profesional a los procesos de acreditación. En 2006 ENAC firmó un acuerdo de colaboración con la Asociación Española de Hematología y Hemoterapia.

La colaboración con las sociedades ha sido muy fructífera y enriquecedora y, entre otras actividades, cabe destacar su participación en la elaboración de algunos

de los documentos desarrollados para este esquema (CGA-ENAC-LCL, *Criterios generales de acreditación de Laboratorios clínicos*, NT-48, *Alcances de acreditación de laboratorios clínicos*), el apoyo en la difusión de dichos documentos, de la norma y del proceso de acreditación en general (con una participación de ENAC en más de 70 congresos y cursos externos), y la información sobre expertos técnicos-candidatos para actuar en los procesos de evaluación de ENAC (hasta diciembre de 2014, 188 profesionales han recibido formación como Expertos Técnicos en la norma UNE-EN ISO 15189 en ENAC).

En estos momentos, la implantación de la acreditación es variable dentro de nuestro entorno europeo. Es creciente el número de países en los que las autoridades sanitarias exigen la acreditación de laboratorios clínicos, ya sea para toda su actividad o para algunas especialidades o pruebas específicas. En España, recientemente, el Ministerio de Sanidad ha establecido la exigencia de la acreditación para los laboratorios de cribado neonatal que quieran ser designados como centros de referencia (CSUR) (Tabla 1).

En este contexto, el número de laboratorios acreditados varía entre países, siendo lógicamente la obligato-

Tabla 1. Países europeos en los que las autoridades sanitarias exigen la acreditación

Alemania	Cribado neonatal e Inmunodeficiencias primarias
Bélgica	Biología molecular (oncología, genómica, virología)
Francia	Todos los laboratorios clínicos
Grecia	Laboratorios clínicos privados
Hungría	Todos los laboratorios clínicos
Irlanda	Inmunoematología (transfusión sanguínea)
Letonia	Todos los laboratorios clínicos
República checa	Análisis genéticos (genoma humano)
España	Cribado neonatal (centros de referencia)

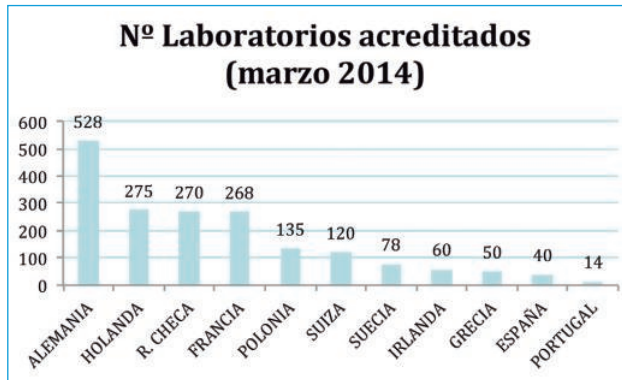


Figura 1.

riedad un factor determinante, pero también el histórico de acreditación, dándose también la situación de países en los que, sin existir una exigencia de la acreditación, el número de laboratorios acreditados es muy alto y un gran porcentaje de su actividad se lleva a cabo bajo acreditación, como es el caso de Suecia y Finlandia, que iniciaron la acreditación de laboratorios clínicos a principios de los años 90 (Figura 1).

En España, que otorgó la primera acreditación a un laboratorio clínico en el año 2000 según la norma UNE-EN 45001 al Laboratorio Normativo de Salud Pública de Bilbao para las pruebas de cribado neonatal, el inicio de la acreditación según la norma UNE-EN ISO 15189 se produjo con la acreditación de este mismo laboratorio en el año 2005 y la del primer laboratorio hospitalario en el mismo año, Laboratorio de Urgencias del Hospital Universitario La Paz.

A fecha de diciembre de 2014, 46 laboratorios clínicos se encuentran acreditados por ENAC con alcances

Tabla 2.

Bioquímica clínica	29
Genética molecular	15
Hematología	14
Serología infecciosa	11
Inmunología	10
Microbiología molecular	8
Virología	7
Bacteriología	6
Toxicología clínica	6
Inmunohematología	5
Micobacterias	5
Metabolopatías	5
Cribado neonatal	4
Citogenética	4
Micología	4
Parasitología	3
Patología Molecular	3
Citopatología	2
Histocompatibilidad	1
Reproducción asistida/DGP	1

de acreditación que cubren ya todas las áreas y un 23% de estos laboratorios lo están para alcance flexible. En la actualidad un buen número de laboratorios se encuentran en proceso de acreditación y es previsible que, de forma similar a la situación de los países de nuestro entorno, en los próximos años la mayoría de los laboratorios clínicos opten por la acreditación (Tabla 2).

Citología. El linfocito T clonal maduro

COORDINADORES: **B. NAVARRO CUBELLS.** *Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Clínico Universitario La Fe. Valencia.*

E. LUÑO FERNÁNDEZ. *Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Universitario Central de Asturias. Oviedo*

Los síndromes linfoproliferativos T (SLP-T), originados a partir de linfocitos T periféricos tras su maduración en el timo, constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades linfoides que plantean muchos desafíos desde el punto de vista clínico y de diagnóstico por su baja incidencia, su gran heterogeneidad clínica, su complejidad morfológica e inmunofenotípica y el todavía limitado conocimiento de su patogénesis molecular, lo que creemos justifica el interés de este simposio.

La clasificación de la OMS 2008, basada en la integración de las características morfológicas, inmunohistoquímicas, inmunofenotípicas y clínicas, si bien mejora las clasificaciones previas, continúa siendo difícil y poco reproducible. La gran complejidad biológica y funcional de las diferentes poblaciones normales de células T se refleja en el número de entidades, algunas de ellas todavía no categorizadas (NOS), que probablemente incluyen diversas entidades que carecen de criterios y biomarcadores diagnósticos.

A lo largo de este simposio, dedicado de forma monográfica a los síndromes linfoproliferativos crónicos T, expertos en la materia describen los principios en los que se basa la moderna clasificación de estos linfomas, las dificultades diagnósticas que persisten en un número no desdeñable de casos y el impacto que su correcta caracterización tiene para establecer el pronóstico y seleccionar el tratamiento más efectivo que permita mejorar la supervivencia en este grupo de entidades, en su mayoría agresivas y de mal pronóstico.

La Dra. Estela Matutes hablará de los aspectos citológicos, moleculares y terapéuticos de los síndromes linfoproliferativos T leucemizados, entidades bien definidas en las que los hallazgos citológicos y de inmunofenotipo, unidos a los datos clínicos, son la clave para el diagnóstico. Respecto a las características genéticas y moleculares, aportan información fundamental sobre la patogénesis y son relevantes para la estratificación de riesgo.

La Dra. Julia Almeida, a partir del estudio de las características inmunofenotípicas del linfocito T clonal y su contrapartida normal, analiza su impacto en la definición y clasificación actual de los síndromes linfoproliferativos crónicos T y NK. A lo largo de su exposición, incide en el escaso conocimiento sobre el fenotipo de las poblaciones T/NK normales presentes en el ganglio linfático y otros tejidos linfoides secundarios, en la importancia del análisis del estadio de maduración y otras características fenotípicas de la célula tumoral, y en la contribución a la identificación de algunas categorías concretas, de la aplicación de metodologías basadas en el estudio del sistema inmune y en análisis geneticomoleculares masivos.

Para finalizar, el Dr. Miguel Alcoceba se encargará de reflejar la importancia diagnóstica de la detección de clonalidad T, especialmente en aquellas neoplasias linfoproliferativas de estirpe T de difícil diagnóstico. Su análisis mediante PCR múltiple permite la detección de clonalidad en > 95% de los SLP-T, incluyendo algunas de las neoplasias T agresivas más frecuentes.

Esperamos que este simposio sea de vuestro interés y sirva para mejorar nuestro conocimiento de estas entidades, favorezca la aplicación en la práctica rutinaria de las metodologías más sensibles y específicas y redunde en el desarrollo de tratamientos más efectivos que permitan mejorar la supervivencia de estos pacientes.

Leukaemic mature T-cell lymphoproliferative disorders. Cytology, molecular features and management

E. MATUTES

Haematopathology Unit. Hospital Clínic. Barcelona

Introduction

Among the various mature T-cell lymphoid disease entities recognised by the 2008 WHO classification, those that manifest primarily with blood involvement are: T-cell prolymphocytic leukaemia (T-PLL), T-cell large granular lymphocytic (T-LGL) leukaemia, adult T-cell leukaemia-lymphoma (ATLL) and Sezary syndrome (SS)¹. Cytology together with immunophenotyping and, when necessary, histology and molecular genetics are the key elements to establish the diagnosis. The precise characterisation of these diseases is relevant to ascertain prognosis and select the optimal treatment and management. We will refer to the disease features emphasizing the cytological aspects, molecular genetics and management of the leukaemic T-cell disorders focussing on the two most frequent T-cell leukaemias seen by the haematologists in the Western world: T-PLL and T-cell LGL leukaemia.

T-prolymphocytic leukaemia (T-PLL)

Prior to the immunophenotypic era, Catovsky and cols first described T-PLL in 1973 in a patient presenting with clinical features similar to B-cell PLL but in whom the prolymphocytes were T cells as they lacked immunoglobulins in the membrane and, formed rosettes with sheep red blood-cells. Over the last four decades, multiple single case report and series of patients with this disease have been documented. T-PLL is recognised in the WHO classification as a distinct entity having three morphological variants that share a similar clinical course and identical molecular genetics.

There is no evidence for a particular geographical distribution. Carcinogenic agents, radiation and/or viruses do not play a role in the pathogenesis of T-PLL but there is a close relationship between the sporadic form of T-PLL that occurs in adults and the T-cell leukaemia that develops in patients with the inherited disorder ataxia telangiectasia (AT). It affects middle age and elderly patients and often manifest with wide-

spread disease shown by rapidly raising lymphocyte counts hepatosplenomegaly and lymphadenopathy; skin involvement is seen in a third of the cases. Other features are serous effusions and central nervous system involvement². A smouldering form with low level lymphocytosis and mild or no organomegaly has been recognised in c.10% of the patients. Although the disease may remain stable for a few years, progression in all of these patients do occur.

Cell morphology and immunophenotype are the two key front-line diagnostic investigations. Three T-PLL morphological variants had been described and recognised by the WHO. The typical form is characterised by a medium size lymphoid cell with irregular or regular nuclear outline, a prominent nucleolus and a deeply basophilic cytoplasm with blebs. A second form designated small-cell T-PLL variant had already been identified by the ultrastructural characteristics in 1984³. In this group, that represents around one fifth of all cases, the lymphoid cells are smaller, the nucleolus is not seen by light microscopy or only present in a small proportion of cells and the cytoplasm is similar to the typical prolymphocytes. Cases described in the literature as T cell chronic lymphocytic leukaemia (T-CLL) and/or knobby type T-CLL represent small-cell T-PLL variants. This is supported by the similar immunophenotype, clinical course and more importantly cytogenetics⁴. Indeed, the term T-CLL has been abandoned and it is not considered in the WHO classification. The third morphological form is the cerebriform variant in which the lymphocytes have a highly convoluted or cerebriform nuclei identical to that of the neoplastic cells in SS⁵. These patients sometimes present problems of differential diagnosis with cutaneous lymphomas, particularly when they manifest with skin lesions. In this context, skin histology showing perivascular dermal infiltrates without epidermotropism as seen in classical T-PLL and in particular cytogenetics showing the recurrent T-PLL abnormalities are extremely helpful to establish the precise diagnosis.

T-PLL is characterised by recurrent chromosomal abnormalities that essentially involve chromosomes 14, 8 and 11. The abnormality *inv(14)(q11;q32)* is the hallmark of T-PLL and it is detected in up to 80% of the cases (2). This juxtaposes the *TCR-alpha* gene (14q11) to the proto-oncogenes *TCL1*, *TCL1b* or *TCL6* (14q32.1) leading to the activation of these oncogenes and overexpression of the tcl-1 protein. In some cases the *TCR-alpha* gene (14q11) is juxtaposed to the *MTCP-1* gene (Xq28) resulting in the *t(X;14)*. The *MTCP-1* gene is homologous to *TCL-1*. Transcriptional activation of *MTCP1* and *TCL-1* can trigger malignant transformation of T-cells in transgenic mice. Therefore this supports the view that these oncogenes play a role in the pathogenesis of T-PLL. Indeed, the observation that approximately 10% of patients with AT have circulating T-cell clones with these abnormalities prior to the development of the disease suggest that these are early initiating oncogenic events. Abnormalities involving both arms of chromosome 8 are seen in greater than half of the cases and over-expression of the *myc* protein is found in cases with *iso8q*. Although *11q23* abnormalities are rarely detected by cytogenetics, molecular analysis frequently shows mutations of the *ATM* gene. There is a high incidence of recurrent chromosomal losses (8p, 11q, 22q11, 13q, 6q, 9p, 12p, 11p11-p14, and 17p) and gains (8q, 14q32, 22q21-qter, and 6p). The mutational landscape of T-PLL is still in its infancy. However in the last few years, the presence of activating mutations affecting genes of the *JAK-STAT* signalling pathway including *IL2RG-JAK1-JAK3-STAT5B* has been documented⁶⁷ These findings may have therapeutic relevance as inhibitors of the *JAK-STAT* signalling are already available for other hematopoietic malignancies.

T-PLL is refractory to conventional chemotherapy². At present the best treatment is alemtuzumab followed by stem-cell transplant (SCT). Up to 80% of patients achieve a complete response (CR) to Alemtuzumab when it is used as first line treatment. Combination of alemtuzumab with FMC (fludarabine, mitoxantrone, cyclophosphamide) or deoxycoformycin has been used in some studies but results are not superior to single agent alemtuzumab. However, alemtuzumab therapy is not curative and consolidation with allogeneic or autologous SCT in first remission should always be considered in suitable patients⁸.

T-cell LGL leukaemia

T-cell LGL leukaemia is a mature T cell neoplasm that results from the clonal expansion of a cytotoxic memory T-cell with a distinct morphology that gives the designation to this disease. Approximately one-third of patients are asymptomatic at diagnosis. Main symptoms are those derived from cytopenias, particularly

neutropenia, such as recurrent bacterial infections, tiredness, anemia and autoimmune phenomena. Its association with rheumatoid arthritis as well as with other autoimmune diseases is well recognised. It can also be seen in patients with myelodysplastic syndrome, may develop in lymphoma patients treated with chemoimmunotherapy or follow haemopoietic SCT. Splenomegaly is seen in c. 40% of the patients but lymphadenopathy is extremely infrequent. Peripheral blood counts show a variable degree of cytopenias with or without lymphocytosis. The predominant circulating lymphocyte is of medium size with an eccentric nucleus, condensed chromatin and abundant cytoplasm with coarse or fine azurophilic granulation. These cells termed large granular lymphocytes (LGL) are indistinguishable from the few circulating LGL present in healthy individuals. The infiltration of the bone marrow is usually very mild and the pattern of infiltration in the trephine biopsy is characteristic. This shows the presence of reactive nodules composed by CD20+ B-cells and CD4+ T cells whilst the neoplastic CD8+ cells are located in the interstitium and/or within the sinusoids. Demonstration of clonality is essential and mandatory to rule out expansions of LGL reactive to viral infections or post-splenectomy. This can be carried out by the polymerase chain reaction for the T-cell receptor (TCR) Beta or gamma chain genes.

There have been major advances in the understanding the pathogenesis of T-cell LGL leukaemia. The disease results from the clonal expansion and proliferation of a cytotoxic T-lymphocyte triggered by a persistent stimulation by an auto or foreign antigen with failure to undergo apoptosis⁹. It has been shown that activation of survival pathways and failure to undergo apoptosis are the main altered pathways in T-cell LGL leukaemia. These include dysregulation of Fas and Fas ligand (FasL), and activation of multiple survival signalling pathways, such as the *JAK/STAT3*, sphingolipid, and *Ras/MEK/ERK* pathways. Furthermore, around a third of the patients have activating mutations in the *STAT3* gene and less frequently of *STAT5b*^{10,11}. The presence of *STAT* mutations is more frequently seen in patients with associated rheumatoid arthritis and has been associated to a more active disease. Activation of the *STAT3* oncogene leads to cell signalling in a variety of cancers. Mutations on *STAT3* are not exclusive of T-cell LGL leukaemia but also found in chronic natural killer (NK) LGL lymphoproliferative disorders.

There are no formal guidelines for the management of these patients. Asymptomatic patients with only mild cytopenias could be in a watch and wait policy. Treatment is indicated in patients with severe cytopenias, rapidly raising lymphocyte counts and/or progressively enlarging spleen. So far the best option is an immunomodulatory treatment using immunosuppres-

sive agents either methotrexate, cyclosporin A or cyclophosphamide¹². Although all of these may correct the cytopenias and control the lymphocytosis eradication of the T-cell clone is rarely achieved. *STAT3* mutations appear to predict response to methotrexate¹³. There is no evidence for a cross-resistance for these agents as some patients that do not respond to one of them may well respond to the other. Patients with large tumour load may require other treatments such as deoxycoformycin or monoclonal antibody therapy with alemtuzumab. SCT has not a role in this leukaemia. The disease course is chronic with median survivals greater than 10 years. Aggressive disease or transformation into a high grade lymphoma is very rare.

Adult T cell leukaemia lymphoma (ATLL)

This is a unique disease etiologically related to the human T-cell leukaemia lymphoma virus HTLV-1. It has a particular geographical distribution overlapping with that of the retrovirus but sporadic cases have been diagnosed all around the world. In Europe is seen in immigrant patients from the endemic areas. In Spain, the diagnosis of ATLL always needs to be considered in patients with a T-cell lymphoma or leukaemia that are immigrant from certain South American countries such as Chile and Brazil and from the Central and West Africa. A survey in Spain documented a total of 229 HTLV-1 positive cases from 1989 to 2012 and 17 of the 229 developed ATLL¹⁴.

From a clinical perspective, most patients present with aggressive leukaemia or lymphoma (acute and lymphoma forms) and a significant minority manifest with a chronic or smouldering forms. In these two latter forms, the disease eventually progresses in terms of months or a few years. Morphologically, the circulating neoplastic lymphocytes designated as "flower cells" are medium in size with a polylobated nucleus, no prominent nucleolus and variably degree of cytoplasmic basophilia; occasional immunoblast like cell may be present. There is an overlap between ATLL and SS in the cytological features such as the presence of cerebriform cells in ATLL and in the pattern of skin infiltration as epidermotropism can be present in a half of the ATLL cases. Further, the histology of the lymphoid tissues is not specific to ATLL and may be similar to other peripheral T cell lymphomas not otherwise specified (PTCL NOS)¹⁵.

Chromosomal abnormalities in ATLL are often complex particularly in the acute form with aneuploidy and several hot spots such as 14q and 3p. Abnormalities in tumor suppressor genes such as *TP53* and p14/p16 are frequent. In contrast to healthy carriers neoplastic ATLL cells have a monoclonal integration of the HTLV-1. However, the site of integration is random and the

retrovirus itself does not carry an oncogene. The tax protein encoded by the HTLV px region plays a role in the leukaemogenesis by activating a variety of cellular genes (trans-acting mechanism). Another viral factor the HTLV-1 basic Zip factor (HBZ), encoded by minus strand mRNA has been recently documented to be involved in viral replication and T-cell proliferation and therefore relevant as a driver of leukaemogenesis^{16,17}. Microarray analyses of the transcriptomes of ATL cells at the chronic and acute stages can elucidate the mechanisms of stage progression in this disease; this has revealed that several hundred genes are modulated in expression including those for *MET*, a receptor tyrosine kinase for hepatocyte growth factor and the cell adhesion molecule *TSLC1*.

There is no standard first line treatment for ATLL. The efficacy of Zidovudine (AZT) plus Interferon (IFN) has been demonstrated in small series of patients and recently confirmed in two meta-analyses that have documented an improved survival^{16,18}. Therefore this combination is currently used together with chemotherapy or by its own in Europe and the USA. Allogeneic SCT should be contemplated in all patients suitable for this procedure. A variety of new potential drugs are currently under investigation for the treatment of ATLL such as the McAb anti-chemokine receptor 4 (anti-CCR4) KW-0761, histone deacetylase (HDCA) inhibitors, a new anti-folate pralatrexate and forodesine¹⁸.

Sezary syndrome (SS)

This is a form of cutaneous T cell lymphoma defined by the presence of erythroderma, circulating cerebriform clonal CD4+ T cells ($> 1.000/\text{mm}^3$) and often generalised lymphadenopathy. In patients with erythroderma, criteria recommended for the diagnosis of SS by the International Society for Cutaneous Lymphoma (ISCL) include the following: absolute Sezary count 1.000/ml, a CD4/ CD8 ratio of 10, aberrant expression of pan-T-cell antigens, demonstration of T-cell clonality by Southern blot or PCR-based methods, or cytogenetic demonstration of an abnormal clone in the blood.

Patients present with pruritus, erythroderma and variable degree of organomegaly. The bone marrow is infrequently involved. The circulating neoplastic lymphocytes have a nucleus with grooved chromatin (cerebriform) and variable amount of cytoplasm which may contain vacuoles. The nuclear irregularities can be best appreciated by electron microscopy that shows a serpentine nucleus. Two variant forms small and large have been recognised for many years but the most common picture seen is a mixture of these two cell types in the same patient.

SS has not a recurrent chromosomal abnormality but complex karyotypes are common. The genomic

Table 1. Disease features, cytology, molecular genetics, therapy and outcome in leukaemic T-cell lymphoproliferative disorders

Disease	Clinical features	Cytology	Cytogenetics/Molecular genetics	Treatment	Outcome
T-PLL	Hepatosplenomegaly Lymphadenopathy Skin lesions High lymphocyte count	Typical variants: Small cerebriform	Inv(14)(q11;q32) T(X;14)(q28;q11) Iso8q Oncogenes involved: <i>TCL-1, MTCP1</i> , Mutations on <i>ATM</i> and genes on the <i>JAK-STAT</i> pathway	Alemtuzumab Deoxycoformycin FCM+Alemtuzumab SCT	Poor Median OS: 7-24 months
T-cell LGL leukaemia	Cytopenias Mild splenomegaly Autoimmune phenomena	LGL	Activating mutations on <i>STAT3</i> and <i>STAT5b</i>	Methotrexate Cyclosporin A Cyclophosphamide Alemtuzumab	Favourable Median OS> 10 years
ATLL	Acute, lymphoma, chronic and smouldering forms	Flower cell	HTLV-1 tax and HBZ viral proteins <i>TP53</i> , p14/p16	IFN+AZT +/- chemotherapy Anti-CCR4 SCT	Variable according to the clinical forms
SS	Eritroderma, circulating clonal lymphocytes, variable organomegaly	Cerebriform cell	Complex karyotypes Deregulation of <i>MYC</i> and IL-2 signaling <i>TP53, JUNB, STAT4</i>	Bexarotene, IFN, HDAC inhibitors, Alemtuzumab, deoxycoformycin	Survival at 5 years of 24%

T-PLL: T-cell prolymphocytic leukaemia; ATLL: adult T-cell leukaemia lymphoma; SS: Sezary syndrome; FCM: fludarabine, cyclophosphamide, mitoxantrone; SCT: stem cell transplant; OS: overall survival; LGL: large granular lymphocyte; HTLV-1: human T-cell lymphotropic virus; HDAC: histone deacetylase; IFN: interferon; AZT: zidovudine.

complexity and instability has been suggested to have a prognostic impact. Analysis on copy number aberrations in a cohort of SS patients has shown a significantly better median overall-survival in those with fewer than 3 copy number alterations compared with those with 3 or more copy number alterations.

Gene expression profiling of Sezary cells has revealed deregulated expression of several oncogenes and tumor suppressor genes, including *TGF- β* receptor II, *JUNB*, *STAT4*, *MMP9*, *MXI1*, and *TWIST*. Other documented deregulated genes in SS are those encoding *MYC*, *MYC*-regulating proteins, mediators of *MYC*-induced apoptosis, IL-2 signalling pathway components and *TP53* inactivation¹⁹.

There is no standard front line treatment for SS. Although topical treatment or PUVA may help to alleviate symptoms, the great majority of patients require systemic treatment. Agents with variable efficacy include the retinoid bexarotene, IFN alone or in combination with extracorporeal photopheresis, HDAC inhibitors and Alemtuzumab given subcutaneously²⁰. High dose chemotherapy followed by SCT could be considered in suitable and fit refractory patients.

Conclusions

The leukaemic mature T-cell disorders comprise several well defined disease entities with different pathogenesis, clinical and laboratory features and outcome. Cytol-

ogy and immunophenotyping compounded with the information of the clinical features are the key front-line investigations in the diagnostic work-up of these diseases. Molecular genetics have provided insights in their pathogenesis as well as have been shown to be relevant for risk stratification into prognostic groups. All these have led to the development of more effective treatments and improvement in survival.

References

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NC, Jaffe ES, Pileri A, Stein H et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2008 (4th edition).
2. Matutes E, Brito-Babapulle V, Swansbury J, Ellis J, Morilla R, Dearden C et al. Clinical and laboratory features of 78 cases of T-prolymphocytic leukemia. *Blood* 1991;78(12):3269-74.
3. Matutes E, García-Talavera J, O'Brien M, Catovsky D. The morphological spectrum of T-prolymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1986;64(1):111-24.
4. Rashidi A, Fischer SI. T-cell chronic lymphocytic leukemia or small cell variant of T-cell prolymphocytic leukemia: a historical perspective and search for consensus. *Eur J Haematol* 2015 (in press).
5. Pawson R, Matutes E, Brito-Babapulle V, Maljaie H, Hedges M, Mercieca J et al. Sezary cell leukaemia: a distinct T cell disorder or a variant form of T prolymphocytic leukaemia? *Leukemia* 1997;11(7):1009-13.
6. Bergmann AK, Schneppenheimer S, Seifert M, Betts MJ, Haake A, López C, et al. Recurrent mutation of *JAK3* in T-Cell Prolymphocytic Leukemia. *Genes, Chromosomes & Cancer* 2014;3:309-16.

7. Kiel MJ, Velusamy T, Rolland D, Sahasrabudde AA, Chung F, Bailey NG et al. Integrated genomic sequencing reveals mutational landscape of T-cell prolymphocytic leukemia. *Blood* 2014;124(9):1460-72.
8. Dearden C. How I treat prolymphocytic leukemia. *Blood* 2012;120(3):538-51.
9. Steinway SN, LeBlanc F, Loughran TP Jr. The pathogenesis and treatment of large granular lymphocyte leukemia. *Blood Reviews* 2014;28:87-4.
10. Koskela HLM, Eldfors S, Ellonen P, van Adrichem AJ, Kuusanmäki H, Andersson EI, et al. Somatic STAT3 Mutations in Large Granular Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* 2012; 366:1905-13.
11. Rajala HL, Eldfors S, Kuusanmaki H, van Adrichem AJ, Olson T, Lagstrom S et al. Discovery of somatic STAT5b mutations in large granular lymphocytic leukemia. *Blood* 2013;121:4541-50.
12. Lamy T, Loughran TP Jr. How I treat LGL leukemia *Blood* 2011;117(10):2764-74.
13. Loughran TP Jr, Zick L, Olson TL, Wang V, Zhang D, Rajala HLM et al. Immunosuppressive therapy of LGL leukemia: prospective multicenter phase II study by the Eastern Cooperative Oncology Group (E5998). *Leukemia* 2015;29: 886-94.
14. Treviño A, Alcántara LC Jr, Benito R, Caballero E, Aguilera A, Ramos JM et al. Molecular Epidemiology and Clinical Features of Human T Cell Lymphotropic Virus Type 1 Infection in Spain. *AIDS Res Hum & Retrovir* 2014;30:856-62.
15. Matutes E. Adult T-cell leukaemia lymphoma. *J Clin Pathol* 2007;60:1373-7.
16. Tsukasaki K, Tobinai K. Biology and treatment of HTLV-1 associated T-cell lymphomas. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 2013;26:3-14.
17. Ishitsuka K, Tamura K. Human T-cell leukaemia virus type I and adult T-cell leukaemia-lymphoma. *Lancet Oncol* 2014; 15:517-26.
18. Matutes E. Novel and emerging drugs for rarer chronic lymphoid leukaemias. *Curr Cancer Drug Targets* 2012;12(5):484-504.
19. Vermeer MH, van Doorn R, Dijkman R, Mao X, Whittaker S, van Voorst Vader PC et al. Novel and highly recurrent chromosomal alterations in Sezary Syndrome. *Cancer Res* 2008;68 (8):2689-98.
20. Wilcox RA. Cutaneous T-cell lymphoma: 2014 Update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* 2014;89:838-51.

Inmunofenotipo del linfocito T clonal y de su contrapartida normal

J. ALMEIDA¹, P. BÁRCENA¹, J. FLORES-MONTERO¹, A. LÓPEZ¹, N. PUIG², S. BARRENA¹, M. JARA-ACEVEDO¹, N. MUÑOZ¹, G. VÉLEZ¹, T. LANGERAK³, M. LIMA⁴, A. ORFAO¹, EN NOMBRE DEL CONSORCIO EUROFLOW

¹Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC, Instituto Mixto USAL-CSIC). Dpto. de Medicina y Servicio de Citometría. Instituto Biosanitario de Salamanca (IBSAL). Salamanca, España. ²Servicio de Hematología. Hospital Universitario de Salamanca. IBSAL. Salamanca, España. ³Department of Immunology. Erasmus MC. University Medical Center. Rotterdam, The Netherlands. ⁴Department of Hematology. Laboratory of Cytometry. Hospital de Santo António. Centro Hospitalar do Porto. Unit for Multidisciplinary Research in Biomedicine (UMIB). Porto, Portugal

Síndromes linfoproliferativos crónicos T y NK: definición y clasificación actual de la Organización Mundial de la Salud

Los síndromes linfoproliferativos crónicos T y NK (SLPC-T/NK) son un grupo muy heterogéneo de neoplasias hematológicas que derivan de linfocitos T y células NK, respectivamente, maduros. Ello supone, en el caso de los SLPC de línea T, que se originan a partir de linfocitos T periféricos que ya han terminado su maduración en el timo, motivo por el cual estas entidades también se conocen con el nombre de “neoplasias T periféricas”, “postímicas” o “maduras”^{1,2}.

Son neoplasias poco frecuentes, con tasas de incidencia anual de aproximadamente 1,5 casos por cada 100.000 habitantes³; en nuestro medio (países occidentales) representan aproximadamente el 10-15% (las de línea T) y menos del 1% (las de línea NK) de todos los linfomas no Hodgkin^{1,2}. Su baja incidencia de presentación, junto con la gran heterogeneidad clínica que presentan y la carencia de marcadores moleculares o genéticos para la mayoría de las categorías diagnósticas, son factores que han contribuido a que los SLPC-T/NK sean mucho menos conocidos que las neoplasias maduras linfoides B⁴, y eso a su vez se refleja en las dificultades que existen hoy día para su diagnóstico correcto (incluido el diagnóstico de clonalidad, ya que en ocasiones las características biológicas de las células se superponen con las de los procesos reactivos) y clasificación, aun cuando son en su mayoría enfermedades agresivas de mal pronóstico, con pobre respuesta general a los tratamientos disponibles².

Actualmente, el diagnóstico y la clasificación de los SLPC-T/NK se basa en los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), revisados recientemente para todas las hemopatías malignas, y basados de forma general en la integración de las características clínicas, morfológicas, inmunofenotípicas y genéticas o moleculares^{2,5}. Pese a que esta clasificación mejora las utilizadas previamente para la categorización de los SLPC-T/NK, continúa siendo difícil y poco reproducible^{6,7}. Esta dificultad se explica, además de por los

motivos mencionados, por el desconocimiento de la contrapartida celular normal en la mayoría de las categorías de SLPC-T/NK, que por otro lado puede ser muy diversa, probablemente como reflejo de la extrema complejidad biológica y funcional de las diferentes poblaciones normales de células T y NK^{6,7}; además, actualmente se conoce muy poco el fenotipo de las poblaciones linfoides T/NK normales presentes en el ganglio linfático y otros tejidos linfoides secundarios, por lo que para los SLPC-T/NK predominantemente ganglionares ni siquiera se dispone de referencias de normalidad. Teniendo en cuenta el antecedente conocido de que en otras hemopatías malignas (como los SLPC de línea B) la identificación de la contrapartida normal supuso un gran avance en el manejo clínico de estos pacientes, es de esperar que el conocimiento del tipo de célula originaria de cada entidad de SLPC-T/NK y de las características morfológicas, fenotípicas y funcionales de ambos tipos celulares (tumoral/contrapartida normal) contribuya a mejorar nuestro conocimiento de los SLPC-T/NK y facilite el diagnóstico y la clasificación de estas entidades, a la vez que podría sentar las bases para la identificación de nuevas dianas terapéuticas. Por este motivo, en los últimos años se está haciendo un gran esfuerzo en este campo que incluso se evidencia en la clasificación actual de la OMS, en la que se tienen en cuenta características clínicas de la entidad, que en parte reflejarían la localización normal y función de las células T/NK de las que derivan^{2,6}. De este modo, se consideran por un lado los SLPC-T/NK preferentemente diseminados (formas leucémicas), por otro lado aquellos que tienen una expresión predominantemente ganglionar y, finalmente, aquellos de infiltración predominante extranodal, ya sean formas primariamente cutáneas o que afectan a otros tejidos u órganos extranodales (Tabla 1). Además, con la finalidad de comprender mejor los SLPC-T/NK, algunos estudios recientes se han centrado en relacionar determinadas categorías con poblaciones linfoides maduras T y NK concretas que, por su semejanza fenotípica, funcional y genética, pudieran considerarse su contrapartida normal; estas aproximaciones metodológicas, llevadas a cabo a través de análisis

Tabla 1. Clasificación actual de los síndromes linfoproliferativos crónicos T y NK (OMS 2008)^{2,6}

Formas diseminadas (leucémicas)	
Leucemia prolinfocítica T	
Leucemia de linfocitos grandes granulares T	
Síndrome linfoproliferativo crónico de células NK*	
Leucemia agresiva de células NK	
Enfermedad linfoproliferativa sistémica de células TVEB positivo de la infancia	
Leucemia/linfoma T del adulto	
Formas extranodales	
Linfoma T/NK extranodal, tipo nasal	
Linfoma T asociado a enteropatía	
Linfoma T hepatoesplénico	
Formas (primariamente) cutáneas	
Micosis fungoide/síndrome de Sézary	
Síndromes linfoproliferativos T CD30+ primariamente cutáneos	
Linfoma anaplásico de célula grande primariamente cutáneo	
Linfoma T tipo paniculitis subcutánea	
Linfoma T gamma delta primariamente cutáneo	
Linfoma T cutáneo citotóxico epidermotrópico agresivo CD8+ primariamente cutáneo*	
Linfoma T de célula pequeña/media CD4+ primariamente cutáneo*	
Linfoma tipo <i>Hydroa vacciniforme</i>	
Formas ganglionares	
Linfoma T periférico no especificado	
Linfoma T angioinmunoblástico	
Linfoma anaplásico de célula grande ALK positivo	
Linfoma anaplásico de célula grande ALK negativo*	

*Entidades provisionales. VEB: virus de Epstein-Barr.

convencionales de las células del sistema inmune y más recientemente mediante análisis genéticos o moleculares masivos (ultrasecuenciación, secuenciación de exoma completo, secuenciación de ARN, etc.) han contribuido en los últimos años a aclarar el origen celular de algunas categorías concretas, como es el caso del linfoma T angioinmunoblástico, para el que se ha propuesto un origen en una célula T CD4+ colaboradora folicular^{2,7,8}, la leucemia/linfoma T del adulto, que derivaría de un linfocito T regulador CD4+/CD25+^{2,9,10}, la leucemia de células grandes granulares T, cuyo origen se encuentra en poblaciones linfoides T de diversas líneas de función citotóxica (TCR α CD8+, TCR α β CD4+/CD8d y TCR γ δ ^{1,2}, o el linfoma T asociado a enteropatía, derivado de linfocitos T intraepiteliales^{2,11}. Además, aun cuando no se conozca de forma precisa la contrapartida normal de

otras muchas categorías de SLPC-T/NK, el estudio del estadio de maduración y otras características fenotípicas de la célula tumoral ha puesto de manifiesto que existe una asociación entre determinadas entidades y el estadio madurativo de las células T normales, de claro interés para el diagnóstico y la clasificación¹⁰: por ejemplo, en la leucemia prolinfocítica T las células tumorales tienen un fenotipo de célula TCR α β naif (menos frecuentemente de linfocito T de memoria central), el síndrome de Sézary y una gran parte de los linfomas T periféricos no especificados tienen un estadio madurativo correspondiente a un linfocito T α β CD4+ de memoria, y en la leucemia de linfocitos grandes granulares T los linfocitos clonales tienen el fenotipo de una célula efectora o, menos frecuentemente, de memoria periférica¹⁰.

Características inmunofenotípicas del linfocito T clonal, en comparación con su contrapartida normal: interés para la clasificación en categorías de la OMS 2008

En la [Tabla 2](#) se muestran las principales características fenotípicas de las diferentes categorías diagnósticas de SLPC-T/NK y se hace referencia al origen celular concreto de cada entidad (en los casos en los que se conoce) o a la línea celular linfoide/estadio de maduración al que pertenecen las células clonales. A continuación se describe brevemente el fenotipo de las células tumorales de las categorías de SLPC-T más representativas de las que se conoce la contrapartida normal, o que claramente se relacionan con un tipo funcional o fenotípico concreto de linfocito T maduro, y se hace hincapié en su interés desde un punto de vista clínico, para la **clasificación de los SLPC-T**, que se expone a continuación.

Leucemia prolinfocítica T

En la leucemia prolinfocítica T el fenotipo de las células clonales se corresponde con el de una célula T α β madura generalmente naif (menos frecuentemente de memoria central); en más de la mitad de los casos expresa CD4+ (y en un cuarta parte de los pacientes además coexpresa CD8), suele expresar CD7 de forma fuerte (similar a la expresión de esta molécula en la membrana de una célula T CD4+ naif, aunque en ocasiones la expresión de CD7 puede ser aberrante) y ser CD2+/CD28+/CD26+, en ausencia de marcadores de citotoxicidad^{1,2,10}. En un 80-85% de los casos expresa en el citoplasma TCL1, como consecuencia de la alteración genética característica de esta entidad (alt. en el cromosoma 14, [Tabla 2](#)); en la actualidad se dispone de anticuerpos monoclonales que permiten detectar cyTCL-1, lo cual facilita extraordinariamente el diagnóstico, sobre todo teniendo en cuenta que, hasta la fecha, es el único SLPC-T/NK en el que se detecta positividad para este marcador¹⁰.

Tabla 2. Características inmunofenotípicas origen celular propuesto y alteraciones genéticas de los SLPC-T/NK (adaptado de Gaulard P, de Leval L. Pathology of peripheral T-cell lymphomas: Where do we stand? Semin Hematol 2014;51:5-16).

Presentación clínica	Entidad	Derivación celular	Fenotipo	TCR 1	Alteraciones genéticas
Diseminada/ Leucémica	Leucemia prolinfocítica T	Tαβ naif/MC	CD4+CD8-(60%) CD4+CD8+ (25%) CD4-CD8+ (15%)	No citotóxico Naif/MC	Sí inv(14)(q11;q32), t(14;14) (q11;q32) (TCRA/D-TCL1A)
Extranodal	Leucemia de células T grandes granulares	Tαβ (raros casos Tγδ)	> CD8+ Variantes poco comunes: CD4+	Citotóxico	Sí Mutaciones STAT3 (20-30%), STAT5b (raro)
	Síndrome linfoproliferativo crónico de células NK	Célula NK madura	CD3-CD16+CD56-/+ o CD56+ Expresión anormal KIR	Citotóxico	No Mutaciones STAT3 (20-30%) STAT5b (raro)
	Leucemia agresiva de células NK ²	Célula NK	CD3-CD56+	Citotóxico	No Desconocidas
	Enfermedad linfoproliferativa sistémica de células T VEB positivo de la infancia	Tαβ	CD8+: infección primaria VEB CD4+: infección crónica VEB	Citotóxico	Sí Desconocidas
	Leucemia/Linfoma T del adulto ³	Tαβ	> CD4+ Pocos casos: CD8+ o CD4+CD8+	T regulador CD4+CD25++ FOXP3+	Sí Reordenamientos gen TCL-1
	Linfoma de células T/NK extranodal, tipo nasal ²	Célula NK	CD3-CD56+	Citotóxico	No Alteraciones citogenéticas no específicas
	Linfoma T asociado a enteropatía	Linfocitos intraepiteliales, Tαβ (raros casos Tγδ)	CD8-/+ CD4-	Citotóxico	Sí Desconocidas
Linfoma de células T hepatoesplénico	Tγδ (raros casos Tαβ)	CD8-/+ CD4-	Citotóxico	Sí iso7q, asociado con trisomía 13	
Cutánea	Micosis fungoide	Tαβ	> CD4+ (raro CD8+)	No citotóxico Memoria	Sí Desconocidas
	Síndrome de Sézary	Tαβ	> CD4+ (raro CD8+) > CD7- CD26-	No citotóxico memoria	Sí Cariotipos complejos
	Síndromes linfoproliferativos cutáneos primarios de células T CD30+	Tαβ	> CD4+ (< 5% CD8+)		Sí Desconocidas
	Linfoma cutáneo primario anaplásico de células grandes	Tαβ	CD4+	Citotóxico	Sí Desconocidas
	Papulosis linfomatoide	Tαβ	CD4+	Citotóxico	Sí Desconocidas
	Linfoma de células T subcutáneo tipo paniculitis	Tαβ	CD8+	Citotóxico	Sí Desconocidas
	Linfoma cutáneo primario de células T gamma-delta	Tγδ (Vδ2)	CD8-/+ CD4-	Citotóxico	Sí Desconocidas
	Linfoma cutáneo primario de células T citotóxicas, epid. agresivo CD8+	Tαβ	CD8+CD4-	Citotóxico	Sí Desconocidas
	Linfoma cutáneo primario de células T pequeñas/ medianas CD4+	Tαβ	CD4+, TFH	TFH	Sí Desconocidas
	Linfoma tipo Hidroa vacciniiforme	Tαβ (raros casos NK)		Citotóxico	Sí Desconocidas

Tabla 2 (cont.). Características inmunofenotípicas origen celular propuesto y alteraciones genéticas de los SLPC-T/NK (adaptado de Gaulard P, de Leval L. Pathology of peripheral T-cell lymphomas: where do we stand? Semin Hematol 2014;51:5-16).

Presentación clínica	Entidad	Derivación celular	Fenotipo	TCR 1	Alteraciones genéticas	
Nodal	Linfoma de células T periférico, no especificado (NOS)	Tαβ raros casos T γδ	(CD4 > CD8)	Variable, un subgrupo T _{FH} y citotóxico	Sí	Mutaciones RHOA (G17V) TFH: t(5;9)(q33;q22)
	Linfoma T angioinmunoblástico	Tαβ	CD4, TFH CD10+CD279+	TFH	Sí	Mutaciones RHOA (G17V), IDH2 Alteraciones citogenéticas no específicas
	Linfoma anaplásico de células grandes, ALK + ⁴	Tαβ (ζTH2?)	CD30+ GR/PER+	Citotóxico	Sí	t(2;5) / NPM-ALK t(1;2) / TPM3-ALK t(2;3) / TFG-ALK inv(2) / ATIC-ALK t(2;22) / CTLC-ALK
	Linfoma anaplásico de células grandes, ALK -	Tαβ (TH2?)	CD30+ GR/PER+	Citotóxico	Sí	Desconocidas

¹Reordenamiento genes TCR. ²Asociado a virus de Epstein-Barr (VEB). ³Asociado a HTLV-1 (virus de la leucemia de células T humano tipo 1). ⁴Cinasa de linfoma anaplásico.

SLPC: síndrome linfoproliferativo crónico; MC: memoria central; TFH: célula T colaboradora folicular; GR: granzima; PER: perforina.

Leucemia de linfocitos grandes granulares (LGL) T

El fenotipo de la célula clonal, en este caso es de una célula T LGL, citotóxica, generalmente efectora y activada (CD3+/CD56+/CD57+/CD28-/CD27-/CD45RA+/CD197-/HLADR-/ heterogéneo); generalmente son linfocitos Tαβ CD8+/CD4-, menos frecuentemente son Tαβ CD4+/CD8-/ LGL y más raramente Tγδ. El descubrimiento muy reciente de que un 20-30% de los casos de leucemia de LGL Tαβ CD8+/CD4- tienen mutaciones en STAT3, y más raramente en STAT5b, podría ser útil en el diagnóstico diferencial entre procesos clonales/malignos y policlonales/reactivos, ya que el fenotipo de las células T es muy similar al de los linfocitos T LGL normales y en algunas ocasiones incluso es difícil poner de manifiesto el carácter clonal de la expansión¹².

Leucemia/linfoma T del adulto

Recientemente se ha postulado que el origen de esta neoplasia es un linfocito T regulador CD4+/CD25+/Foxp3+^{2,7,9,10}; generalmente es una célula de memoria Tαβ CD4+/CD8-, de fenotipo no citotóxico. No obstante, el fenotipo puede no ser tan típico y el diagnóstico definitivo solo se consigue demostrando la presencia del genoma del virus HTLV-I en el genoma de las células clonales^{2,6}.

Linfoma T asociado a enteropatía

La célula originaria del tumor es un linfocito T intraepitelial, de fenotipo citotóxico (granzima B+) generalmente TCRαβ +, menos frecuentemente TCRγδ¹¹. En la

última clasificación de la OMS² se distinguen dos formas de linfoma T asociado a enteropatía: tipo I (asociado a enfermedad celiaca) y tipo II (sin asociación con enfermedad celiaca). En el tipo I las células T son CD3+, CD5, CD4-, CD8-/d, CD56-, granzima B+; además, suelen ser CD103+ (como los linfocitos T intraepiteliales normales) y CD30, este último sobre todo cuando las células son grandes. En el tipo II las células T suelen expresar CD56 y CD8, pueden expresar CD103, pero CD30 es habitualmente negativo¹¹.

Micosis fungoide/síndrome de Sézary

El fenotipo del linfocito T clonal se corresponde con el de una célula TαβCD4+ de memoria epidermotrópica (CXCR4+) que, a diferencia del linfocito T CD4+ normal de la piel, característicamente expresa CD7 de forma débil (o está ausente), es CD28+/CD26, en ausencia (generalmente) de marcadores de citotoxicidad. No obstante, este fenotipo no es en absoluto específico, sino que un fenotipo similar puede observarse también en muchos linfomas T periféricos no especificados^{1,2}.

Linfoma T angioinmunoblástico y linfomas T relacionados de fenotipo similar al del linfocito T colaborador folicular (TFH, follicular helper T cells)

El linfoma T angioinmunoblástico es el tipo de linfoma T más frecuente en nuestro medio, después del linfoma T periférico no especificado. Las células T clonales de este tumor tienen un fenotipo típico de célula normal TFH, y por tanto son células T (CD3+) CD4+ con capa-

cidad de estimular linfocitos B (CD28+, CD40L+), que expresan los marcadores típicos (aunque no específicos) de célula TFH: CD10, ICOS, CD279 (PD-1) y CXCR5 (receptor de CXCL13), entre otros^{2,6}. Es muy característico el patrón de expresión fuerte y homogéneo de CD279, que debe distinguirse de la expresión débil que aparece con frecuencia en otros linfomas T, como el síndrome de Sézary, en los que la expresión de PD-1 es similar a la que se observa en los linfocitos T normales de la capa paracortical del ganglio linfático (más débil y heterogénea)¹¹.

El origen celular de este tipo de linfoma en un linfocito T CD4+ folicular explicaría algunas de las manifestaciones más típicas de la enfermedad, como la hiperplasia linfoide B (sobre todo de células plasmáticas), la proliferación de células dendríticas foliculares en el ganglio afectado y la hipergammaglobulinemia policlonal, característica de estos pacientes, así como las manifestaciones autoinmunes, que se han atribuido a los efectos mediados por la quimiocina CXCL13⁶.

Otros linfomas T también se caracterizan por expresar marcadores de linfocito THF y se ha postulado que esta sería su contrapartida normal, como la variante folicular del linfoma T periférico no especificado o el linfoma primario de células CD4+ de tamaño pequeño-medio primariamente cutáneo¹¹.

Linfoma anaplásico de célula grande

Se desconoce en el momento actual la célula originaria de este tumor tan agresivo; en la mayoría de los casos deriva de un linfocito T $\alpha\beta$ CD4+ (pero puede tener incluso su origen en una célula B) y es característica la expresión fuerte y homogénea de CD30, así como el tamaño grande de las células y la expresión citoplasmática de granzima B, entre otras características fenotípicas y genéticas que se detallan en la [Tabla 2](#)⁶.

Consideraciones finales

En los últimos años se ha avanzado considerablemente en nuestro conocimiento de las células T normales de las cuales derivarían los diversos SLPC-T/NK y se han identificado marcadores fenotípicos que nos permiten mejorar el diagnóstico y la clasificación de estas entidades, pese a que en el momento actual aún desconocemos la lesión genética de la mayor parte de las enfermedades linfoproliferativas crónicas T/NK. Es de esperar que, además de facilitar el diagnóstico y clasificación de los SLPC-T/NK, el conocimiento más profundo de las características biológicas de las células T/NK maduras normales y clonales arroje nuevas expectativas de tratamiento de estas entidades, algunas de las cuales tienen un pronóstico infausto actualmente.

Agradecimientos

Este estudio ha sido parcialmente financiado por la Junta de Castilla y León a través de las ayudas Ref. SA103/03 y SA079U14 (Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León, Valladolid, España) y por la Red Temática de Investigación de Centros de Cáncer (RTICC) Ref. RTICC RD06/0020/0035-FEDER y RTICC RD12/0036/0048-FEDER (Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, Madrid, España). Las actividades del Consorcio EuroFlow fueron financiadas con fondos de la Unión Europea (Ref. STREP EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708: *Flow cytometry for fast and sensitive diagnosis and follow-up of hematological malignancies*).

Bibliografía

1. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Isaacson PG. Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. *Blood* 2008;112:4389-99.
2. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissue. Lyon, France: IARC press; 2008.
3. Smith A, Howell D, Patmore R, Jack A, Roman E. Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network. *Br J Cancer* 2011;105:1684-92.
4. Attygalle AD, Cabeçadas J, Gaulard P, Jaffe ES, de Jong D, Ko YH, et al. Peripheral T-cell and NK-cell lymphomas and their mimics; taking a step forward - report on the lymphomaworkshop of the XVIth meeting of the European Association for Haematopathology and the Society for Hematopathology. *Histopathology* 2014;64:171-99.
5. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* 2011;117:5019-32.
6. Gaulard P, de Leval L. Pathology of peripheral T-cell lymphomas: where do we stand? *Semin Hematol* 2014;51:5-16.
7. Inghirami G, Chan WC, Pileri S, AIRC 5xMille consortium 'Genetics-driven targeted management of lymphoid malignancies'. Peripheral T-cell and NK cell lymphoproliferative disorders: cell of origin, clinical and pathological implications. *Immunol Rev* 2015;263:124-59.
8. Gaulard P, de Leval L. Follicular helper T cells: implications in neoplastic hematopathology. *Semin Diagn Pathol* 2011;28:202-13.
9. Bangham CR, Toulza F. Adult T cell leukemia/lymphoma: FoxP3(+) cells and the cell-mediated immune response to HTLV-1. *Adv Cancer Res* 2011;111:163-82.
10. Van Dongen JJ, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VH, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* 2012;26:1908-75.
11. Pittaluga S, Nicolae A. Diagnostic challenges in peripheral T-cell lymphomas. *Hematology Education: The Education Program for the Annual Congress of the European Hematology Association* 2015;9:265-70.
12. Jerez A, Clemente MJ, Makishima H, Koskela H, Leblanc F, Peng Ng K, et al. STAT3 mutations unify the pathogenesis of chronic lymphoproliferative disorders of NK cells and T-cell large granular lymphocyte leukemia. *Blood* 2012;120:3048-57.

DetECCIÓN DE CLONALIDAD T COMO AYUDA EN EL DIAGNÓSTICO DE LAS NEOPLASIAS LINFOPROLIFERATIVAS DE ESTIRPE T

M. ALCOCEBA, A. BALANZATEGUI, M. GARCÍA-ÁLVAREZ, M.I. PRIETO-CONDE, R. GARCÍA-SANZ, M. GONZÁLEZ

Hospital Universitario de Salamanca-IBSAL. IBMCC (USAL-CSIC). Salamanca

Introducción

Los síndromes linfoproliferativos T (SLP-T) representan un grupo heterogéneo de enfermedades linfoides que incluye entidades predominantemente nodales, linfomas extranodales y leucemias T. Son entidades poco frecuentes y constituyen el ~5-7% del total de síndromes linfoproliferativos. La leucemia linfoblástica aguda (LLA) de origen T representa el 15-20% de todas las LLA, mientras que las leucemias linfoides maduras y el linfoma no Hodgkin (LNH) de origen T son extremadamente raros, excepto para grupos específicos como los linfomas cutáneos¹.

La clasificación de linfomas T se basa en gran parte en criterios morfológicos, inmunohistoquímicos, inmunofenotípicos y clínicos¹, lo que permite un diagnóstico por lo general sencillo. Sin embargo, el diagnóstico puede complicarse, ya que las características morfológicas e inmunofenotípicas no son específicas de la enfermedad y pueden variar entre entidades^{1,2}. Además, en ocasiones no hay marcadores claros o tienen un inmunofenotipo compatible con el patrón normal pan-T. Más aún, en algunos casos la diferenciación entre procesos linfoides malignos y procesos reactivos con expansiones linfoides asociadas sigue siendo difícil incluso aumentando el panel de marcadores inmunohistoquímicos o inmunofenotípicos. En conjunto, en un ~5-15% de los casos estos métodos no llegan a un diagnóstico definitivo. En estos casos, los estudios moleculares que detectan la presencia de reordenamientos monoclonales de los genes del receptor de célula T (TCR) son de gran utilidad. Estos reordenamientos se caracterizan porque se producen de una forma estrictamente ordenada en los primeros pasos de la diferenciación linfoide, por lo que están presentes en la mayoría de las células linfoides inmaduras y en todas las células maduras. Dado que leucemias y linfomas derivan de una única célula maligna transformada, todas las células pertenecientes al tumor contienen el mismo reordenamiento, y por ello todas esas entidades deberían tener uno o varios reordenamientos monoclonales de los genes del TCR.

Por tanto, el análisis molecular de los genes de los receptores TCR permite identificar patrones de reordenamiento comunes a muchas células, lo cual ayuda a establecer el diagnóstico de clonalidad en la mayoría de los síndromes linfoproliferativos. Además, el estudio del reordenamiento TCR es de especial interés en el seguimiento de enfermedad mínima residual (EMR) en determinados SLP-T.

En esta revisión analizaremos brevemente los mecanismos moleculares del TCR y su reordenamiento sincrónico con la diferenciación linfoide. Posteriormente nos centraremos en su estrategia de estudio (detección e interpretación) y sus aplicaciones clínicas en el diagnóstico y monitorización terapéutica de hemopatías malignas.

Diferenciación linfoide T - reordenamiento de los genes TCR

Los loci de los genes del TCR contienen diferentes genes que codifican segmentos variables (V), de diversidad (D) y de unión (*joining*, J) que son sometidos a un proceso de reordenamiento durante la diferenciación linfoide³.

El reordenamiento comienza con la unión de un segmento D y uno J, produciéndose un reordenamiento incompleto DJ. Si este resultara ser no funcional, se reordena el otro alelo. A continuación se produce la unión de un segmento V al reordenamiento D-J en el caso de los genes del TCR beta (TCR β), y TCR delta (TCR δ) (Figura 1), o bien produce directamente reordenamiento entre V y J en el caso de los genes TCR alfa (TCR α) y TCR gamma (TCR γ).

Los reordenamientos de los genes del TCR durante la diferenciación linfoide siguen un orden jerárquico que suele ser muy estricto. Primero se reordenan los genes TCR δ y luego TCR γ , pudiendo dar lugar a una expresión TCR $\gamma\delta$. Con frecuencia, se continúa con el reordenamiento de los genes TCR β , con posterior delección de TCR δ y subsiguiente reordenamiento TCR α , que podría dar entonces lugar a una expresión TCR $\alpha\beta$. Los patrones de reordenamiento de los genes TCR en neoplasias linfoides generalmente se ajusta a este orden

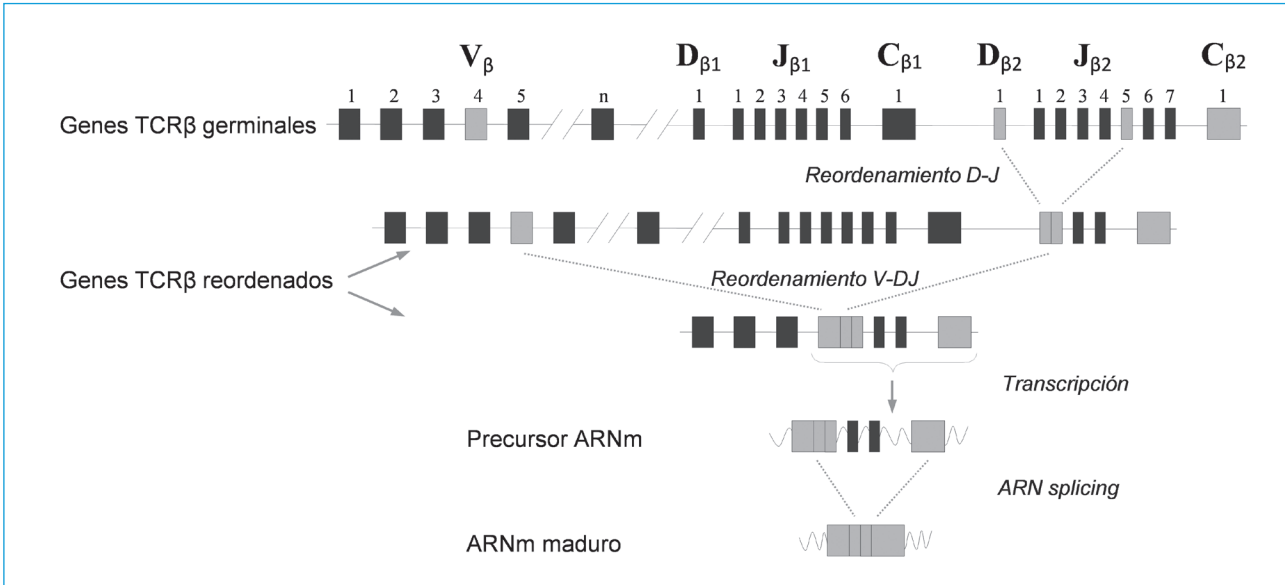


Figura 1. Reordenamiento de TCRβ. En el ejemplo, primero se reordena Dβ2 con Jβ2.5. A continuación, se une Vβ4 al reordenamiento Dβ2-Jβ2.5, formándose un reordenamiento completo Vβ4- Dβ2-Jβ2.5 (modificado de Van Dongen et al. Leukemia 2003).

jerárquico, aunque siempre es posible encontrar patrones inusuales.

Las múltiples combinaciones de los genes V, D y J conforman el repertorio TCR, que se crea mediante varias posibilidades (Tabla 1). La primera es la combinatoria, que se forma por las diferentes combinaciones V, D y J, que podría estimarse en $\sim 3 \cdot 10^6$ para moléculas TCRαβ y $\sim 5 \cdot 10^3$ para moléculas TCRγδ (Tabla 1). Durante el reordenamiento, en los sitios de unión entre segmentos V, D y J se producen deleciones e inserciones de nucleótidos que forman regiones de unión altamente diversas que también contribuyen al repertorio, que de este modo se estima en $> 10^{12}$.

Estrategia de estudio del TCR – PCR múltiple (BIOMED-2)

La metodología considerada como estándar es la que propuso el grupo europeo de estandarización BIOMED-2. En

este proyecto se estandarizaron protocolos y un panel de primers multiplex que mediante PCR permite analizar el reordenamiento de los genes del TCR⁴. De los 4 grupos de genes, los genes del TCRβ constituyen el grupo de estudio más útil por su diversidad genética y por estar presente en todos los SLP-T maduros TCRαβ y en muchos TCRγδ. Por su parte, los genes del TCRα se excluyen por su elevado grado de complejidad derivado de su elevada variabilidad genética. Además, todos los SLP-T con reordenamientos TCRα contienen reordenamientos TCRβ y, por lo general, TCRγ. Los otros 2 grupos de genes presentan algunas limitaciones. Así, los genes TCRγ están presentes en todos los SLP-T con TCRαβ y TCRγδ. Sin embargo, su mayor limitación es la reducida diversidad de repertorio, que dificulta la interpretación de los reordenamientos dominantes que pueden aparecer en los estudios. El estudio de los genes TCRδ podría ser potencialmente útil en SLP-T inmaduros y en aquellas TCRγδ. Sin embargo, está deletado en la mayoría de SLP-T maduros.

Tabla 1. Repertorio de genes TCR y diversidad combinatoria (modificada de IMGT, <http://www.imgt.org/>, último acceso 12/06/2015)

Locus	Localización cromosómica	Tamaño del locus (kb)	V	D	J	C	Número de genes TR funcionales	Diversidad combinatoria (rango por locus)
TCRα	14q11.2	1.000	43-45	-	50	1	94-96	2.200-2.300
TCRβ	7q34	620	40-48	2	12-13	2	56-65	960-2.300
TCRγ	7p14	160	4-6	-	5	2	11/13	20-30
TCRδ	14q11.2	530	7-8	3	4	1	15-16	36-224
Número total de genes funcionales		1.840	90-102	5	71-72	6	172-185	

Estudio del TCR β

El TCR β , localizado en el cromosoma 7q34, contiene de 40 a 48 genes V β funcionales pertenecientes a 23 familias y 2 *clusters*, D β 1-J β 1-C β 1 y D β 2-J β 2-C β 2. A su vez, J β 1 contiene 6 genes funcionales J β (J β 1.1-J β 1.6) y J β 2 otros 7 (J β 2.1- J β 2.7; [Figura 2A](#)). La diversidad combinatoria de TCR β es claramente superior a la de TCR γ o TCR δ .

El estudio del reordenamiento completo se realiza en dos tubos diferentes (tubos A y B) de PCR, en un diseño que permite el uso de múltiples *primers* en cada uno de los tubos. En el tubo A se incluyen *primers* diseñados para amplificar todas las familias V β , los 6 genes J β 1 y los genes J β 2.2, J β 2.6 y J β 2.7. Por su parte, el tubo B contiene los *primers* para todas las V β y los genes J β 2 restantes. En el estudio de reordenamiento incompleto (tubo C) se incluyen *primers* de los genes D β 1 y D β 2 y todos los de J β , tanto J β 1 como J β 2.

Estudio del TCR γ

El TCR γ está localizado en el brazo corto del cromosoma 7, en la región 7p14. Contiene 10 genes que se reordenan, siendo 6 V γ funcionales y 4 pseudogenes yV γ , pertenecientes a 4 familias, así como 4 genes J γ ([Figura 2B](#)). Si bien este repertorio limitado facilita la amplificación de los genes mediante PCR, por la misma razón es complicada la distinción entre producto clonal y policlonal. Por ejemplo, poblaciones clonales pequeñas con una V γ -J γ frecuente podrían no detectarse del fondo policlonal. Del mismo modo, linfocitos T policlonales que empleen combinaciones V γ -J γ poco frecuentes o raras podrían detectarse erróneamente como clonales. Por otro lado, reordenamientos canónicos frecuentes como V γ 9-J γ 1.2 aumentan con la edad por el resultado de acumulación de linfocitos T TCR $\gamma\delta$. Esto podría dar lugar a falsos positivos, al identificar como clonales reordenamientos que en realidad son canónicos.

Dado que el TCR γ no se deleciona en linfocitos T con TCR $\alpha\beta$, y por tanto está presente en TCR $\alpha\beta$ y TCR $\gamma\delta$, la identificación clonal mediante TCR γ no permite la discriminación del tipo de reordenamiento (TCR $\alpha\beta$ o TCR $\gamma\delta$) utilizado por el linfocito T. Además, dado que los reordenamientos del TCR γ están presentes en ~60% de las LLA de línea B, la presencia de reordenamiento clonal no permite identificar la línea celular de origen en proliferaciones linfoides inmaduras.

En el diseño de estudio se excluyeron la yV γ 12 debido a su rareza y J γ 1.2, apenas presente en SLP-T y que por lo general se asocia a un reordenamiento TCR γ en el otro alelo, con el objetivo de reducir la presencia de falsos positivos. Así, se emplean dos tubos, el tubo A con dos *primers* de V γ 1 y V γ 10 junto con los *primers* para todas las J γ (excepto la excluida J γ 1.2), y el tubo B con V γ 9, V γ 11 y las mencionadas J γ .

Estudio del TCR δ

El TCR δ se localiza en la región 14q11.2, entre genes del TCR α V α y J α . Contiene 8 V δ funcionales, 3 genes D δ y 4 genes J δ ([Figura 2C](#)). Al menos 5 V α pueden reordenarse con J α , mientras que reordenamientos TCR δ con V α y J δ podrían hallarse, si bien son muy infrecuentes.

El repertorio de TCR $\gamma\delta$ es reducido en comparación con TCR $\alpha\beta$. La recombinación preferencial de algunos genes reduce aún más el repertorio combinado TCR $\gamma\delta$ final, lo que podría dar lugar a la detección de pseudoclonalidad. Además, se ha observado una restricción por edad del uso de determinados genes, observándose mayor frecuencia de V γ 9/V δ 2 en adultos o restricción de V δ 1 y V δ 2. Esto podría dar lugar a bandas oligoclonales de linfocitos T V δ 1 y V δ 2. Además, se ha observado el uso preferencial de determinados genes V δ según el tejido (por ejemplo, V δ 1 en bazo y V δ 2 en piel)⁵. Aun con estas limitaciones, el estudio de clonalidad de TCR δ podría ser útil en el análisis de leucemias inmaduras T y SLP-T TCR $\gamma\delta$.

El estudio se realiza en un único tubo en el que se incluyen *primers* para 6 genes V δ , 2 D δ y 4 J δ . Debido a su bajísima incidencia, V δ 7, V δ 8 y D δ 1 se excluyeron del estudio.

En conjunto, ante la sospecha de un SLP-T la estrategia que se debe seguir supondría el análisis de los genes TCR β (tanto completo como incompleto) y TCR γ , bien en paralelo o de modo consecutivo. El estudio de TCR δ , en general junto a TCR γ , quedaría limitado a situaciones clínicas muy concretas, como las mencionadas leucemias inmaduras T y SLP-T TCR $\gamma\delta$.

Detección e interpretación de reordenamientos T clonales

Tras la amplificación mediante PCR de los genes TCR, el producto de PCR obtenido se analiza con electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) mediante técnica de heterodúplex o electroforesis capilar, mediante el uso de secuenciadores automáticos que permiten discriminar productos de PCR separados por una base y que en la actualidad constituye la metodología estándar.

La interpretación de los resultados de clonalidad va a depender de varios parámetros: a) un conocimiento detallado de la estructura del TCR y los patrones de reordenamiento; b) la presencia de amplificaciones no específicas en determinadas reacciones, de picos clonales no reproducibles (pseudoclonalidad); c) la posible presencia de reacciones inmunes inflamatorias; d) diferente distribución de repertorio por edad; e) la cantidad de linfocitos o el ADN de partida; f) el tipo de muestra de estudio⁶. Por estas razones y para lograr una correcta interpretación, el estudio de clonalidad debe realizarse por duplicado, bien en la misma o en distintas muestras.

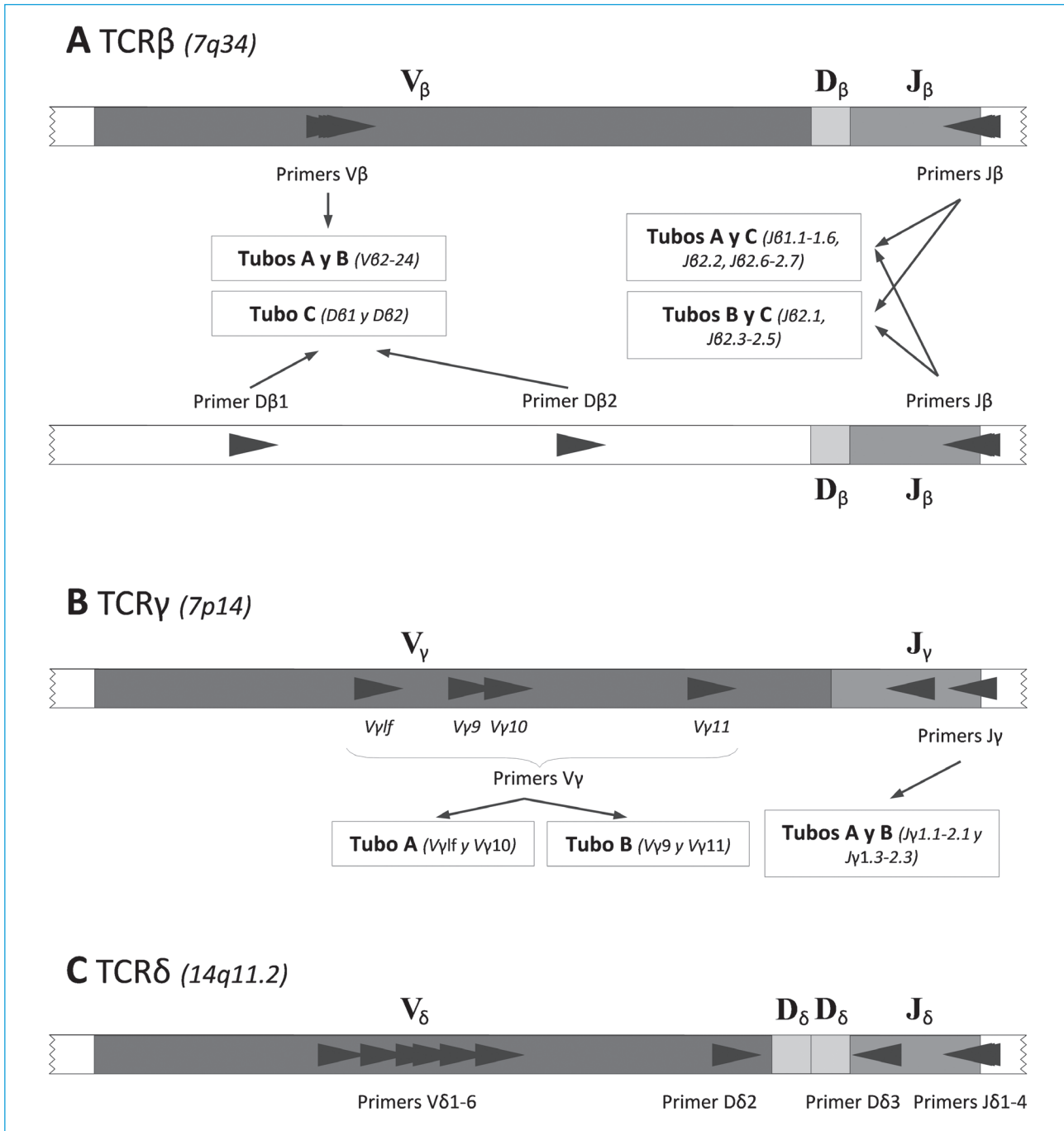


Figura 2. Estrategia de estudio del reordenamiento de genes TCR. A. TCR β . B. TCR γ . C. TCR δ (modificado de Van Dongen et al. Leukemia 2003).

El consenso de interpretación de resultados se resume a continuación y en la [Tabla 2](#).

- Si se observa 1 o 2 picos clonales, la conclusión será "clonal".
- En caso de 3 o más clones, se determinará "oligoclonal".

- Si se observa un patrón característico de campana de Gauss, sin presencia de picos clonales, la conclusión será "policlonal".

En estos tres casos es posible especificar otros detalles como la presencia de productos bialélicos, productos clonales menores o con un fondo oligoclonal o policlonal.

Tabla 2. Sistema EuroClonality para una conclusión molecular uniforme (modificado de Langerak et al. Leukemia 2012)

Tipo de perfil por tubo (por duplicado)	Interpretación molecular/ descripción técnica por tubo	Opcional: interpretación molecular/ descripción técnica detallada ^a
Presencia de 1 o 2 pico(s) clonal(es) reproducible(s) ^{b,c}	Clonal (tamaño: ... nt)	Clonal débil (... nt) Clonal (... nt) sobre fondo policlonal
Presencia de múltiples ($n \geq 3$) picos reproducibles ^{b,d}	Oligoclonal/productos múltiples (n= ...) (... nt)	Clon dominante sobre fondo oligoclonal/policlonal
Curva de Gauss/banda difusa ^e (con o sin pequeños picos no reproducibles ^b)	Policlonal (no clonal ^e)	Policlonal irregular (no clonal ^e)
Presencia de pico(s) clonal(es) no reproducible(s) ^b	No detección clonal pseudoclonal	
Ausencia de picos (sin fondo)	Ausencia de producto (específico)	Presencia de producto(s) no específico(s) (... nt)
Patrones que no encajan en las categorías descritas	No evaluable ^f	

HD: heterodúplex; nt: nucleótido.

^aEjemplos de descripciones técnicas más detalladas que pueden ser elegidas por el usuario.

^bEn el análisis por HD el número de bandas no refleja necesariamente el número de productos de PCR diferentes, ya que se pueden formar heterodúplex adicionales entre productos.

^cPara una conclusión molecular de clonalidad no es necesaria la presencia de picos clonales en todos los tubos analizados.

^d En TCR β la presencia de cuatro picos clonales es compatible con un solo clon.

^eEn el análisis por HD puede no verse una banda difusa policlonal clara aunque haya productos en el gel, por lo que este patrón se marcará como "no clonal".

^fEl número de PCRs en los que no puede darse descripción por tubo es inferior al 5%.

- En caso de mala calidad de ADN, o si no son valorables los perfiles de TCR analizados, la conclusión es "no valorable".
- Si no se observan productos específicos de TCR la conclusión general es "no reordenamiento TCR detectado".
- Si se observan perfiles pseudoclonales o perfiles con picos múltiples no reproducibles la conclusión sería "no detección de clonalidad, sugestivo de baja cantidad de ADN".

Valor clínico de los estudios de clonalidad por biología molecular en hemopatías malignas

En la práctica clínica diaria, en la mayoría de los síndromes linfoproliferativos de origen linfoide T, especialmente en las formas leucémicas, el diagnóstico se puede establecer mediante estudios clínicos, morfológicos e inmunofenotípicos sin necesidad de realizar estudio del TCR. Sin embargo, especialmente en los linfomas no Hodgkin, el diagnóstico de malignidad puede ser más complicado, por lo que para obtener un diagnóstico de certeza de neoplasia se requiere demostrar la existencia de clonalidad linfoide mediante estudio del reordenamiento del TCR.

Leucemia linfoblástica aguda

La gran mayoría de las LLA de precursores B (> 95%) tienen reordenamiento de los genes de las inmuno-

globulinas (IGH, ~78% VD JH y un 26% DJH) y con frecuencia IG κ (~56%, 42% Ig κ , 14% κ De). Además pueden tener algunos reordenamientos poco comunes, incluyendo los de los genes del TCR, habiéndose observado la presencia de reordenamientos de TCR β (35%), TCR γ (54%) y TCR δ (59%).

En LLA de precursores T, los reordenamientos del TCR se detectan en más del 95% (TCR γ 84%, TCR δ 50%), apareciendo reordenamientos promiscuos de los genes de IGH en un ~15-20%.

La principal aplicación clínica de los estudios moleculares de clonalidad en las LLA sería la monitorización de la EMR, ya que el valor clínico de otras aplicaciones (demostración de clonalidad, definición de línea celular y de estadio madurativo) tienen menor utilidad práctica^{7,8}.

Síndromes linfoproliferativos maduros T

La presencia de reordenamiento monoclonal del TCR es una constante en estas entidades. La aplicación clínica del análisis de estos genes en el estudio de los LN H-T es similar a la descrita para las leucemias linfoides, pero aquí cobra gran trascendencia su valor como ayuda al diagnóstico en casos dudosos, sobre todo cuando hay dudas frente a procesos reactivos. Esto tiene especial relevancia en LN H-T más que en los de origen B, donde el estudio de la restricción de cadena ligera en el ámbito de citometría de flujo es altamente informativo de clonalidad B. De hecho, algunos grupos consideran

que para un diagnóstico de certeza de algunos subtipos de LNH-T es obligado demostrar clonalidad mediante el estudio del TCR. Un ejemplo característico sería el linfoma no Hodgkin B rico en células T, ya que el estudio del TCR permite demostrar que los linfocitos T son reactivos y no neoplásicos como la histología parece indicar.

Existen entidades sin anomalías genéticas específicas que presentan reordenamiento de TCR, como la leucemia de linfocitos grandes granulares (LLGG), la micosis fungoide y su contrapartida leucémica, el síndrome de Sézary. En otros casos, como la leucemia/linfoma T del adulto, que se desarrolla asociada a la infección por el HTLV-1 (*human T cell leukemia virus-1*), cuyo material genético aparece integrado en el ADN de la célula tumoral, se puede ver la doble característica: integración monoclonal del genoma viral (presencia de secuencias específicas del virus y genes del TCR con reordenamiento monoclonal). Los portadores sanos muestran integración del material genético de forma no clonal.

Por otro lado, su aplicación como marcador para el estudio de EMR es útil en los LNH-T. Sin embargo, la mayoría de la información disponible se restringe fundamentalmente a pacientes sometidos a tratamientos

con dosis altas de quimioterapia (trasplante), tanto para evaluar la calidad de la remisión clínica obtenida como en la determinación de la posible contaminación de los productos de infusión por células tumorales residuales. Los estudios iniciales demuestran que estos estudios de EMR son útiles, pero su metodología es compleja y, por tanto, de difícil implantación en la práctica clínica diaria.

En la [Tabla 3](#) se puede ver la eficacia de la estrategia BIOMED-2 en la detección de clonalidad T. Basándose en esta estrategia, el uso combinado de los genes TCR β y TCR γ permite identificar reordenamientos clonales en > 94% de todas las neoplasias T, incluyendo prácticamente todos los casos de linfoma T periférico no especificado (LNH-T NOS) y linfoma de células T angioinmunoblástico (AITL), las dos neoplasias T agresivas más frecuentes⁹.

Otras aplicaciones

Como se ha visto, la presencia de clones T no es exclusiva de los SLP-T. Otras neoplasias hematológicas como la LLA-B, la leucemia mieloblástica aguda (LMA), el síndrome mielodisplásico o el mieloma múltiple (MM)

Tabla 3. Perfil genotípico de TCR en cinco grupos de síndromes linfoproliferativos T (modificado de Brüggemann et al. Leukemia 2007)

	T-PLL	T-LGL	LNH-T, NOS	AITL	ALCL (ALK+)	ALCL (ALK-)	Total
	n = 33	n = 28	n = 47	n = 37	n = 34	n = 9	n = 188
TCRβ							
Casos V β -J β (%)	31 (94)	24 (86)	40 (85)	26 (70)	23 (68)	7 (78)	151 (80)
Solo casos D β -J β (%)	2 (6)	3 (11)	6 (13)	7 (19)	2 (6)	0 (0)	20 (11)
Sin reordenamiento (%)	0 (0)	1 (4)	1 (2)	4 (11)	9 (26)	2 (22)	17 (9)
TCRγ							
Casos V γ 1 (%)	23 (70)	19 (68)	32 (68)	25 (68)	20 (59)	7 (78)	126 (67)
Solo V γ 10-V γ 11 (%)	5 (15)	2 (7)	7 (15)	7 (19)	2 (6) ^b	0 (0) ^b	23 (12) ^b
Solo casos V γ 9 (+V γ 10-V γ 11) (%)	3 (9)	6 (21)	5 (11)	2 (5)	2 (6) ^b	1 (11) ^b	19 (10) ^b
Sin reordenamiento (%)	2 (6)	1 (4)	3 (6) ^a	3 (8)	10 (29)	1 (11)	20 (11)
TCRδ							
Al menos 1 reordenam. TCR δ (%)	2 (6)	8 (29)	7 (15)	13 (35)	4 (12)	0 (0)	34 (18)
Sin reordenamiento (%)	31 (94)	20 (71)	40 (85)	24 (65)	30 (88)	9 (100)	154 (82)
TCR total:							
Reordenamientos TCR totales (%)	33 (100)	28 (100)	47 (100)	35 (95)	26 (76)	8 (89)	177 (94) ^c
TCR β +/TCR γ + /TCR δ - (%)	29 (88)	18 (64)	37 (79)	19 (51)	20 (59)	7 (78)	130 (69)
TCR β +/TCR γ + /TCR δ + (%)	2 (6)	8 (29)	6 (13)	13 (35)	3 (9)	0 (0)	32 (17)
Otras combinaciones (%)	2 (6)	2 (7)	4 (9)	3 (8)	3 (9)	1 (11)	15 (8)

AITL: linfoma T angioinmunoblástico; ALCL: linfoma anaplásico de célula grande; LNH-T NOS: linfoma no Hodgkin T no especificado de otro modo; TCR: receptor de célula T; T-LGL: leucemia de linfocitos grandes; T-PLL: leucemia prolinfocítica T.

^aIncluyendo un caso con el gen J γ 2.1 (J γ P) reordenado no detectable con BIOMED-2.

^bEn 3 casos de ALCL ALK+ y un caso ALK- se produjo una identificación ambigua del uso de V γ en función del tamaño del producto de PCR.

^cSe incluyen 20 casos en los que el número de señales clonales TCR β y/o TCR γ excedió en el máximo número de reordenamientos bialélicos.

pueden presentar clones T al diagnóstico sin que ello constituya la presencia de un SLP-T asociado. Así, además de sus principales aplicaciones en la confirmación del diagnóstico de SLP-T y seguimiento de EMR, el estudio de clonalidad T puede tener otras aplicaciones con implicaciones pronósticas. Por ejemplo, el estudio de clonalidad T permitió determinar en algunos pacientes con MM (32%), bien al diagnóstico o en la evolución, la presencia de clones de linfocitos T con reordenamiento del TCR β . Los pacientes que tenían estos reordenamientos presentaron una supervivencia global superior a aquellos sin detección de clonalidad T¹⁰.

Consideraciones finales

En conclusión, el análisis de clonalidad mediante PCR múltiple según la metodología del proyecto BIOMED-2 es un estudio básico para la confirmación del diagnóstico de neoplasias de células T. El uso de esta estrategia permite la detección de clonalidad en más del 95% de los casos con SLP-T.

Para establecer un diagnóstico definitivo los resultados de clonalidad mediante PCR deben integrarse con el resto de datos del paciente, incluyendo morfología, inmunohistoquímica, inmunofenotipo y clínica.

Desde punto de vista práctico, sus principales aplicaciones serían la detección de clonalidad en casos en los que se requiera el diagnóstico de certeza de malignidad (por ejemplo, LNH-T) y el estudio de EMR, especialmente en LLA de línea T y en pacientes sometidos a quimioterapia con intención curativa y que puedan tener enfermedad en médula ósea.

Como perspectiva de futuro, con la incorporación de la tecnología de secuenciación masiva (NGS) a la práctica rutinaria cabe esperar que la técnica de elección sea mediante paneles específicos de NGS que permitan tanto el diagnóstico como la monitorización de EMR^{11,12}. Esta tecnología permitiría la detección de poblaciones clonales en muestras con muy baja infiltración, dada la capacidad de cuantificación de las secuencias, permitiendo una mayor sensibilidad y mejor monitorización de la EMR. Además, permitiría de modo simultáneo el estudio de mutaciones específicas o de translocaciones que redundaría en un mejor diagnóstico de los SLP-T¹³.

Este trabajo ha sido realizado en parte gracias a los siguientes proyectos financiados: RD12/0036/0069, Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC); PI12/02361, PI12/02321 y PI12/02311 del Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III; GRS265/A/08

y BIO/SA56/13, de la Gerencia Regional de Salud y Consejería de Sanidad de Castilla y León.

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. International Agency for Research on Cancer. Lyon, France: IARC Press; 2008.
2. Greer JP, Kinney MC, Loughran TP, Jr. T cell and NK cell lymphoproliferative disorders. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2001;259-81.
3. Davis MM, Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. Nature 1988;334(6181):395-402.
4. Van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. Leukemia 2003;17(12):2257-317.
5. Beldjord K, Beldjord C, Macintyre E, Even P, Sigaux F. Peripheral selection of V delta 1+ cells with restricted T cell receptor delta gene junctional repertoire in the peripheral blood of healthy donors. J Exp Med 1993;178(1):121-7.
6. Langerak AW, Groenen PJ, Brüggemann M, Beldjord K, Bellan C, Bonello L, et al. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. Leukemia 2012;26(10):2159-71.
7. Droese J, Langerak AW, Groenen PJ, Brüggemann M, Neumann P, Wolvers-Tettero IL, et al. Validation of BIOMED-2 multiplex PCR tubes for detection of TCRB gene rearrangements in T-cell malignancies. Leukemia 2004;18(9):1531-8.
8. Szczepanski T, van DV, Raff T, Jacobs DC, van Wering ER, Brüggemann M, et al. Comparative analysis of T-cell receptor gene rearrangements at diagnosis and relapse of T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) shows high stability of clonal markers for monitoring of minimal residual disease and reveals the occurrence of second T-ALL. Leukemia 2003;17(11):2149-56.
9. Brüggemann M, White H, Gaulard P, García-Sanz R, Gameiro P, Oeschger S, et al. Powerful strategy for polymerase chain reaction-based clonality assessment in T-cell malignancies Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4 CT98-3936. Leukemia 2007;21(2):215-21.
10. Raitakari M, Brown RD, Gibson J, Joshua DE. T cells in myeloma. Hematol Oncol 2003;21(1):33-42.
11. Schumacher JA, Duncavage EJ, Mosbrugger TL, Szankasi PM, Kelley TW. A comparison of deep sequencing of TCRG rearrangements vs. traditional capillary electrophoresis for assessment of clonality in T-Cell lymphoproliferative disorders. Am J Clin Pathol 2014;141(3):348-59.
12. Sufficool KE, Lockwood CM, Abel HJ, Hagemann IS, Schumacher JA, Kelley TW, et al. T-cell clonality assessment by next-generation sequencing improves detection sensitivity in mycosis fungoides. J Am Acad Dermatol 2015.
13. Dörte W, Walker BA, Brüggemann M, Catherwood M, Pott C, Stamatopoulos K, et al. Translocations and clonality detection in lymphoproliferative disorders by capture-based Next-Generation Sequencing. A pilot study by the Euroclonality-NGS Consortium. Haematologica 2015;100(Suppl1):106.

Linfomas. Síndromes linfoproliferativos crónicos (linfoma difuso de células B grandes)

COORDINADORES: **C. PANIZO.** *Clínica Universidad de Navarra. Pamplona, Navarra*
C. GRANDE. *Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid*

Los linfomas no hodgkinianos (LNH) son los más frecuentes de los tumores hematológicos en los países occidentales, representando el 4% de todos los tumores malignos tanto en incidencia como en muertes por año. Se estima que solo en los Estados Unidos más de 60.000 personas serán diagnosticadas de LNH durante este año, y casi 20.000 de ellos morirán por la enfermedad¹. De entre todos los LNH, el linfoma difuso de células B grandes (LDCBG) es el tipo histológico más común, representando el 25-35% de los nuevos casos de LNH diagnosticados anualmente. A su vez, la categoría de LDCBG agrupa un conjunto de enfermedades heterogéneas en cuanto a características clínicas y anatomopatológicas².

Conforme se han ido produciendo avances en el diagnóstico molecular del LDCBG también se han ido identificando alteraciones citogenéticas en *bcl-6*, *bcl-2*, *p53*, *myc*, y la expresión de *Ki-67* asociadas con pronóstico adverso³. En 2002, Rosenwald y cols., revolucionaron el conocimiento de los factores pronósticos genéticos al identificar mediante técnicas de expresión génica tres subtipos distintos de LDCBG: tipo centro germinal de células B (GCB), tipo células B activadas (ABC o no-GCB) y LDCBG de tipo 3⁴. En la última década hemos asistido a una notable profundización en el conocimiento de los mecanismos moleculares responsables de la proliferación y supervivencia del clon linfomatoso: el 10% de los pacientes con DLBCL muestran reordenamientos en el oncogén *MYC*, lo que se creía era el sello distintivo exclusivo del linfoma de Burkitt. El aumento en la expresión de la proteína *MYC* fruto de ese reordenamiento promueve el crecimiento y la proliferación linfomatosa. Además, en los enfermos con LDCBG tratados con R-CHOP la presencia de reordenamientos en *MYC* se ha correlacionado con peores resultados de supervivencia⁵. Sin embargo, estudios más recientes han revelado que el impacto de *MYC* está fuertemente influido por *BCL2*. Las alteraciones de *MYC* concurrentes con la traslocación *BCL2* (lo que se conoce como “linfomas *double hit*”) acontecen en el 5% de los casos de LDCBG y representan un subgrupo resistente al tratamiento con una mediana de supervivencia de tan solo 8 meses⁶. En su mayoría estos casos son del subtipo GCB.

En la primera ponencia, el Dr. Vega expondrá los principales descubrimientos recientes en cuanto a los hitos genéticos y las principales vías de señalización implicadas en la etiopatogenia de la enfermedad. Pero como señala el título de su ponencia, su exposición va a ir más allá y profundizará sobre su propia experiencia en el conocimiento de los mecanismos moleculares responsables de la proliferación y supervivencia del clon linfomatoso a través de la interacción de la célula tumoral con su microentorno. Cada vez existe mayor evidencia que sugiere que la interacción entre las células del linfoma y del estroma favorece la progresión del linfoma y es un componente crítico de la biología del tumor⁷. El Dr. Vega expondrá sus investigaciones, en las que ha llegado a identificar un nuevo *crosstalk* bidireccional entre las vías *NF-kB* y *Hedgehog* (*Hh*) que puede ser iniciado mediante señales inflamatorias y ligandos de *Hh* generados por las células del estroma y del linfoma con importantes implicaciones biológicas en el LDCBG. La comprensión e interrupción de esta interrelación celular microambiente-linfoma puede revelar nuevas vías terapéuticas para el tratamiento del LDCBG.

El tratamiento del LDCBG ha experimentado pocos cambios en las últimas décadas. Sin ninguna duda, se puede afirmar que una forma de inmunoterapia consistente en el tratamiento con el anticuerpo monoclonal anti-CD20 rituximab ha representado el mayor avance en la terapia de esta entidad en los últimos quince años⁸. No obstante, el 10-15% de los pacientes diagnosticados de LDCBG presentan enfermedad refractaria primaria y un 20-25% adicional recaen después de tener una respuesta inicial a la terapia con R-CHOP. Es por ello que se precisan nuevos tratamientos, que se dirijan selectivamente a las células tumorales y que mejoren los resultados conseguidos con el tratamiento estándar sin aumentar la toxicidad.

En la segunda ponencia del simposio, la Dra. Inogés expondrá cómo nuevos métodos de inmunoterapia a través de la manipulación del sistema inmune se han convertido en alternativas terapéuticas muy interesantes. El potencial terapéutico del sistema inmune, y de los linfocitos T citotóxicos en particular, ya ha sido reconocido en neoplasias hematológicas, con la observación de enfermedad injerto contra tumor tras el trasplante alogénico, donde las células del donante reconocen aloantígenos de las células del receptor y las destruyen. Los anticuerpos biespecíficos son construcciones artificiales en las que dos sitios de unión antígeno específicos de dos anticuerpos, están alineados en una molécula de fusión. Para la terapia antitumoral, los anticuerpos biespecíficos reconocen un antígeno en la célula tumoral y una molécula en la célula efectora. Son muy atractivos porque permiten la redirección de los linfocitos T hacia las células tumorales⁹. Los CAR son proteínas de fusión que incorporan moléculas de reconocimiento antigénico y dominios de activación T. Los TCR reconocen péptidos presentados por moléculas MHC; por tanto, el reconocimiento está restringido por MHC. Sin embargo, los CAR reconocen proteínas de superficie y glicolípidos de una manera no restringida por MHC, por eso pueden utilizarse independientemente del HLA del paciente. En su ponencia, la Dra. Inogés comentará extensamente las distintas generaciones de CAR y los resultados de los ensayos clínicos que con esta terapia se están obteniendo en el LDCBG.

Por lo que respecta a la práctica clínica habitual, es conocido que los pacientes con LDCBG tienen un riesgo del 5% de presentar recaída o progresión en el sistema nervioso central (SNC), que supone una alta morbilidad y con frecuencia también un desenlace fatal con una supervivencia general inferior a 6 meses¹⁰. El diagnóstico precoz de eventos del SNC resulta muy importante tanto para el éxito del tratamiento como para mejorar el pronóstico en el LDCBG. Habitualmente al diagnóstico de la afectación del SNC se llega por la presencia de signos o síntomas relacionados y es confirmado por el examen del líquido cefalorraquídeo y las técnicas de neuroimagen¹¹. En la última ponencia del simposio, el Dr. Sancho hará especial hincapié en la importancia que tiene por parte del clínico la identificación de pacientes con riesgo de enfermedad del SNC, y por tanto la necesidad de conocer y estudiar particularmente en cada paciente con LDCBG los factores pronósticos que pueden determinar la afectación del SNC. Señalar que a los factores pronósticos clásicos como LDH incrementada, afectación testicular o mamaria se están incorporando otros nuevos, como la presencia de reordenamientos de MYC¹⁰. En su ponencia el Dr. Sancho también comentará cómo la administración de profilaxis junto con la terapia de primera línea es una estrategia ampliamente utilizada en nuestro medio para reducir la incidencia de la enfermedad CNS y la recaída, a pesar de que en la actualidad existe un consenso limitado sobre qué pacientes deben recibir profilaxis del SNC, así como sobre la eficacia real de la profilaxis en la era de la inmunoterapia^{12,13}.

Bibliografía

1. Chiu BC, Hou N. Epidemiology and etiology of non-hodgkin lymphoma. *Cancer Treat Res* 2015;165:1-25.
2. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. Geneva, Switzerland: WHO; 2008.
3. Friedberg JW. New strategies in diffuse large B-cell lymphoma: translating findings from gene expression analyses into clinical practice. *Clin Cancer Res* 2011;17(19):6112-7.
4. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002;346(25):1937-47.
5. Savage KJ, Johnson NA, Ben-Neriah S, et al. MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy. *Blood* 2009;114(17):3533-7.
6. Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol* 2012;30(28):3452-9.
7. Blonska M, Agarwal N, Vega F. Shaping of the tumor microenvironment: Stromal cells and vessels. *Semin Cancer Biol* 2015 (in press).
8. Coiffier B, Lepage E, Briere J, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002;346:235-42.
9. Fournier P, Schirmacher V. Bispecific Antibodies and Trispecific Immunocytokines for Targeting the Immune System Against Cancer. Preparing for the Future. *BioDrugs* 2013;27:35-53.
10. Fletcher CD, Kahl BS. Central nervous system involvement in diffuse large B-cell lymphoma: an analysis of risks and prevention strategies in the post-rituximab era. *Leuk Lymphoma* 2014;55(10):2228-40.
11. Benevolo G, Stacchini A, Spina M, Ferreri AJ, Arras M, Bellio L, et al. Final results of a multicenter trial addressing role of CSF flow cytometric analysis in NHL patients at high risk for CNS dissemination. *Blood* 2012 18;120(16):3222-8.
12. Tomita N, Yokoyama M, Yamamoto W, Watanabe R, Shimazu Y, Masaki Y, et al. Central nervous system event in patients with diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Cancer Sci* 2012; 103:245-51.
13. Sancho JM, Morgades M, Alonso N, Deben G, Fernández de Sevilla A, Vázquez L, et al, on behalf of investigators of QUIT Study (PETHEMA, GELTAMO and GOTEL Groups). Prospective study on the practice of central nervous system prophylaxis and treatment in non-Hodgkin's lymphoma in Spain. *Med Clin (Barc)* 2008;131:441-6.

Cross talk between Hedgehog and NF- κ B pathways: A novel finding in the pathobiology of diffuse large B cell lymphoma with potential therapeutic implications

F. VEGA

Department of Pathology and Laboratory Medicine. University of Miami. Sylvester Comprehensive Cancer Center. Miami, Florida. USA

Introduction

Diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) is the most common lymphoid malignancy in adults, accounting for 30% of non-Hodgkin lymphoma (NHL). In the United States alone, 70,800 new cases of NHL and 18,990 deaths from the disease were estimated in 2014 (Surveillance, Epidemiology and End Results Program, NCI, <http://seer.cancer.gov>). Despite major therapeutic advances, up to 40% of patients with DLBCL remain incurable. Many aspects of the DLBCL pathophysiology are still poorly understood, in particular those related to lymphoma microenvironment (LM)¹.

Compelling evidence suggests that crosstalk between lymphoma and stromal cells favors lymphoma progression and is a critical component of the tumor biology. We have identified a novel bidirectional crosstalk between NF- κ B and Hedgehog (Hh) pathways that can be initiated by inflammatory signals and Hh ligands generated by the LM and lymphoma cells with biological implications in DLBCL. Understanding and disrupting this crosstalk may reveal novel therapeutic avenues for the treatment of DLBCL.

Hh signaling

Hh signaling is a highly regulated signaling pathway that is important not only for embryonic development, tissue patterning and organogenesis but also for tissue repair and for the maintenance of stem cells in adult tissues. The Hh family of proteins comprises of 3 ligands, Sonic (Shh), Indian (Ihh) and Desert (Dhh). These ligands are secreted and interact with a receptor complex composed of two main proteins, patched 1 (PTCH1), and smoothened (SMO). PTCH1 is the ligand receptor subunit and, in the absence of Hh ligands, inhibits SMO. In the presence of Hh ligands, the inhibition of PTCH1 over SMO is abrogated, resulting in SMO activation (Figure 1). SMO is a member of the Frizzled family (class F) of G-protein coupled receptors (GPCRs) and upon activation transduces Hh signals to

glioma associated oncogene (GLI) transcription factor family (canonical Hh signaling). Hh ligands can also signal through GLI-independent mechanisms collectively referred as “non-canonical Hh signaling”².

Evidence of the importance of Hh signaling in lymphopoiesis and hematological malignancies

In the adult hematopoietic system, Hh signaling regulates intrathymic T-cell development and it is one of the survival signals provided by follicular dendritic cells to prevent apoptosis in germinal center B cells³. Hh proteins are expressed in all lymphoid organs and are secreted as soluble ligands by stromal cells⁴. Using a c-Myc-driven mouse model that generated a wide range of B-cell malignancies including 40% slow-growing (low-grade) plasmacytomas, Dierks and cols.⁵ showed that lymphoma cells undergo apoptosis in the absence of their stromal microenvironment and that, to some extent, they are protected from apoptosis in the presence of Hh ligands or SMO agonists. They also showed that the suppression of Ihh secretion by the stromal cells using an *Ihh* short hairpin RNA substantially decreased lymphoma cell growth. These findings suggested that Hh ligands secreted by the LM (stromal cells) are survival factors for some B-cell lymphomas.

We have found frequent expression of Hh ligands, including expression of the Hh precursor (full length) and the N-terminal Hh peptide (secreted form) in DLBCL tumors and cell lines⁶. Moreover, the secreted Hh N-terminal peptide, but not the precursor form, was detected in culture medium collected from DLBCL cells lines. Expression of Hh ligands or secreted Hh N-terminal peptide was not detected in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma (CLL/SLL) tumors, cell lysates or in the culture medium collected from primary CLL/SLL cells. These data indicate that Hh ligands are synthesized, processed and secreted by DLBCL cells (in contrast to CLL/SLL cells, in which Hh ligands are provided by stromal cells). These data led us to hypothesize that Hh ligands may represent a surviv-

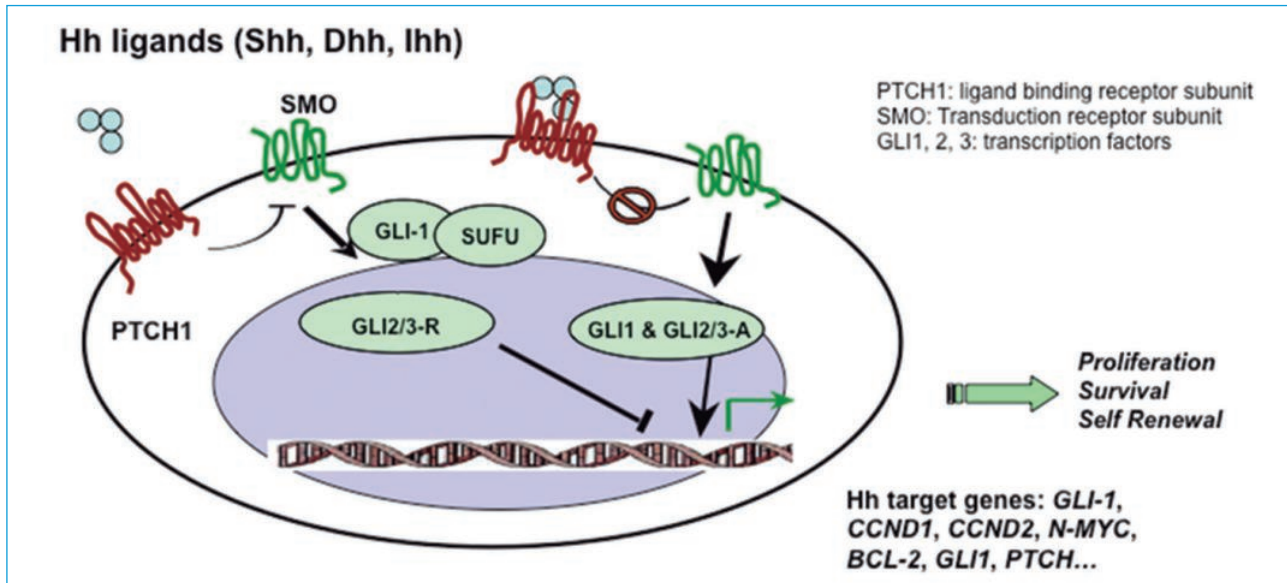


Figura 1. Schematic diagram of canonical Hedgehog (Hh) signaling pathway. Note that *GLI1* is a downstream target of itself and measuring *GLI1* expression levels are readout of the activity of the canonical Hh signaling pathway. Hh proteins can also signal through *GLI1*-independent mechanisms: Non-canonical signaling (not shown).

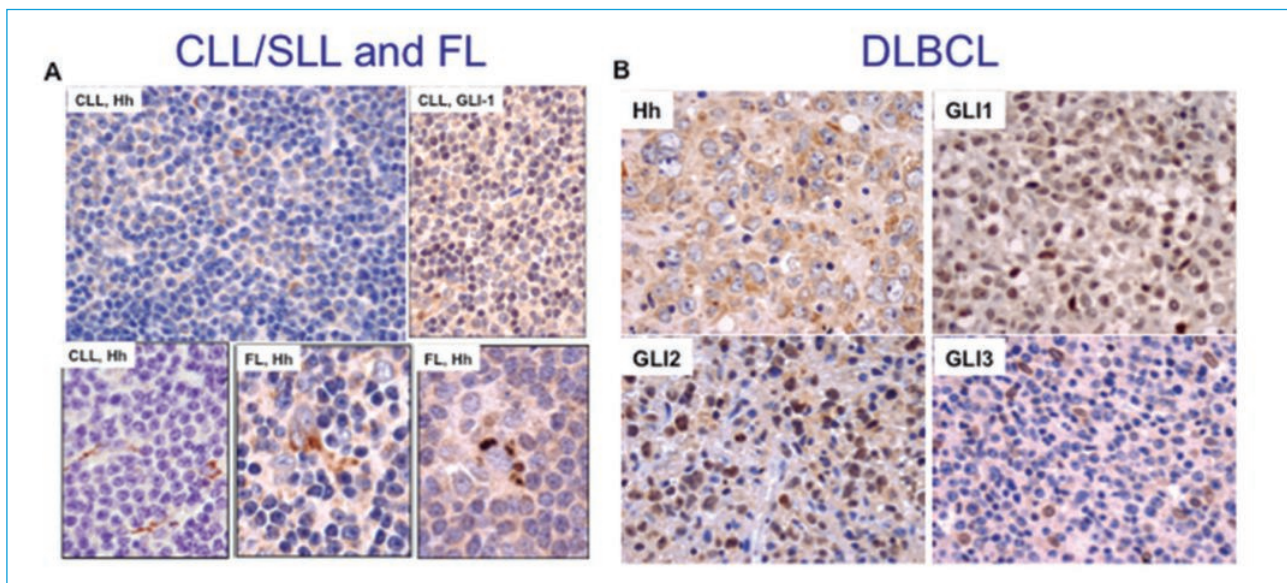


Figura 2. Hh signaling in lymphomas. The expression levels of Hh-related proteins (Hh ligands and the transcription factors *GLI1*, *GLI2*, and *GLI3*) were explored in low grade and high grade B cell lymphomas using immunohistochemistry (for Hh ligands, the polyclonal antibody that recognizes all three Hh ligands was used). A. In low-grade lymphomas, chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma (CLL/SLL) and follicular lymphoma (FL), Hh ligands were detected in the cytoplasm of stromal cells (fibroblastic reticular cells FRCs (lower left), follicular dendritic cells (lower center), endothelial cells, and macrophages (lower right), but not in the tumor cells. Only in CLL/SLL, a subset of the tumor cells, the proliferative component (prolymphocytes and paraimmunoblasts inside the proliferation centers), were positive for Hh ligands. Hh pathway was active in CLL as documented by the nuclear expression of *GLI1* by a subset of the tumor cells. B. In DLBCL, in contrast to low-grade B cell lymphomas, expression of Hh ligands was detected in the cytoplasm of the lymphoma cells. Hh signaling was active, as documented by the detection of nuclear expression of *GLI1* and *GLI2*, but not *GLI3*. These findings suggested that Hh ligands are produced and secreted by the DLBCL lymphoma cells. These results were confirmed by *in vitro* studies⁶.

al and/or proliferative advantage for DLBCL and suggested that the expression and secretion of Hh ligands may confer to the DLBCL cells some degree of stromal independence.

Supporting this hypothesis we found that pharmacologic inhibition or silencing *SMO* decreased cell viability & colony formation, induced cell cycle arrest (mainly in germinal center [GC] DLBCL) and apoptosis (mainly in activated B cell [ABC] DLBCL)⁶. Moreover, co-culturing DLBCL cells with HS-5 cells (stromal cells that produce Ihh) increased chemotolerance to single chemotherapy agents (doxorubicin and methotrexate) that was significantly abrogated by inhibiting *SMO* by using sublethal doses of *SMO* inhibitors⁷. Stimulation of *SMO* with Shh N terminal peptide enhanced chemotolerance in DLBCL cell lines in the absence of stromal cells. These data suggest that the activation of *SMO* provides survival signals and enhances resistance to chemotherapy in DLBCL cells and suggest that targeting *SMO* may be of therapeutic value to increase chemosensitivity in DLBCL.

The importance of Hh signaling in DLBCL is emphasized by the correlation between expression levels of *SMO* and *GLI1* with overall patient survival (Figure

3). In addition, DLBCL patients with low clinical stages (I and II) with high expression of *SMO* or *GLI1* have a distinctly worse overall survival than those patients with low-expression of *SMO* and *GLI1*. Patients with high clinical stages (III and IV) with high expression of *SMO* or *GLI1* have a distinctly worse overall survival than those with low-expression.

SMO is a potential scaffold molecule that enhances activation of NF- κ B signaling pathway

We found that activation of Hh signaling positively correlates with activation of canonical NF- κ B pathway in DLBCL tumors and that Hh ligands contributes to canonical NF- κ B activation in DLBCL as confirmed with EMSA and supershift assays (using p65, p50, c-Rel, RelB and p52 antibodies)⁸. Using 3 different DLBCL cell lines, we confirmed that NF- κ B binding activity was induced (Ly7) or enhanced (DOHH2 and HBL1) after treatments with recombinant Hh peptide (Figure 4). We found that *SMO*, the signal transducer subunit of Hh pathway, contributes to NF- κ B activation through recruiting G protein subunits G α 1 and G α 12 to *SMO* to activate the

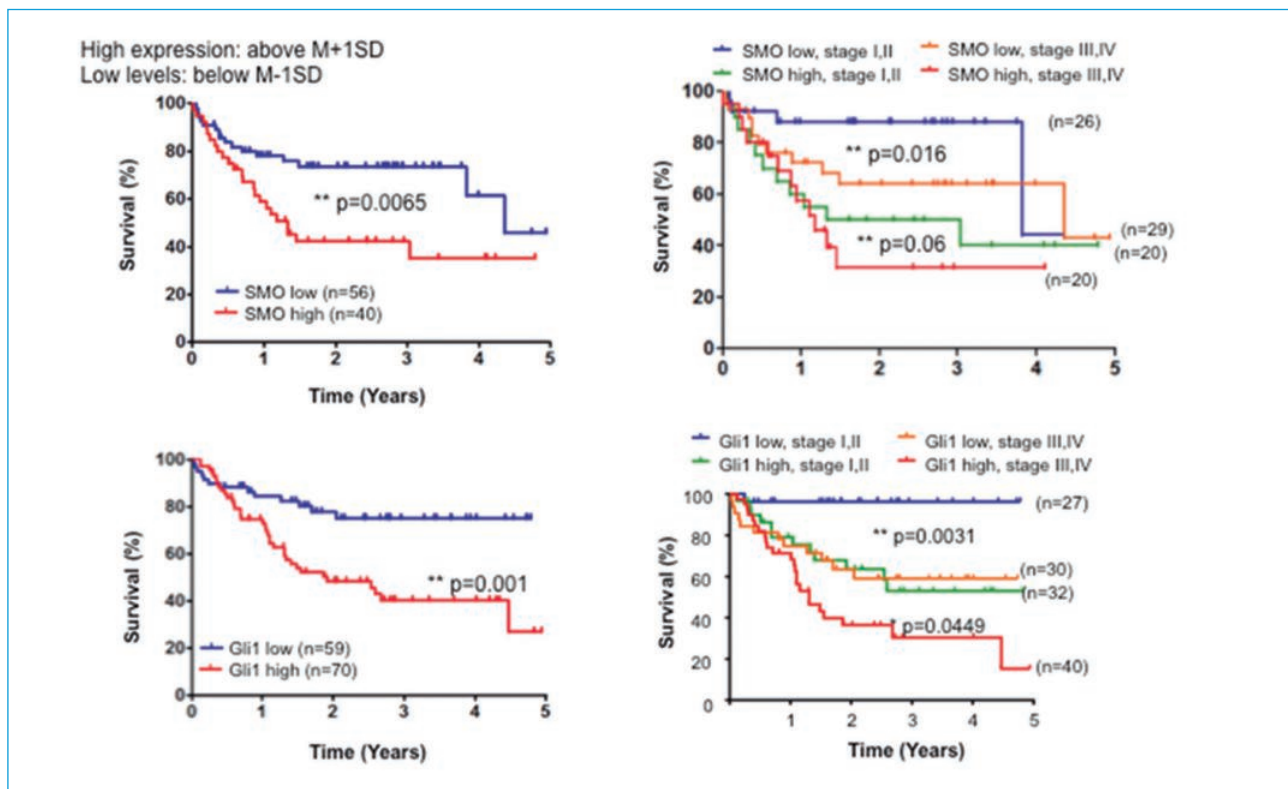


Figure 3. *GLI1* and *SMO* expression levels in 414 DLBCL tumor biopsies. Gene expression data were retrieved from public repository (GSE10846, Lenz et al. N Engl J Med 2008;359:2313) and analyzed by OncoPrint v4.5 software. Cut off values for high and low gene expression was determined with the mean (M) and standard deviation (SD). High expression levels were considered those above M+1SD and low levels were those below M-1SD.

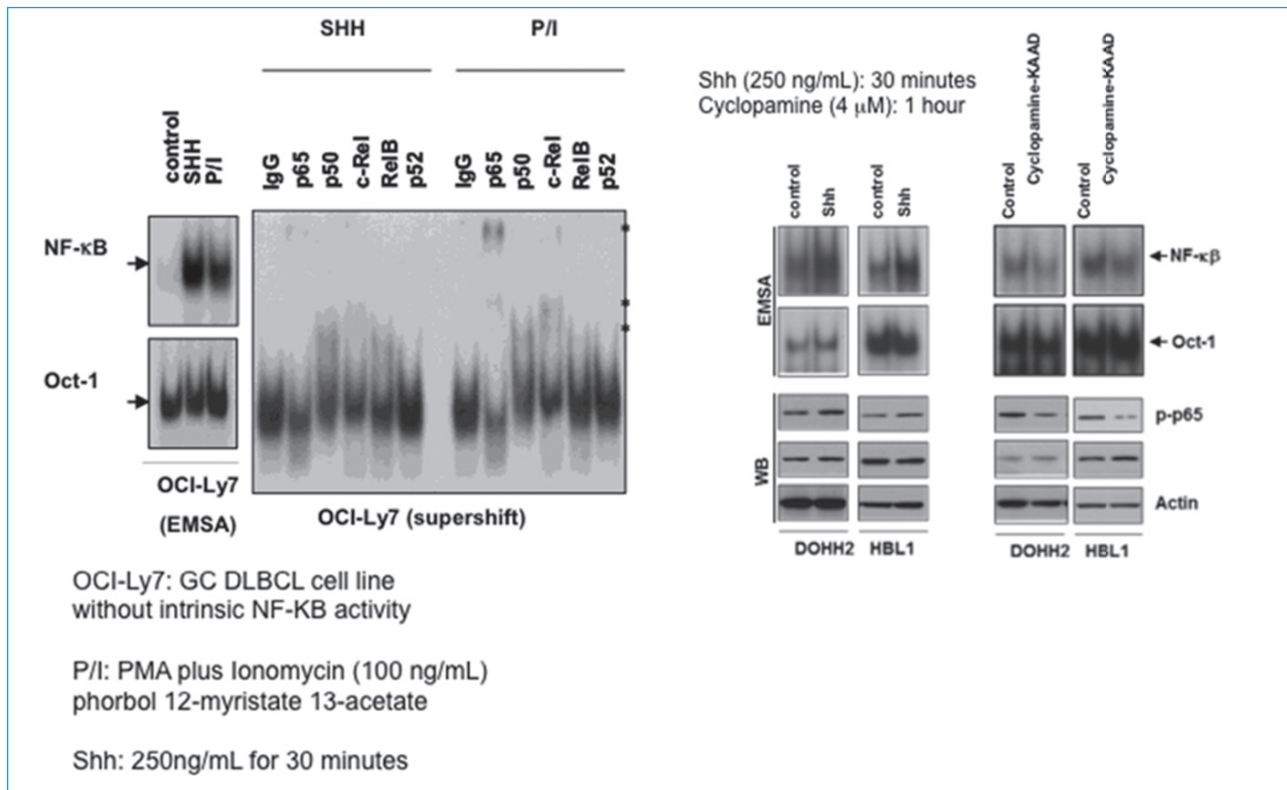


Figura 4. Recombinant Shh induced NF-κB DNA binding activity in OCI-Ly7 as analyzed by EMSA (left panel) and enhanced NF-κB DNA binding activity in DOHH2 and HBL1 (right panels). PMA (100 ng/ml) plus Ionomycin (100 ng/ml) was used for a positive control. OCI-Ly7, DOHH2 and HBL1 cells were treated with/out recombinant Shh (250ng/ml) for 30 min or PMA (100 ng/ml) plus Ionomycin (100 ng/ml) for 60 min as a positive control followed by supershift assay. ns, nonspecific. *, supershift bands (middle and right panels). Inhibiting Hh signaling with cyclopamine-KAAD (4 μM) DOHH2 and HBL-1 resulted in decrease of NF-κB DNA binding activity. DMSO (vehicle for cyclopamine) was used as controls for drug treatments.

PKCβ/CARMA1/BCL-10/MALT1/TRAF-6/NEMO signaling axis, followed by assembling of the CARMA1/BCL10/MALT1 (CBM) complex to SMO. This effect of SMO on NF-κB is through non-canonical Hh signaling mechanism (independent of GLI1) and, moreover, it seems to be independent of the constitutive activation of NF-κB due to oncogenic mutations⁸. We also found that combining SMO inhibitors with BAY-11-7082 (NF-κB inhibitor) resulted in a higher decrease of cell viability and increased apoptosis than that observed by the two drugs alone.

Crosstalk between NF-κB and GLI1: IKKβ stabilizes GLI1 protein levels resulting in nuclear accumulation of GLI1

To identify regulators that participate in the transcriptional activity of GLI1, we explored GLI1 interacting proteins by liquid chromatography tandem mass spectrometry following immunoprecipitation (IP) of recombinant GLI1. IKKβ was one of the proteins associated with GLI1. The NF-κB pathway plays a critical role in

B-cell physiology and contributes to the proliferation and survival of DLBCL cells. IKKβ, catalytic subunit of the IKK complex, is a major regulator of canonical NF-κB signaling in response to cytokines. Our data support a novel role of IKKβ in the regulation of the stability of GLI1 protein. This interaction was validated using IP (IKKβ and GLI1) experiments and *in-vitro* GST pull-down assays using GST-IKKβ (Figure 5). Although both kinases IKKα and IKKβ were associated with GLI1, only transfection of IKKβ resulted in the appearance of slow migratory GLI1 protein band. Consequently, we examined if the slow migratory GLI1 band detected in the immunoblots is due to phosphorylation of GLI1. *In-vitro* kinase assays confirmed that IKK phosphorylates GLI1 and we identified several potential phosphorylation sites in the C-terminal region of GLI1.

In DLBCL, we found that activation or overexpression of IKKβ increased GLI1 protein levels (cytoplasmic and nuclear fractions)⁶, while inhibition or transient silencing of IKKβ decreased GLI1 protein levels (Figure 6). Following TNFα-induced activation of IKKβ, we observed stabilization of GLI1 protein levels as compared

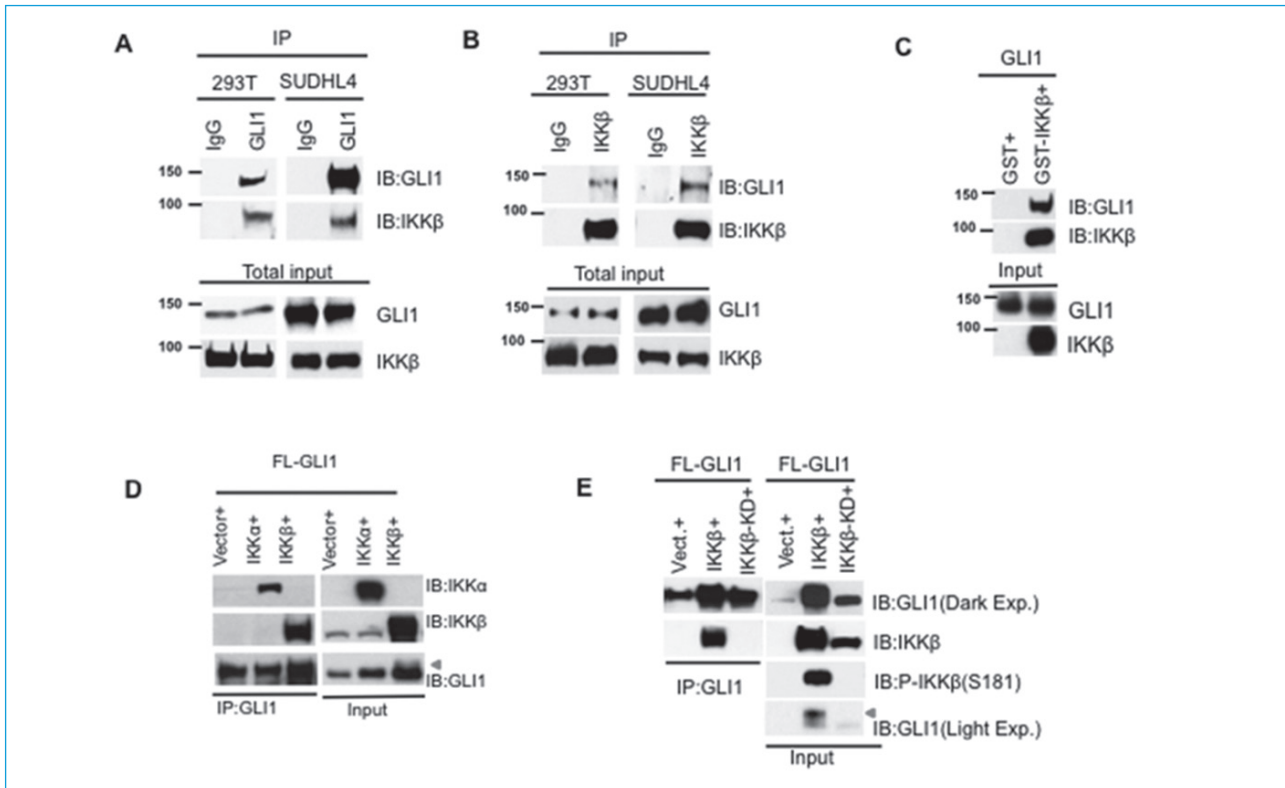


Figura 5. A. *In-vitro* immunoprecipitation of endogenous GLI1 in 293T and SUDHL4 cells. B. Endogenous immunoprecipitation of IKKβ in 293T and SUDHL4 cells. C. GST-tagged IKKβ and recombinant full-length GLI1 proteins used for the in-vitro pull down assay. D. Full length IKKα and IKKβ constructs were coexpressed in 293T cells with either vector or FL-GLI1, and total cell lysates were subjected to anti-GLI1 immunoprecipitation. Bound IKKs were detected by anti-IKKα and IKKβ antibodies. E. FL-GLI1 construct was coexpressed with vector, IKKβ or IKKβ-KD in 293T cells, and total cell lysates were subjected to anti-GLI1 immunoprecipitation. Bound IKKβ was detected by anti-IKKβ antibody.

to TNFα-unstimulated 293T GLI1 transfected cells. Moreover, IKKβ activation decreased total and K48-linked GLI1 ubiquitination that was associated with increased GLI1 protein levels. These findings suggest the activation of IKKβ stabilizes GLI1 protein decreasing its proteosomal degradation.

Our data support that disrupting this crosstalk with specific IKKβ and/or GLI1 inhibitors in combination with conventional cytotoxic drugs may represent an attractive unique strategy for treating DLBCL patients. Using a co-culture trans-well model where DLBCL cells and stromal cells were co-cultured together, the combination of TPCA1 (IKKβ inhibitor) with GANT-61 (GLI1 inhibitor) resulted in synergistic effect in survival. Similar findings were observed in a xenograft model of DLBCL.

Conclusions

Here, we presented a novel bidirectional crosstalk between NF-κB and Hh pathways with biological and therapeutic implications in DLBCL. Disrupting this crosstalk may represent a novel therapeutic approach for DLBCL.

Funds and conflict of interests: The work described here was supported by funds from University of Miami, 2015 CTSI Award Program (1UL1TR000460), 2015 Woman Cancer Association of the University of Miami, The Translational Grant of The Leukemia & Lymphoma Society, and K08 Physician-Scientist Award 1 K08 CA143151-01 from the National Institutes of Health (NIH). I do not have any potential conflict of interest.

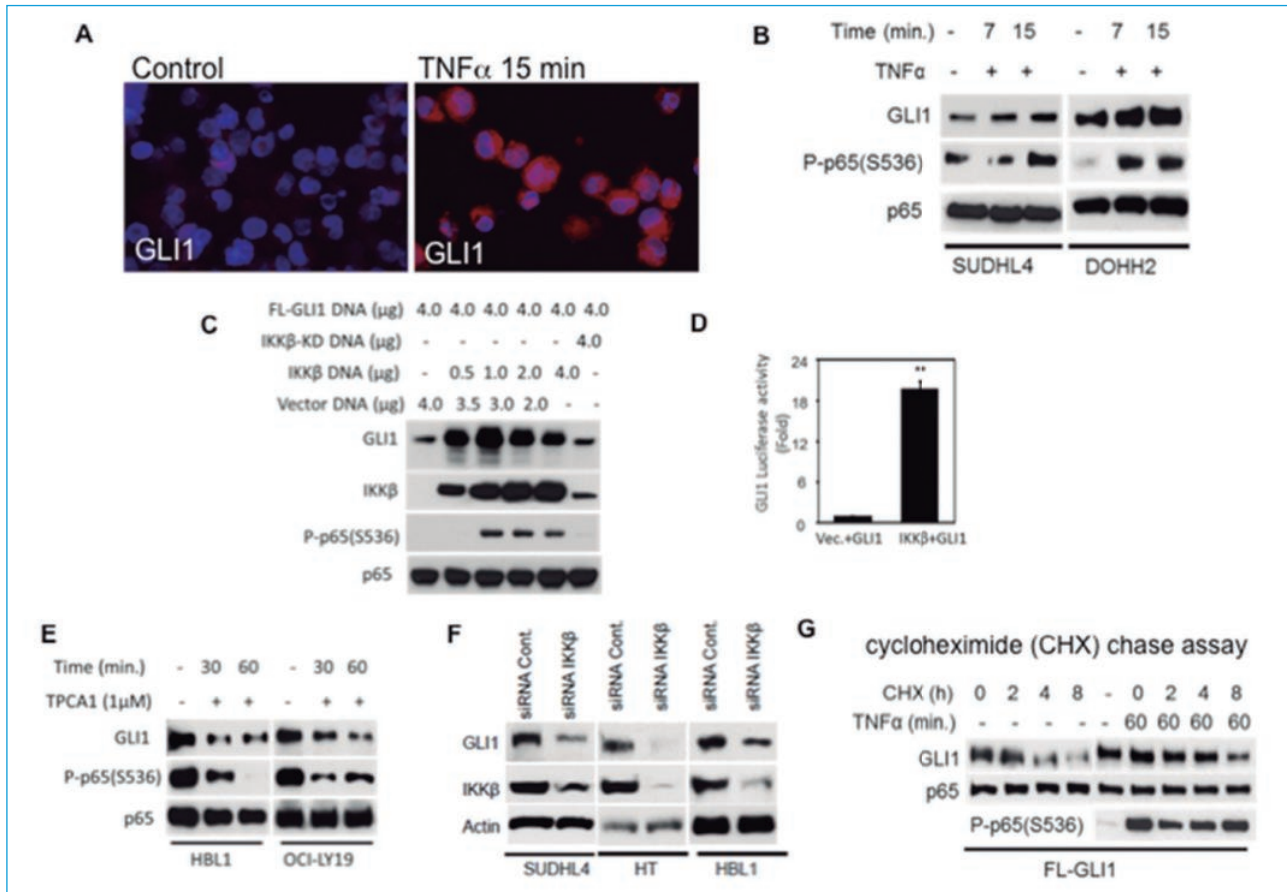


Figura 6. A. Stimulation with TNF α for 15 minutes in OCI-LY7 cells resulted in increased cytoplasmic and nuclear GLI1. B. SUDHL4 and DOHH2 cells were stimulated with or without TNF α for indicated time periods. Cell lysates were then subjected to immunoblotting. Phosphorylation of the P65 (Ser-536) subunit of NF- κ B confirmed IKK β mediated activation of the NF- κ B pathway in the TNF α stimulated cells. C. IKK β or IKK β -KD was coexpressed with vector or GLI1 in 293T cells, and total cell lysates were subjected to anti-IKK β immunoprecipitation. Bound GLI1 was detected by anti-GLI1 antibody. D. 8X GLI1 luciferase and renilla constructs were transfected into indicated cells for 48h and subjected to luciferase reporter assay. Results are normalized to renilla luciferase and expressed as fold change in relative luciferase activity compared with control. Data represent the mean and standard deviation of three independent experiments (*P < 0.05). E. HBL1 and OCI-LY19 cells were treated with or without TPCA1 (specific IKK β inhibitor) for indicated time periods. Cell lysates were then subjected to immunoblotting. F. HBL1 cells were transduced with lenti-viral particles expressing shRNA-targeting luciferase (control) and IKK β shRNAs. The transduced cells were selected with puromycin and subjected to immunoblotting. G. A cycloheximide (CHX) chase assay showed that in the presence of TNF α there is decrease in the degradation of TNF α supporting the concept that the activation of IKK β blocks the degradation of GLI1.

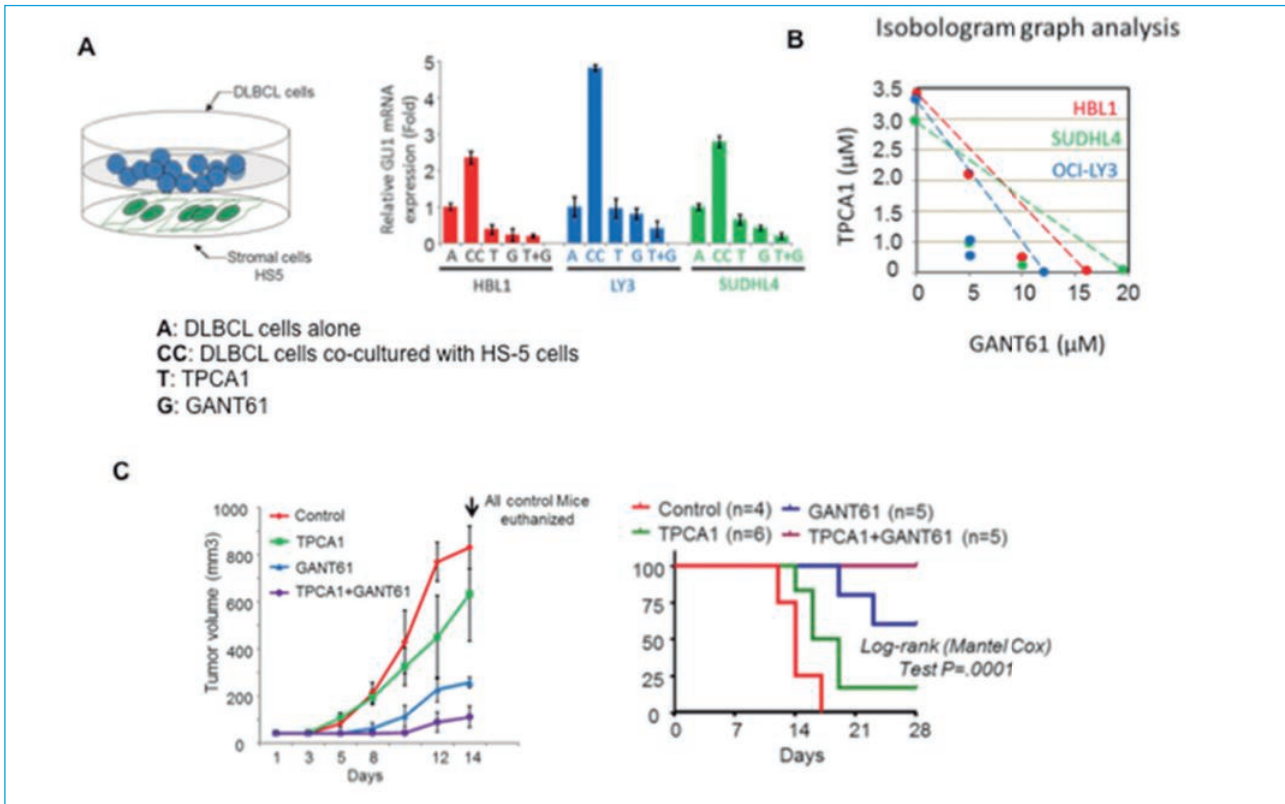


Figure 7. A. Co-culture of DLBCL cell lines with stromal cells (HS-5) in trans-well experiments. The cells were treated with or without TPCA1 and GANT61 for 24h. Cells lysates were then subjected to qRT-PCR analysis. Results are normalized to GAPDH mRNA level and expressed as fold changes in mRNA expression compared with control. Data represent the mean and standard deviation of three independent experiments (**P < 0.005; ***P < 0.0005). A, represents alone DLBCL cells; CC, represents DLBCL cells co-culture with HS-5 cells; T, represents TPCA1 and G, represents GANT61. B. For isobologram graph analysis, DLBCL cells were co-culture with HS-5, treated with or without TPCA1 and GANT61 for 48h and subjected to MTS assays. C. A xenograft experiment showed that the treatment with GANT61 plus TPCA-1 retarded significantly DLBCL growth.

References

- Blonska M, Agarwal N, Vega F. Shaping of the tumor microenvironment: Stromal cells and vessels. *Semin Cancer Biol* 2015 (in press).
- Robbins DJ, Fei DL, Riobo NA. The Hedgehog signal transduction network. *Sci Signal* 2012;5:246.
- Sacedón R, Díez B, Núñez V, Hernández-López C, Gutiérrez-Frías C, Cejalvo T, et al. Sonic hedgehog is produced by follicular dendritic cells and protects germinal center B cells from apoptosis. *J Immunol* 2005;174:1456-61.
- Kim JE, Singh RR, Cho-Vega JH, Drakos E, Davuluri Y, Khokhar FA, et al. Sonic hedgehog signaling proteins and ATP-binding cassette G2 are aberrantly expressed in diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol* 2009;22:1312-20.
- Dierks C, Grbic J, Zirikli K, Beigi R, Englund NP, Guo GR, et al. Essential role of stromally induced hedgehog signaling in B-cell malignancies. *Nat Med* 2007;13:944-51.
- Singh RR, Kim JE, Davuluri Y, Drakos E, Cho-Vega JH, Amin HM, Vega F. Hedgehog signaling pathway is activated in diffuse large B-cell lymphoma and contributes to tumor cell survival and proliferation. *Leukemia* 2010;24:1025-36.
- Singh RR, Kunkalla K, Qu C, Schlette E, Neelapu SS, Samaniego F, Vega F. ABCG2 is a direct transcriptional target of hedgehog signaling and involved in stroma-induced drug tolerance in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncogene* 2011;30:4874-86.
- Qu C, Liu Y, Kunkalla K, Singh RR, Blonska M, Lin X, et al. Trimeric G protein-CARMA1 axis links smoothed, the hedgehog receptor transducer, to NF-kappaB activation in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2013;121:4718-28.

Nuevas aproximaciones inmunoterapéuticas en el LDCBG: anticuerpos biespecíficos, terapia celular mediada por linfocitos T con CAR

S. INOGÉS SANCHO, A. LÓPEZ DÍAZ DE CERIO

Área de Terapia Celular. Clínica Universidad de Navarra. Pamplona, Navarra

Introducción

El linfoma difuso de células B grandes (LDCBG) es el linfoma no Hodgkin (LNH) más común, constituyendo un 35% de todos los LNH. Es un tumor agresivo caracterizado por un rápido crecimiento si no se trata¹. Muchos de estos pacientes no se curan con los tratamientos convencionales, por eso es necesario buscar nuevos tratamientos que se dirijan selectivamente a las células tumorales y que mejoren los resultados conseguidos con los tratamientos estándar sin aumentar la toxicidad.

La manipulación del sistema inmune se ha convertido en una alternativa muy interesante. El potencial terapéutico del sistema inmune, y de los linfocitos T citotóxicos (CTL) en particular, ha sido reconocido en neoplasias hematológicas, con la observación de enfermedad injerto contra tumor tras el trasplante alogénico, donde las células del donante reconocen aloantígenos de las células del receptor y las destruyen. Sin embargo, el trasplante alogénico se asocia a una elevada morbimortalidad debido a la enfermedad injerto contra huésped, que se produce porque las células T del donante dañan también los tejidos del receptor. Por eso es necesario el desarrollo de formas de inmunoterapia menos tóxicas que el trasplante.

Los anticuerpos monoclonales (AcMo) que reconocen específicamente antígenos en la superficie del tumor pueden ser una alternativa de inmunoterapia más selectiva. Otra vía posible es la utilización de células T dirigidas específicamente contra antígenos presentes en las células tumorales. Hay dos aproximaciones posibles: introducir los genes que codifican el TCR (del inglés *T cell receptor*) de interés o introducir genes que codifiquen CAR (del inglés *chimeric antigen receptor*). Los CAR son proteínas de fusión que incorporan moléculas de reconocimiento antigénico y dominios de activación T. Los TCR reconocen péptidos presentados por moléculas MHC (del inglés, *major histocompatibility complex*), por tanto, el reconocimiento está restringido por MHC. Sin embargo los CAR reconocen proteínas de superficie y

glicolípidos de una manera no restringida por MHC, por eso pueden utilizarse independientemente del HLA del paciente. La atención en los últimos años se ha centrado, fundamentalmente, en el desarrollo de estrategias con CAR.

Inmunoterapia con AcMo: anticuerpos biespecíficos

El rituximab es un AcMo anti-CD20 que ha revolucionado el tratamiento de los pacientes con LNH CD20+ y leucemia linfática crónica (LLC). Sin embargo, a pesar de su eficacia y de su excelente patrón de seguridad, solo una pequeña parte de los pacientes consiguen remisiones completas con rituximab como agente único. La terapia combinada con quimioterapia produce efectos clínicos superiores en la mayoría de los pacientes con LNH en comparación con la quimioterapia sola², concretamente en pacientes con LDCBG. Aunque la mayoría de los pacientes tienen una respuesta objetiva después del tratamiento inicial, algunos recaen y desarrollan resistencia a la quimioterapia y a la terapia anti-CD20³.

En los últimos años se han conocido mejor los mecanismos por los que rituximab destruye las células tumorales y se están desarrollando nuevas estrategias para mejorar la actividad de los AcMo⁴, entre las que se encuentran la utilización de anticuerpos biespecíficos.

Anticuerpos biespecíficos

Estas moléculas son construcciones artificiales en las que dos sitios de unión antígenoespecíficos de dos anticuerpos están alineados en una molécula de fusión. Para la terapia antitumoral, los anticuerpos (Ac) biespecíficos reconocen un antígeno en la célula tumoral y una molécula en la célula efectora. Son muy atractivos porque permiten la redirección de los linfocitos T a las células tumorales⁵. Además, los Ac poseen la capacidad de unirse a epítopos tumorales más allá de los péptidos presentados por MHC. Como resultado, se pueden superar mecanismos de escape inmune del tumor, como

la pérdida o regulación de MHC. Por tanto, la posibilidad dada por los Ac biespecíficos para dirigir células T policlonales a las células tumorales ha planteado mucho interés para la terapia del cáncer y se están desarrollando una gran cantidad de estos Ac con resultados clínicamente prometedores.

Los primeros Ac biespecíficos fueron generados por conjugación química o por hibridación somática. Este último método se basa en la fusión somática de dos hibridomas que expresan cada una de las especificidades deseadas (tecnología de los quadromas). Sin embargo, de esta manera el 80-90% de los Ac producidos no son los deseados y además el proceso de purificación es complejo.

Posteriormente la tecnología de los quadromas se optimizó, utilizando hibridomas de diferentes especies para las distintas especificidades. TRION Pharma, junto con Fresenius Biotech, desarrollaron varios Ac biespecíficos con una doble especificidad para un antígeno tumoral (EpCAM o HER2 o CD20) y para CD3. De esta manera, esos Ac son capaces de unirse a las células tumorales, a las células T y simultáneamente a través del fragmento Fc a las células accesorias que tienen receptores Fc. Por eso, estos Ac, que tienen 3 sitios de unión, se han descrito como trifuncionales y se llaman triomab. Catumaxomab (EpCAMxCD3) fue el primer anticuerpo de este tipo aprobado por la FDA para el tratamiento intraperitoneal de ascitis maligna en pacientes con carcinomas EpCAM+. Otros triomabs, ertumaxomab (HER2xCD3) y FBTA05 (CD20xCD3) también se han probado en ensayos clínicos en pacientes con cáncer de mama y linfomas de células B.

Con la aparición de la tecnología recombinante ha sido posible la manipulación genética de los Ac para conseguir mejores construcciones. Esta tecnología ha permitido generar combinaciones de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de las inmunoglobulinas para crear pequeños Ac biespecíficos sin dominios Fc. Esto es especialmente importante para evitar los problemas derivados de la presencia de dominios Fc, como son las señales inhibitorias de la respuesta inmune o los efectos adversos asociados a la activación no específica asociada a la liberación de citocinas. Hay dos alternativas los BiTE o TaFv (tándem scFv) y los diabodis bi-específicos (bsDb) (Figura 1).

Los BiTE (*bispecific T-cell engager*) son proteínas de fusión formadas por los scFv de los 2 Ac unidos de forma covalente por un péptido *linker* y con una orientación en tándem, de tal manera que 4 productos génicos están alineados en última instancia en una sola cadena de aproximadamente 55 kDa. La orientación en tándem de las scFv proporciona la flexibilidad necesaria para la unión simultánea a los 2 epítopes situados en dos células distintas. Estas moléculas son menos inmunogénicas que los clásicos Ac biespecíficos, llegan mejor al tumor

y son más eficientes porque permiten una mayor proximidad entre la célula tumoral y la célula efectora. Estos constructos, como no tienen dominio Fc, no reclutan células accesorias; sin embargo, la señal que producen a través de CD3 induce las 2 señales necesarias para la activación fisiológica del linfocito T y por tanto no necesitan otras señales de coestimulación.

Actualmente hay varios BiTE en estudio dirigidos contra CD3 y distintos antígenos asociados a tumor: EGFR, HER-2, CEA, EpCAM, EphA2, MCSP, CD19 y CD33. Dos de ellos, blinatumomab (CD19 x CD3) y MT110 (EpCAM y CD3) ya se están probando en ensayos clínicos en pacientes con LNH/LLA-B y en pacientes con cáncer de pulmón o colorrectal, respectivamente.

En contraste a los BiTE, los bsDbs están formados por la asociación no covalente de las dos scFv conectadas con un péptido muy corto que se opone a las interacciones intracadena, de forma que los dominios variables están orientados de forma opuesta⁶. Además hay otras alternativas para construir anticuerpos biespecíficos, pero aún están siendo evaluadas en modelos preclínicos.

Utilización de anticuerpos biespecíficos en LDCBG

No hay mucha experiencia sobre la utilización de este tipo de Ac en LDCBG, pero se han publicado ya algunos resultados que animan a investigar en esta línea. El grupo de Buhmann publicó los resultados de un estudio en 6 pacientes para evaluar la eficacia de FBTA05 (Ac trifuncional anti-CD3 x anti-CD20) en pacientes con neoplasias recurrentes de células B. En este estudio se incluyeron 3 pacientes con LLC y 3 pacientes con LNH de alto grado (2 de ellos LDCBG) refractarios a otros tratamientos. En todos los casos la administración del Ac se siguió de administración de linfocitos de donante o PBST. Los resultados de este ensayo muestran que en 4 de los 6 pacientes (todos los pacientes con LLC y uno de los dos pacientes con LDCBG) se observó respuesta al tratamiento. En el paciente con LDCBG que respondió se observó una respuesta parcial (RP) y la supervivencia fue de 486 días⁷.

Actualmente hay un ensayo clínico fase I/II en marcha (NCT 01138579) para evaluar la seguridad y la eficacia del tratamiento combinado de FBTA05 y linfocitos del donante en pacientes con neoplasias hematológicas CD20+ refractarias o en recaída después de trasplante alogénico.

Blinatumomab fue el primer BiTE usado en ensayos clínicos. Se ha evaluado su eficacia en varios tipos de LNH y leucemias, demostrando respuestas completas (RC) y RP⁸. Además, se han tratado 13 pacientes con LDCBG en una extensión del estudio MT103-104⁹. De los 13 pacientes, 2 no fueron evaluados porque no pudieron alcanzar la dosis adecuada. En 6 de los 11

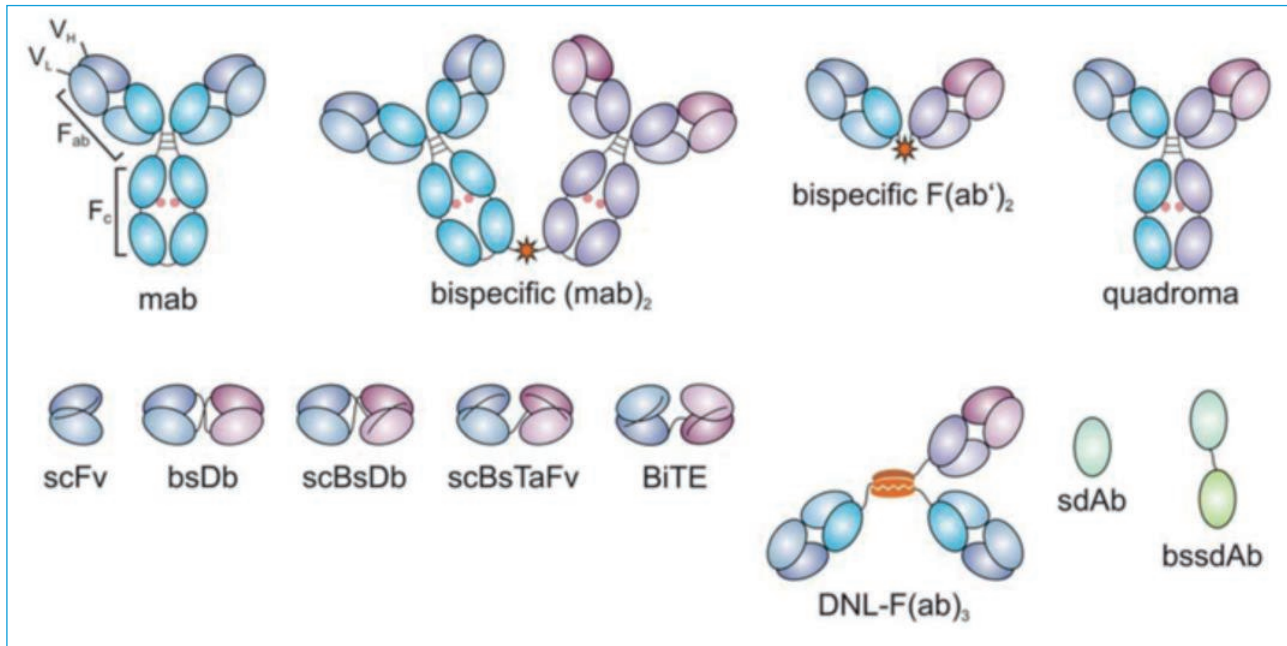


Figura 1. Evolución de anticuerpos bispecíficos. Los primeros anticuerpos bispecíficos se produjeron mediante unión química de dos anticuerpos monoclonales (mAb) o de fragmentos Fab, o por tecnología de quadroma. Posteriormente, la tecnología recombinante ha permitido la generación de pequeños anticuerpos bispecíficos con diferentes construcciones, entre los que están los BiTE y diabodies (figura tomada de Stamova et al. *Antibodies* 2012;1:172-98).

evaluables (55%) se detectaron respuestas y en 2 hubo estabilizaciones de la enfermedad. De los 6 respondedores, 4 tuvieron RC con una mediana de duración de 7,8 meses. Estos primeros datos justifican el desarrollo de otros ensayos clínicos en pacientes con LDCBG. Actualmente hay varios ensayos clínicos para evaluar la eficacia de blinatumomab, siendo uno de ellos para pacientes con LDCBG: NCT01741792⁹. En el último análisis de los 19 pacientes incluidos, 16 fueron evaluables: en el 44% se observaron respuestas objetivas que incluían 3 RC y 4 RP¹⁰.

Inmunoterapia con CAR

Un CAR (*chimeric antigen receptor*) es un receptor de antígeno construido mediante tecnología recombinante que está formado por un dominio extracelular, que es un scFv (fragmentos variables de la cadena pesada y ligera de una inmunoglobulina en una sola cadena) unido a un dominio transmembrana, que a su vez se une a uno o más dominios intracelulares de señalización de células T.

Los CAR de primera generación estaban formados por un dominio de reconocimiento antigénico (scFv) unido a un dominio de señalización citoplasmático derivado de CD3- ϵ o de la porción constante de una inmunoglobulina (FcR- γ). Aunque estos CAR se unían eficazmente a sus antígenos diana¹¹, tenían una limitada capacidad de proliferación y escasa capacidad citotóxica

debido a la carencia de moléculas de coestimulación. Por eso, en la segunda generación de CAR se incorporaron en la porción intracelular del receptor quimérico dominios de coestimulación. De esta manera se consigue tanto mejorar la persistencia de las células *in vivo* como su actividad citotóxica. Se han construido diferentes CAR de segunda generación, algunos que incorporan CD28 y otros 4-1BB, aunque no hay estudios claros que determinen cuál de los dos es mejor¹². A diferencia de los CAR de primera generación, los CAR de segunda generación han mostrado buenos resultados en distintos ensayos clínicos.

Un paso más son los CAR de tercera generación, que incorporan en el dominio citoplasmático dominios de 2 moléculas de coestimulación en tándem. Estos nuevos CAR se han probado en modelos preclínicos, pero la experiencia es aún muy limitada en ensayos clínicos¹³ (Figura 2).

Utilización de células T con CAR en LDCBG

La mayoría de los buenos resultados con estas células se han logrado en neoplasias hematológicas. El uso de CAR de segunda generación dirigidos a CD19 (CART-19) ha demostrado eficacia clínica sin precedentes incluso en algunos pacientes con LLA en recaídas y/o refractarias¹⁴ y con LLC¹⁵, proporcionando una estrategia potencialmente curativa para neoplasias malignas de células B.

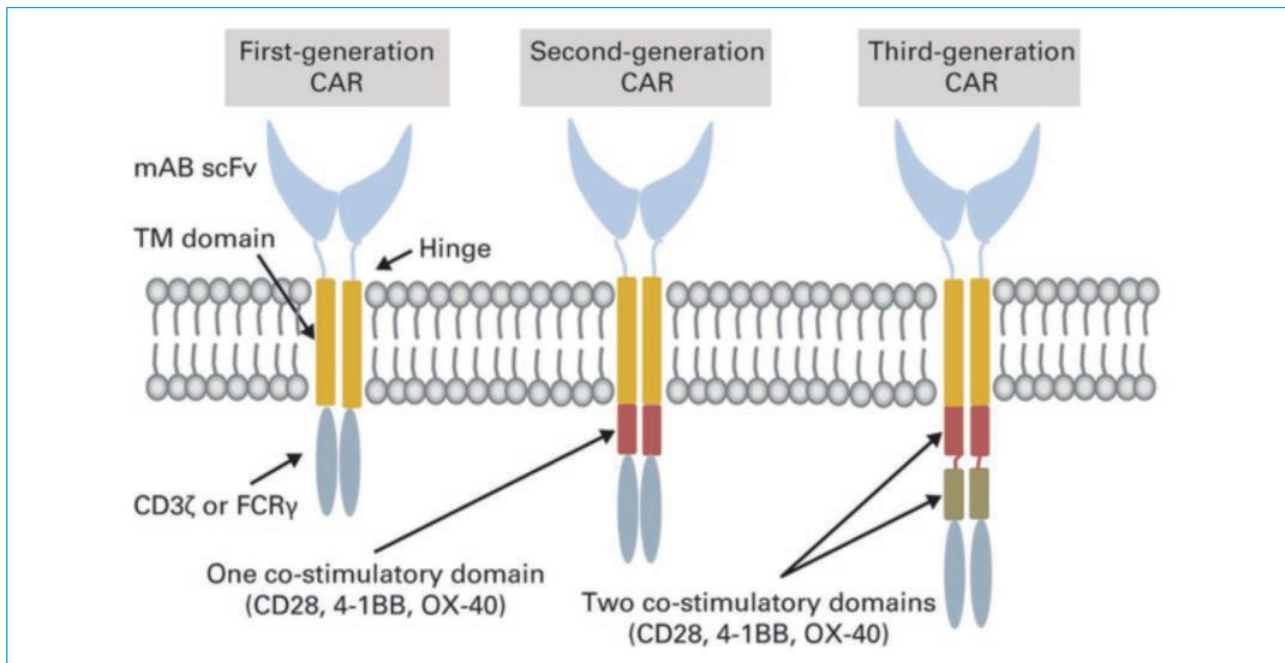


Figura 2. Estructura de receptores de antígenos quiméricos (CAR). Los CAR de primera generación se componen de un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) que reconoce específicamente el antígeno tumoral, fusionado a un dominio transmembrana (TM) vinculado al dominio citoplásmico de señalización de receptor de células T (por ejemplo, CD3- ζ o Fc receptor [FCR] cadenas γ). Los CAR de segunda generación incluyen un dominio de una señal de coestimulación (por ejemplo, CD28, el 4-1BB, OX-40) y las de tercera generación contienen dos dominios de coestimulación (por ejemplo, CD28-4-1BB, CD28-OX40) (Figura tomada de Jae H. Park, Renier J. Brentjens JCO 2015;33:651-3).

Ya se ha comenzado también a probar la estrategia en pacientes con LDCGB. Un ensayo publicado por Savoldo mostró que casi ninguno de los pacientes con LDCGB avanzado estudiados tenía una respuesta clínica objetiva después del tratamiento CART-19 en ausencia de regímenes de acondicionamiento¹⁶. Por el contrario, otro estudio preliminar comunicado en la reunión de la Sociedad Americana de Hematología (ASH-2013) demostró resultados clínicos eficaces en algunos de los pacientes con LDCGB refractarios tratados con CART-19 que habían recibido quimioterapia con citorreductores previa a la infusión de las células. Kochenderfer y cols., publican en 2015 los resultados del mismo estudio¹⁷. Este artículo es la primera demostración de que es posible inducir RC en pacientes con LDCGB refractarios a quimioterapia después de recibir células CAT-19. Incluyen 15 pacientes con neoplasias B avanzadas (9 LDCGB, 4 LLC y 2 linfomas indolentes). De los 15 pacientes, 8 tuvieron RC, 4 RP y 1 estabilización de la enfermedad (los otros 2 no fueron evaluables para respuesta). De las 8 RC, 4 fueron en pacientes con LDCGB (4/7 evaluables para respuesta). De estas 4 respuestas 3 continuaban en el momento de la publicación del artículo, con una duración entre 9-22 meses. Estos resultados demuestran que el tratamiento con CAR puede ser eficaz para el tratamiento de LDCGB refractario a quimioterapia.

Bajo la premisa de que CD20 es también una diana ideal para el tratamiento de la LNH, se han diseñado CAR anti-CD20. En un estudio piloto en 3 pacientes con neoplasias hematológicas diferentes a LDCGB se demostró la actividad antitumoral *in vivo* de células CART-20¹⁸. Tras estos primeros resultados, se ha evaluado la eficacia de estas células en LDCGB. En el trabajo publicado por Wang y cols.¹⁹ se demuestra que el tratamiento con CART-20 en combinación con acondicionamiento con quimioterapia resultó en regresiones tumorales de 3 a 6 meses en 4 de 5 pacientes evaluables. Un paciente, caracterizado como de alto riesgo y con un mal pronóstico, experimentó una RC de 14 meses duradera y permanente tras una sola infusión de CAR-T.

Conclusiones

- El LDCGB es un tumor inclurable con los tratamientos actuales, por eso es necesario buscar estrategias terapéuticas que mejoren los resultados sin aumentar la toxicidad.
- La inmunoterapia se presenta como una alternativa muy interesante para el tratamiento de estos tumores en combinación con los tratamientos estándar.
- Los anticuerpos biespecíficos, y sobre todo la terapia con células T con CAR, son dos de las estrate-

gias más prometedoras que se están desarrollando en los últimos años. Ya han mostrado resultados brillantes en distintas neoplasias hematológicas y pueden ser útiles en el LDCBG.

Bibliografía

- Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research, *Hematol. Am Soc Hematol Educ Program* 2009;pp. 523-31.
- Maloney DG. Anti-CD20 antibody therapy for B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 2012;366:2008-16.
- Cultrera JL, Dalia SM. Diffuse large B-cell lymphoma: current strategies and future directions. *Cancer Control* 2012; 19:204-13.
- Riaz W, Hernández-Ilizaliturri FJ, Czuczman MS. Strategies to enhance rituximab anti-tumor activity in the treatment of CD20-positive B-cell neoplasms. *Immunol Res* 2010;46: 192-205.
- Fournier P, Schirmacher V. Bispecific Antibodies and Trispecific Immunocytokines for Targeting the Immune System Against Cancer. *Preparing for the Future BioDrugs* 2013; 27:35-53.
- Perisic O, Webb PA, Holliger P, Winter G, Williams RL. Crystal structure of a diabody, a bivalent antibody fragment. *Structure* 1994;(12):1217-26.
- Buhmann R, Simoes B, Stanglmaier M, Yang T, Faltin M, Bund D, et al. Immunotherapy of recurrent B-cell malignancies after allo-SCT with Bi20 (FBTA05), a trifunctional anti-CD3anti-CD20 antibody and donor lymphocyte infusion. *Bone Marrow Transplantation* 2009;43:383-97.
- Nagorsen D, Kufer P, Baeuerle PA, Bargou R. Blinatumomab: a historical perspective. *Pharmacol Ther* 2012;136(3):334-42.
- Viardot A, Goebeler M, Pfreundschuh M, Adrian N, Libicher M, Degenhard E, et al. Open label phase 2 study of the bispecific T-cell engager (BiTE®) blinatumomabin patients with relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2013;122(21):1811.
- Wu B, Hijazi Y, Wolf, Brandl C, Sun YN, Zhu M. Pharmacokinetics (PK) of blinatumomab and its clinical implications. *ASCO Meeting* 2013;31:3048.
- Brocker T, Karjalainen K. Signals through T cell receptor-zeta chain alone are insufficient to prime resting T lymphocytes. *J Exp Med* 1995;181:1653-9.
- Zhong XS, Matsushita M, Plotkin J, Rivieri I, Sadelain M. Chimeric antigen receptors combining 4-1BB and CD28 signaling domains augment PI3- kinase/AKT/Bcl-XL activation and CD8T cell mediated tumor eradication. *Mol Ther* 2010;18:413-20.
- Till BG, Jensen MC, Wang J, Qian X, Gopal AK, Maloney DG, et al. CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: Pilot clinical trial results. *Blood* 2012;119:3940-50.
- Kochenderfer JN, Dudley ME, Carpenter RO, Kassim SH, Rose JJ, Telford WG, et al. Donor-derived CD19-targeted T cells cause regression of malignancy persisting after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2013;122:4129-39.
- Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 2011;365:725-33.
- Savoldo B, Ramos CA, Liu E, Mims MP, Keating MJ, Carrum G, et al. CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. *J Clin Invest* 2011;121:1822-6.
- Kochenderfer JN, Dudley ME, Kassim SH, Somerville RP, Carpenter RO, Steller-Stevenson H, et al. Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *J Clin Oncol* 2015;33:540-9.
- Till BG, Jensen MC, Wang J, Qian X, Gopal AK, Maloney DG, et al. CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: pilot clinical trial results. *Blood* 2012;119:3940-50.
- Yao W, Wen-ying Z, Qing-wang H, Yang L, Han-ren D, Ye-lei G, et al. Effective response and delayed toxicities of refractory advanced diffuse large B-cell lymphoma treated by CD20-directed chimeric antigen receptor-modified T cells. *Clinical Immunology* 2014;155:160-75.

Profilaxis del sistema nervioso central en el LBDCG: a qué pacientes, cuándo y cómo

J.M. SANCHO

Servicio de Hematología Clínica. Institut Català d'Oncologia-Hospital Germans Trias i Pujol. Institut de Recerca contra la Leucemia Josep Carreras. Badalona. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona

Introducción

La infiltración neuromeningea en pacientes con linfoma no hodgkiniano (LNH) es una complicación que ocurre de forma global en aproximadamente un 5% de los pacientes, generalmente en el transcurso de enfermedad progresiva más que como presentación inicial. Los LNH pueden invadir el sistema nervioso central (SNC) como infiltración meníngea o intraparenquimatosa y dicha infiltración tiende a situarse de manera preferente en la base del cráneo y alrededor del cordón medular¹. El pronóstico tras la infiltración en SNC es pésimo, con un deterioro en la calidad de vida de los pacientes tanto por la propia infiltración como por la toxicidad derivada de los tratamientos dirigidos contra el SNC, tales como la irradiación craneal o craneoespinal, la quimioterapia intratecal (IT) o la quimioterapia sistémica con fármacos con capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE).

Una de las circunstancias que explica la relativa baja frecuencia de recaída neuromeningea en estos pacientes, además de las estrategias de profilaxis del SNC, es la protección que ejerce la BHE. Se han postulado diversos mecanismos de infiltración neuromeningea en las neoplasias: a) extensión hematogena por diseminación arterial o a través del plexo venoso de Batson; b) extensión directa desde localizaciones tumorales contiguas; y c) migración centrípeta desde la afectación sistémica siguiendo los espacios perineurales o perivasculares². También puede producirse diseminación neuromeningea por “siembra” directa desde la sangre periférica en el líquido cefalorraquídeo (LCR) tras la realización de las punciones lumbares que se efectúan con motivo del cribado y de la profilaxis de la propia infiltración (un mecanismo más propio de las leucemias agudas).

Dado el mal pronóstico de la infiltración en SNC, con una supervivencia inferior a 6 meses³⁻⁵, resulta esencial la identificación de pacientes con riesgo de recaída de cara a decidir cuándo y cómo administrar profilaxis para dicha infiltración. Dichos factores de riesgo han sido identificados a través del análisis de grandes series

retrospectivas, con las limitaciones que ello implica. La histología del linfoma es el principal factor de riesgo para la infiltración neuromeningea y permite establecer 3 grupos de riesgo: 1) alto riesgo de recaída (> 20-25% de infiltración en SNC), en el que se incluirían los subtipos histológicos de alto grado de malignidad como el linfoma linfoblástico o el de Burkitt, y por tanto con obligatoriedad de realizar sistemáticamente profilaxis de la infiltración neuromeningea debido a su bien conocida propensión a infiltrar el SNC; 2) bajo riesgo de recaída (< 1%), constituido por los linfomas de bajo grado de malignidad o indolentes (por ejemplo, el linfoma folicular o el de la zona marginal), para los que no se recomienda, en general, profilaxis del SNC; y 3) riesgo intermedio de recaída (aproximadamente 5% de recaída en SNC), constituido por otros linfomas agresivos cuyo paradigma es el linfoma B difuso de células grandes (LBDCG), en los que no hay consenso sobre cuándo debe administrarse dicha profilaxis^{1,2,6}. Entre las dificultades para establecer un consenso sobre la profilaxis del SNC en el LBDCG están ausencia de estudios prospectivos y aleatorizados, el hecho de que la recaída en SNC no sea un acontecimiento frecuente y la heterogeneidad en el tipo y los criterios de profilaxis considerados en los diferentes estudios, que no permiten su comparación. A ello se añade el impacto de las nuevas técnicas diagnósticas más sensibles para la detección de infiltración neuromeningea oculta, como la citofluorometría multiparamétrica⁷ o la introducción del tratamiento sistémico basado en inmuoquimioterapia con rituximab.

Influencia del rituximab en la infiltración neuromeningea en LBDCG

Tras la introducción de la inmuoquimioterapia, varios estudios sugieren una disminución en la frecuencia de recaída en SNC^{4,5,8-11} respecto a la era previa a la incorporación de rituximab, lo que probablemente es un reflejo de que el mejor control sistémico del linfoma es responsable de esta disminución. Asimismo, se ha observado

un cambio en el patrón de recaídas, con predominio de recaídas más tardías (> 1 año), de recaídas de localización parenquimatosa en lugar de meníngea^{4,5,8,9,12-14} y recaídas aisladas en SNC^{4,14,15} frente a las combinadas (sistémica y en SNC). Sin embargo, otros estudios^{3,13,15-18} no han reflejado esta disminución en la frecuencia de recaída neuromeníngea con rituximab, aunque un reciente metaanálisis¹⁹ observó una disminución significativa en la incidencia de recaída neuromeníngea en los pacientes que recibieron rituximab (4,7% comparado con 5,7%, odds ratio [OR] 0,7, intervalo de confianza [IC] del 95% 0,54-0,91) (Tabla 1).

Factores de riesgo clínico-biológicos de recaída neuromeníngea

En la era previa a la introducción de rituximab varios estudios han observado un mayor riesgo de recaída neuromeníngea en pacientes con LBDCG con valores de lactatodeshidrogenasa sérica (LDH) elevados y afección extraganglionar en más de una localización en el momento del diagnóstico²⁰⁻²³ (Tabla 2). En el trabajo de Van Besien y cols.²⁰, con más de 600 pacientes con linfoma B agresivo, se observó recaída neuromeníngea en 24 (4,5%), aunque solo 11 tenían un valor de LDH sérica elevado y más de una localización extraganglionar. Estos mismos factores se describieron en un estu-

dio francés²¹, aunque tras introducir el índice pronóstico internacional (IPI) en el análisis multivariante solo este se asoció a mayor riesgo de recaída en SNC. El IPI elevado también fue un factor de riesgo de recaída neuromeníngea en un estudio del Southwest Oncology Group²⁴, junto a más de una localización extraganglionar, mientras que otro estudio nórdico²² sugiere un modelo de riesgo de recaída en SNC basado en 5 factores independientes que incluyen, entre otros, un valor de LDH sérica elevado y la infiltración de más de una localización extraganglionar.

Tras la introducción de rituximab varios estudios han analizado de manera retrospectiva la incidencia y los factores de riesgo asociados con la recaída neuromeníngea. En un estudio francés³ en pacientes de edad avanzada con LBDCG aleatorizados a R-CHOP o CHOP, el único factor de riesgo de recaída en SNC fue un IPI ajustado a edad (aaIPI) > 1, aunque este factor estaba presente en más del 60% del total de los pacientes del estudio, por lo que no parece aconsejable como único factor para guiar la profilaxis del SNC. Tras excluir el aaIPI del análisis, un valor de LDH sérica incrementado y un mal estado general (*performance status* [PS] > 1) fueron factores predictivos independientes de recaída en SNC. Otro estudio similar del grupo alemán⁴ en el que se aleatorizó a R-CHOP o CHOP cada 14 días, con profilaxis de SNC con quimioterapia IT en pacientes de

Tabla 1. Incidencia de recaída en SNC en LBDCG en la era de la inmunoquimioterapia

Autores, año ^{referencia}	N	Incidencia de recaída en SNC	Profilaxis del SNC
Feugier et al., 2004 ³	399	5,4% (R-CHOP)	No
Boehme et al., 2009 ⁴	1217 (944 LBDCG)	4,1% (R-CHOP)	Metotrexato IT si infiltración de MO, testículo, senos paranasales, órbita, cavidad oral, lengua y glándulas salivares
Shimazu et al., 2009 ⁸	403	8,4% (R-CHOP)	Metotrexato IT si infiltración de senos paranasales, testículo o vértebras
Villa et al., 2010 ⁵	435	6,4% (R-CHOP)	Metotrexato IT alterno con citarabina IT, a partir de 2002, si infiltración de senos paranasales
Yamamoto et al., 2010 ¹⁶	375	3,9% (R-CHOP)	No
Chihara et al., 2011 ¹⁸	386	5,3% (R-CHOP)	Metotrexato o citarabina IT si infiltración testicular (a partir de 1999)
Tai et al., 2011 ¹⁷	499	6% (R-CHOP)	Profilaxis IT en 82 pacientes a juicio del médico y preferencia del paciente
Mitrovic et al., 2012 ⁹	1197	2,1% (R-CHOP-like)	No
Schmitz et al., 2012 ¹⁰	2210 (1809 LBDCG)	aaIPI 0-1: 0%-0,5% (R-quimioterapia) aaIPI ≥ 2: 4,2%-9,7% (R-quimioterapia)	Metotrexato IT, en los estudios High-CHOEP y MegaCHOEP, a pacientes con infiltración de cabeza y cuello, MO o testículo
Tomita et al., 2012 ²⁹	1221	6,7% (R-CHOP)	No
Cao et al., 2012 ¹³	315	3,33% (R-CHOP)	No
Deng et al., 2013 ¹⁵	599	4,3% (R-CHOP)	-
Zhang et al., 2014 ¹⁹	4911	4,7% (R-quimioterapia)	-

SNC: sistema nervioso central; LBDCG: linfoma B difuso de célula grande; R: rituximab; CHOP: ciclofosfamida, adriamicina, vincristina y prednisona; CHOEP: ciclofosfamida, adriamicina, vincristina, etopósido y prednisona; IT: intratecal; aaIPI: Índice Pronóstico Internacional ajustado a edad; MO: médula ósea.

Tabla 2. Factores de riesgo de recaída en SNC en linfomas en la era previa a rituximab

Autores, año ^{referencia}	N	Recaída en SNC	Factores de riesgo (análisis multivariante)	Comentario
Van Besien et al., 1998 ²⁰	605*	4,5%	LDH elevada > 1 localización extraganglionar	No profilaxis del SNC
Haioun et al., 2000 ²¹	974*	1,6%	IPI elevado LDH elevada > 1 localización extraganglionar**	Profilaxis del SNC
Hollender et al., 2002 ²²	2514	5,2%	LDH elevada > 1 localización extraganglionar Albumina < 35 g/L Edad > 60 años Afección retroperitoneal	-
Boehme et al., 2007 ²³	1693*	2,2%	LDH elevada > 1 localización extraganglionar No administración de etopósido	Profilaxis del SNC (intratecal) en un 4,2% según criterio médico
Bernstein et al., 2008 ²⁴	899*	2,8%	IPI > 1 localización extraganglionar	Profilaxis del SNC solo si quimioterapia sistémica con m-BACOD o proMACE-cytaBOM

*Histología agresiva; **Tras extraer IPI.

SNC: sistema nervioso central; LDH: lactatodeshidrogenasa; IPI: Índice Pronóstico Internacional;

m-BACOD: metotrexato, bleomicina, ciclofosfamida y etopósido; proMACE: prednisona, metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida y etopósido; cytaBOM: citarabina, bleomicina, vincristina y metotrexato.

alto riesgo, encontró como factores de recaída en SNC la presencia de más de una localización extraganglionar, LDH sérica elevada y un PS > 1. Esta combinación de factores de riesgo estaba presente en el 4,8% de los pacientes, en los que la probabilidad de recaída fue de un 33,5% comparada con solo un 2,8% del resto de pacientes que recibieron R-CHOP. También la LDH sérica elevada y la afección de más de una localización extraganglionar se describieron como factores de riesgo en el análisis multivariante de una revisión de pacientes con linfoma B agresivo tratados con ensayos clínicos del German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group¹⁰, aunque la combinación de estos factores de riesgo fracasó en predecir la recaída neuromeningea en más del 70% de los casos. Un valor de LDH sérica elevado ha sido descrito también como factor de riesgo de recaída neuromeningea en otros estudios de la era del rituximab^{8,16}, así como la infiltración de más de una localización extraganglionar⁹ y un IPI intermedio-alto o alto^{10,14,16}. En el metaanálisis previamente mencionado¹⁹, tanto la LDH sérica elevada como la presencia de más de una localización extraganglionar fueron factores de riesgo independientes de recaída neuromeningea. De la misma manera, una reciente revisión²⁵ recomienda considerar como pacientes de alto riesgo de recaída en SNC a aquellos con LDH sérica elevada y más de una localización extraganglionar.

Existe controversia en cuanto a considerar la enfermedad voluminosa como factor de riesgo de recaída neuromeningea^{10,18}. Respecto a la biología del linfoma, no hay evidencia que demuestre la posible influencia

del origen de la célula B (centrogerminal o célula B activada) sobre la infiltración en SNC. Por el contrario, varios estudios han descrito una frecuencia elevada de infiltración (al diagnóstico y de recaída) en SNC en pacientes con linfoma B agresivo con *MYC* reordenado (solo o acompañado de otros reordenamientos de *BCL-2* o *BCL-6*, como ocurre en los linfomas doble o triple *hit*). Basada en estos resultados, una reciente revisión²⁵ recomienda considerar como alto riesgo de recaída neuromeningea a pacientes con LBDCG y reordenamientos del gen *MYC*.

Localizaciones extraganglionares de especial riesgo de recaída en SNC

Las dos localizaciones extraganglionares que cuentan con mayor evidencia de incrementar el riesgo de recaída en SNC son la **testicular**^{5,12,17,26,27} y la de **mama**^{17,28-31}, ya sea como localización primaria del linfoma o como extensión de un linfoma ganglionar diseminado. Así, un gran estudio de 373 pacientes con linfoma primario de testículo²⁶, en el que un 18% había recibido profilaxis neuromeningea con quimioterapia IT, encontró una frecuencia de recaída neuromeningea del 15%, similar a la de otro estudio²⁷. También la infiltración de mama supone un riesgo incrementado de recaídas en SNC, como ha reflejado un estudio retrospectivo de varios centros de EE. UU.³¹. Con solo un 9% de pacientes a los que se había administrado profilaxis del SNC, dicho estudio reveló un 16% de recaídas neuromeningeas, al igual que otro estudio coreano³⁰ (16% de recaídas neu-

romeníngeas comparadas con 0 en un grupo control de linfomas ganglionares en estadio I-II) y similar a otro francés²⁸.

Respecto a otras localizaciones extraganglionares, la evidencia de un mayor riesgo de recaída neuromeníngea es menor. En los últimos años algunos autores han señalado la infiltración **renal** por linfoma como un factor de riesgo de recaída en SNC. Así, un estudio retrospectivo³² de 52 pacientes con afección renal por LBDCG (de un total de 2.656 pacientes con LBDCG) encontró infiltración neuromeníngea en 20 (36%) de estos pacientes. En la misma línea, Tai y cols.¹⁷ observaron que la infiltración renal por linfoma fue el factor de riesgo más potente de recaída en SNC, superior incluso a la infiltración de mama o la testicular. En lo que se refiere a la infiltración de **médula ósea**, a pesar de los resultados de estudios de la era prerrituximab, un estudio más reciente que investigó específicamente la infiltración de médula ósea en LBDCG encontró que esta infiltración solo se asoció a mayor riesgo de recaída en SNC si se acompañaba de LDH elevada³³. Por otra parte, en un reciente metaanálisis¹⁹, tanto la infiltración de médula ósea como la testicular constituyeron factores independientes de riesgo de recaída neuromeníngea. Otra localización extraganglionar que se ha asociado a mayor riesgo de recaída en SNC es el **espacio epidural**, aunque la evidencia procede de estudios antiguos. En un amplio estudio retrospectivo japonés²⁹, la infiltración ósea o la de glándula suprarrenal constituyeron, además de la afección de mama, factores de riesgo independientes de recaída en SNC. La afección extraganglionar **craneofacial** (órbita, senos paranasales y cavidad oral), que ha sido utilizada como factor de riesgo para guiar la administración de profilaxis del SNC, no parece asociarse a mayor infiltración neuromeníngea, como se ha visto en 2 recientes estudios. En el primero de ellos, del German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group³⁴, no se encontraron diferencias en la incidencia acumulada de enfermedad en SNC entre pacientes con y sin afección craneofacial (1,6% frente a 3,4%, $p = 0,682$) en pacientes tratados con rituximab. Tampoco se observaron diferencias en la frecuencia de infiltración en SNC en función de la profilaxis IT con metotrexato (infiltración en 4,2% con profilaxis frente a 2,3% sin profilaxis, $p = 0,981$). Esto llevó a los autores a sugerir que rituximab elimina el riesgo de recaída neuromeníngea en pacientes con infiltración extraganglionar craneofacial, hallazgo similar al de otro estudio³⁵.

Tipo de profilaxis de la infiltración neuromeníngea

A pesar de la identificación de los factores de riesgo mencionados anteriormente, existe una amplia controversia acerca de la utilidad y el tipo de profilaxis que se

debe administrar a los pacientes con LBDCG y riesgo elevado de recaída neuromeníngea. Una vez más, la falta de estudios aleatorizados es la principal dificultad para extraer conclusiones válidas. Un estudio en centros españoles⁶ identificó el tratamiento intratecal triple (ITT, con metotrexato, citarabina e hidrocortisona) como la pauta de quimioterapia más frecuentemente utilizada tanto para la profilaxis como para el tratamiento de la infiltración en SNC en pacientes con linfoma, reflejo de la estrategia de profilaxis utilizada en los protocolos de leucemia aguda linfoblástica. Sin embargo, la evidencia de la utilidad de la profilaxis con quimioterapia IT ha sido cuestionada en algunos estudios retrospectivos y metaanálisis de la era de la inmunquimioterapia con rituximab^{10,14,19,36}, con la excepción, tal vez, del linfoma testicular²⁶, lo que podría tener relación con la falta de eficacia de la quimioterapia IT en la recaída parenquimatosa, más propia de la era del rituximab. La alternativa a la utilización de quimioterapia IT es la utilización de quimioterapia sistémica con fármacos con capacidad de atravesar la BHE, fundamentalmente metotrexato o citarabina a dosis elevadas. Los estudios con esta estrategia son todavía escasos³⁷⁻⁴⁰ y difíciles de interpretar debido a la variabilidad en la consideración de los criterios de alto riesgo de recaída en SNC o en la pauta y dosis de quimioterapia sistémica (Tabla 3). Sin embargo, se ha descrito una baja incidencia de recaída en SNC con la adición de metotrexato intravenoso a dosis de 1,5-3,5 g/m² de forma posterior o alterno con los ciclos de R-CHOP-*like*^{38,40}, aunque la toxicidad asociada con esta estrategia de profilaxis hace que deba ser evaluada cuidadosamente en pacientes de edad avanzada, a la vez que puede comprometer la administración programada de la quimioterapia con R-CHOP.

Conclusiones

La infiltración neuromeníngea en pacientes con LBDCG es una complicación poco frecuente que se asocia a mal pronóstico. Es importante conocer los factores de riesgo de dicha infiltración para poder administrar una profilaxis adecuada dirigida al SNC. Sin embargo, aunque se dispone de mucha información, esta procede mayoritariamente de estudios retrospectivos y heterogéneos en cuanto a la población de pacientes incluida, tratamiento sistémico y en los criterios para administrar profilaxis de la recaída en SNC.

- La introducción de la inmunquimioterapia basada en rituximab parece asociarse con una tendencia a una menor frecuencia de recaídas en SNC, e incluso con un cambio en el patrón de dichas recaídas (parenquimatosas en lugar de leptomeníngeas y más tardías en comparación con la era previa al rituximab).

Tabla 3. Estudios de profilaxis de la infiltración neuromeningea con quimioterapia sistémica

Autores, año ^{referencia}	N	Incidencia de recaída en SNC	Pauta de quimioterapia y profilaxis del SNC
Adde et al., 2006 ³⁷	38	6%	R-CHOEP-14 + citarabina 3 g/m ² /12h (2 dosis)
Abramson et al., 2010 ³⁸	65	3%	R-CHOP + metotrexato 3,5 g/m ² (3 dosis)
Récher et al., 2011 ³⁹	196 183	0 2%	R-ACVBP + metotrexato 2 g/m ² (2 dosis) + R-ifosfamida-etopósido + citarabina 100 mg/m ² (2 dosis) R-CHOP + metotrexato IT
Holte et al., 2013 ⁴⁰	156	4,5%	R-CHOEP-14 + citarabina 3 g/m ² /12h (4 dosis) + metotrexato 3 g/m ² (1 dosis)

SNC: sistema nervioso central; R: rituximab; CHOP: ciclofosfamida, adriamicina, vincristina y prednisona; CHOEP: ciclofosfamida, adriamicina, vincristina, etopósido y prednisona; ACVBP: doxorubicina, ciclofosfamida, vindesina, bleomicina, y prednisona; IT: intratecal.

- Respecto a los factores de riesgo, los valores de LDH sérica elevados junto con más de una localización extraganglionar se asocian a una mayor frecuencia de recaída neuromeningea en estudios tanto de la era prerrituximab como postrituximab, aunque administrar profilaxis solo en presencia de ambos factores no parece suficiente para prevenir todas las recaídas.
 - Los pacientes con infiltración testicular o de mama tienen claramente un elevado riesgo de recaída, y posiblemente también los que tienen infiltración renal o epidural, así como los que presentan reordenamientos del gen *MYC*, aunque posiblemente hagan falta más estudios que investiguen estos aspectos.
 - A pesar del mayor riesgo de recaída neuromeningea en presencia de algunos de dichos factores, no está clara la estrategia de profilaxis (intratecal o con quimioterapia sistémica) que se debe administrar a estos pacientes, debido, nuevamente a la ausencia de estudios aleatorizados.
- Sancho JM, Morgades M, Alonso N, Deben G, Fernández de Sevilla A, Vázquez L, et al, on behalf of investigators of QUIT Study (PETHEMA, GELTAMO and GOTEL Groups). Prospective study on the practice of central nervous system prophylaxis and treatment in non-Hodgkin's lymphoma in Spain. *Med Clin (Barc)* 2008;131:441-6.
 - Sancho JM, Orfao A, Quijano S, García O, Panizo C, Pérez-Ceballos E, et al. (For the Spanish Group for the Study of CNS Disease in NHL). Clinical significance of occult cerebrospinal fluid involvement assessed by flow cytometry in non Hodgkin's lymphoma patients at high risk of central nervous system disease in the rituximab era. *Eur J Haematol* 2010;85:321-38.
 - Shimazu Y, Notohara K, Ueda Y. Diffuse large B-cell lymphoma with central nervous system relapse: prognosis and risk factors according to retrospective analysis from a single-center experience. *Int J Hematol* 2009;89:577-83.
 - Mitrovic Z, Bast M, Bierman PJ, Bociek RG, Vose JM, Chan WC, et al. The addition of rituximab reduces the incidence of secondary central nervous system involvement in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2012;157:401-3.
 - Schmitz N, Zeynalova S, Glass B, Kaiser U, Cavallin-Stahl E, Wolf M, et al. CNS disease in younger patients with aggressive B-cell lymphoma: an analysis of patients treated on the Mabthera International Trial and trials of the German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group. *Ann Oncol* 2012;23:1267-73.
 - Wilson WH, Bromberg JE, Stetler-Stevenson M, Steinberg SM, Martin-Martin L, Muñoz C, et al. Detection and outcome of occult leptomeningeal disease in diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma. *Haematologica* 2014;99:1228-35.
 - Guirguis HR, Cheung MC, Mahrous M, Piliotis E, Berinstein N, Imrie KR, et al. Impact of central nervous system (CNS) prophylaxis on the incidence and risk factors for CNS relapse in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era: a single centre experience and review of the literature. *Br J Haematol* 2012;159:39-49.
 - Cao B, Zhou X, Ji D, Cao J, Guo Y, Zhang Q, et al. Central Nervous system involvement in adult patients with diffuse large B-cell lymphoma: Influence of rituximab. *Oncol Lett* 2012;4:541-5.
 - Kumar A, Vanderplas A, LaCasce AS, Rodríguez MA, Crosby AL, Lepisto E, et al. Lack of benefit of central nervous system prophylaxis for diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era: findings from a large national database. *Cancer* 2011; 118:1-8.
 - Deng L, Song Y, Zhu J, Zheng W, Wang X, Xie Y, et al. Secondary central nervous system involvement in 599 patients with diffuse large B-cell lymphoma: are there any changes in the rituximab era? *Int J Hematol* 2013;98:664-71.

Bibliografía

- Colocci N, Glantz M, Recht L. Prevention and treatment of central nervous system involvement by non-Hodgkin's lymphoma: A review of the literature. *Semin Neurol* 2004;24:395-404.
- Chamberlain MC. Neoplastic meningitis. *J Clin Oncol* 2005;23:3605-13.
- Feugier P, Virion JM, Tilly H, Haioun C, Marit G, Macro M, et al. Incidence and risk factors for central nervous system occurrence in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma: influence of rituximab. *Ann Oncol* 2004;15:129-33.
- Boehme V, Schmitz N, Zeynalova S, Loeffler M, Pfreundschuh M. CNS events in elderly patients with aggressive lymphoma treated with modern chemotherapy (CHOP-14) with or without rituximab: an analysis of patients treated in the RICOVER-60 trial of the German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group (DSHNHL). *Blood* 2009;113:3896-902.
- Villa D, Connors JM, Shenkier TN, Gascoyne RD, Sehn LH, Savage KJ. Incidence and risk factors for central nervous system relapse in patients with diffuse large B-cell lymphoma: the impact of the addition of rituximab to CHOP chemotherapy. *Ann Oncol* 2010;21:1046-52.

16. Yamamoto W, Tomita N, Watanabe R, Hattori Y, Nakajima Y, Hyo R, et al. Central nervous system involvement in diffuse large B cell lymphoma. *Eur J Haematol* 2010;85:6-10.
17. Tai WM, Chung J, Tang PL, Koo YX, Hou X, Tay KW, et al. Central nervous system (CNS) relapse in diffuse large B cell lymphoma (DLBCL): pre- and post-rituximab. *Ann Hematol* 2011;90:809-18.
18. Chihara D, Oki Y, Matsuo K, Onoda H, Taji H, Yamamoto K, et al. Incidence and risk factors for central nervous system relapse in patients with diffuse large B-cell lymphoma: analyses with competing risk regression model. *Leuk Lymphoma* 2011;52:2270-5.
19. Zhang J, Chen B, Xu X. Impact of rituximab on incidence of and risk factors for central nervous system relapse in patients with diffuse large B-cell lymphoma: a systematic review and meta-analysis. *Leuk Lymphoma* 2014;55:509-14.
20. Van Besien K, Ha CS, Murphy S, McLaughlin P, Rodriguez A, Amin K, et al. Risk factors, treatment, and outcome of central nervous system recurrence in adults with intermediate-grade and immunoblastic lymphoma. *Blood* 1998;91:1178-84.
21. Haioun C, Besson C, Lepage E, Thieblemont C, Simon D, Rose C, et al. Incidence and risk factors of central nervous system relapse in histologically aggressive non-Hodgkin's lymphoma uniformly treated and receiving intrathecal central nervous system prophylaxis: A GELA study on 974 patients. *Ann Oncol* 2000;11:685-90.
22. Hollender A, Kvaloy S, Nome O, Skovlund E, Lote K, Holte H. Central nervous system involvement following diagnosis of non-Hodgkin's lymphoma: a risk model. *Ann Oncol* 2002;13:1099-107.
23. Boehme V, Zeynalova S, Kloess M, Loeffler M, Kaiser U, Pfreundschuh M, et al. Incidence and risk factors of central nervous system recurrence in aggressive lymphoma—a survey of 1693 patients treated in protocols of the German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group (DSHNHL). *Ann Oncol* 2007;18:149-57.
24. Bernstein SH, Unger JM, Leblanc M, Friedberg J, Miller TP, Fisher RI. Natural history of CNS relapse in patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma: a 20-year follow-up analysis of SWOG 8516 – the Southwest Oncology Group. *J Clin Oncol* 2009;27:114-9.
25. Fletcher CD, Kahl BS. Central nervous system involvement in diffuse large B-cell lymphoma: an analysis of risks and prevention strategies in the post-rituximab era. *Leuk Lymphoma* 2014;55:2228-40.
26. Zucca E, Conconi A, Mughal TI, Sarris AH, Seymour JF, Vitolo U, et al. Patterns of outcome and prognostic factors in primary large-cell lymphoma of the testis in a survey by the International Extranodal Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol* 2003;21:20-7.
27. Hasselblom S, Ridell B, Wedel H, Norrby K, Sender Baum M, Ekman T. Testicular lymphoma—a retrospective, population-based, clinical and immunohistochemical study. *Acta Oncol* 2004;43:758-65.
28. Gholam D, Bibeau F, El Weshi A, Bosq J, Ribrag V. Primary breast lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2003;44:1173-8.
29. Tomita N, Yokoyama M, Yamamoto W, Watanabe R, Shimazu Y, Masaki Y, et al. Central nervous system event in patients with diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Cancer Sci* 2012;103:245-51.
30. Yhim HY, Kim JS, Kang HJ, Kim SK, Kim WS, Choi ChW, et al. Matched-pair analysis comparing the outcomes of primary breast and nodal diffuse large B-cell lymphoma in patients treated with rituximab plus chemotherapy. *Int J Cancer* 2012;131:235-43.
31. Hosein PJ, Maragulia JC, Salzberg MP, Press OW, Habermann TM, Vose JM, et al. A multicentre study of primary breast diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Br J Haematol* 2014;165:358-63.
32. Villa D, Connors JM, Sehn LH, Gascoyne RD, Savage KJ. Diffuse large B-cell lymphoma with involvement of the kidney: outcome and risk of central nervous system relapse. *Haematologica* 2011;96:1002-07.
33. Lee KW, Yi J, Choi IS, Kim JH, Bang SM, Kim DW, et al. Risk factors for poor treatment outcome and central nervous system relapse in diffuse large B-cell lymphoma with bone marrow involvement. *Ann Hematol* 2009;88:829-38.
34. Murawski N, Held G, Ziepert M, Kempf B, Viardot A, Hänel M, et al. The role of radiotherapy and intrathecal CNS prophylaxis in extralymphatic craniofacial aggressive B-cell lymphomas. *Blood* 2014;124:720-8.
35. Lee GW, Go SI, Kim SH, Hong J, Kim YR, Oh S, et al. Clinical outcome and prognosis of patients with primary sinonasal tract diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP chemotherapy: A study by the Consortium for Improving Survival of Lymphoma (CISL). *Leuk Lymphoma* 2015;56:1020-6.
36. Pfreundschuh M, Schubert J, Ziepert M, Schmits R, Mohren M, Lengfelder E, et al. Six versus eight cycles of bi-weekly CHOP-14 with or without rituximab in elderly patients with aggressive CD20+ B-cell lymphomas: a randomised controlled trial (RICOVER-60). *Lancet Oncol* 2008;9:105-16.
37. Adde M, Enblad GG, Hagberg H, Sundström C, Laurell A. Outcome for young high-risk aggressive B-cell lymphoma patients treated with CHOEP-14 and rituximab (R-CHOEP-14). *Med Oncol* 2006;23:283-93.
38. Abramson JS, Hellmann M, Barnes J, Hammerman P, Toomey C, Takvorian T, et al. Intravenous methotrexate as central nervous system (CNS) prophylaxis is associated with a low risk of CNS recurrence in high-risk patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer* 2010;116:4283-90.
39. Récher C, Coiffier B, Haioun C, Molina TJ, Fermé C, Casasnovas O, et al. Intensified chemotherapy with ACVBP plus rituximab versus standard CHOP plus rituximab for the treatment of diffuse large B-cell lymphoma (LNH03-2B): an open-label randomised phase 3 trial. *Lancet* 2011;379:1858-67.
40. Holte H, Leppä S, Björkholm M, Fluge O, Jyrkkö S, Delabie J, et al. Dose-densified chemoimmunotherapy followed by systemic central nervous system prophylaxis for younger high-risk diffuse large B-cell/follicular grade 3 lymphoma patients: results of a phase II Nordic Lymphoma Group study. *Ann Oncol* 2013;24:1385-92.

Leucemias agudas. Progresos en el diagnóstico y tratamiento de la leucemia mieloblástica aguda

COORDINADORES: **J. SERRANO LÓPEZ.** *Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba*
P. MONTESINOS. *Hospital Clínico Universitario La Fe. Valencia*

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una neoplasia marcada por su heterogeneidad tanto biológica como clínica. En la última década los avances en la caracterización biológica de la enfermedad han sido relevantes y pioneros en la aplicación de las más modernas técnicas moleculares y de secuenciación. Sin embargo, los extraordinarios conocimientos adquiridos en la biología de la LMA deben aún reflejarse en cambios en las estrategias terapéuticas.

En la primera ponencia, el Dr. Jordi Esteve resumirá los modelos actuales de integración de los datos biológicos en la categorización pronóstica y de riesgo en los pacientes afectados de LMA y su posible impacto en las decisiones terapéuticas en distintos ámbitos. Así, el diseño de estrategias globales de tratamiento adaptadas al riesgo resulta esencial para la elección de terapias en los pacientes de mayor edad, elección óptima del tratamiento postremisión en pacientes candidatos a alo-TPH y la posibilidad de inclusión en ensayos clínicos que exploren fármacos dirigidos a dianas específicas. El papel de algunos de estos prometedores nuevos fármacos es revisado por el Dr. Miguel Ángel Sanz, incluyendo los resultados de los más novedosos ensayos clínicos internacionales que generan grandes expectativas, con la visión crítica que solamente un experto con tan dilatada experiencia nos puede aportar (“cada mutación que se identifica y se comprende su papel en la leucemogénesis representa una oportunidad terapéutica”). El paradigma por excelencia en el que se cumple dicha premisa lo constituye, hoy en día, la leucemia aguda promielocítica. Así, el Dr. Francesco Lo-Coco, para concluir este simposio, revisará los aspectos más novedosos, retos actuales y aspectos futuros en dicha leucemia, como el tratamiento en subgrupos de alto riesgo y de los pacientes en recaída, intentando minimizar los riesgos y la toxicidad.

Impacto de la caracterización biológica en la estratificación pronóstica y tratamiento de la leucemia mieloide aguda: tratamiento adaptado al riesgo

J. ESTEVE REYNER^{1,2}, M. DÍAZ-BEYÁ^{1,2}, D. ESTEBAN CORREDERA¹, M. PRATCORONA CANELA^{1,2,3}

¹Servicio de Hematología. Hospital Clínic. IDIBAPS (Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer). Barcelona. ²Instituto de Investigación contra la Leucemia Josep Carreras (IJC). Barcelona. ³Servicio de Hematología.

Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona

Estratificación pronóstica en la leucemia mieloide aguda

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una enfermedad muy heterogénea, tanto desde el punto de vista clínico como biológico, resultado de diversas alteraciones genéticas que cooperan entre sí y que conducen a la transformación neoplásica de los precursores hemopoyéticos en los que se origina la enfermedad. Los estudios de secuenciación completa del genoma han permitido descubrir gran parte de las mutaciones responsables del proceso leucemogénico, su incidencia relativa y las interacciones entre ellas; en algunos casos se empiezan a conocer las consecuencias funcionales de dichas mutaciones. Así, dentro del espectro amplio de la LMA, reconocemos ya diversas entidades diferenciadas y bien caracterizadas desde el punto de vista molecular, con mecanismos fisiopatológicos diversos, con una historia natural específica, y esta naturaleza múltiple se reconoce en la clasificación de la OMS de la LMA. El análisis del impacto pronóstico de algunas de estas mutaciones ha contribuido a formular clasificaciones con una estratificación pronóstica, de aplicabilidad clínica, a partir de la caracterización en el momento del diagnóstico en el ámbito citogenético y del análisis molecular de algunas mutaciones con claro valor predictivo, en especial las que implican a los genes *NPM1*, *FLT3* y *CEBPA*. Entre estas clasificaciones pronósticas de uso clínico extendido destacan la clasificación citogenética revisada del grupo británico MRC-NCRI y la del grupo de expertos de la European LeukemiaNet (ELN), que combina características citogenéticas y moleculares^{1,2} (Tabla 1). Lógicamente, existen otras propuestas de estratificación pronóstica basadas en la caracterización genética al diagnóstico, aunque la mayoría comparten “lugares comunes” entre sí.

Estas clasificaciones pronósticas, pese a su indudable utilidad clínica, presentan algunas limitaciones evidentes, como la incapacidad para estratificar subgrupos citogenéticos o anomalías genéticas de baja frecuencia, o las derivadas de la complejidad intrínseca de la enfer-

medad, con interacción de diversas mutaciones. Así, la multiplicidad de mutaciones de valor pronóstico diverso que pueden concurrir en un mismo paciente puede resultar en una predicción incierta. Este sería el caso de los pacientes con LMA con reordenamiento de *core-binding factor* (LMA-CBFR), considerada de buen pronóstico, y su frecuente asociación a mutaciones activadoras en genes codificantes de proteínas con actividad tirosina cinasa en vías de señalización celular, como RAS o KIT, asociadas por lo general a un pronóstico desfavorable³. Por otra parte, otras características propias de una mutación determinada, como pueda ser la proporción de población leucémica portadora de la misma (carga alélica) en el caso de las mutaciones subclonales o características intrínsecas del tipo de mutación pueden modificar su impacto pronóstico. Este es el caso de la mutación *FLT3*-ITD (*FLT3* internal tandem duplication), en la que la carga alélica, el tamaño de la inserción o la región donde se produce dicha inserción modulan el efecto pronóstico adverso de dicha mutación^{4,5}.

La identificación de otras mutaciones individuales con un potencial valor pronóstico añadido, como es el caso de las mutaciones de *RUNX1*, *DNMT3A*, *IDH1-2*, *ASXL1* o *TP53*, entre otras, podrían refinar la estratificación pronóstica de las clasificaciones anteriormente mencionadas, como en un modelo más recientemente propuesto basado únicamente en mutaciones moleculares⁶ (Tabla 1). El valor pronóstico de estas mutaciones, sin embargo, no se observa en todos los estudios realizados. Estas diferencias pueden ser debidas a las características propias de la población analizada o del tratamiento recibido⁷. A su vez, otros estudios han mostrado cómo la sobreexpresión de determinados genes, como *EVI1*, *BAALC* o *ERG*, o determinados perfiles más complejos de expresión génica, algunos de ellos claramente relacionados con características de inmadurez (*stem-cellness*) de la población leucémica, permiten la identificación de grupos de pacientes de riesgo elevado, que presentan mayor quimiorresistencia⁸⁻¹⁰. No obstante, dichos estudios que proponen firmas génicas con valor pronóstico, aunque son de un

Tabla 1. Estratificación pronóstica de la LMA según tres modelos: basado en citogenética (grupo MRC), combinación citogenética-molecular (European LeukemiaNet) y según mutaciones genéticas (Grossmann, 2012)

Clasificación	Grupos de riesgo	Subtipos
Clasificación citogenética MRC-NCRI ¹	Favorable	LPA con t(15;17)(q22;q21) t(8;21)(q22;q22) inv(16)(p13.1;q22) o t(16;16)(p13.1;q22)
	Intermedia	Otras anomalías no favorables ni desfavorables
	Desfavorable	add(5q), del(5q), -5 -7, add(7q)/del(7q) inv(3) o t(3;3)(q21;q26.2) t(11q23) excepto t(9;11) y t(11;19) t(9;22)(q34;q11) -17/abn(17p) Cariotipo complejo (> 3 alteraciones)
Clasificación genética de la European LeukemiaNet ²	Riesgo favorable	t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16) o t(16;16) (p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> Mutación <i>NPM1</i> sin FLT3-ITD (cariotipo normal) Mutación bialélica de <i>CEBPA</i> (cariotipo normal)
	Intermedio-I	Mutación <i>FLT3-ITD</i> con/sin mutación <i>NPM1</i> (c. normal) <i>NPM1</i> germinal sin FLT3-ITD (c. normal)
	Intermedio-II	t(9;11)(p22;q23); <i>MLL3-MLL</i> Otras anomalías
	Alto	inv(3)(q21;q26) o t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVI1</i> t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11)(v;q23); <i>MLL rearranged</i> -5 or del(5q); -7; abn(17p); cariotipo complejo (≥ 3)
Modelo pronóstico jerárquico basado en mutaciones ⁶	Muy favorable	PML-RARA (LPA) Mutación bialélica de <i>CEBPA</i>
	Favorable	CBF-r: <i>RUNX1-RUNX1T1</i> , <i>CBFB-MYH11</i> Mutación <i>NPM1</i> sin FLT3-ITD
	Intermedia	FLT3-ITD+ Ausencia de mutaciones <i>NPM1</i> , <i>CEBPA</i> , FLT3-ITD
	Desfavorable	MLL-PTD; mutaciones de <i>RUNX1</i> o <i>ASXL1</i>
	Muy desfavorable	Mutación <i>TP53</i>

LPA: leucemia promielocítica aguda; CBF-r: reordenamiento *core binding factor* (*RUNX1* o *CFBbeta*); abn(17): anomalías en cromosoma 17p; MLL-PTD: *MLL partial tandem duplication*.

interés conceptual indudable y pueden proporcionar ventajas teóricas sobre las clasificaciones pronósticas basadas en un número limitado de marcadores moleculares, resultan difíciles de implementar, por el momento, en la práctica asistencial habitual para la toma de decisiones.

Más recientemente, el mayor conocimiento del significado y secuencias de RNA no codificante (*non-coding RNA*, ncRNA), como RNA de pequeño tamaño (microRNA) o de mayor tamaño (*long non-coding RNA*, lncRNA),

que parecen jugar un papel esencial en la regulación de la expresión génica y postranscripcional del mRNA en múltiples procesos celulares, ha llevado a analizar su papel en la LMA, donde parecen tener también un papel relevante. En consecuencia, no sorprende que algunos de estos ncRNA aporten información pronóstica adicional, dentro de determinadas categorías moleculares, de acuerdo con estudios recientes^{11,12}.

La complejidad del perfil mutacional de cada caso individual de LMA, cada vez más accesible gracias a

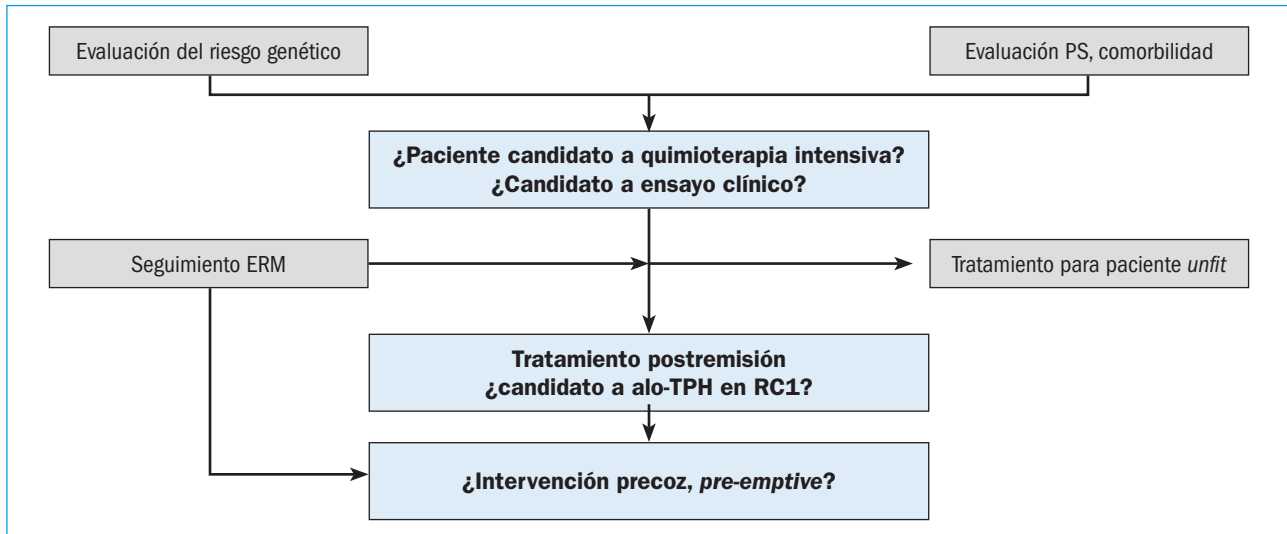


Figura 1. Etapas básicas en el diseño de tratamiento adaptado al riesgo en los pacientes con LMA.

las técnicas de ultrasecuenciación de múltiples genes de interés (*targeted next-generation sequencing*, NGS), dificulta, de manera paradójica, la sistematización de la estratificación pronóstica basada en mutaciones génicas individuales, al ser cada paciente portador prácticamente de una combinación única. En este contexto, el análisis secuencial de la enfermedad residual mínima (ERM) se está revelando como una estrategia pronóstica con un gran potencial, como alternativa o método complementario a la estratificación pronóstica basada únicamente en el análisis genético inicial. La determinación evolutiva de la ERM proporciona una información dinámica de la población leucémica residual, supone una evaluación precisa de la respuesta al tratamiento en las distintas fases del mismo y ofrece información pronóstica clínicamente relevante en distintos puntos temporales. De alguna manera, la ERM es una herramienta que permite recapitular o condensar la complejidad biológica de la LMA al diagnóstico y, a la vez, revelar la sensibilidad al tratamiento administrado. Un ejemplo del potencial de la evaluación de la ERM en la LMA lo constituye el valor predictivo de la monitorización de *NPM1mut* en los enfermos con LMA asociada a mutación de *NPM1*, al tratarse de un marcador molecular estable cuyo análisis cuantitativo ha permitido definir puntos de corte con un valor clínico evidente en la predicción de la recidiva^{13,14}. Además, en enfermos sin un marcador molecular adecuado en la actualidad para el seguimiento de la ERM, el desarrollo de nuevas estrategias de secuenciación de última generación (NGS) permitirá identificar diversos marcadores específicos, aplicables para una evaluación individualizada de la ERM, propia de cada paciente.

Tratamiento adaptado al riesgo: pacientes jóvenes

La caracterización biológica de la LMA puede determinar la elección del tratamiento en distintos ámbitos, desde la predicción de la respuesta al tratamiento quimioterápico convencional, el potencial beneficio de determinadas modificaciones del tratamiento, hasta el empleo de dosis escaladas de antraciclinas o ara-C o la adición del anticuerpo monoclonal conjugado gemtuzumab-ozogamycin (GO, Mylotarg®), el tratamiento postremisión óptimo, o la posibilidad de inclusión en ensayos clínicos con fármacos dirigidos a dianas moleculares.

Una de las consecuencias de la caracterización biológica de la LMA al diagnóstico con mayor aplicación actual es la elección del tratamiento postremisión en los pacientes jóvenes en primera remisión completa (RC1) y, en especial, el potencial beneficio de la realización de un trasplante alogénico de progenitores hemopoyéticos (aloTPH) en esta fase. La elevada morbilidad del procedimiento requiere una cuidadosa evaluación del balance de riesgo-beneficio asociado a cada caso. En general, la indicación de alo-TPH en RC1 se establece para los subtipos de LMA con alto riesgo de recidiva tras la quimioterapia y/o autotrasplante, y en pacientes con un riesgo de mortalidad relacionada con el procedimiento razonable. Cabe señalar que la evidencia existente respecto al potencial del beneficio en el tratamiento postremisión de los enfermos en RC1 proviene de estudios multicéntricos, de registro o metaanálisis, de naturaleza esencialmente retrospectiva. Basado en dicha experiencia, el alo-TPH en RC1 parece favorecer a los pacientes afectados de una LMA de riesgo elevado, definida por ser porta-

dores de alteraciones citogenéticas o moleculares de alto riesgo^{15,16} (Tabla 2). Por el contrario, el alo-TPH no es una estrategia recomendada en RC1 en los pacientes con alteraciones citogenéticas de riesgo favorable como los casos de LMA CBFr o pacientes con riesgo citogenético intermedio con un genotipo favorable, como el definido por la presencia de mutaciones de *NPM1* o mutación bialélica de *CEBPA* sin *FLT3-ITD*¹⁶. La monitorización de la ERM también puede ser útil para la identificación de aquellos pacientes que, siendo portadores de una LMA de riesgo genético favorable, tienen un alto riesgo de recidiva y, por tanto, podrían beneficiarse de la realización de un alo-TPH en RC1^{13,14,17,18}. La decisión de realización de un alo-TPH, no obstante, trasciende el potencial beneficio debido a la disminución estimada del riesgo de recidiva y debe tener en cuenta el riesgo de mortalidad asociada al procedimiento. El riesgo inherente al procedimiento puede estimarse mediante diversas escalas que analizan variables y comorbilidades del paciente con impacto en el resultado del alo-TPH y puede estar condicionado, además, por características del procedimiento como la intensidad del tratamiento^{19,20}. En este sentido, algunos estudios recientes sugieren que el alo-TPH con acondicionamiento de intensidad reducida (alo-TIR) sería equiparable al alo-TPH con un régimen mieloablatoivo en pacientes “de edad intermedia” (40-60 años), al quedar compensado el mayor riesgo de recidiva tras

alo-TIR con el exceso de mortalidad observado tras acondicionamiento mieloablatoivo²¹.

El análisis de las características biológicas que se asocian a mayor respuesta a un tratamiento determinado constituye otro claro ejemplo de terapia adaptada al riesgo. Un ejemplo de ello sería el análisis de los pacientes que parecen beneficiarse de la adición del anticuerpo monoclonal conjugado GO a un esquema de quimioterapia convencional, de acuerdo con un metaanálisis que analiza el resultado de diversos estudios aleatorizados y que identificaría a los pacientes de citogenética de buen pronóstico o intermedia como aquellos que muestran mayor sensibilidad al fármaco, pero no así los portadores de una citogenética de alto riesgo²².

Tratamiento adaptado al riesgo en pacientes de edad avanzada

El papel de la quimioterapia intensiva, considerada como el tratamiento estándar en los pacientes jóvenes, es controvertido en los pacientes de mayor edad, que representan la mayoría de los enfermos de LMA. En este grupo es crítico identificar los grupos de pacientes que pueden beneficiarse de tratamiento quimioterápico intensivo, en los que estaría justificada la exposición al riesgo. En este sentido, la presencia de alteraciones citogenéticas favorables o la mutación de *NPM1* serían, nuevamente, los marcadores que predeterminarían una

Tabla 2. Tratamiento postremisión recomendado según evidencia existente en pacientes jóvenes según riesgo genético

Categoría genética	Tto. postremisión recomendado (RC1)	
Favorable	t(8;21)(q;22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16) o t(16;16) (p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> Mutación <i>NPM1</i> sin <i>FLT3-ITD</i> Mutación bialélica de <i>CEBPA</i>	HiDAC ¿Auto-TPH? Considerar alo-TPH si ERM(+) o recaída molecular
Intermedia	Mutación <i>NPM1</i> con <i>FLT3-ITD</i> <i>NPM1/CEBPA</i> germinal sin <i>FLT3-ITD</i> (“triple negativo”) <i>NPM1wt</i> con <i>FLT3-ITD</i> t(9;11)/AF9-MLL t(11;19)/MLL-ENL	Alo-TPH ¿Auto-TPH/HiDAC si ratio <i>FLT3-ITD/FLT3wt</i> baja? Alo-TPH Alo-TPH ¿Papel de inhibidores de <i>FLT3</i> ? Alo-TPH ¿Auto-TPH si RCmol?
Desfavorable	inv(3) o t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVI1</i> t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11)(v;q23); <i>MLL</i> reordenado -5 o del(5q); -7; abn(17p) o mutación de TP53 cariotipo complejo (≥ 3) y/o monosómico	Alo-TPH Tto. experimental en pacientes no candidatos

HiDAC: dosis altas de ara-C (high-dose cytarabine); alo-TPH: trasplante alogénico de progenitores hemopoyéticos (PH); auto-TPH: trasplante autólogo de PH; RCmol: remisión completa molecular.

mejor respuesta a la quimioterapia²³. Por el contrario, la presencia de alteraciones citogenéticas adversas, frecuentes en este grupo de edad, son predictivas de quimiorresistencia y, por tanto, factores que desaconsejan este tratamiento.

De manera alternativa, el análisis de los estudios basados en el empleo de agentes hipometilantes en pacientes no candidatos a quimioterapia intensiva pueden contribuir a identificar los predictores de la respuesta a los mismos. En este sentido, la presencia de displasia multilineal o un cariotipo adverso, predictoras de una mala respuesta a la quimioterapia intensiva, serían características que apoyarían el empleo de azacitidina en esta población. En el ámbito molecular, la búsqueda de biomarcadores asociados a la respuesta al tratamiento con agentes hipometilantes es un campo de gran interés, dada la relativa difícil predicción de la respuesta a los mismos y el elevado impacto económico asociado a su uso. A este respecto, algún estudio reciente identifica la presencia de mutaciones de *TET2*, en ausencia de mutaciones de *ASXL1*, como el perfil genético que se asocia a una mayor probabilidad de respuesta a agentes hipometilantes, azacitidina y decitabina en pacientes con síndromes mielodisplásicos²⁴.

Conclusiones

La caracterización biológica de la LMA al diagnóstico y el seguimiento minucioso de la ERM son dos herramientas fundamentales para establecer el riesgo específico de la enfermedad y estimar la probabilidad de respuesta al tratamiento. El diseño de estrategias de tratamiento adaptadas al riesgo en los enfermos con LMA es esencial para la elección del tratamiento en pacientes mayores, seleccionar el mejor tratamiento postremisión en pacientes candidatos a alo-TPH y la posibilidad de inclusión en ensayos clínicos que exploren el potencial beneficio de nuevos fármacos dirigidos a dianas terapéuticas.

Este trabajo se ha realizado en parte con las ayuda de las siguientes becas: ISCIII PI13/00999 (JE), RETICS RD12/0036/0071 (JE, MDB, MP); Río Hortega CM13/00205-ISCIII (MDB), Fundación Española de Hematología y Hemoterapia (beca de investigación MDB).

Bibliografía

- Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* 2010;116:354-65.
- Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2010;115:453-74.
- Paschka P, Du J, Schlenk RF, Gaidzik VI, Bullinger L, Corbacioglu A, et al. Secondary genetic lesions in acute myeloid leukemia with inv(16) or t(16;16): a study of the German-Austrian AML Study Group (AML5G). *Blood* 2013;121:170-7.
- Schlenk RF, Kayser S, Bullinger L, Kobbe G, Casper J, Ringhoffer M, et al. Differential impact of allelic ratio and insertion site in FLT3-ITD-positive AML with respect to allogeneic transplantation. *Blood* 2014;124:3441-9.
- Pratcorona M, Brunet S, Nomdedéu J, Ribera JM, Tormo M, Duarte R, et al. Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia harboring a low-allelic burden FLT3-ITD mutation and concomitant NPM1 mutation: relevance to post-remission therapy. *Blood* 2013;121:2734-8.
- Grossmann V, Schnittger S, Kohlmann A, Eder C, Roller A, Dicker F, et al. A novel hierarchical prognostic model of AML solely based on molecular mutations. *Blood* 2012;120:2963-72.
- Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2012;366:1079-89.
- Eppert K, Takenaka K, Lechman ER, Waldron L, Nilsson B, van Galen P, et al. Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nat Med* 2011;17:1086-93.
- Metzeler KH, Maharry K, Kohlschmidt J, Volinia S, Mrózek K, Becker H, et al. A stem cell-like gene expression signature associates with inferior outcomes and a distinct microRNA expression profile in adults with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2013;27:2023-31.
- Li Z, Herold T, He C, Valk PJ, Chen P, Jurinovic V, et al. Identification of a 24-gene prognostic signature that improves the European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: an international collaborative study. *J Clin Oncol* 2013;31:1172-81.
- Marcucci G, Mrozek K, Radmacher MD, Garzon R, Bloomfield CD. The prognostic and functional role of microRNAs in acute myeloid leukemia. *Blood* 2011;117:1121-9.
- Díaz-Beyá M, Brunet S, Nomdedéu J, Tejero R, Díaz T, Pratcorona M, et al. MicroRNA expression at diagnosis adds relevant prognostic information to molecular categorization in patients with intermediate-risk cytogenetic acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2014;28:804-12.
- Krönke J, Schlenk RF, Jensen KO, Tschürtz F, Corbacioglu A, Gaidzik VI, et al. Monitoring of minimal residual disease in NPM1-mutated acute myeloid leukemia: a study from the German-Austrian acute myeloid leukemia study group. *J Clin Oncol* 2011;29:2709-16.
- Shayegi N, Kramer M, Bornhäuser M, Schaich M, Schetelig J, Platzbecker U, et al. The level of residual disease based on mutant NPM1 is an independent prognostic factor for relapse and survival in AML. *Blood* 2013;122:83-92.
- Cornelissen JJ, Gratwohl A, Schlenk RF, Sierra J, Bornhäuser M, Juliusson G, et al. The European LeukemiaNet AML Working Party consensus statement on allogeneic HSCT for patients with AML in remission: an integrated-risk adapted approach. *Nat Rev Clin Oncol* 2012;9:579-90.
- Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2008;358:1909-18.
- Yin JA, O'Brien MA, Hills RK, Daly SB, Wheatley K, Burnett AK, et al. Minimal residual disease monitoring by quantitative RT-PCR in core binding factor AML allows risk stratification and predicts relapse: results of the United Kingdom MRCAML-15 trial. *Blood* 2012;120:2826-35.
- Jourdan E, Boissel N, Chevret S, Delabesse E, Renneville A, Cornillet P, et al. Prospective evaluation of gene mutations and

- minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood* 2013;121:2213-23.
19. Gratwohl A. The EBMT risk score. *Bone Marrow Transplant* 2012;47(6):749-56.
 20. Versluis J, Labopin M, Niederwieser D, Socié G, Schlenk RF, Milpied N, et al. Prediction of non-relapse mortality in recipients of reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation with AML in first complete remission. *Leukemia* 2015;29:51-7.
 21. Passweg JR, Labopin M, Cornelissen J, Volin L, Socié G, Huynh A, et al. Conditioning intensity in middle-aged patients with AML in first CR: no advantage for myeloablative regimens irrespective of the risk group-an observational analysis by the Acute Leukemia Working Party of the EBMT. *Bone Marrow Transplant* 2015 (en prensa).
 22. Kharfan-Dabaja MA, Hamadani M, Reljic T, Pyngolil R, Komrokji RS, Lancet JE, et al. Gemtuzumab ozogamicin for treatment of newly diagnosed acute myeloid leukaemia: a systematic review and meta-analysis. *Br J Haematol* 2013;163:315-25.
 23. Becker H, Marcucci G, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, et al. Favorable prognostic impact of NPM1 mutations in older patients with cytogenetically normal de novo acute myeloid leukemia and associated gene- and microRNA-expression signatures: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 2010;28:596-604.
 24. Bejar R, Lord A, Stevenson K, Bar-Natan M, Pérez-Ladaga A, Zaneveld J, et al. TET2 mutations predict response to hypomethylating agents in myelodysplastic syndrome patients. *Blood* 2014;124:2705-12.

Nuevos agentes terapéuticos en la leucemia mieloide aguda

M.Á. SANZ, G. IACOBONI, P. MONTESINOS

Servicio de Hematología. Hospital Universitario La Fe. Departamento de Medicina de la Universidad de Valencia. Valencia

Introducción

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una condición heterogénea caracterizada por una proliferación incontrolada de las células neoplásicas precursoras hematopoyéticas clonales y un deterioro de la hematopoyesis normal. Aunque la terapia de inducción convencional produce buenas respuestas iniciales, las tasas de recaída son altas, con solo el 40% de los pacientes menores de 60 años y del 10% al 20% de los pacientes de mayor edad, permaneciendo en remisión a los 5 años. Por lo tanto, hay un margen considerable para la mejora de los tratamientos actuales. A medida que ha aumentado nuestra comprensión de los mecanismos biológicos implicados en la leucemogénesis de la LMA, las oportunidades para desarrollar medicamentos dirigidos a las vías desreguladas que alteran el crecimiento, la división y la diferenciación celular han aumentado también. Cada mutación que se identifica y de la que se comprende su papel leucemógeno representa una oportunidad terapéutica. Varios nuevos tratamientos en desarrollo se dirigen a los cambios genéticos y moleculares en la célula, que se sabe que juegan un papel en la patogénesis de la LMA y/o pueden afectar el pronóstico del paciente.

En este artículo pretendemos revisar el papel que

algunos prometedores agentes pueden tener en el tratamiento de la LMA.

Nuevos agentes terapéuticos

Aunque numerosos agentes terapéuticos nuevos han sido explorados en los últimos años, en esta revisión solo mencionaremos aquellos que han alcanzado cierto desarrollo en ensayos clínicos (Tabla 1).

Agentes citotóxicos

Análogos de las purinas

Algunos análogos de nucleósidos de purina, como fludarabina, cladribina y clofarabina, están siendo explorados con algunos resultados prometedores, particularmente cuando son usados en combinación con citarabina. La justificación de uso de esta combinación sinérgica de análogos de purina se basa en que actúan como potentes inhibidores de la ribonucleótido reductasa y modulan la actividad desoxicitidina-cinasa, lo que contribuye a aumentar la concentración intracelular de araC-trifosfato (ara-CTP) y, por ende, a aumentar significativamente la citotoxicidad de la citarabina.

Tabla 1. Nuevos agentes en avanzado estado de desarrollo para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda

Categoría	Agente
Citotóxicos Análogos de nucleósido	Fludarabina, cladribina, clofarabina, sapacitabina
Nuevos alquilantes	Lomustina, laromustina
Inhibidores de topoisomerasa II	Vosaroxin
Citarabina y daunorubicina liposomal	CPX-351
Hipometilantes	Azacitidina, decitabina, SGI-110
Inhibidores de FLT3	Lestaurtinib, midostaurin, sorafenib, quizartinib
Inhibidores de farnesil transferasa	Tipifarnib
Inhibidores de ciclo celular	Volasertib, barasertib

Tras los primeros ensayos de la combinación de citarabina con fludarabina, el denominado “régimen FLAG-IDA”, en el que se combinan ambos análogos con idarubicina y G-CSF, ha devenido en uno de los esquemas terapéuticos más usados, principalmente como tratamiento de rescate pero también como tratamiento de primera línea^{1,2}. En esta última indicación, merece especial mención el estudio aleatorizado recientemente reportado por el MRC británico en el que se demuestra una ventaja terapéutica de la combinación FLAG-IDA sobre un régimen “3+7” estándar, con o sin la adición de etopósido, tanto en la tasa de remisiones como en la supervivencia global³.

La adición de cladribina, otro análogo de purina, al clásico esquema “3+7” de daunorrubicina y citarabina también demostró una ventaja terapéutica en un amplio estudio fase III aleatorizado del grupo polaco PALG (Polish Acute Leukemia Group)⁴. Es interesante, sin embargo, que en un estudio ulterior del mismo grupo⁵ se confirme la ventaja terapéutica de la adición de cladribina a un esquema convencional de daunorrubicina y citarabina pero no se observe ventaja con la adición de fludarabina.

Otro análogo de nucleósido de purina que ha demostrado también una significativa actividad antileucémica en pacientes con LMA es clofarabina. Aunque se ha usado como agente único, los resultados más satisfactorios se han reportado en combinaciones con citarabina con y sin idarubicina⁶⁻⁸. Sin embargo, este agente se asocia con una toxicidad no despreciable que debe tenerse en cuenta cuando se usa en los pacientes más vulnerables⁹.

En la actualidad se están llevando a cabo diversos estudios, particularmente en el MD Anderson Cancer Center, que exploran el papel de fludarabina, cladribina y clofarabina en combinación con idarubicina y citarabina a altas dosis².

Sapacitabina es un nuevo análogo oral de citosina que ha sido también evaluado en pacientes mayores con LMA no previamente tratados o en primera recaída¹⁰, produciendo una tasa de respuestas del 25-45% con una toxicidad aceptable. Burnett y cols.¹¹ han reportado recientemente los resultados de un ensayo clínico en fase III en 143 pacientes con LMA o SMD de riesgo alto, siguiendo el típico diseño británico *pick a winner* comparando sapacitabina con dosis bajas de citarabina. No se observaron diferencias en ninguno de los resultados terapéuticos.

Nuevos agentes alquilantes

Lomustina y laromustina son dos agentes alquilantes que han demostrado alguna eficacia en pacientes con LMA. El primero ha demostrado un incremento de la tasa de remisiones y una prolongación de la superviven-

cia cuando se añadió a la clásica combinación de idarubicina y citarabina, aunque a expensas de una mayor toxicidad hematológica, mucositis y náuseas, pero sin impacto en la mortalidad¹². Con respecto a laromustina, los estudios iniciales demostraron cierta eficacia en pacientes mayores con LMA de alto riesgo^{13,14}. Un estudio aleatorizado llevado a cabo en pacientes con LMA en primera recaída comparó citarabina a dosis altas en combinación con laromustina o con placebo¹⁵. La combinación con laromustina produjo más remisiones pero la supervivencia global no mejoró, debido a la mortalidad asociada a la inmunosupresión.

Nuevos inhibidores de topoisomerasa II

Vosaroxin es un inhibidor de la topoisomerasa II¹⁶. Aunque es similar a las antraciclinas, su administración no está asociada con cardiotoxicidad. Por otra parte, vosaroxin demostró no ser un sustrato para la P-glicoproteína, por lo que conserva la actividad, incluso en el modelo de leucemia resistente a múltiples fármacos¹⁷. En un estudio en fase II multicéntrico (REVEAL-1) llevado a cabo en pacientes de edad avanzada con LMA de alto riesgo tratados previamente, los pacientes recibieron 4 programas de dosificación diferentes con vosaroxin¹⁸; la tasa global de respuesta fue del 76% y el programa de dosificación de 2 veces por semana es el que se recomendó para ser aplicado en otros estudios. Un ensayo en fase Ib/II en pacientes con LMA en recaída o refractarios se probó la combinación de dosis crecientes de vosaroxin (10-90 mg/m²) con dosis intermedia-alta de citarabina¹⁹. La dosis máxima tolerada (DMT) de vosaroxin fue de 80 mg/m² cuando se combina con dosis intermedias de citarabina, pero no se alcanzó la DMT para el esquema incluyendo altas dosis de citarabina. La tasa de CR/CRi fue del 28% y un ensayo en fase III de vosaroxin + citarabina se ha iniciado en pacientes con leucemia mieloide aguda en recaída/refractaria. Por último, dentro del programa *pick a winner* del CNRI británico, se hizo un estudio en pacientes de edad avanzada con LMA *de novo* que fueron aleatorizados para comparar vosaroxin con dosis bajas de Ara-C (LDAC) y vosaroxin + LDAC vs. LDAC²⁰. La administración de vosaroxin no se asoció con un beneficio clínico significativo.

Otros nuevos agentes citotóxicos

CPX-351 es una formulación liposomal de citarabina y daunorrubicina en relación molar 5:1 que en el modelo preclínico ha demostrado generar una sinergia óptima de estos fármacos clásicos²¹. En un ensayo fase II en pacientes de edad avanzada con LMA no tratada CPX-351 se asoció con mejores resultados de respuesta y de supervivencia en comparación con el de régimen

estándar “3 + 7” con daunorrubicina y citarabina. Esto fue particularmente claro en el subgrupo de pacientes con LMA secundaria, que es ahora el objetivo de los estudios de fase III en curso²². Sobre la base de este estudio, un ensayo fase III, multicéntrico y aleatorizado, que ha sido diseñado para comparar CPX-351 frente a citarabina más daunorrubicina en pacientes de 60 a 75 años con LMA de alto riesgo previamente no tratada, está actualmente en curso (NCT01696084). Otros estudios de este agente en combinación con azacitidina o LDAC también están en marcha.

Agentes hipometilantes

Los agentes hipometilantes azacitidina y decitabina fueron aprobados por la FDA para pacientes de riesgo intermedio-2 y alto y son una opción de tratamiento común en monoterapia para pacientes con LMA de edad avanzada. Un nuevo inhibidor de la ADN metiltransferasa actividad hipometilante, SGI-110, se ha incorporado recientemente a este grupo de agentes. Se han llevado a cabo varios estudios con estos agentes. El ensayo AZA-001, que compara azacitidina 75 mg/m² durante 7 días con regímenes de tratamiento convencionales (tratamiento de soporte, LDAC o quimioterapia intensiva) para mielodisplasia de alto riesgo, demostró en un análisis del subgrupo de pacientes con 20-30% de blastos en la médula ósea que tenían un beneficio en la supervivencia con azacitidina²³. Basados en este estudio, se diseñó un estudio de fase III con azacitidina frente a regímenes de tratamientos convencionales (LDAC, quimioterapia intensiva o solo tratamiento de soporte) en los pacientes ancianos con diagnóstico de LMA con > 30% de blastos, obteniéndose en el grupo de azacitidina un beneficio en la supervivencia global (10,4 meses vs. 6,5 meses) y en la supervivencia a 1 año (46,5% vs. 34,2%). Sin embargo, el objetivo primario no se alcanzó²⁴.

Decitabina se mostró en un estudio fase II como tratamiento de primera línea en pacientes de edad avanzada con LMA una tasa de respuesta global del 25% y una supervivencia media de 7,7 meses cuando se administró a dosis de 20 mg/m² al día durante 5 días al mes. Curiosamente, las respuestas se observaron en todos los subgrupos citogenéticos, así como en pacientes con mielodisplasia previa²⁵. Esto llevó a un ensayo aleatorio de decitabina frente LDAC o tratamiento de soporte en pacientes de edad avanzada con LMA no tratada y citogenética de riesgo intermedio y alto²⁶. El análisis primario mostró un aumento no significativo en la supervivencia global con decitabina (7,7 meses vs. 5,0 meses). Sin embargo, un análisis ulterior de la supervivencia mostró un beneficio para la decitabina no observado en el momento del análisis primario. Esto condujo a la aprobación por la EMA (European Medicines Agency)

de la decitabina para el tratamiento de LMA en pacientes mayores. Un análisis retrospectivo de 671 pacientes de edad avanzada con LMA tratados con quimioterapia intensiva o terapia epigenética (azacitidina o decitabina), que se llevó a cabo en el MD Anderson Cancer Center, mostró una tasa de respuesta más alta en el grupo de quimioterapia (42% vs. 28%), mientras que la tasa de supervivencia fue similar en los dos grupos. Decitabina mostró una mejor supervivencia global en comparación con azacitidina (5,5 vs. 8,8 meses)²⁷. En un ensayo clínico fase II se analizó un esquema extendido de decitabina (20 mg/m² al día durante 10 días)²⁸. El régimen fue bien tolerado y mostró una tasa de RC del 47% y una mediana de la supervivencia global y libre de enfermedad de 14 y 11 meses, respectivamente. Con el mismo esquema, en otros centros se obtuvo una tasa de RC del 40% en pacientes mayores con LMA de nuevo diagnóstico, con una mediana de supervivencia global de 10 meses; los respondedores mostraron una supervivencia prolongada de aproximadamente 16 meses²⁹. Esto ha llevado a diseñar un ensayo fase III aleatorizado, actualmente en marcha, de 10 días de decitabina comparado con quimioterapia convencional en pacientes mayores de 60 años (clinicaltrials.gov NCT02172872). Un estudio aleatorizado para evaluar 5 o 10 días de decitabina se encuentra también actualmente en curso en el MD Anderson Cancer Center².

Agentes dirigidos a dianas moleculares

Los recientes avances en el conocimiento de la biología y los mecanismos moleculares implicados en la leucemogénesis de la LMA han favorecido el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos molecularmente.

Inhibidores de FLT3

Las mutaciones de FLT3-ITD se identifican en el 20% de los pacientes con LMA y en un tercio de los pacientes con citogenética normal, confiriendo en general un peor pronóstico que los pacientes con FLT3 no mutado^{30,31}.

Lestaurinib y sorafenib como agentes únicos, pero también combinados con quimioterapia convencional, han demostrado resultados decepcionantes y sin actividad clínica significativa³²⁻³⁴. Un estudio fase I/II con sorafenib en combinación con LDAC en pacientes de edad avanzada con LMA de nuevo diagnóstico o SMD de alto riesgo (NCT00516828) ha sido completado recientemente, pero sus resultados aún no han sido reportados³⁵.

Midostaurina (PKC412), sin embargo, es otro inhibidor de FLT3 que ha demostrado actividad biológica como agente único en la reducción de blastos en pacientes con LMA en recaída y FLT3 mutado^{36,37}. Estos resultados llevaron al desarrollo de un estudio fase III,

aleatorizado, de midostaurina en combinación con daunorrubicina y citarabina en el tratamiento de primera línea para pacientes con LMA menores de 60 años que ya ha completado su reclutamiento (estudio RATIFICAR; NCT00651261), pero sus resultados no han sido aún reportados. Dos ensayos de fase II que estudian la eficacia de midostaurina en combinación con azacitidina (NCT01093573) o decitabina (NCT01846624) en pacientes de edad avanzada con LMA están actualmente en curso³⁵.

Quizartinib (AC-220) es inhibidor FLT3 de segunda altamente selectivo³⁸. Un ensayo de fase II con quizartinib en monoterapia en pacientes mayores con LMA avanzada mostró un alto grado de actividad en pacientes FLT3 mutados (CR+CRp+CRi 57%), pero también sugiere tener actividad en pacientes no mutados. Otros estudios de quizartinib en monoterapia y en combinación con otros agentes están en curso o en proyecto en pacientes con LMA. En particular, un ensayo clínico fase I/II con quizartinib en combinación con 5-azacitidina o LDAC en pacientes jóvenes con LMA en recaída y en pacientes mayores de 60 años de edad con LMA tratados previamente (NCT01892371), está actualmente en curso a fin de evaluar el potencial terapéutico de esta combinación³⁵.

Inhibidores de farnesil transferase

Tipifarnib es un inhibidor oral selectivo de farnesil transferasa que bloquea la transducción de señales de Ras activada³⁹. Como agente único, la tasa de respuesta general es < 2 0%^{40,41}. Puede presentar toxicidad significativa gastrointestinal, neurológica e infecciosa^{42,43}. En comparación con el tratamiento de soporte en pacientes de edad avanzada, tipifarnib en monoterapia no dio ventaja en la supervivencia⁴⁴. Por lo tanto, su papel actual podría estar en la terapia de mantenimiento en pacientes en CR que tienen un alto riesgo de recaída⁴⁵.

Inhibidores de cinasas del ciclo celular

Volasertib es una pequeña molécula derivada de la dihidropteridina que actúa frente a la polocinasa 1, induciendo arresto mitótico, inhibición de la proliferación y apoptosis en modelos preclínicos y clínicos⁴⁶. En un estudio fase II⁴⁷ los resultados mostraron que la combinación de volasertib y LDARAC llevó a un aumento en la tasa de respuestas y a una prolongación significativa de la supervivencia en comparación con la monoterapia con LDARAC en pacientes con LMA no elegibles para quimioterapia intensiva. En el grupo de combinación se observó también una mayor frecuencia de eventos adversos, pero no resultó en una tasa de mortalidad más alta.

Barasertib es un inhibidor potente y selectivo de la auroracinas B. En un ensayo de fase II que se realizó para comparar barasertib con LDARAC (aleatorizados 2: 1) en pacientes con LMA de nuevo diagnóstico no susceptibles de ser tratados con quimioterapia intensiva, barasertib resultó en una mejora significativa en la tasa objetiva de respuesta completa (OCRR)⁴⁸. Aunque el estudio no fue diseñado para comparar la supervivencia, también se observó mejoría en los pacientes tratados con barasertib, aunque no fue significativa (8,2 meses vs. 4,5 meses). Los efectos secundarios fueron superiores con barasertib (estomatitis/mucositis y neutropenia febril), pero la tasa de mortalidad a 30 días fue similar en ambos grupos. Un estudio fase I con barasertib en combinación con LDARAC en pacientes no elegibles para quimioterapia intensiva⁴⁹ ha llevado a investigar esta combinación en un ensayo fase II/III aleatorizado muticéntrico (NCT00952588), cuyos resultados aún no están disponibles.

Conclusión

A medida que ha aumentado nuestra comprensión de los mecanismos biológicos implicados en la leucemogénesis de la LMA, las oportunidades para desarrollar medicamentos dirigidos a las vías desreguladas que alteran el crecimiento, la división y la diferenciación celular han aumentado. Cada mutación que se identifica y de la cual se comprende su papel en la leucemogénesis representa una oportunidad terapéutica. Varios nuevos agentes terapéuticos en desarrollo se dirigen a los cambios genéticos y moleculares en la célula que se sabe que juegan un papel en la patogénesis y en el pronóstico de la LMA. Sin embargo, aunque algunos parecen prometedores, especialmente para pacientes mayores frágiles, todavía ninguno se ha establecido definitivamente en la práctica clínica, ya que aun produciendo mejores tasas de respuesta rara vez se traducen en mejoras significativas de la supervivencia. Diversos ensayos clínicos en fase III que pretenden demostrar mejoras en la supervivencia con tratamientos dirigidos a dianas moleculares están actualmente en fase muy avanzada y han creado grandes expectativas.

Bibliografía

1. De la Rubia J, Regadera A, Martín G, et al. FLAG-IDA regimen (fludarabine, cytarabine, idarubicin and G-CSF) in the treatment of patients with high-risk myeloid malignancies. *Leuk Res* 2002;26(8):725-30.
2. Kadia TM, Ravandi F, O'Brien S, Cortes J, Kantarjian HM. Progress in acute myeloid leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2015;15(3):139-51.
3. Burnett AK, Russell NH, Hills RK, et al. Optimization of chemotherapy for younger patients with acute myeloid leukemia: results of the medical research council AML15 trial. *J Clin Oncol* 2013;31(27):3360-8.

4. Holowiecki J, Grosicki S, Robak T, et al. Addition of cladribine to daunorubicin and cytarabine increases complete remission rate after a single course of induction treatment in acute myeloid leukemia. Multicenter, phase III study. *Leukemia* 2004;18(5):989-97.
5. Holowiecki J, Grosicki S, Giebel S, et al. Cladribine, but not fludarabine, added to daunorubicin and cytarabine during induction prolongs survival of patients with acute myeloid leukemia: a multicenter, randomized phase III study. *Journal of Clinical Oncology* 2012;30(20):2441-8.
6. Faderl S, Ravandi F, Huang X, et al. A randomized study of clofarabine versus clofarabine plus low-dose cytarabine as front-line therapy for patients aged 60 years and older with acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome. *Blood* 2008;112(5):1638-45.
7. Faderl S, Ferrajoli A, Wierda W, et al. Clofarabine combinations as acute myeloid leukemia salvage therapy. *Cancer* 2008;113(8):2090-6.
8. Nazha A, Kantarjian H, Ravandi F, et al. Clofarabine, idarubicin, and cytarabine (CIA) as frontline therapy for patients \leq 60 years with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Am J Hematol* 2013;88(11):961-6.
9. Martínez-Cuadrón D, Montesinos P, Oriol A, et al. Phase II trial to assess the safety and efficacy of clofarabine in combination with low-dose cytarabine in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Ann Hematol* 2014;93(1):43-6.
10. Kantarjian H, Faderl S, García-Manero G, et al. Oral sapacitabine for the treatment of acute myeloid leukaemia in elderly patients: a randomised phase 2 study. *Lancet Oncol* 2012;13(11):1096-104.
11. Burnett AK, Russell N, Hills RK, et al. A randomised comparison of the novel nucleoside analogue sapacitabine with low-dose cytarabine in older patients with acute myeloid leukaemia. *Leukemia* 2015;29(6):1312-9.
12. Pigneux A, Harousseau J-L, Witz F, et al. Addition of lomustine to idarubicin and cytarabine improves the outcome of elderly patients with de novo acute myeloid leukemia: a report from the GOELAMS. *Journal of Clinical Oncology* 2010;28(18):3028-34.
13. Giles F, Rizzieri D, Karp J, et al. Cloretazine (VNP40101M), a novel sulfonylhydrazine alkylating agent, in patients age 60 years or older with previously untreated acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 2007;25(1):25-31.
14. Schiller GJ, O'Brien SM, Pigneux A, et al. Single-agent laromustine, a novel alkylating agent, has significant activity in older patients with previously untreated poor-risk acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 2010;28(5):815-21.
15. Giles F, Vey N, DeAngelo D, 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.
16. Freeman C, Keane N, Swords R, Giles F. Vosaroxin: a new valuable tool with the potential to replace anthracyclines in the treatment of AML? *Expert Opin Pharmacother* 2013;14(10):1417-27.
17. Hoch U, Lynch J, Sato Y, et al. Voreloxin, formerly SNS-595, has potent activity against a broad panel of cancer cell lines and in vivo tumor models. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009;64(1):53-65.
18. Stuart RK, Cripe LD, Maris MB, et al. REVEAL-1, a phase 2 dose regimen optimization study of vosaroxin in older poor-risk patients with previously untreated acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2015;168(6):796-805.
19. Lancet JE, Roboz GJ, Cripe LD, et al. A phase 1b/2 study of vosaroxin in combination with cytarabine in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2015;100(2):231-7.
20. Dennis M, Russell N, Hills RK, et al. Vosaroxin and vosaroxin plus low-dose Ara-C (LDAC) vs. low-dose Ara-C alone in older patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2015;125(19):2923-32.
21. Lim W-S, Tardi PG, Santos Dos N, et al. Leukemia-selective uptake and cytotoxicity of CPX-351, a synergistic fixed-ratio cytarabine:daunorubicin formulation, in bone marrow xenografts. *Leuk Res* 2010;34(9):1214-23.
22. Lancet JE, Cortes JE, Hogge DE, et al. Phase 2 trial of CPX-351, a fixed 5:1 molar ratio of cytarabine/daunorubicin, vs cytarabine/daunorubicin in older adults with untreated AML. *Blood* 2014;123(21):3239-46.
23. Fenaux P, Mufti GJ, Hellström-Lindberg E, et al. Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 2010;28(4):562-9.
24. Dombret H, Seymour JF, Butrym A, et al. International phase 3 study of azacitidine vs. conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with $>$ 30% blasts. *Blood* 2015.
25. Cashen AF, Schiller GJ, O'Donnell MR, DiPersio JF. Multicenter, phase II study of decitabine for the first-line treatment of older patients with acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 2010;28(4):556-61.
26. Kantarjian HM, Thomas XG, Dmoszynska A, et al. Multicenter, randomized, open-label, phase III trial of decitabine versus patient choice, with physician advice, of either supportive care or low-dose cytarabine for the treatment of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 2012;30(21):2670-7.
27. Quintás-Cardama A, Ravandi F, Liu-Dumlao T, et al. Epigenetic therapy is associated with similar survival compared with intensive chemotherapy in older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Blood* 2012;120(24):4840-5.
28. Blum W, Garzon R, Klisovic RB, et al. Clinical response and miR-29b predictive significance in older AML patients treated with a 10-day schedule of decitabine. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(16):7473-8.
29. Ritchie EK, Feldman EJ, Christos PJ, et al. Decitabine in patients with newly diagnosed and relapsed acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2013;54(9):2003-7.
30. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood* 2001;98(6):1752-9.
31. Smith BD, Levis M, Beran M, et al. Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood* 2004;103(10):3669-76.
32. Knapper S, Burnett AK, Littlewood T, et al. A phase 2 trial of the FLT3 inhibitor lestaurtinib (CEP701) as first-line treatment for older patients with acute myeloid leukemia not considered fit for intensive chemotherapy. *Blood* 2006;108(10):3262-70.
33. Levis M, Ravandi F, Wang ES, et al. Results from a randomized trial of salvage chemotherapy followed by lestaurtinib for patients with FLT3 mutant AML in first relapse. *Blood* 2011;117(12):3294-301.
34. Serve H, Krug U, Wagner R, et al. Sorafenib in combination with intensive chemotherapy in elderly patients with acute

- myeloid leukemia: results from a randomized, placebo-controlled trial. *Journal of Clinical Oncology* 2013;31(25):3110-8.
35. Montalbán-Bravo G, García-Manero G. Novel drugs for older patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2015;29(4):760-9.
 36. Stone RM, Deangelo DJ, Klimek V, 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.
 37. Fischer T, Stone RM, Deangelo DJ, et al. Phase IIB trial of oral Midostaurin (PKC412), the FMS-like tyrosine kinase 3 receptor (FLT3) and multi-targeted kinase inhibitor, in patients with acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome with either wild-type or mutated FLT3. *Journal of Clinical Oncology* 2010;28(28):4339-45.
 38. Zarrinkar PP, Gunawardane RN, Cramer MD, et al. AC220 is a uniquely potent and selective inhibitor of FLT3 for the treatment of acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2009;114(14):2984-92.
 39. Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ. The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* 2005;118(Pt 5):843-6.
 40. Harousseau J-L, Lancet JE, Reiffers J, et al. A phase 2 study of the oral farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in patients with refractory or relapsed acute myeloid leukemia. *Blood* 2007;109(12):5151-6.
 41. Lancet JE, Gojo I, Gotlib J, et al. A phase 2 study of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in poor-risk and elderly patients with previously untreated acute myelogenous leukemia. *Blood* 2007;109(4):1387-94.
 42. Karp JE, Lancet JE, Kaufmann SH, et al. Clinical and biologic activity of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in adults with refractory and relapsed acute leukemias: a phase 1 clinical-laboratory correlative trial. *Blood* 2001;97(11):3361-9.
 43. Laubach J, Rao AV. Current and emerging strategies for the management of acute myeloid leukemia in the elderly. *Oncologist* 2008;13(10):1097-108.
 44. Harousseau J-L, Martinelli G, Jedrzejczak WW, et al. A randomized phase 3 study of tipifarnib compared with best supportive care, including hydroxyurea, in the treatment of newly diagnosed acute myeloid leukemia in patients 70 years or older. *Blood* 2009;114(6):1166-73.
 45. Karp JE, Smith BD, Gojo I, et al. Phase II trial of tipifarnib as maintenance therapy in first complete remission in adults with acute myelogenous leukemia and poor-risk features. *Clin. Cancer Res* 2008;14(10):3077-82.
 46. Janning M, Fiedler W. Volasertib for the treatment of acute myeloid leukemia: a review of preclinical and clinical development. *Future Oncol* 2014;10(7):1157-65.
 47. Döhner H, Lübbert M, Fiedler W, et al. Randomized, phase 2 trial of low-dose cytarabine with or without volasertib in AML patients not suitable for induction therapy. *Blood* 2014;124(9):1426-33.
 48. Kantarjian HM, Martinelli G, Jabbour EJ, et al. Stage I of a phase 2 study assessing the efficacy, safety, and tolerability of barsertib (AZD1152) versus low-dose cytosine arabinoside in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Cancer* 2013;119(14):2611-9.
 49. Kantarjian HM, Sekeres MA, Ribrag V, et al. Phase I study assessing the safety and tolerability of barsertib (AZD1152) with low-dose cytosine arabinoside in elderly patients with AML. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2013;13(5):559-67.

Advances in treatment of acute promyelocytic leukemia

F. LO-COCO, L. CICONI

Department of Biomedicine and Prevention. University Tor Vergata. Rome, Italy

Acute promyelocytic leukemia (APL), once considered the most highly fatal human leukemia, is nowadays curable in the vast majority of patients. This notwithstanding, APL must be regarded as a medical emergency in which immediate diagnosis and prompt initiation of supportive therapy and antileukemic therapy is essential to counteract the risk of early death and to guarantee optimal patient outcome. Early death still remains the most relevant hurdle to final cure of this disease and its size is still very high approaching 20-30% of cases even in well developed countries¹. It is estimated that the phenomenon of early death in APL could be even more relevant in other parts of the world, particularly in developing countries and other areas with low resources. Actions to undertake to impact on this relevant issue should include educational programs at emergency doors and intensive care units with dissemination of basic notions about APL diagnosis and early management including essentials of supportive care. Finally, more investigation on potential predictive factors of hemorrhagic early death is warranted¹. In the case of morphological and clinical suspicion of APL, current guidelines indicate that therapy with retinoic acid (ATRA) should be started even before a genetic diagnosis is available.

Until recently, front-line therapy of APL has traditionally relied on the use of combined ATRA and anthracycline-based chemotherapy. This strategy, developed mostly by European cooperative groups including the Italian GIMEMA, the European French-Belgian-Swiss, the Spanish PETHEMA, the UK MRC and the German AMLCG, has been exported and used worldwide resulting in long-term cure rates of approximately 75%-80%². In particular, the Italian group GIMEMA reported high rates of molecular remission in newly diagnosed and genetically confirmed APL using a simultaneous ATRA plus IDArubicin (AIDA) combination for induction treatment, followed by 3 courses of intensive chemotherapy as consolidation². The development by Sanz and colleagues of risk stratification for newly diagnosed APL based on white blood cell count at diagnosis has

contributed to the refinement of APL therapy, with the introduction of risk adapted approaches.³ Two independent risk-adapted studies were designed by the PETHEMA and GIMEMA cooperative groups in which treatment intensification was based on the initial relapse risk. The results of both studies showed improved outcomes by adding ATRA for consolidation to the original AIDA scheme. In line with these findings, most studies include nowadays risk-adapted approaches². Despite the dramatic progress achieved in front-line therapy with the ATRA/chemotherapy combination, relapses still occur in approximately 20% of patients. Moreover, these regimens are associated with significant toxicity due to severe myelosuppression frequently resulting in life-threatening infections, and with serious, though infrequent late complications such as cardiomyopathy and the occurrence of secondary myelodysplastic syndromes and/or acute myeloid leukemias^{2,4}.

Following the demonstration of its striking activity in relapsed patients, arsenic trioxide (ATO) has been licensed in the USA and Europe for the treatment of relapsed and refractory APL⁵. Arsenic derivatives had been used since ancient times in Chinese medicine for the treatment of malignant and inflammatory diseases. The mechanism of action of ATO in APL is complex and not yet known in detail. At a high concentration (0.5 to 2.0 $\mu\text{mol/L}$) ATO induces apoptosis in vitro, through induction of caspases 2 and 3, while at lower concentrations (0.1 to 0.5 $\mu\text{mol/L}$) it induces partial differentiation of leukemic promyelocytes through PML/RAR α degradation; furthermore, ATO is known to inhibit angiogenesis via down-regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF)⁵. As concerning its toxicity profile, ATO is usually well tolerated and its use is associated with a series of manageable adverse events including hyperleucocytosis, the APL differentiation syndrome, prolongation of the QT interval, peripheral neuropathy, mild myelosuppression, hyperglycemia and hypokalemia. Of these, QT prolongation and, particularly, the so called APL differentiation syndrome are the most serious ones as they can evolve into severe and potentially fatal ven-

tricular arrhythmias (torsade de points) or respiratory failure, respectively (reviewed in ref. 5).

According to original clinical trials reported in China, ATO was able to induce hematological CR in > 85% patients who relapsed after front-line ATRA. These results were subsequently reproduced in the USA first in a pilot, then in an expanded multicenter trial for patients relapsed after ATRA-based therapies, with CR rates of 86%. Significantly, unlike ATRA, ATO as a single agent was able to induce durable molecular remission after two cycles in the majority of patients treated for disease recurrence. Confirmation of the high efficacy of ATO for relapsed APL was provided successively by several trials conducted worldwide which reported CR rates > 70% and 1-3 years survival rates in the range of 50-70%. In addition to trials in which ATO was used as a single agent, some studies investigated its efficacy and toxicity profile in combination with other agents including ATRA. Synergism with ATRA and increased antileukemic efficacy in APL was demonstrated in a Chinese randomised study comparing ATO+ plus ATRA vs. either ATO or ATRA used as single agents. No significant additional toxicity was reported in this or in other studies which analysed the effect of ATRA and ATO combination⁵. Following the experience in relapsed patients and based on the favourable toxicity profile, several investigators have more recently explored the effect of ATO in newly diagnosed APL patients and reported preliminary findings in front-line therapy. Results of studies from Shanghai, Houston, India and Iran conducted with ATO as single agent or combined to ATRA for newly diagnosed patients reported CR rates of 86-95%, molecular remission rates after two cycles of 76-100% and survival rates of 86-88%, with significantly better responses being obtained in patients with low and intermediate-risk disease as compared to high-risk patients (reviewed in Breccia M, Lo-Coco F. Arsenic trioxide for management of acute promyelocytic leukemia: current evidence on its role in front-line therapy and recurrent disease. *Expert Opin Pharmacother* 2012;13:1031-43). These data strongly suggested that at least non-high risk APL patients could be treated without chemotherapy.

The possibility to cure APL without chemotherapy was actually verified in a randomised trial of the GIMEMA, AMLSG and SAL Cooperative groups which compared ATRA plus ATO approach with the standard ATRA plus chemotherapy front-line therapy in patients with low-intermediate risk APL (APL 0406 study). Initial results of this study showed that the combination of ATO and ATRA is superior in terms of survival outcome compared to the conventional AIDA regimen in low/intermediate-risk APL while rates of treatment-related toxicities, mainly hematologic toxicity, were lower. Hepatic toxicity and QT prolongation were the most

frequent treatment-related side effects reported in patients treated with ATRA and ATO and were managed with temporary discontinuation and/or reduction of therapy⁶. These were confirmed in a recent update on an extended series of the APL0406 trial. In light of these results, this combination regimen has been widely adopted as first-line therapy for low-intermediate risk APL and seems to emerge as the new standard of care in this patient setting. Recent NCCN guidelines have included ATRA plus ATO as a therapeutic option in non-high risk APL and in those patients with comorbidities who are unfit for conventional chemotherapy regimens⁷. In addition, health-related quality of life (QoL) was measured in the APL0406 trial using patient self-reported questionnaires. The data showed statistically improved QoL outcome in the ATRA-ATO arm as compared with ATRA-chemotherapy group, particularly at post-induction evaluation⁸.

The recent randomized NCRI AML 17 trial has also compared the ATO plus ATRA versus the standard AIDA regimen in both low-intermediate and high-risk APL. ATO schedule in this trial was different from APL0406 study and included high-risk patients. The latter received a single dose of Gemtuzumab Ozogamycin (GO) in addition to ATO and ATRA during induction therapy. Preliminary results presented at the 2015 EHA annual conference in Vienna, showed significantly superior EFS in the cohort treated with ATO plus ATRA group as compared to the AIDA group in either low-intermediate or high-risk groups⁹. However, the high risk group in the NCRI included a relatively low number of patients.

Conclusions and future perspectives

Despite the impressive progress achieved in the last 20 years in APL treatment, there are still many aspects which require intensive investigational efforts. Among these, early death remains a challenging issue. Future clinical investigation should focus on several patient subsets including high risk disease, elderly and pediatric patients. As to high-risk APL, a randomized multicenter study comparing standard AIDA with ATO plus ATRA and minimal chemotherapy will be conducted soon in Europe by several cooperative groups.

Despite it is not currently available in US and Europe, a novel oral arsenic formulation (oral tetra-arsenic tetra sulfide) has been recently employed as frontline treatment for low-intermediate risk APL in combination with ATRA with encouraging results¹⁰.

Given the potentially equal efficacy and similarly low toxic profile of oral arsenic compared to i.v. ATO, it is conceivable that in the near future APL will be manageable after induction on an outpatient basis with entirely oral treatment.

References

1. Lo-Coco F. ED in APL: tip of the iceberg? *Blood* 2011;118:1188-89.
2. Sanz MA, Lo-Coco F. Modern approaches to treating acute promyelocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2011;29:495-503.
3. Sanz MA, Lo-Coco F, Martín G, et al. Definition of relapse risk and role of nonanthracycline drugs for consolidation in patients with acute promyelocytic leukemia: a joint study of the PETHEMA and GIMEMA cooperative groups. *Blood* 2000;96:1247-53.
4. Wang ZY, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood* 2008;111:2505-15.
5. Breccia M, Lo-Coco F. Arsenic trioxide for management of acute promyelocytic leukemia: current evidence on its role in front-line therapy and recurrent disease. *Expert Opin Pharmacother* 2012;13:1031-43.
6. Lo-Coco F, Avvisati G, Vignetti M et al. Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. *New Engl J Med* 2013;368:111-21.
7. O'Donnell MR, Tallman MS, Abboud CN, et al. Acute myeloid leukemia, version 2.2013. *J Natl Compr Canc Netw* 2013;11(9):1047-55.
8. Efficace F, Mandelli F, Avvisati G, et al. Randomized phase III trial of retinoic acid and arsenic trioxide versus retinoic acid and chemotherapy in patients with acute promyelocytic leukemia: health-related quality-of-life outcomes. *J Clin Oncol* 2014;32(30):3406-12.
9. Burnett AK, Russell NH, Hills RK et al. Arsenic Trioxide and ATRA therapy in Acute Promyelocytic Leukaemia of all Risk Groups: Results of the Randomised NCRI AML17 Trial (Abstr.) EHA 2015.
10. Zhu HH, Huang XJ. Oral arsenic and retinoic acid for non-high-risk acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med* 2014;371(23):2239-41.

Hematogeriatría

COORDINADORES: **C. BOQUÉ GENOVART.** *Servicio de Hematología Clínica. Institut Català d'Oncologia. ICO de Hospitalet – Hospital Duran I Reynals. L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona*
V. VICENTE GARCÍA. *Servicio de Hematología. Centro Regional de Hemodonación. Murcia*

En nuestro país, y en los países de nuestro entorno, estamos presenciando un aumento de la esperanza de vida y, con ello, la hematología está asistiendo a un aumento del número de pacientes mayores con diagnósticos oncohematológicos que requieren tratamiento, y otros con diversas patologías cardiovasculares que necesitan profilaxis o terapia antitrombótica. Nuestra especialidad debe intensificar cambios e innovaciones que le permitan adaptarse a este nuevo reto.

El objetivo principal de los tratamientos de los pacientes mayores debe beneficiar al paciente no solo en términos de supervivencia, también en términos de calidad de vida y de autonomía funcional. La escasa participación de los pacientes de más de 70 años en los ensayo clínicos y la dificultad de predecir la tolerancia a los diversos tratamientos dejan un panorama en el que la toma de decisiones presenta muchas incertidumbres.

El Dr. Alfonso Cruz-Jenfoft presenta las herramientas para la valoración geriátrica en hematología. Partiendo de que la valoración geriátrica (VG) integral es la herramienta que ha demostrado tener el mayor valor predictivo, el Dr. expone las diversas formas adaptadas de VG que permiten el cribado, por un lado, de los pacientes que están en muy buen estado de salud y, por otro, de aquellos que están muy mal. Estas VG adaptadas permiten, por tanto, detectar aquellos pacientes complejos, prefrágiles, en los que la VG integral tiene un gran papel al ser capaz de detectar problemas no percibidos con otro tipo de evaluaciones y aporta información relevante en la toma de decisiones complejas en las que son necesarias la colaboración entre hematólogos y geriatras o hematogeriatras, o incluso en las que se pueden determinar intervenciones de soporte puntuales antes o durante los tratamientos.

El Dr. Fernando Ramos muestra los distintos enfoques que debemos tener en cuenta en los pacientes mayores con leucemia mieloide aguda, los de intención curativa, los que son capaces de modificar la biología de la enfermedad y los tratamientos de soporte. Nos describe los esquemas predictivos de respuesta y supervivencia basados en parámetros clínicos para cada una de las opciones terapéuticas expuestas, como el esquema HCT-CI/EBMT y el esquema E-ALMA que, junto a las características de la propia leucemia, nos guiarán en la elección del tratamiento más apropiado.

La Dra. Vanessa Roldan revisa los problemas de la anticoagulación en los pacientes ancianos con fibrilación auricular, cuya prevalencia llega al 10% de los pacientes mayores de 80 años. Expone las escalas de indicación de anticoagulación que actualmente se utilizan y los perfiles de riesgo hemorrágico de los pacientes, además de las ventajas de los anticoagulantes orales de acción directa.

El Dr. Michael Hallek presenta el tratamiento actual de los pacientes con leucemia linfática crónica (LLC). A pesar de que la mediana de edad diagnóstico es 72 años, los pacientes de edad avanzada están poco representados en los ensayos clínicos y los nuevos fármacos son un reto y una oportunidad para estos pacientes. Basándose en los estudios de los *score* pronósticos, muestra lo importante que es que en el futuro los pacientes con LLC entren en ensayos clínicos que permitan dar respuesta al desafío de los tratamientos ajustados al perfil genético.

La leucemia aguda mieloblástica en el paciente anciano

F. RAMOS ORTEGA

Unidad de Hematología Clínica. Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Universitario de León e Instituto de Biomedicina. León

Introducción

En nuestro medio, casi dos terceras partes de los pacientes con leucemia aguda mieloblástica (LMA) tienen más de 60 años y un tercio tiene más de 70. La evolución demográfica de nuestro país hace previsible que estas proporciones aumenten todavía más en los próximos años, por lo que tanto los médicos especialistas en formación como los médicos en ejercicio deben hacer un esfuerzo para adaptarse a esta realidad. Para elevar un poco más el listón, la proporción de pacientes mayores con LMA que están vivos a los 5 años del diagnóstico es inferior al 10% y no se han producido avances significativos en las tasas de curación en los últimos 20 años.

Desde el punto de vista ético, en esta franja de edad es más acuciante la necesidad de asegurar la autonomía del paciente en la toma de decisiones y evitar incurrir en situaciones de maleficencia fruto de un planteamiento terapéutico excesivamente optimista o de una actitud paternalista, lo que no es tarea fácil. Evidentemente, lo deseable es beneficiar al paciente en términos de supervivencia, calidad de vida y autonomía funcional, pero la forma de conseguirlo sin desviarse de la ruta vital marcada por el propio paciente es un auténtico reto, ya que algunos de estos pacientes no desean o no están en condiciones de seguir el itinerario que se hace imprescindible en las estrategias con intención curativa, mientras que otros que podrían completar dicha ruta clínica no la siguen por razones ajenas a la biología, como podrían indicar los datos del registro poblacional sueco¹. Cabe recordar que la calidad de vida individual solo la puede interpretar uno mismo y que la toxicidad farmacológica subjetiva (astenia, dolor, disnea, etc.) no debe erigirse en una forma de medir la calidad de vida relacionada con la salud.

Los factores pronósticos de supervivencia en la LMA del anciano² son los mismos que en los pacientes jóvenes (edad, recuento leucocitario, *performance status* [PS], citogenética y tipo de LMA [*de novo vs. secundaria*]), pero son más frecuentes las configuraciones de alto riesgo. El significado pronóstico de las alteraciones

moleculares en presencia de una citogenética normal ha sido menos estudiado en este grupo de edad y los datos preliminares sugieren que podría tener un peso menor que en los pacientes jóvenes³.

Por último, mientras que los pacientes jóvenes participan con frecuencia en ensayos clínicos (EC), la participación de los mayores es casi testimonial (5% de los mayores de 70 años en la serie del MRC)² y se ha constatado la dificultad para incluir pacientes con quimioterapia intensiva dentro del grupo control de EC aleatorizados en los que se prueban tratamientos de intensidad reducida para pacientes de edad avanzada no trasplantables. Por estas razones, la información disponible en este grupo de edad sobre la eventual superioridad de la quimioterapia intensiva frente al tratamiento exclusivamente de soporte o de baja intensidad procede de estudios con una potencia limitada^{4,5} y de validez externa discutible, razón por la que siempre deberían complementarse con estudios basados en la práctica asistencial. Aun así, ante la duda, cuando un paciente de edad avanzada tiene una configuración de bajo riesgo, se debe hacer todo lo posible para aplicar el tratamiento estándar si es su deseo y su situación basal lo permite.

Evaluación del estado basal

Conocer las perspectivas de supervivencia de un paciente adulto mayor en la situación basal (inmediatamente antes del diagnóstico de su leucemia) exige conocer como mínimo si existe o no comorbilidad⁶, algo que es más frecuente en esta franja de edad pero que no es patrimonio exclusivo del anciano. También sería deseable conocer su capacidad para realizar actividades físicas, el estado cognitivo y emocional, su estado nutricional y fuerza muscular, el número de fármacos que toma a diario, su grado de independencia para la realización de las actividades (tanto básicas como instrumentales) de la vida diaria, si presenta o no los denominados "síndromes geriátricos" y, especialmente, el grado de apoyo familiar y social del que dispone⁷⁻¹². Todos estos parámetros forman parte de la valoración geriátrica

integral (VGI), que debería realizar un equipo multidisciplinar coordinado por un geriatra. Afortunadamente, en los pacientes ancianos con LMA *de novo* se dispone habitualmente de tiempo suficiente para intentar una evaluación geriátrica mientras se esperan los resultados citogenéticos, antes de tomar una decisión en firme¹³.

Puesto que muchas de las unidades de hematología de nuestro país no disponen de un equipo geriátrico de apoyo, sería deseable disponer de instrumentos de cribado que seleccionasen los pacientes tributarios de evaluación geriátrica. Aunque dichos instrumentos existen (VES13, G8, etc.), su sensibilidad y especificidad con respecto al criterio de referencia (VGI) son manifiestamente mejorables.

Recientemente se ha propuesto⁷ un esquema de actuación simplificado en los pacientes independientes en las actividades de la vida diaria, con un PS según ECOG de 0-2 y sin comorbilidad relevante, con el fin de detectar los pacientes “vulnerables” (aquellos que parecen estar en buena forma para recibir quimioterapia intensiva cuando en realidad no lo están). Dicho esquema consistiría en la evaluación de la función física y el estado cognitivo, parámetros que han demostrado tener relevancia pronóstica para la supervivencia cuando este tipo de pacientes recibe quimioterapia intensiva. Aunque se podría pensar que dicha evaluación es superflua, los datos disponibles muestran que la evaluación

geriátrica es capaz de detectar casos problemáticos que de otro modo pasarían desapercibidos^{8,9}. En los ancianos con una dependencia evidente en las actividades básicas de la vida diaria, un PS según ECOG de 3-4 no vinculado a la LMA o comorbilidad muy importante, la evaluación geriátrica podría ser innecesaria para la toma de decisiones, ya que muy probablemente serían considerados frágiles o muy enfermos si se les efectuase una VGI formal (Tabla 1).

En el caso de los pacientes incluidos en estudios asistenciales y ensayos clínicos, la evaluación geriátrica debería recogerse en todos los protocolos (siguiendo las directrices del Grupo Español de Hematogeriatría), con el fin de disponer cuanto antes de datos de calidad sobre su impacto real en la práctica hematológica.

Tratamiento con intención curativa

En los pacientes con un adecuado estado basal el tratamiento debería ser el mismo que el de cualquier paciente adulto de menor edad. Para ello la primera aproximación es el estudio citogenético, seguido de un tratamiento adaptado al riesgo en el que la presencia de una configuración favorable es determinante para las expectativas de curación con quimioterapia intensiva (con o sin trasplante autólogo). Cuando la configuración pronóstica es menos favorable, la posibilidad de

Tabla 1. Valoración del estado basal en el paciente anciano con LMA (modificado de Klepin HD. Geriatric perspective: How to assess fitness for chemotherapy in acute myeloid leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2014;2014(1):8-13)

Datos iniciales	Datos complementarios	Subgrupo terapéutico	Actitud que se debe seguir
A. Centros con un programa geriátrico multidisciplinario de calidad			
En todos los pacientes	Es deseable efectuar una VGI en el centro a tiempo	Discutir con el equipo geriátrico	EC si cumple criterios de selección Tratamiento según subgrupo
B. Centros con un equipo geriátrico básico o insuficiente			
ECOG 0-2 Ausencia de comorbilidad relevante Independencia en AVD (enfermería)	Buena función física Ausencia de deterioro cognitivo NRM aceptable con TPH	Pacientes en forma para recibir quimioterapia intensiva	EC si cumple criterios de selección Tratamiento estándar del adulto
ECOG 0-2 Ausencia de comorbilidad relevante Independiente en AVD (enfermería)	Deterioro de la función física Deterioro cognitivo (incluso leve) NRM elevada con TPH	Pacientes vulnerables si reciben quimioterapia intensiva	EC si cumple criterios de selección Tratamiento alternativo
ECOG 3-4 no vinculado a la leucemia Comorbilidad importante Dependencia en AVD (enfermería)	Considerar consulta a Geriatría y Trabajo Social	Pacientes frágiles o muy enfermos	Paliativo
Casos dudosos	Considerar consulta a Geriatría y Trabajo Social	Asignación caso a caso	EC si cumple criterios de selección Tratamiento según subgrupo

VGI: valoración geriátrica integral; AVD: actividades de la vida diaria (básicas = autocuidado, o instrumentales = interacción social); tratamiento estándar del adulto: el que recibiría un adulto de menor edad en función de su estratificación pronóstica y la mortalidad propia del TPH; tratamiento alternativo = citarabina a dosis bajas, hipometilantes, pautas poliquimioterápicas con fludarabina y citarabina.

El apoyo social y familiar es especialmente relevante en los pacientes con limitaciones en las actividades básicas de la vida diaria, pero también en los pacientes con limitaciones solamente en las actividades instrumentales a esta edad, e incluso en los independientes (desarrollo de complicaciones, frecuentes visitas al hospital de día, capacidad económica limitada). Dicho apoyo puede modular la intensidad del tratamiento que se va a recibir cuando se barajen dos posibles subgrupos terapéuticos.

efectuar un alotrasplante hematopoyético pasa a ser el segundo elemento clave y para tomar esta decisión se deberían utilizar herramientas estandarizadas que permitan estimar la mortalidad relacionada con la técnica, siendo recomendable usar el índice combinado HCT-CI/EBMT recientemente propuesto por el grupo español y que ha sido objeto de un análisis posterior en una serie más amplia (Tabla 2)^{14,15}.

Si el tratamiento puente ideal hacia el trasplante debe ser convencional (quimioterapia intensiva) o alternativo (hipometilantes y pautas equivalentes) es un asunto actualmente en discusión en el que los datos (la proporción de pacientes que llegan al trasplante y las condiciones en que lo hacen con cada estrategia terapéutica) deben tomar el protagonismo que hasta ahora tienen las meras opiniones.

Tratamiento modificador de la historia natural de la enfermedad

Son muchas las enfermedades crónicas y neoplásicas en las que en los últimos años se han conseguido mejoras en la supervivencia sin que las opciones de curación se hayan modificado sustancialmente. En la LMA los avances en este campo han sido pequeños pero innegables y basados en el uso de quimioterapia convencional atenuada (citarabina a bajas dosis)¹⁶ o agentes hipometilantes (azacitidina y decitabina)^{17,18}. Su aplicación en la práctica clínica habitual puede verse facilitada por el desarrollo de esquemas predictivos de respuesta y supervivencia basados en parámetros clínicos (esquema E-ALMA, Tabla 3), hasta que hallazgos moleculares contrastados permitan acercarse a la tan ansiada medicina de precisión.

Tabla 2. Mortalidad relacionada con la técnica del trasplante hematopoyético alogénico en función de la comorbilidad del paciente (puntuación HCT-CI) y las circunstancias del trasplante (puntuación del EBMT) (modificado de ElSawy M, Storer BE, Sorror ML. "To combine or not to combine": Optimizing risk assessment before allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20(9):1455-6)

Puntuación HCT-CI	Puntuación del EBMT	NRM a 4 años (%)
0	0-3	11%
0	Mayor o igual a 4	19%
1-2	0-3	16%
1-2	Mayor o igual a 4	28%
Mayor o igual a 3	0-3	31%
Mayor o igual a 3	Mayor o igual a 4	41%

HCT-CI: *hematopoietic cell transplantation comorbidity index*; EBMT: European Group for Blood and Marrow Transplantation; NRM: *non-relapse mortality*.

Tabla 3. Esquema predictivo europeo para el tratamiento de la LMA con azacitidina (E-ALMA) (modificado de Ramos F, Thépot S, Pleyer L, Maurillo L, Itzykson R, Bargay J, et al; European ALMA Investigators. Azacitidine frontline therapy for unfit acute myeloid leukemia patients: clinical use and outcome prediction. *Leuk Res* 2015;39(3):296-306)

European ALMA Score				
Predictores	Estratos	Subtotal		
Performance Status (ECOG)	0	0		
	1-2	1		
	3-4	2		
Recuento leucocitario antes de AZA	Hasta $10 \times 10^9/L$	0		
	Mayor de $10 \times 10^9/L$	1		
Citogenética	Normal	0		
	Normal	1		
	Subgrupos pronósticos	Total	% RC	SG
	Favorable	0	36,4	17,6
	Intermedio	1-2	19,8	10,6
	Desfavorable	3-4	14,6	4,5

AZA: azacitidina; ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group; % RC: porcentaje de remisiones completas; SG: mediana de supervivencia global (meses); Aplicabilidad: pacientes unfit con LMA diagnosticada según criterios OMS, con cualquier porcentaje de blastos en la médula ósea, tratados en la comunidad en primera línea con azacitidina.

Otras pautas atenuadas, basadas en combinaciones de fludarabina y citarabina (con o sin antraciclinas) como los esquemas FLAGIDA-lite (20) y los propuestos por los grupos PETHEMA Y CETLAM, muestran resultados prometedores en lo referente a la proporción de pacientes que alcanza la remisión completa, pero todavía no disponemos de resultados de su comparación formal con el tratamiento convencional o los agentes hipometilantes en aspectos básicos como la supervivencia global y la calidad de vida relacionada con la salud, lo que esperamos conseguir en los próximos años.

Tratamiento de soporte

El tratamiento de soporte no es una alternativa, sino el elemento conductor común de todas las estrategias terapéuticas. Sin embargo, su uso exclusivo (tratamiento paliativo) supone una decisión de gran importancia para el paciente, porque la experiencia individual, los datos observacionales y los procedentes de ensayos clínicos muestran que la mediana de supervivencia de los pacientes que siguen esta ruta es inferior a 3 meses.

Conclusiones

En los pacientes ancianos con LMA debemos intentar mantener una actitud proactiva y reducir al mínimo la proporción de pacientes que reciben un tratamiento exclusivamente paliativo, lo que es ya una realidad en las mejores unidades clínicas de nuestro país.

Se hace cada vez más necesario mejorar la identificación de los pacientes que pueden seguir de forma segura una estrategia curativa, evitándole al resto de los enfermos lo que a fecha de hoy podría considerarse un sufrimiento inapropiado, para lo que necesitamos dar un paso adelante e integrar en nuestra actividad las habilidades geriátricas básicas, así como avanzar en la identificación de dianas terapéuticas que permitan emular lo conseguido hasta la fecha en el ámbito de la leucemia aguda promielocítica.

Bibliografía

1. Juliusson G, Antunovic P, Derolf A, Lehmann S, Möllgård L, Stockelberg D, et al. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood* 2009;113(18):4179-87.
2. Wheatley K, Brookes CL, Howman AJ, Goldstone AH, Milligan DW, Prentice AG, et al; United Kingdom National Cancer Research Institute Haematological Oncology Clinical Studies Group and Acute Myeloid Leukaemia Subgroup. Prognostic factor analysis of the survival of elderly patients with AML in the MRC AML11 and LRF AML14 trials. *Br J Haematol* 2009;145(5):598-605.
3. Lazenby M, Gilkes AF, Marrin C, Evans A, Hills RK, Burnett AK. The prognostic relevance of *flt3* and *npm1* mutations on older patients treated intensively or non-intensively: a study of 1312 patients in the UK NCRI AML16 trial. *Leukemia* 2014;28(10):1953-9.
4. Löwenberg B, Zittoun R, Kerkhofs H, Jehn U, Abels J, Debusscher L, et al. On the value of intensive remission-induction chemotherapy in elderly patients of 65+ years with acute myeloid leukemia: a randomized phase III study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Leukemia Group. *J Clin Oncol* 1989;7(9):1268-74.
5. Tilly H, Castaigne S, Bordessoule D, Casassus P, Le Prisé PY, Tertian G, et al. Low-dose cytarabine versus intensive chemotherapy in the treatment of acute nonlymphocytic leukemia in the elderly. *J Clin Oncol* 1990;8(2):272-9.
6. Giles FJ, Borthakur G, Ravandi F, Faderl S, Verstovsek S, Thomas D, et al. The haematopoietic cell transplantation comorbidity index score is predictive of early death and survival in patients over 60 years of age receiving induction therapy for acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2007;136(4):624-7.
7. Klepin HD. Geriatric perspective: how to assess fitness for chemotherapy in acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2014;2014(1):8-13.
8. Hamaker ME, Prins MC, Stauder R. The relevance of a geriatric assessment for elderly patients with a haematological malignancy--a systematic review. *Leuk Res* 2014;38(3):275-83.
9. Hamaker ME, Schiphorst AH, ten Bokkel Huinink D, Schaar C, van Munster BC. The effect of a geriatric evaluation on treatment decisions for older cancer patients--a systematic review. *Acta Oncol* 2014;53(3):289-96.
10. Klepin HD, Geiger AM, Tooze JA, Kritchevsky SB, Williamson JD, Pardee TS, et al. Geriatric assessment predicts survival for older adults receiving induction chemotherapy for acute myelogenous leukemia. *Blood* 2013;121(21):4287-94.
11. Klepin HD, Geiger AM, Tooze JA, Kritchevsky SB, Williamson JD, Ellis LR, et al. The feasibility of inpatient geriatric assessment for older adults receiving induction chemotherapy for acute myelogenous leukemia. *J Am Geriatr Soc* 2011;59(10):1837-46.
12. Deschler B, Ihorst G, Platzbecker U, Germing U, März E, de Figuerido M, et al. Parameters detected by geriatric and quality of life assessment in 195 older patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia are highly predictive for outcome. *Haematologica* 2013;98(2):208-16.
13. Ostgard LS, Nørgaard JM, Sengeløv H, Holm MS, Jensen MK, Kallenbach M, et al. Impact of chemotherapy delay on short- and long-term survival in younger and older AML patients: a Danish population-based cohort study. *Leukemia* 2014;28(9):1926-9.
14. Barba P, Martino R, Pérez-Simón JA, Fernández-Avilés F, Castillo N, Piñana JL, et al. Combination of the Hematopoietic Cell Transplantation Comorbidity Index and the European Group for Blood and Marrow Transplantation score allows a better stratification of high-risk patients undergoing reduced-toxicity allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20(1):66-72.
15. ElSawy M, Storer BE, Sorror ML. "To combine or not to combine": optimizing risk assessment before allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20(9):1455-6.
16. Burnett AK, Milligan D, Prentice AG, et al. A comparison of low-dose cytarabine and hydroxyurea with or without all-trans retinoic acid for acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome in patients not considered fit for intensive treatment. *Cancer* 2007;109:1114-24.
17. Fenaux P, Mufti GJ, Hellström-Lindberg E, 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;28:562-9.

18. Kantarjian HM, Thomas XG, Dmoszynska A, et al. Multicenter, randomized, open-label, phase III trial of decitabine versus patient choice, with physician advice, of either supportive care or low-dose cytarabine for the treatment of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2012;30:2670-7.
19. Ramos F, Thépot S, Pleyer L, Maurillo L, Itzykson R, Bargay J, et al; European ALMA Investigators. Azacitidine frontline therapy for unfit acute myeloid leukemia patients: clinical use and outcome prediction. *Leuk Res* 2015;39(3):296-306.
20. Bermúdez A, Pérez-Vázquez G, Insunza A, Baro J, Colorado M, Conde E, et al. FLAGIDA-lite is an effective regimen for patients between 70 and 80 years with acute myeloid leukemia or refractory anemia with excess blasts-2 and is feasible as outpatient treatment. *Am J Hematol* 2012;87(1):42-4.

Herramientas para la valoración geriátrica en Hematología

A. J. CRUZ-JENTOFT

Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid

Un número creciente de los pacientes que acuden a la consulta del hematólogo son personas mayores. Además de la enfermedad por la que consultan, muchos de estos pacientes, especialmente los más mayores, tienen otras enfermedades, problemas físicos o mentales o usan un elevado número de fármacos que condicionan la toma de decisiones diagnósticas y terapéuticas, influyen en el pronóstico y alteran el curso clínico de la enfermedad índice.

Estos enfermos son excluidos o están muy infrarrepresentados en los ensayos clínicos de los tratamientos e intervenciones para tratar las enfermedades hematológicas, especialmente las oncohematológicas, en las que la agresividad de los tratamientos es mayor, y especialmente los pacientes más complejos. Por tanto, el tratamiento óptimo de muchas enfermedades y sus potenciales resultados o tolerabilidad son inciertos.

La toma de decisiones en estos pacientes complejos se hace en muchas situaciones clínicas de forma subjetiva, tanto por parte del profesional como del propio paciente. En geriatría existe una herramienta que ha demostrado su valor en este entorno, conocida como “valoración geriátrica integral” (VGI). La valoración geriátrica es un proceso diagnóstico multidisciplinar e interdisciplinar que pretende cuantificar los problemas y capacidades

médicos, psicosociales y funcionales de cada individuo mayor con la intención de elaborar un plan integral de tratamiento y seguimiento a largo plazo.

La valoración geriátrica es útil para tomar decisiones en pacientes mayores con enfermedades graves o complejas, es capaz de detectar problemas no percibidos, predice la mortalidad y la tolerancia al tratamiento en pacientes oncológicos y permite adaptar la intervención a las necesidades personales de cada individuo. Es una herramienta compleja que, en su mejor expresión, debe ser realizada por un equipo geriátrico multidisciplinar.

La VGI no es rentable en todos los individuos mayores. En el contexto de las consultas de los especialistas de órgano o sistema, formas adaptadas de la valoración geriátrica permiten tanto el cribado de aquellos pacientes que están muy bien (y pueden ser diagnosticados y tratados con los protocolos habituales) como los que están muy mal (en quienes el deterioro funcional es poco reversible o en quienes una causa de mortalidad o discapacidad competitiva tiene mayor posibilidad de afectar al paciente que la enfermedad hematológica). De esta manera, permiten también distinguir aquellos individuos complejos que precisan una valoración más completa por geriatría, idealmente en el marco de una consulta de hematogeriatría u oncogeriatría.

Prevención del tromboembolismo en fibrilación auricular en el paciente anciano

V. ROLDÁN SCHILLING

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

La edad es un importante factor de riesgo tanto para el tromboembolismo arterial como venoso. El riesgo de ictus isquémico aumenta 1,5 veces por cada 10 años de edad, con una incidencia de 29 casos por cada 1.000 para pacientes mayores de 85 años, entre otras razones porque la hipertensión, la insuficiencia cardiaca y la fibrilación auricular (FA) son más frecuentes en pacientes ancianos. Mientras que la FA es poco frecuente en pacientes menores de 65 años, la prevalencia llega hasta el 10% en pacientes mayores de 80, de forma que casi el 25% de los ictus isquémicos en pacientes mayores de 80 años son causados por la FA^{1,2}.

La anticoagulación oral con fármacos antivitaminas K (AVK) reduce el riesgo de ictus aproximadamente un 64% en pacientes con FA. Sin embargo, el tratamiento anticoagulante oral lleva aparejado un aumento del riesgo hemorrágico³. Aproximadamente el riesgo de hemorragia mayor en un paciente tratado con AVK es del 2-3% al año. Además, el riesgo de sangrado asociado a la anticoagulación es dependiente de la edad y aumenta un 40% por cada 10 años. Esto ha llevado a una infrutilización de la anticoagulación en pacientes con FA, especialmente en pacientes con edad avanzada³.

Según las últimas guías sobre el manejo de la FA de la Sociedad Europea de Cardiología, la indicación de la anticoagulación viene definida por la escala CHA2DS2-VASc (insuficiencia cardiaca congestiva, hipertensión, edad ≥ 75 [doble], diabetes, ictus [doble], enfermedad vascular y categoría de sexo [mujeres]). Las guías indican que se debe anticoagular a todos los pacientes con una igual o mayor de 2, donde la edad superior a 75 años (2 puntos) sería indicación por sí sola de anticoagulación. Las mismas guías recomiendan estimar el riesgo hemorrágico mediante la escala HAS-BLED (hipertensión, insuficiencia renal/hepática, ictus previo, antecedentes de hemorragia, INR lábil, edad superior a 65 años, ingesta de fármacos que afecten a la hemostasia), donde de nuevo la edad supone un factor de riesgo⁴.

Sin embargo, como ya es conocido, el tratamiento con AVK tiene una serie de limitaciones que son más acusadas en pacientes con FA. Por una parte, la edad

aumenta la sensibilidad a estos fármacos y los pacientes ancianos suelen necesitar dosis más pequeñas. Las interferencias farmacológicas, así como la coexistencia de otras comorbilidades (insuficiencia cardiaca, renal), también dificultan el control con estos fármacos⁵.

En este sentido, los anticoagulantes orales de acción directa (ACODS) ofrecen una serie de ventajas que los hacen atractivos para este grupo de edad: inicio y fin de acción rápido, escasas interferencias farmacológicas, dosis fija y no necesidad de monitorización.

Dabigatran es un inhibidor directo y reversible de la trombina. Su eficacia y seguridad en la prevención del ictus y el tromboembolismo sistémico en la FA fue probado en el ensayo RELY. Aproximadamente un 40% de los pacientes eran mayores de 75 años. Dos subestudios del ensayo RELY demostraron que para pacientes mayores de 75 y 80 años se mantenían los criterios de eficacia (dabigatran 150 fue superior a warfarina en la prevención del ictus) y seguridad en términos de reducción de hemorragia intracraneal. Sin embargo la tasa de hemorragia mayor fue superior en el brazo de dabigatran para los dos grupos de edad, especialmente en pacientes mayores de 80 años. Aunque un 80% de la molécula se elimina por vía renal, la adjudicación de la dosis (150 o 110) no se ajustó a la función renal, lo que pudiera explicar el mayor riesgo hemorrágico en pacientes mayores⁶.

Rivaroxaban es un inhibidor directo del factor Xa. El estudio ROCKET comparó rivaroxaban con warfarina para la prevención del ictus en FA. En este caso no hubo diferencias en los resultados obtenidos de la población global y entre los pacientes mayores y menores de 75 años. Aproximadamente un 44% de los pacientes eran mayores de 75 años. Rivaroxaban fue no inferior a warfarina en la reducción del ictus y la hemorragia mayor y superior en la reducción de la hemorragia intracraneal. En este caso sí se redujo la dosis en caso de filtrado glomerular inferior a 50 mL/min. Por otro lado, hay que destacar que los pacientes incluidos en el ROCKET eran de mayor riesgo trombótico que los incluidos en el RELY, donde el 55% presentaban ictus previo⁷.

Apixaban es también un inhibidor directo y reversible del factor Xa. Su eficacia y seguridad para la prevención del ictus asociado a la FA se ensayó en el estudio ARISTOTLE. Un 31% de los pacientes eran mayores de 75 años. Se redujo la dosis en caso de coexistir 2 de los siguientes factores, edad \geq 80 años, peso \leq 60 kg o creatinina \geq 1,5 mg/dL, o bien en caso de filtrado glomerular inferior a 30 mL/min. Tampoco mostró diferencias en los resultados, analizándolos por subgrupos de edad (mayor o menor de 75 años). En ambos grupos apixaban fue superior a warfarina en la prevención del ictus y la reducción de la hemorragia, tanto mayor como intracraneal⁸.

Conclusiones

La prevalencia de la FA está aumentando conforme aumenta la edad de la población. La anticoagulación oral es efectiva reduciendo el riesgo de ictus isquémico, aunque lleva incrementado un aumento del riesgo hemorrágico. En cualquier caso, el beneficio neto es a favor de la prevención del ictus.

Los anticoagulantes orales de acción directa, dabigatran, rivaroxaban y apixaban, son al menos tan efectivos como la warfarina reduciendo el riesgo de ictus y son más seguros que warfarina en población anciana. Por otra parte, su facilidad de uso, la no necesidad de monitorización y la menor interacción farmacológica y

dietética hacen que sean atractivos para el uso en esta población.

Bibliografía

1. Van Walraven C, Hart RG, Connolly S, et al. Effect of age on stroke prevention therapy in patients with atrial fibrillation: the atrial fibrillation investigators. *Stroke* 2009;40:1410-6.
2. Wolf PA, Abbott RD, Kannel WB. Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the Framingham study. *Stroke* 1991;22:983-8.
3. Go AS, Hylek EM, Borowsky LH, et al. Warfarin use among ambulatory patients with nonvalvular atrial fibrillation: the anticoagulation and risk factors in atrial fibrillation (ATRIA) study. *Ann Intern Med* 1999;131:927-34.
4. Camm AJ, Lip GY, De Caterina R, Savelieva I, Atar D, Hohnloser SH, et al; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). 2012 focused update of the ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation: an update of the 2010 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation. Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association. *Eur Heart J* 2012;33(21):2719-47.
5. Barco S, Cheung YW, Eikelboom JW, Coppens M. New oral anticoagulants in elderly patients. *Best Pract Res Clin Haematol* 2013;26:215-24.
6. Connolly SJ, Ezekowitz MD, Yusuf S, et al. Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2009;361:1139-51.
7. Patel MR, Mahaffey KW, Garg J, et al. Rivaroxaban versus warfarin in nonvalvular atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2011;365:883-91.
8. Granger CB, Alexander JH, McMurray JJ, et al. Apixaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2011;365:981-92.

Casos clínico-citológicos. Grupo Español de Citología Hematológica (GECH)

COORDINADORES: **J.M. RAYA SÁNCHEZ.** *Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Universitario de Canarias. Universidad de La Laguna. Santa Cruz de Tenerife*

E. LUÑO FERNÁNDEZ. *Servicio de Hematología. Hospital Central de Asturias. Universidad de Oviedo. Oviedo, Asturias*

El Grupo Español de Citología Hematológica (GECH), como ya es tradición, se complace en presentar la siguiente propuesta de casos clínico-citológicos al Congreso Nacional de la SEHH-SETH que, en esta edición de 2015, se celebra en Valencia. El GECH ha seleccionado seis casos por su especial interés científico, siempre con un carácter práctico y docente, y sin renunciar al debate y la interacción con la audiencia.

El Dr. De Miguel (Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid) presentará una paciente joven (29 años) con esplenomegalia asintomática para estudio (como forma de presentación de una enfermedad rara), la cual constituye en muchas ocasiones un reto diagnóstico, y nos mostrará unas imágenes citológicas e histológicas de médula ósea de gran interés.

La Dra. Piñán (Hospital Universitario de Cruces, Vizcaya) nos presenta la evolución inesperada de un adolescente (15 años) con diagnóstico inicial de leucemia aguda linfoblástica T, y cómo la morfología y la citometría de flujo resultan imprescindibles en la evaluación y el seguimiento de estos pacientes, con cambios eventuales que pueden condicionar de forma determinante su pronóstico.

El caso que nos propone la Dra. Monsalve (Hospital Universitario La Paz, Madrid) constituye un ejercicio diagnóstico muy interesante en un lactante con una forma de debut clínicamente muy florida. En esta ocasión, la morfología celular e inmunocitoquímica en el aspirado medular y la imagen histopatológica y la inmunohistoquímica en la biopsia de médula ósea resultan de gran utilidad.

La Dra. Morales (Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, Sevilla) presentará el caso de una paciente de edad avanzada (79 años) con una asociación clínica muy poco corriente, con el VEB como telón de fondo. Incluye imágenes de esas que rara vez podemos ver, ni siquiera en los atlas citomorfológicos.

En el caso del Dr. Sagués (ICO-Girona, Hospital Universitari Dr. Josep Trueta, Girona), la gammapatía monoclonal diagnosticada en un varón de 48 años exhibe características excepcionales, con especial hincapié en los aspectos citológicos, en el diagnóstico diferencial y en la aportación de los estudios genéticos moleculares para llegar a un diagnóstico correcto.

Finalmente, la Dra. Bru (Hospital Joan XXIII, ICO, Tarragona) nos presenta el caso de una mujer de 67 años afecta de una neoplasia mieloproliferativa crónica, en la que (tal vez más que nunca) resulta imprescindible un diagnóstico integrado entre los clínicos, citólogos y genetistas, y que constata que todavía no todo está perfectamente claro en la clasificación OMS actual.

Deseamos, como viene siendo habitual en los congresos de nuestra sociedad, poder contar con una nutrida presencia de hematólogos y residentes, con la esperanza de que este simposio de casos clínico-citológicos les sea ameno y útil.

De forma especial, quisiéramos recordar aquí a dos hematólogas que desgraciadamente nos dejaron en el último año, la Dra. Alicia Domingo y la Dra. M^a del Mar Osma, grandes personas y enormes profesionales, cuya huella en nosotros y en nuestro grupo será indeleble y a cuya memoria nos gustaría dedicar este simposio.

Paciente diagnosticado de leucemia linfoblástica aguda T evolucionada a leucemia aguda de fenotipo mixto

M.Á. PIÑÁN¹, I. ANCÍN¹, I. ASTIGARRAGA², R. ADÁN², A. ECHEBARRÍ², R. LÓPEZ-ALMARAZ², M. GARCÍA ARIÑO², N. OLIVARES³, E. LANDETA¹, I. AMARICA¹, E. LUÑO⁴

¹Servicio de Hematología-Hemoterapia. ²Servicio de Pediatría. ³Servicio de Inmunología.

Hospital Universitario Cruces. Vizcaya. ⁴Servicio de Hematología. Hospital Universitario Central de Asturias. Oviedo

Antecedentes personales y familiares

Sin interés.

Enfermedad actual

En agosto de 2011 un adolescente varón de 15 años ingresa en nuestro hospital por sospecha de leucemia aguda. Refería astenia progresiva de un mes de evolución, acompañada de la aparición de adenopatías periféricas en todos los territorios.

Exploración física

Adenopatías cervicales, axilares e inguinales bilaterales no dolorosas.

Pruebas complementarias

- *Hemograma*: leucocitos: $11,3 \times 10^9/L$ (neutrófilos 35%, linfocitos 25%, monocitos 1%, eosinófilos 3%, blastos 36%); hemoglobina: 133 g/L; plaquetas: $165 \times 10^9/L$.
- *Aspirado medular*: hiper celular, con una infiltración de 72% de blastos de pequeño tamaño, relación nucleocitoplasmática elevada, núcleo redondeado, nucleolado, con citoplasma escaso y agranular; la reacción con la peroxidasa fue negativa (Figuras 1 y 2).
- *Inmunofenotipo en MO*: expresión positiva para los marcadores CD45, CD34, CD3, CD7, CD5, CD2, TCR $\gamma\delta$, nuTdT y CD13. Negatividad para marcadores de estirpe B y mieloperoxidasa (MPO).
- *Cariotipo en MO*: 46,XY[30].
- *Estudio molecular*: reordenamiento TRC $\gamma\delta$ positivo y negatividad para los reordenamientos *BCR-ABL* (*p210*, *p190*), *MLL-AF4*, *TEL-AML1*, *E2A-PBX* (RT-PCR) y *MLL* (FISH).

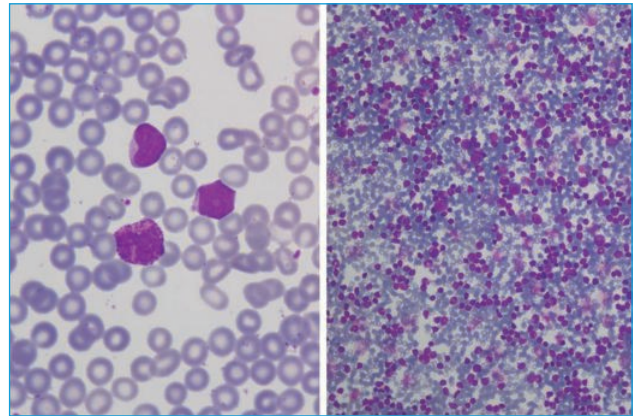


Figura 1. Sangre periférica: blastos de tamaño pequeño, relación nucleocitoplasmática elevada y núcleo nucleolado (MGG x 1000) y aspirado medular: imagen hiper celular y monomorfa constituida por una infiltración blástica de características homogéneas (MGG x 200).

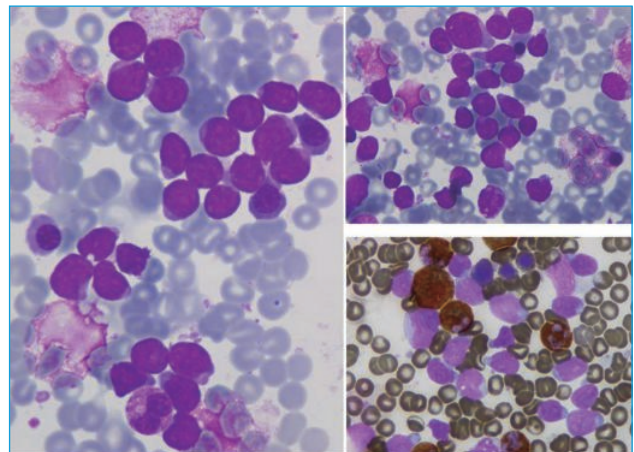


Figura 2. Aspirado medular: blastos de pequeño tamaño, núcleo redondeado con nucleolos y citoplasma agranular (MGG x 1000) y tinción de peroxidasa negativa en la población blástica).

Diagnóstico

Leucemia linfoblástica aguda T (LLA- T), estadio intermedio (II-III) de la clasificación EGIL.

Evolución

El paciente cumplía criterios de LLA-T de alto riesgo e inició tratamiento quimioterápico según protocolo de la SEHOP 2005. En el aspirado medular de evaluación del día +15 de tratamiento persistía un 35,4% de células blásticas, con una enfermedad residual (EMR) por citometría de flujo del 33%, considerado como un fracaso de citorreducción, por lo que se cambió a un protocolo terapéutico de muy alto riesgo. En el día +30 alcanzó remisión completa morfológica, con una enfermedad mínima residual (EMR) < 0,01%. En noviembre de 2013, al finalizar los 2 años de tratamiento, se realizó una evaluación medular en la que se observó la presencia de un 2,8% de células blásticas y una EMR del 1,21%; el cariotipo fue normal y como único dato significativo existía una discreta leucopenia de $3,5 \times 10^9/L$, con fórmula normal, Hb 155 g/L y plaquetas $184 \times 10^9/L$. El paciente estaba asintomático, la exploración física era normal y se decidió vigilancia estrecha con controles periódicos de médula ósea.

En enero de 2014 se hicieron 2 punciones medulares en un espacio de 10 días; en el primero de ellos el recuento de blastos fue de 14% y en el segundo de 25%, complementándose en este último con un estudio ultraestructural. En ambos casos se observaban unas células blásticas “diferentes”, con una mayor proporción de citoplasma y, en general, con una granulación única y/o fina y confluyente, así como dudosos bastones de Auer únicos que se disponían muy próximos a la membrana celular; la reacción de la peroxidasa era positiva en el 16% de los blastos en el primer aspirado y en el 22% en el segundo, y los bastones se teñían con mucha claridad. Otra alteración acompañantes era la eritrofagocitosis por parte de los blastos (Figuras 3-6).

La ultraestructura confirmó el origen mielóide de la celularidad blástica ya que 28% de ellos era positivos para la MPO: 24% con disposición solo granular y en un 4% localizada en la zona de la cisterna perinuclear, trazos de RER, Golgi y gránulos; se vieron asimismo bastones de Auer, tanto en los blastos como entre los detritus de los macrófagos (Figuras 7-11). El fenotipo confirmó asimismo la presencia de la población mielóide (citMPO, CD33, CD117, CD34): 6% junto a la persistencia de la población blástica linfóide T (cCD3, sCD3, CD5, nuTdT, TCR $\gamma\delta$): 5% (Figura 12).

Los estudio citogenéticos y moleculares fueron:

- Cariotipo: 46,XY[30].
- TCR: positivo (PCR).

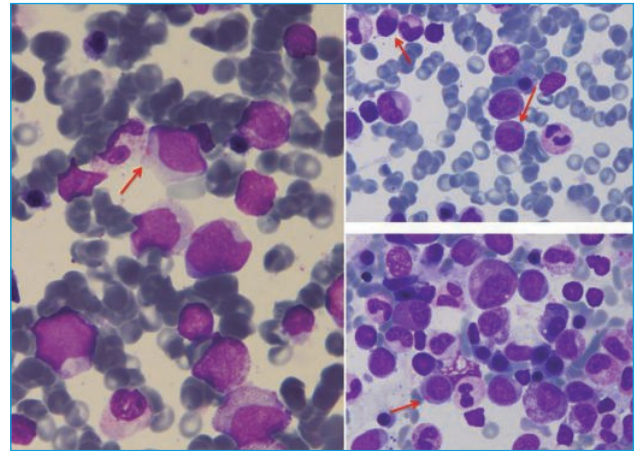


Figura 3. Aspirado medular: blastosis de mediano tamaño, con núcleo de cromatina laxa y citoplasma granular (MGG x 1000).

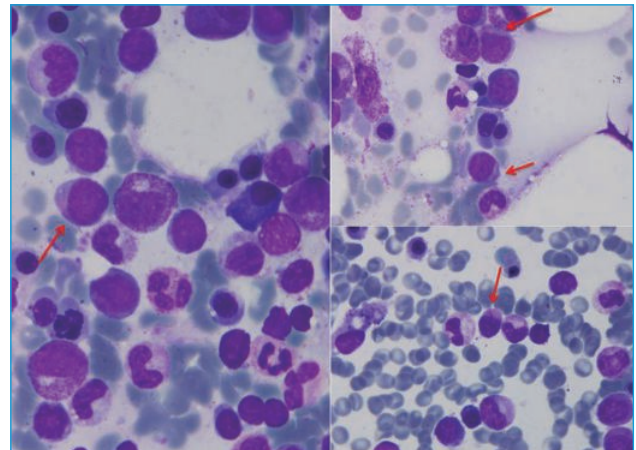


Figura 4. Aspirado medular: blastos con bastones de Auer (MGG x 1000).

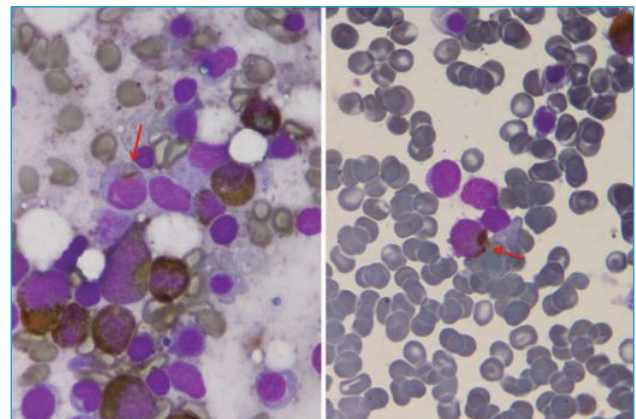


Figura 5. Aspirado medular: bastón de Auer positivo para la tinción de peroxidasa en los blastos.

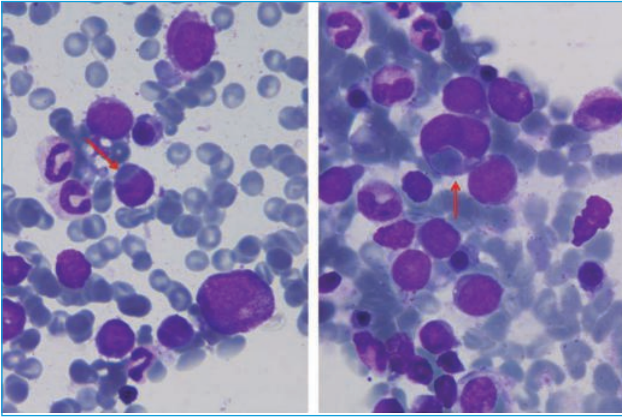


Figura 6. Aspirado medular: imágenes de eritrofagocitosis (MGG x 1000).

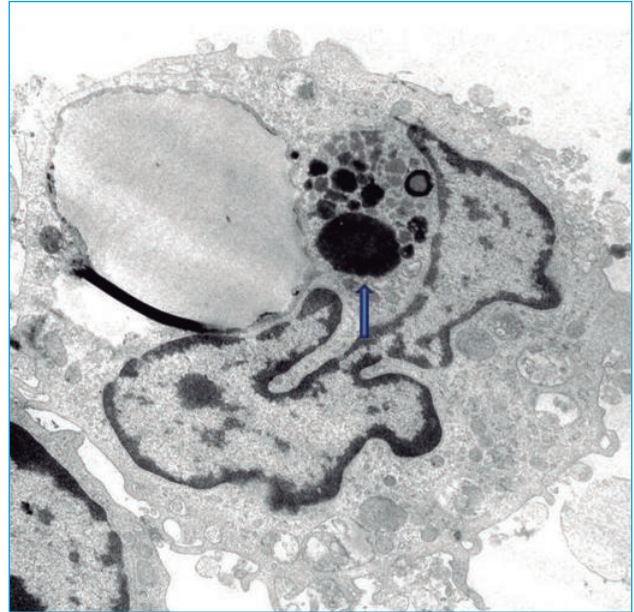


Figura 9. Imagen ultraestructural de un macrófago con un bastón de Auer fagocitado (flecha). MET: reacción de mieloperoxidasa. Doble contraste. x10K.

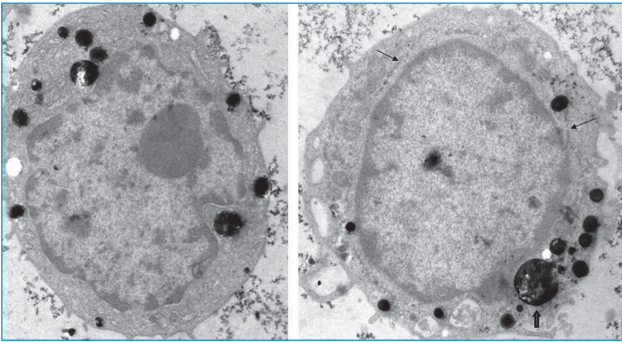


Figura 7. Imagen ultraestructural de 2 blastos con granulación mieloperoxidasa positiva. Las flechas señalan trazos de RER mieloperoxidasa positivos. Bastón de Auer (flecha ancha). MET: reacción de mieloperoxidasa sin contrastar. x12k

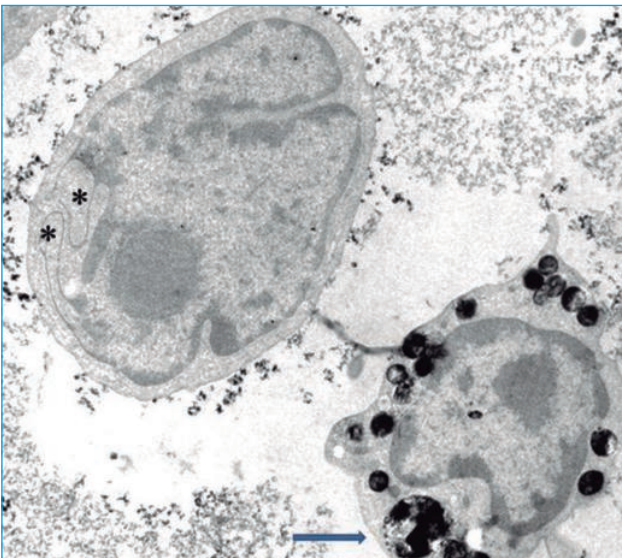


Figura 8. Imagen ultraestructural de un blasto agranular con grandes bolsillos nucleares (*) y un granulocito semimaduro que contiene un bastón de Auer (flecha). MET: reacción de mieloperoxidasa sin contrastar. x12k

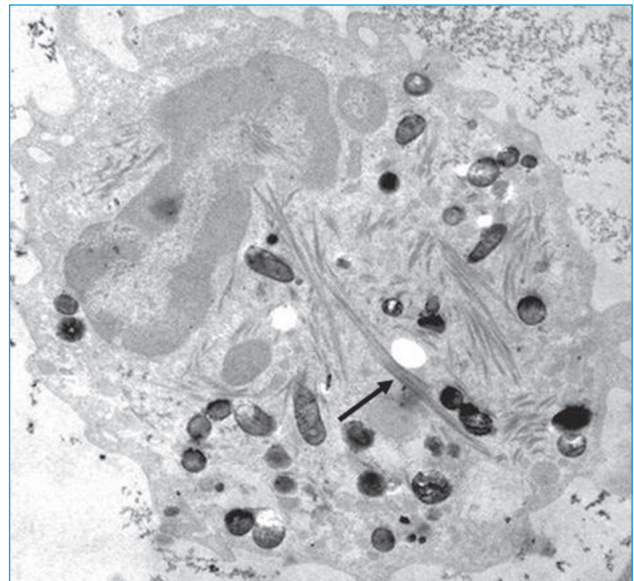


Figura 10. Imagen ultraestructural de un granulocito que contiene múltiples "astillas" pero que no exhiben mieloperoxidasa positividad. MET: reacción de mieloperoxidasa sin contrastar. x12k.

- Reordenamientos *PML-RAR α* , *AML1-ETO*, *CBF-MYH11* (RT-PCR): negativos.
- Estudio de mutaciones *MLL* (FISH), *FLT3/ITD* y *D835* (electroforesis capilar), *NPM1* (*melting* de alta resolución): negativos.

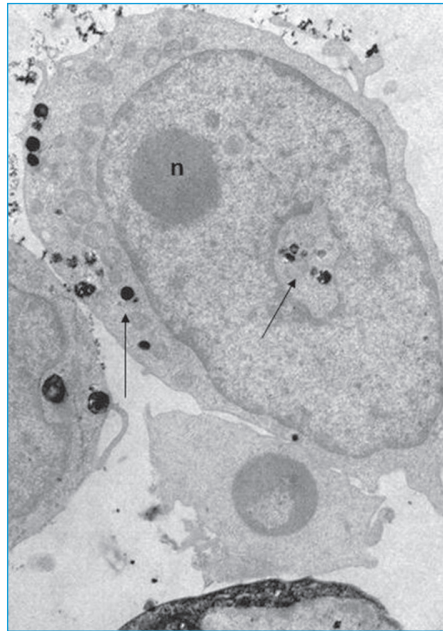


Figura 11. Imagen ultraestructural de un blasto granular (flechas) y un gran nucléolo (n). MET: reacción de mieloperoxidasa sin contrastar. x10K.

Diagnóstico

Leucemia aguda de linaje ambiguo (LALA)-leucemia aguda de fenotipo mixto (LAFM) T/mieloide. El paciente fue tratado con 2 ciclos de FLAG-IDA (G-CSF/7 días, fludarabina 30 mg/m²/días 2-6, citarabina 2 g/m²/días 2-6, idarrubicina 8 mg/m²/días 4-6) y se inició la búsqueda de donante no emparentado. La respuesta a estos tratamientos fue escasa, con persistencia de enfermedad tras el primer ciclo (2% de blastos en sangre periférica y 4,8% en médula ósea, con EMR del 0,37%) y también tras el segundo (2,4% de blastos en médula y una EMR del 0,27%). En la evaluación pretrasplante (mayo de 2014) la infiltración blástica era de un 42% (23% de estirpe linfóide T y 19,1% mielóide).

Recibió tratamiento de reinducción con dexametasona 6 mg/m²/d/5 días, mitoxantrone 8 mg/m²/d/5 días, etopósido 100 mg/m²/d/5 días y citarabina 1 g/m²/12 h/5 días y la respuesta fue nula: 64,5% de blastos en el aspirado del día +15 de tratamiento y una EMR del 8,65% en el día +30.

Por falta de respuesta fue tratado con otro esquema citostático (ciclofosfamida 440 mg/m²/d/5 días,

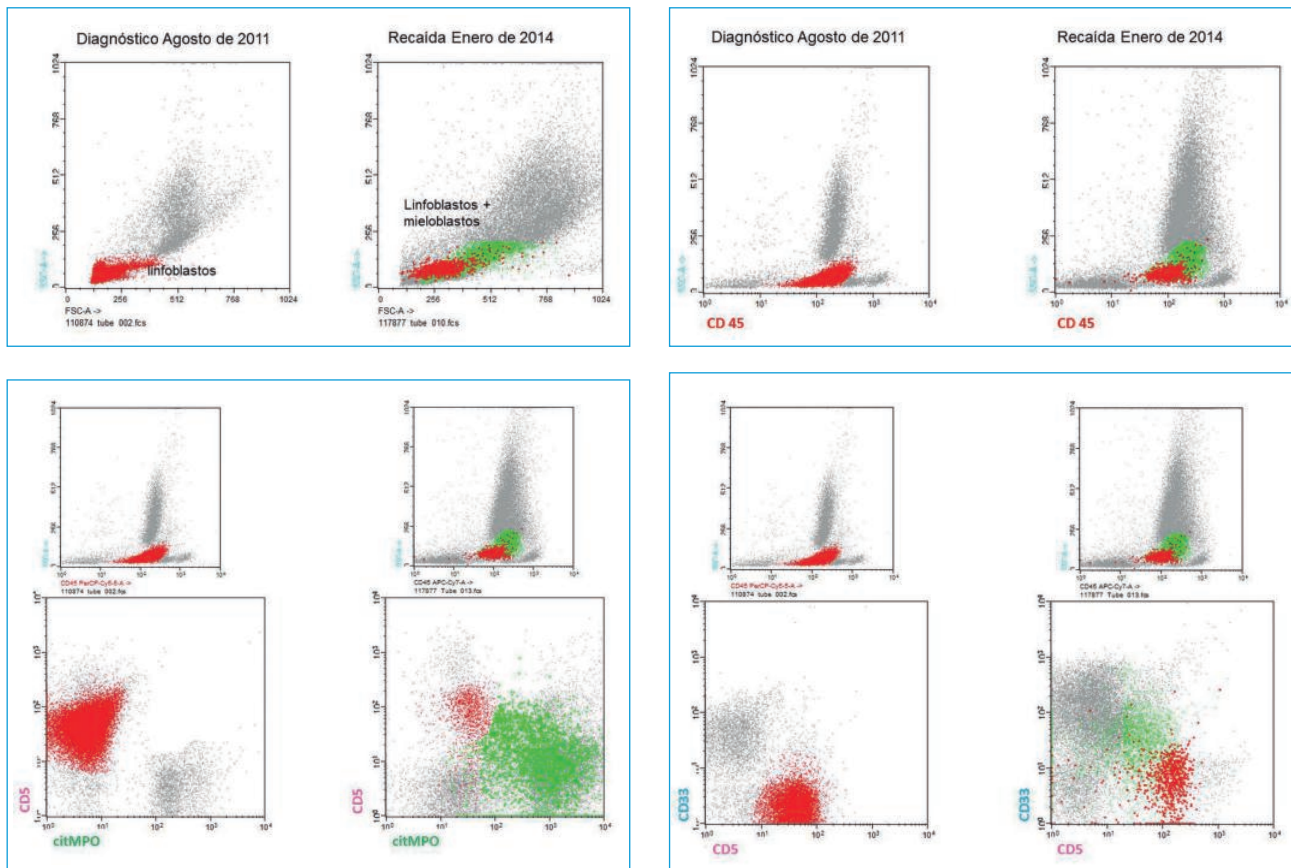


Figura 12. Citometría de flujo: comparación de los diagramas en el momento del diagnóstico y la recaída, mostrando la aparición de la población mielóide mieloperoxidasa positiva.

etopósido 100 mg/m²/d/5 días y neralabina 650 mg/m²/d/5 días), consiguiéndose una EMR del 0,016%.

Se acondicionó con irradiación corporal total (12 Gy), VP-16 30 mg/kg/1 día, ciclofosfamida 60 mg/m²/2 días y ATG 2,5 mg/kg/3 días y se realizó la infusión de progenitores hematopoyéticos en agosto de 2014, sin incidencias. La recuperación hemoperiférica de reticulocitos, neutrófilos y plaquetas se documentó el día +23 del trasplante y el quimerismo del donante fue del 100% el día +25, y se constató 4 meses después.

Las complicaciones postrasplante fueron aplasia medular, neutropenia febril, mucositis grado IV, EICH cutáneo grado I, EICH intestinal grado II, sospecha de infección fúngica pulmonar, cistitis hemorrágica por BK virus, trombosis yugular y subclavia derechas, hipertensión arterial secundaria, hiperbilirrubinemia y polineuropatía sensitivomotora.

En diciembre de 2014 ingresa de nuevo por dolor abdominal, fiebre prolongada, vómitos, cefalea, astenia y anorexia.

En la TC: adenopatías retroperitoneales paraaórticas izquierdas de hasta 11 mm. Engrosamiento de paredes gástricas, principalmente en la región antral. Presencia de lesiones focales esplénicas, hepáticas y renales que sugieren un diagnóstico diferencial entre lesiones infecciosas frente a infiltración tumoral.

Biopsia de la mucosa gástrica: fragmentos de mucosa gástrica de tipo oxíntica con infiltración en la lámina propia por una población celular de pequeño tamaño, hábito linfoide y estirpe T (CD3 positivas) y grandes, de estirpe B (CD20 positivas) que infiltran el epitelio glandular destruyéndolo. Se descarta la existencia de formas blásticas (CD34 y TDT negativos) y el origen mieloide de las células (MPO negativa).

Estas células expresan positividad para MUM-1, bcl-2, CD20 y Ki-67: 80% y negatividad para CD10, CD3, CD5, bcl-6 y CD30. Virus de Epstein-Barr positivo (EBER).

Diagnóstico

Linfoma difuso de células grandes B; compatible con linfoma postrasplante.

Aspirado medular y biopsia: sin evidencia de infiltración linfomatosa ni leucémica; EMR < 0,001%

Recibió tratamiento con varias líneas de quimioterapia e infusión de linfocitos del donante y no se obtuvo respuesta; se sucedió una rápida progresión del linfoma, con aparición de adenopatías periféricas, una gran masa en cavum, hepatoesplenomegalia y afectación del SNC, lo que condujo a un deterioro del estado general, inestabilidad hemodinámica y finalmente el fallecimiento del paciente en marzo de 2015.

Discusión

El Grupo Europeo para la Caracterización Inmunológica de las Leucemias Agudas (EGIL) presentó en 1995 las guías para la clasificación de las leucemias agudas bifenotípicas. Estos criterios fueron incorporados en la OMS de 2001 para clasificar las leucemias agudas de linaje ambiguo (LALA), que incluía las bifenotípicas, bilineales e indiferenciadas. En 2008 se introdujo el término "LAFM" para definir únicamente las dos primeras y se propusieron nuevos criterios¹. El cambio sustancial se basó en la definición y utilización de un menor número de marcadores de línea, excluyendo el sistema de puntuación del EGIL, así como la no necesidad de que las poblaciones de blastos alcanzasen el 20%, en el caso de las bilineales. Estas modificaciones han tenido un impacto en la incidencia de este tipo de leucemias y también han generado no poca controversia²⁻⁵.

Las LALA representan un subgrupo heterogéneo y poco frecuente de leucemias agudas con un pronóstico adverso que afecta tanto a adultos como niños. Suponen menos del 4% del total, siendo menor la incidencia en la población pediátrica (1,2-1,8%) y menor aún si consideramos exclusivamente las bilineales, reduciéndose al 0,2% de todas las leucemias agudas⁶. Las publicaciones generalmente son aportaciones aisladas o revisiones retrospectivas de casos, que muchas veces han sido reclasificados desde la clasificación EGIL y existe un vacío de estudios prospectivos y randomizados, precisamente por esta baja incidencia.

En la mayoría de las leucemias la citogenética y las alteraciones moleculares han tenido un gran protagonismo en el diagnóstico y en el pronóstico, sin embargo, en las LALA los datos biológicos, los criterios pronósticos y la actitud terapéutica no están aún bien definidos, debido una vez más a su rareza y a la carencia de criterios diagnósticos uniformes. Se ha descrito una alta incidencia de anomalías citogenéticas (en el 59-91% de los pacientes), con tan solo un 13% de cariotipos normales; sin embargo, no hay alteraciones específicas asignadas a esta enfermedad y las más frecuentemente halladas son cariotipos complejos con anomalías de los cromosomas 5, 7 y 6q, seguido por cariotipos hiperdiploides, Ph+ o reordenamientos del gen MLL; estos dos últimos son considerados por la clasificación OMS como entidades separadas dentro de este grupo de leucemias. Quizá esta alta frecuencia de alteraciones citogenéticas esté relacionada con el mal pronóstico de esta entidad⁴⁻⁷.

Es muy interesante lo que aportan los estudios del perfil de expresión de los miRNA, que demuestran que este grupo de leucemias, a pesar del fenotipo ambiguo, no constituyen una entidad separada sino que exhiben un perfil, ya sea de LMA, LLA-B o LLA-T, dándonos información adicional sobre el predominio del origen linfoide o mieloide de las LALA, lo que pudiera ayudar

en la elección del tratamiento adecuado. Quizá estos hallazgos moleculares ayuden en un futuro a estratificar a los pacientes desde un punto de vista pronóstico³.

La experiencia terapéutica es muy escasa en la literatura y se han utilizado protocolos de LLA, LMA y mixtos, pero no hay nada establecido, si bien dadas las malas respuestas se recomienda consolidar con alo-trasplante en primera remisión⁴. Según H. Gerr en su revisión de 92 pacientes pediátricos con LALA, la tasa de remisiones completas fue similar a la de los niños con LMA pero significativamente menor que la de los niños con LLA; la SLE fue más alta que la de las LMA con una SG similar y ambas fueron más bajas que las de las LLA. Los resultados fueron peores en los subgrupos inmunológicos bilineal y en los que experimentaron una *lineage switch*, como nuestro caso.

En nuestro paciente se podría discutir un diagnóstico diferencial entre leucemia secundaria a tratamiento quimioterápico y leucemia de fenotipo mixto T/mieloide o desviación de línea; en la primera opción debería haber transcurrido un periodo de tiempo mayor desde la finalización de la terapia y el diagnóstico, generalmente 2 o 3 años, así como la presencia de alteraciones citogenéticas que el paciente no tuvo en ninguna de las evaluaciones realizadas. Para explicar los casos con *lineage switch* se postula la expansión de una población menor de blastos de diferente línea, después de la supresión terapéutica de la población mayor, o también la reprogramación de una célula pluripotente maligna o de un precursor bipotente mieloide-linfoide, o incluso mecanismos de desdiferenciación y rediferenciación, que pueden ocurrir muy temprano en el curso de la enfermedad, entre 8 días y 6 meses; por todo ello, es importante realizar un estricto seguimiento tanto morfológico como fenotípico a lo largo del tratamiento para detectar posibles cambios⁹.

En cuanto al mal pronóstico, no hay duda de que nuestro paciente tenía criterios de refractariedad desde el fracaso de la citorreducción y que la inmunosupresión inducida por los sucesivos tratamientos quimioterápicos condujeron al desarrollo del linfoma postrasplante y al exitus.

Para recordar

- Para el diagnóstico de las leucemias agudas de linaje ambiguo es imprescindible la herramienta

de la citometría de flujo, si bien la citoquímica o inmunohistoquímica también forman parte del panel diagnóstico para el reconocimiento de la línea mieloide.

- En el caso que presentamos la observación detallada de las células blásticas y el hallazgo de unos “sospechosos” gránulos puso en marcha la búsqueda de una segunda población mieloide que de otra manera no se hubiera visto.
- El seguimiento de la morfología y del fenotipo a lo largo de la enfermedad es imprescindible para detectar estos cambios.

Bibliografía

1. Borowitz MJ, Harris MC, Porwit A, Matutes E. Acute leukemias of ambiguous lineage. World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Vol 2. Geneva (Switzerland) WHO Press; 2008.
2. Van den Ancker W, Terwijn M, Westers TM, Merle PA, Beckhoven E, Dräger AM, et al. Acute leukemias of ambiguous lineage: diagnostic consequences of the WHO2008 classification. *Leukemia* 2010;24:1392-6; doi:10.1038/leu.2010.119; published online 20 May 2010.
3. Heesch S, Neumann M, Schwartz S, Bartram I, Schlee C, Burmeister T, et al. Acute leukemias of ambiguous lineage in adults: molecular and clinical characterization. *Ann Hematol* 2013;92:747-58.
4. Matutes E, Pickl WF, van Veer M, Morilla R, Swansbury J, Strobl H, et al. Mixed-phenotype acute leukemia: clinical and laboratory features and outcome in 100 patients defined according to the WHO 2008 classification. *Blood* 2011;117:3163-71.
5. M. C. Béné. Biphenotypic, bilineal, ambiguous or mixed lineage: strange leukemias! doi:10.3324/haematol.2009.007799 *Hematológica* 2009; 94: 891-93
6. Gerr H, Zimmermann M, Schrappe M, Dworzak M, Ludwig W-D, Bradtke J, et al. Acute leukaemias of ambiguous lineage in children: characterization, prognosis and therapy recommendations. *British Journal of Haematology* 2010;149:84-92.
7. Kalliopi N, Manola. Cytogenetic abnormalities in acute leukaemia of ambiguous lineage: an overview. *British Journal of Haematology* 2013;163:24-39.
8. De Leeuw DC, van den Ancker W, Denkers F, de Menezes RX, Westers TM, Ossenkoppele GJ, et al. MicroRNA Profiling Can Classify Acute Leukemias of Ambiguous Lineage as Either Acute Myeloid Leukemia or Acute Lymphoid Leukemia. *Clin Cancer Res* 2013;19:2187-96.
9. Rossi JG, Bernasconi AR, Alonso CN, Rubio PL, Gallego MS, Carrara CA, et al. Lineage switch in childhood acute leukemia: An unusual event with poor outcome. *Am J Hematol* 2012;87:890-7.

Neoplasia mieloproliferativa crónica con eosinofilia y basofilia

N. BRU¹, T. GIMÉNEZ¹, I. GRANADA², C. ARAGUÁS¹, R. AGUINACO¹, M. CERVERA¹,
J. DO NASCIMENTO¹, C. TALARN¹, R. VALLANSOT¹, M. ROZMAN³, L. ESCODA¹

¹Servicio Hematología. Hospital Joan XXIII-ICO. Tarragona. ²Servicio Citogenética. Hospital Trias i Pujol-ICO. Badalona, Barcelona. ³Servicio Hematopatología. Hospital Clínic. Barcelona

Motivo de consulta

Mujer de 67 años de edad que acude en julio de 2014 a consultas externas de Anestesia para estudio preoperatorio por intervención quirúrgica de cistocele. En la analítica se objetiva una leucocitosis con eosinofilia y trombocitosis, por lo que es derivada a Hematología para estudio.

Historia clínica

Sin ningún antecedente personal ni familiar patológico de interés.

Exploración física

La paciente presenta buen estado general. No se palpan adenopatías ni tampoco organomegalias. El resto de la exploración física es estrictamente normal.

Pruebas complementarias

Hemograma: leucocitos $19,14 \times 10^9/L$ (neutrófilos 41%, cayados 1%, metamielocitos 4%, mielocitos 3%, blastos 1%, linfocitos 10%, monocitos 3%, eosinófilos 25%, basófilos 12%); hemoglobina 130 g/L; plaquetas $637 \times 10^9/L$.

Bioquímica: LDH 477 U/L (208-378). Resto de parámetros y hemostasia normal. Serologías víricas negativas.

Frotis sangre periférica: se observa presencia de elementos de la granulopoyesis en todos los estadios madurativos, con basofilia y eosinofilia marcada. Algún núcleo de megacariocito desnudo. Serie eritroide y plaquetar sin alteraciones morfológicas que destacar (Figuras 1-5).

Mielograma: médula ósea de celularidad normal, con representación de todos los elementos de la serie hematopoyéticas. Aumento del número de megacariocitos, algunos de pequeño tamaño y monolobulados, disminución de la serie eritroide e hiperplasia de la serie granulocítica en todos los estadios madurativos

sin alteraciones morfológicas. Incremento de la serie eosinofílica con granulación preeosinofilia y algún elemento en división celular. No se observa un aumento de células blásticas (Figuras 6-9).

Biopsia de médula ósea: de celularidad moderadamente aumentada. Predominio de la serie granulocítica en todos sus estadios madurativos sin alteraciones morfológicas. Predominio de la serie eosinofílica, aumento de megacariocitos, algunos de pequeño tamaño, más evidentes con la tinción del FVIII. No se observan células blásticas con la tinción CD34 ni tampoco fibrosis con la tinción de reticulina (Figuras 10-14).

Estudios citogenéticos y moleculares:

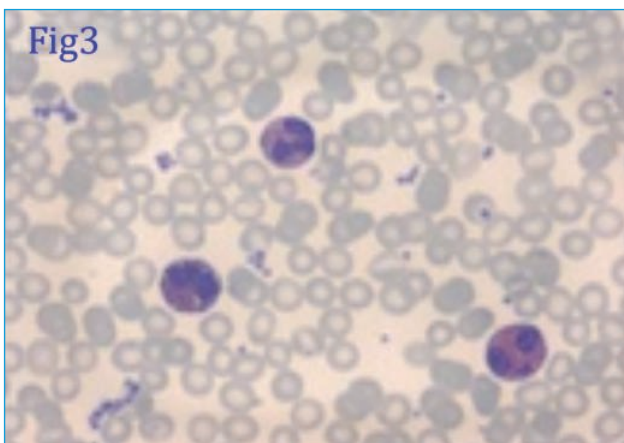
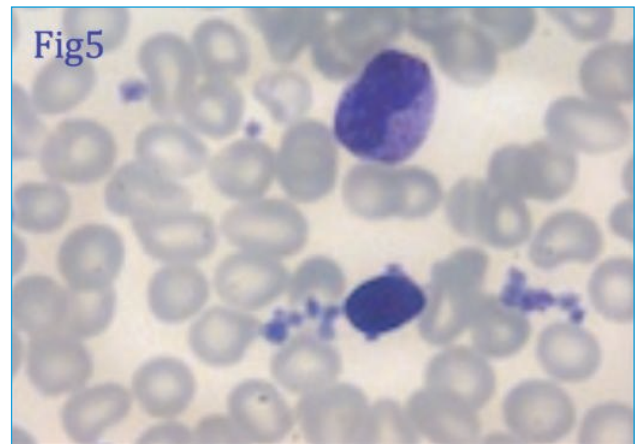
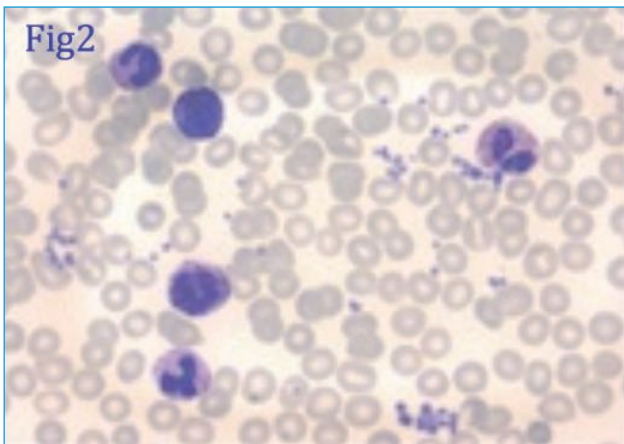
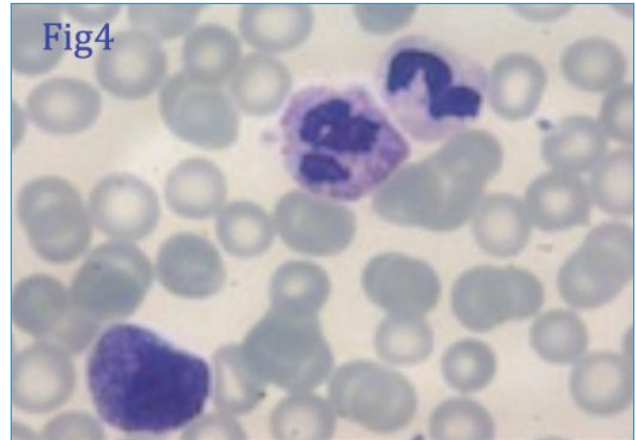
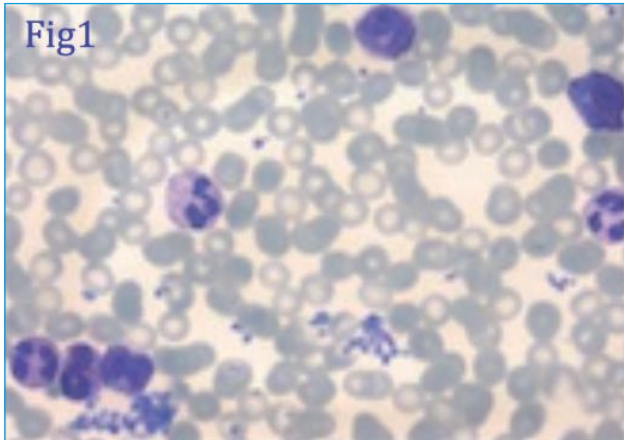
- Citogenética: 46,XX,del(3)(p13p23)[10]/ 46,XX,t(15;17)(q21;q12)[4]/ 46,XX[7] (Figura 15).
- FISH *BCR-ABL1*: se observan 2 copias de *BCR* sobre el cromosoma 22 y 3 copias de *ABL1*, dos sobre el cromosoma 9 y la tercera copia sobre el cromosoma 12p (Figura 16).
- FISH *PDGFRA*, *PDGFRB*, *FGFR1*: sin reordenamiento.
- PCR de *BCR-ABL1* para las isoformas p210 y p190: negativas.
- JAK2 no mutado.
- TCR no clonal.
- RT-PCR *PML-RAR α* : negativo.

Diagnóstico

Neoplasia mieloproliferativa crónica inclasificable con reordenamiento de *ABL1* en 12p (probablemente *ETV6*).

Evolución

Inició tratamiento con imatinib a dosis de 400 mg/día y, tras una semana de tratamiento, se constató normalización hemoperiférica, a excepción de discreta eosinofilia y basofilia, que se ha mantenido estable tras 15 meses de tratamiento. El estudio medular a los 6 y 12



Figuras 1-3. Sangre periférica: importante mieleemia y eosinofilia (MGG x 40).

Figuras 4-5. Sangre periférica: mieleemia sin presencia de blastos (MGG x 100).

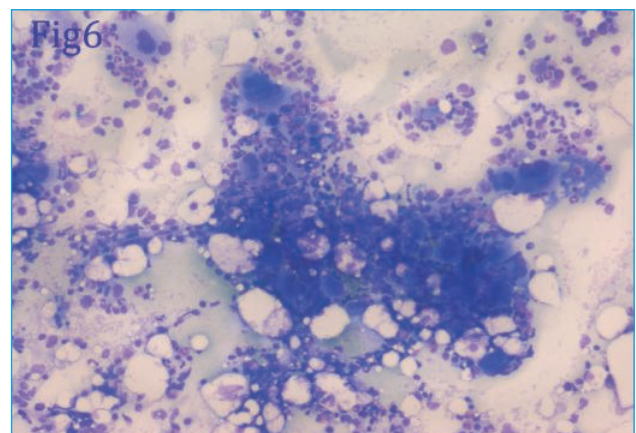


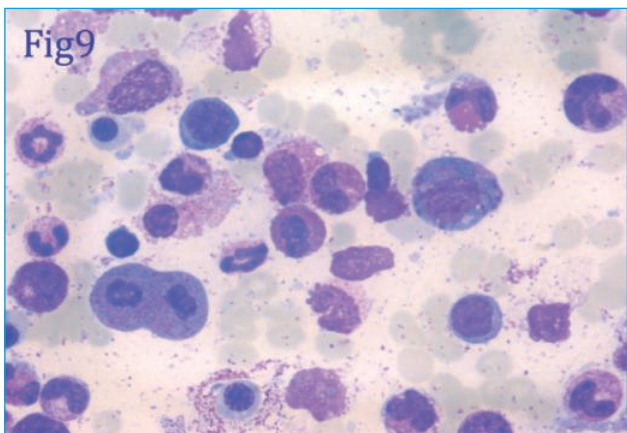
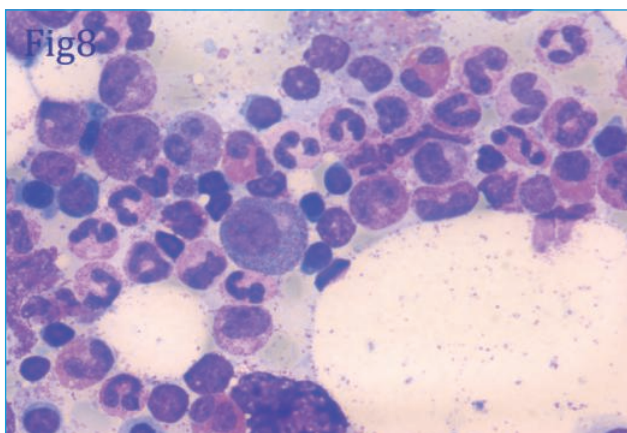
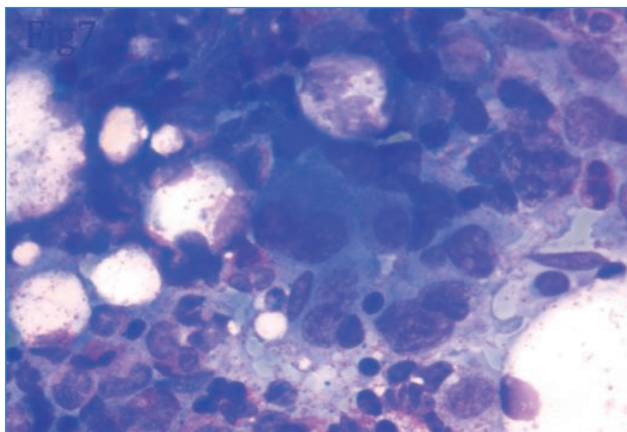
Figura 6. Aspirado medular: celularidad normal. Incremento de megacariocitos (MGG x 10).

meses de tratamiento evidenció una mejoría progresiva, tanto citológica como citogenética.

Discusión

Inicialmente, con los datos clínicos, analíticos y medulares, nuestra primera sospecha diagnóstica fue de una neoplasia mieloproliferativa crónica (NMPC), tipo

leucemia mieloide crónica (LMC) *BCR-ABL1* positiva, pero la citogenética no evidenció alteraciones en los cromosomas 9 y 22, con lo que descartamos el diagnóstico. La marcada eosinofilia en sangre periférica



Figuras 7-9. Aspirado medular: megacariocitos de pequeño tamaño (Figura 7), hiperplasia de la serie granulocítica (Figura 8) e incremento de serie eosinofílica (Figura 9) (MGG x 100).

y medular nos hizo plantear el diagnóstico de leucemia eosinofílica crónica (LEC) y neoplasia mielóide y linfóide con anomalías de *PDGFRA*, *PDGFRB* y *FGFR1*. La ausencia de blastos en el primer caso y el FISH negativo para las alteraciones nombradas en el segundo nos hicieron desestimar dichos diagnósticos.

Llegados a este punto, y con una enfermedad que evocaba continuamente a LMC *BCR-ABL1* positiva,

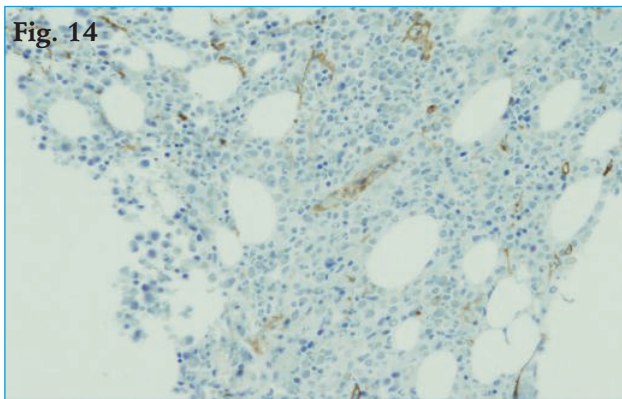
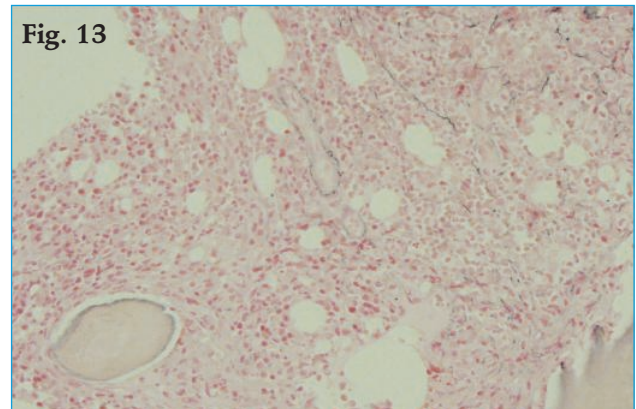
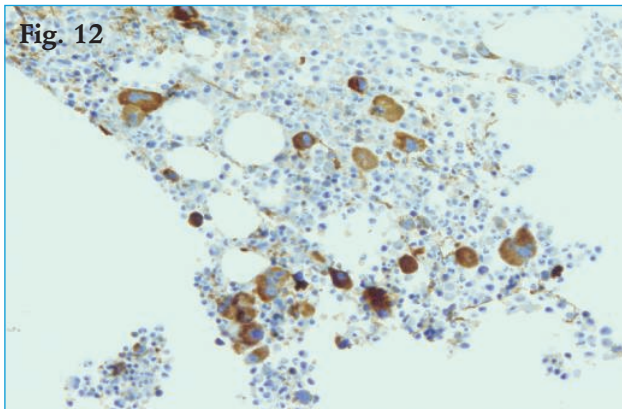
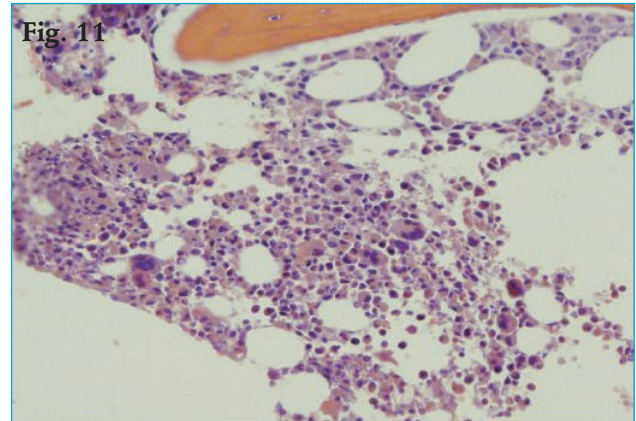
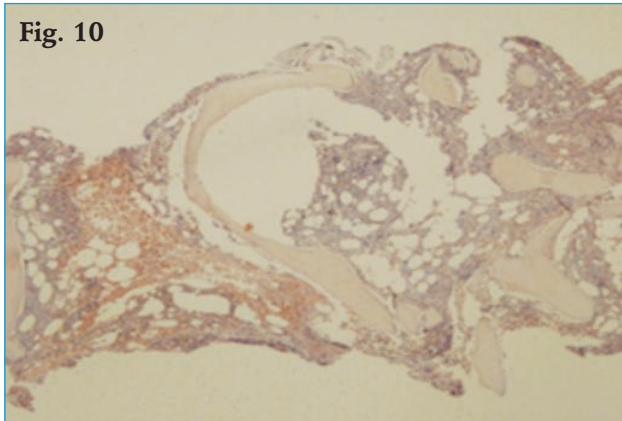
insistimos en la *t(9;22)* y realizamos el FISH para poder encontrar reordenamientos crípticos. Este reveló una tercera copia de *ABL1* en el cromosoma 12p. Se comentó el caso con varios expertos del comité de la Clasificación de Tumores Hematopoyéticos y Tejidos Linfoides de la OMS y se sugirió etiquetarlo como neoplasia mieloproliferativa crónica con reordenamiento de *ETV6-ABL1*.

Nuestro caso presentaba datos analíticos y citológicos sugestivos de LMC con reordenamiento *BCR-ABL1* positivo; sin embargo, aunque el cariotipo indicaba clonalidad, no reveló ninguna alteración en los cromosomas 9 y 22. El FISH del *BCR-ABL1* nos dio la clave al detectar una tercera copia de *ABL1* reordenada en el brazo corto del cromosoma 12, y así se pudo iniciar tratamiento con un inhibidor de las tirosina cinasa (ITK).

El protagonista de este caso es, sin duda, el gen *ABL1*. Se conocen hasta 6 genes que son *partners* de fusión con *ABL* relacionados con neoplasias hematológicas. El más frecuente es *BCR*, pero solo *ETV6* se encuentra en el brazo corto del cromosoma 12¹. Las fusiones de *ABL1* con sus *partners* mantienen el dominio con actividad tirosina cinasa de *ABL1*^{2,3}, característica que les confiere gran relevancia por su implicación terapéutica⁴, ya que los pacientes que presenten patologías con reordenamientos de *ABL1* pueden ser susceptibles a responder al tratamiento con ITK.

La identificación de la *t(9;22)(q34;p13)*, propia del gen de fusión *ETV6-ABL1*, es muy difícil por citogenética convencional. En ocasiones pueden detectarse variantes, como translocaciones balanceadas *t(9;12)(q34;p13)*⁵, inserciones⁶ y alteraciones del cromosoma 12 y/o del cromosoma 9, estas últimas menos frecuentes. Este fenómeno se debe a que en la fusión *ETV6-ABL1* los cromosomas han de romperse por tres puntos distintos, dando lugar a traslocaciones crípticas, difíciles de identificar tanto por citogenética convencional como por FISH de *ETV6-ABL1*. El FISH de *BCR-ABL1*, muestra patrones anómalos de hibridación de *ABL1* en el cromosoma 12p, pero para confirmar el reordenamiento se precisan técnicas más específicas, como la PCR masiva y los estudios de clonación de fragmentos de ADN con cromosoma artificial bacteriano (BACs)^{2,3,4,10}.

El primer caso con reordenamiento *ETV6-ABL1* fue descrito en 1995. Se trataba de una niña de 22 meses diagnosticada de LLA¹². Desde entonces se han descrito en la literatura hasta 30 casos de neoplasias hematopoyéticas con este reordenamiento: 12 casos fueron diagnosticados de LMC sin *BCR-ABL1* (de los cuales 2 se encontraban en fase blástica mielóide, 1 en fase blástica linfóide y el resto en fase crónica), 2 casos como NMPC, 11 casos como LLA y por último 4 casos de leucemia mielóide aguda (LMA)¹¹.



Figuras 10-14. Biopsia medular: celularidad moderadamente aumentada (Figura 10) (MGG x 10) y con aumento de megacariocitos (Figura 11) (MGG x 20), más evidentes con la tinción FVIII (Figura 12) (FVIII x 10). Ausencia de fibrosis (reticulina x10) y sin blastos (CD34 x 10) (Figuras 13 y 14).

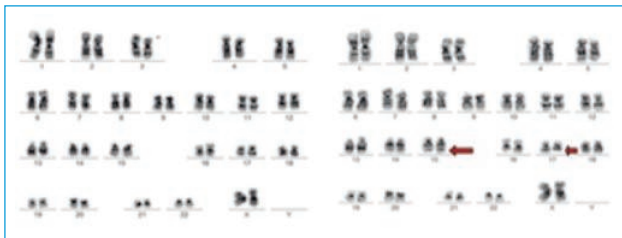


Figura 15. Cariotipo convencional.

Los casos que se diagnostican en forma crónica (LMC, LMC atípicas y NMPC) tienen características comunes, comparables con nuestro caso. No presentan predilección de género: de 13 casos, 7 eran mujeres y 6 hombres con una edad media de 51 años (24-79). La mitad de los casos presentaba esplenomegalia al diagnóstico y en todos ellos se describía una médula ósea hiper celular con megacariocitos de rasgos displásicos típicos de LMC. Todos los casos presentaban leucocitosis con mielema, el 80% eosinofilia y el 50% basofilia. La mitad de los casos presentaban hemoglobina normal (> 120 g/L) y en la totalidad de los casos la cifra de plaquetas era normal o elevada. Respecto la citoge-

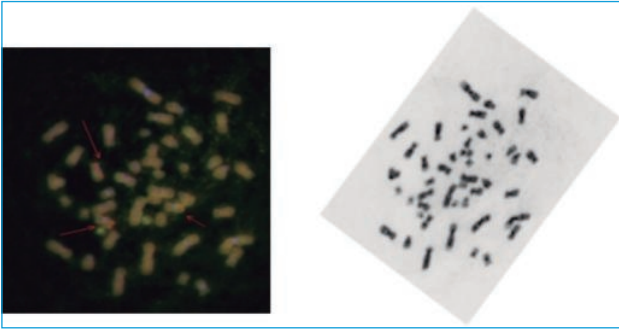


Figura 16. A. VERDE: BCR ROJO: ABL1 FISH BCR-ABL1. Dos copias del gen BCR en el cromosoma 22, dos copias del gen ABL1 sobre el cromosoma 9 y una tercera copia de ABL1 (B) situado en el brazo corto del cromosoma 12p.

nética, la mitad de los casos presentaban un cariotipo con implicación del cromosoma 9 o 12 y el resto un cariotipo normal; sin embargo, en todos los casos se detectó alteración en el patrón de hibridación del *ABL1* tras realizar el FISH del *BCR-ABL1*.

La mitad de los casos recibieron tratamiento con ITK y la otra mitad no. De los que no recibieron tratamiento con ITK, 3 fueron éxitos y los otros 3 están en respuesta completa (RC) tras realizar otros esquemas terapéuticos como trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos⁷, tratamiento con interferón en monoterapia⁹ o combinado con otros agentes quimioterápicos como hidroxiurea junto con esplenectomía¹⁵. Los pacientes que han recibido ITK están en RC, salvo un caso en el que se inició el tratamiento con ITK cuando el paciente ya estaba en fase de agudización. En 2 casos hubo que cambiar de esquema terapéutico a ITK de segunda generación por mala tolerancia^{5-10,13-17}.

Para recordar

- En los casos clínica y morfológicamente sugestivos de NMPC, especialmente *LMC-like*, sin la *t(9;22)*, tengan o no alteraciones citogenéticas que impliquen el cromosoma 9, y en enfermedades hematológicas que cursen con alteraciones citogenéticas de los cromosomas 9 y/o 12, se debería realizar el FISH de *ABL1*, ya que la detección de reordenamientos de *ABL1* tiene implicación terapéutica, dada la buena respuesta descrita a ITK en aquellos pacientes en fase crónica de su enfermedad.
- La relevancia del diagnóstico integrado entre los clínicos, citólogos y genetistas. Las NMPC con reordenamientos entre *ABL1* y *ETV6* que podrían englobarse dentro de una misma entidad en la nueva clasificación de la OMS, ya que comparten características clínicas, morfológicas, genéticas y terapéuticas.

Bibliografía

1. De Braekeleer E, Douet-Guilbert N, Rowe D, Bown N, Morel F, Berthou C, et al. ABL1 fusion genes in hematological malignancies: a review. *European Journal of Haematology* 2011;86:361-71.
2. Zuna J, Zaliova M, Muzikova K, Meyer C, Lizcova L, Zemanova Z et al. Acute leukemias with ETV6/ABL1 (TEL/ABL) fusion: poor prognosis and prenatal origin. *Genes Chromosomes Cancer* 2010;49:873-84.
3. De Braekeleer E, Douet-Guilbert N, Morel F, Le Bris M-J, Basinko A, De Braekeleer M. ETV6 fusion genes in hematological malignancies: a review. *Leukemia Research* 2012;36:945-61.
4. Cross NCP, Reiter A. Tyrosine kinase fusion genes in chronic myeloproliferative diseases. *Leukemia* 2002;16:1207-12.
5. Keung Y-K, Beaty M, Steward W, Jackle B, Pettnati M. Chronic myelocytic leukemia with eosinophilia, *t(9;12)(q34;p13)*, and ETV6-ABL gene rearrangement: case report and review of the literature. *Cancer genetics and cytogenetics* 2002;138:139-42.
6. Kelly J-C, Shahbazi N, Scheerle J, Jahn J, Suchen S, Christacos N-C et al. Insertion *(12;9)(p13;q34q34)*: a cryptic rearrangement involving ABL1/ETV6 fusion in a patient with Philadelphia-negative chronic myeloid leukemia. *Cancer genetics and cytogenetics* 2009;192:36-9.
7. Andreasson P, Johansson B, Carlsson M, Jarlsfelt I, Fioretos T, Mitelman F et al. BCR/ABL Negative Chronic Myeloid Leukemia with ETV6/ABL fusion. *Genes, Chromosomes & Cancer* 1997;20:299-304.
8. Meyer-Monard S, Mühlematter D, Streit A, Chase A-J, Gratwohl A, Cross NCP et al. Broad molecular screening of an unclassifiable myeloproliferative disorder reveals an unexpected ETV6/ABL1 fusion transcript. *Leukemia* 2005;19:1096-9.
9. Mozzicini M-J, Sainity D, Chabannon C. A fifteen-year cytogenetic remission following interferón treatment in a patient with an indolent ETV6-ABL positive myeloproliferative syndrome. *Am J Hematol* 2007;82:688-9.
10. Song J-S, Shin S-Y, Lee S-T, Kim H-J, Kim S-H. A cryptic ETV6/ABL1 rearrangement represents a unique fluorescence in situ hybridization signal pattern in a patient with B acute lymphoblastic leukemia. *Annals of laboratory medicine* 2014;34:475-7.
11. Gancheva K, Virchis A, Howard-Reeves J, CP Cross N, Brazma D, Grace C et al. Myeloproliferative neoplasm with ETV6-ABL1 fusion: a case report and literatura review. *Molecular cytogenetics* 2013;6:39.
12. Papadopoulos P, Ridge SA, Boucher CA, Stocking C, Wiedemann LM. The novel activation of ABL by fusion to a ets-related Gene, TEL. *Cancer Research* 1995;55:34-8.
13. Brunel V, Sainity D, Costello R, Mozzicini M-J, Simonetti j, Arnolet C et al. Translocation of BCR to chromosome 9 in a Philadelphia-negative chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1995;85:82-4.
14. Van Limbergen H, Beverloo HB, Van-Drunen E, Janssens A, Hählen K, Poppe B et al. Molecular cytogenetic and clinical findings in ETV6/ABL1 positive leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2001;30:274-82.
15. Lin H, Guo JQ, Andreff M, Arlinghaus RB. Detection of dual TEL-ABL transcripts and a Tel-Abl protein containing phosphotyrosine in a chronic myeloid leukemia patient. *Leukemia* 2002;16:294.
16. Kawamata N, Dashti A, Lu D, Miller B, Koeffler HP, Schreck R et al. Chronic phase of ETV6-ABL1 positive CML responds to imatinib. *Genes Chromosomes Cancer* 2008;47:919-21.
17. Nand R, Brike C, Kroft SH, Divgi A, Bredeso C, Atallah E et al. Myeloproliferative disorder with eosinophilia and ETV6-ABL gene rearrangement: Efficacy of second-generation tyrosine Kinase inhibitors. *Leukemia Reseach* 2009;33:1144-6.

Mujer de 79 años con pancitopenia y fiebre

R.M. MORALES¹, M.A. DOMÍNGUEZ¹, R. ÁVILA², S. BURILLO³, C. PRATS¹, T. CABALLERO¹, J.M. DE BLAS¹, M.I. MONTERO¹, M.T. VARGAS, R. BERNAL¹, J.A. PÉREZ-SIMÓN¹, J.J. BORRERO²

¹Unidad de Gestión Clínica (UGC) de Hematología y Hemoterapia. Hospitales Universitarios Virgen del Rocío (HHUUVR). Sevilla. ²UGC Anatomía Patológica. HHUUVR. Sevilla. ³Servicio de Inmunología. UGC de Laboratorios clínicos. HHUUVR. Sevilla

Motivo de consulta

Síndrome febril de tres días de evolución.

Historia clínica

Mujer de 79 años con antecedentes personales de poli-mialgia reumática, que se diagnosticó 8 meses antes, en tratamiento con prednisona 2,5 mg/día. Además padecía hipertensión arterial, hipotiroidismo, hipercolesterolemia y doble lesión aórtica de tipo degenerativo. Seguía tratamiento con simvastatina, enalapril, omeprazol, levotiroxina y vitamina D3. La paciente acudió a urgencias por fiebre (39 °C), sudoración nocturna y astenia intensa de 3 días de evolución. También refería pérdida de peso de 13 kg y anorexia desde hacía 4 meses.

Exploración física

Palidez mucocutánea, pequeñas equimosis en las extremidades, resaltando un vitíligo peribucal. Obesidad. Soplo telesistólico panfocal con irradiación a carótidas que no borra segundo tono; exploración pulmonar sin hallazgos. Hepatomegalia no dolorosa de 3 cm bajo el reborde costal y punta de bazo. No se palpaban adenopatías en ningún territorio ganglionar.

Pruebas analíticas

Hemograma: Hb 82 g/L, VCM 82,8 fL, HCM 27,6 pg, reticulocitos corregidos 0,94% (89,1 x 10⁹/L), leucocitos 1,39 x 10⁹/L (neutrófilos 0,6 x 10⁹/L) y plaquetas 70 x 10⁹/L. TP, APTT y fibrinógeno normales.

Bioquímica: fosfatasa alcalina 214 U/L (40-130) y GGT 102 U/L (n < 50). LDH 233 U/L (135-225). Destacaba triglicéridos 311 mg/dL (n < 170), ferritina 2.593 µg/L (15-150), albúmina 2,6 g/dL (3,5-5,3), IgG 458 mg/dL (700-1.600), IgA 45 mg/dL (70-400) e IgM 25 mg/dL (40-230). Test de autoinmunidad negativos.

Microbiología: serologías negativas para VHB, VHC y VIH; PCR en plasma negativa para VIH; serologías

para VEB y CMV, IgM negativa e Ig G positiva en ambos casos.

Pruebas de imagen

Radiografía de tórax: ensanchamiento hilar derecho.

Ecografía abdominal: hepatomegalia heterogénea y discreta esplenomegalia (14 cm de eje mayor); moderada cantidad de líquido ascítico en pelvis.

TC toracoabdominal: adenopatías mediastínicas pequeñas (< 1,5 cm), la mayor en la zona infracarinal (2,5 cm) y en situación diafragmática del lado izquierdo (2 cm); pequeño derrame pleural bilateral. Hepatoesplenomegalia.

PET/TC: adenopatías supradiaphragmáticas metabólicamente positivas (SUV max 11,5) con afectación pulmonar (SUV max 2,9), hepática (SUV max 11), esplénica (SUV max 5,2) y de médula ósea (SUV max 8,3).

Estudios citológicos e histológicos

Extensión de sangre periférica sin alteraciones significativas. El aspirado medular mostró una celularidad moderadamente aumentada, con serie eritroide 50,25%, con leve displasia generalizada; granulopoyesis 38,25%, con frecuente hipogranularidad; eosinófilos 3,25%; serie megacariocítica conservada; monocitos 3,75%, y macrófagos 0,5% (con aislados nidos), en los que destacaba hemofagocitosis de eritrocitos, eritroblastos, plaquetas y granulocitos en el 51,5% de los mismos (Figura 1).

Llamaba la atención en el mielograma la presencia de un 1,25% de unas células grandes dispersas, que morfológicamente se asemejaban a las de Hodgkin y Reed-Sternberg (RS) (Figura 2), con un gran pleomorfismo (20-60 µm) (Figura 3). Mostraban una cromatina densa, a veces reticulada (Figura 4). Algunas presentaban un gran nucléolo basófilo, que podía ser de contornos irregulares o mal delimitados, e incluso múltiples nucléolos pequeños. El núcleo podía ser único, a veces de contornos irregulares e incluso polilobulado, o dar

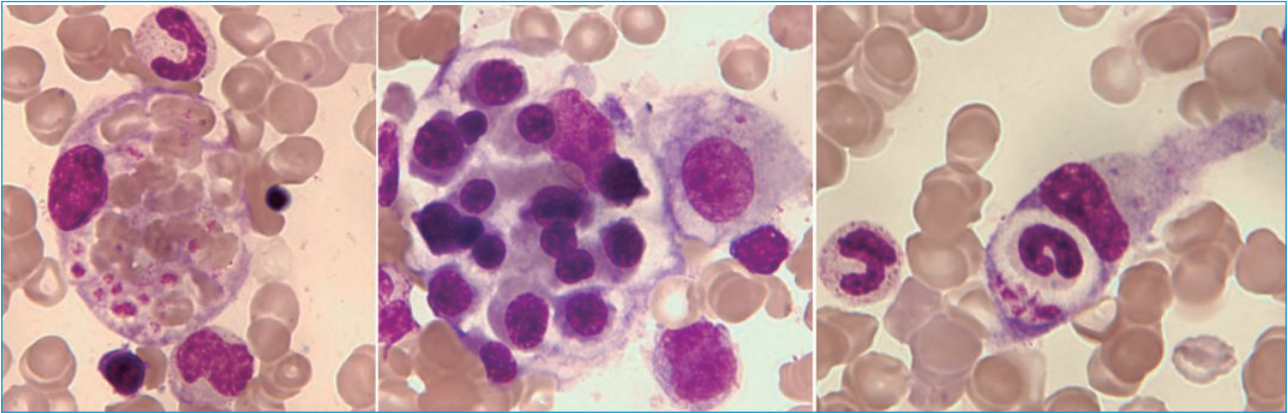


Figura 1. Aspirado de médula ósea (MGG x 1.000). Macrófagos con hemofagocitosis: a la izquierda con eritrocitos y plaquetas, en el centro eritroblastofagocitosis y a la derecha un granulocito joven y varias plaquetas.

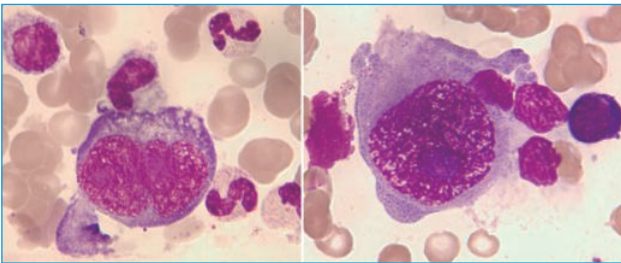


Figura 2. Aspirado de médula ósea (MGG x 1.000). A la izquierda una gran célula tipo Reed-Sternberg. A la derecha célula tumoral con gran nucléolo, tipo mononucleada de Hodgkin.

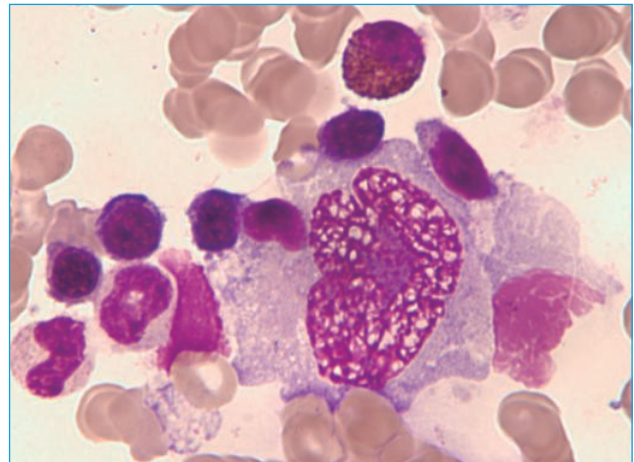


Figura 4. Aspirado de médula ósea (MGG x 1.000). Célula tumoral de gran tamaño, núcleo con la cromatina reticulada y nucléolo basófilo de contorno irregular.

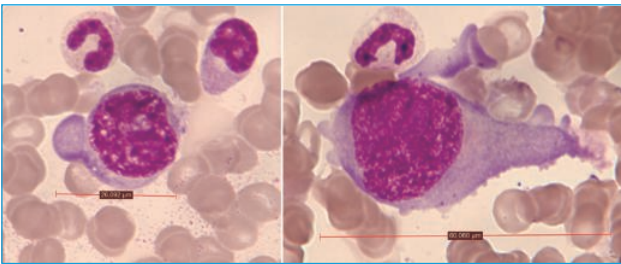


Figura 3. Aspirado de médula ósea (MGG x 1.000). Pleomorfismo de las células linfomatosas: tamaño variable entre 20 y 60 μm aproximadamente.

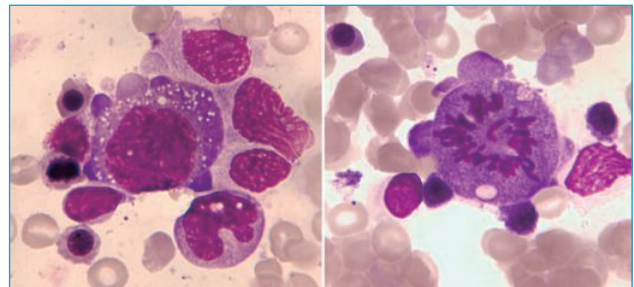


Figura 5. Aspirado de médula ósea (MGG x 1.000). Las células del linfoma muestran grandes mamelones. A la izquierda forma con marcada basofilia y vacuolización; a la derecha mitosis.

impresión de binuclearidad y apariencia sternbergoidé (núcleo y nucléolos en espejo). En el citoplasma, que era amplio y basófilo, se apreciaba vacuolización en cantidad variable, en ocasiones muy pronunciada; contornos irregulares o con grandes mamelones que podían estrangularse por su base y, muy aisladamente, algunas de estas células se encontraban en mitosis (Figura 5). Otras mostraban linfocitos adosados periféricamente (Figura 6) y raramente participaban en los fenómenos de fagocitosis (Figura 7).

En la biopsia de médula ósea (MO) se objetivó aumento de la relación celularidad/grasa (80%), hemato-poyesis polimórfica y una infiltración nodular en la que

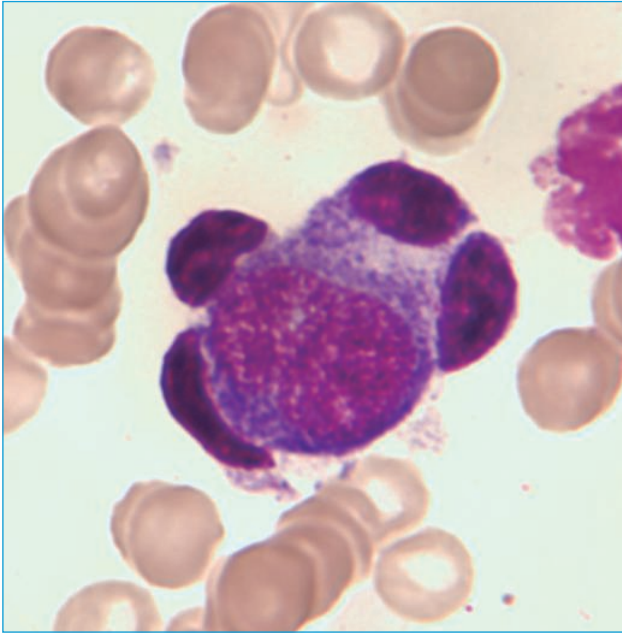


Figura 6. Aspirado de médula ósea (MGG x 1.000). Fenómeno de satelitismo linfocitario en torno a una célula linfomatosa.

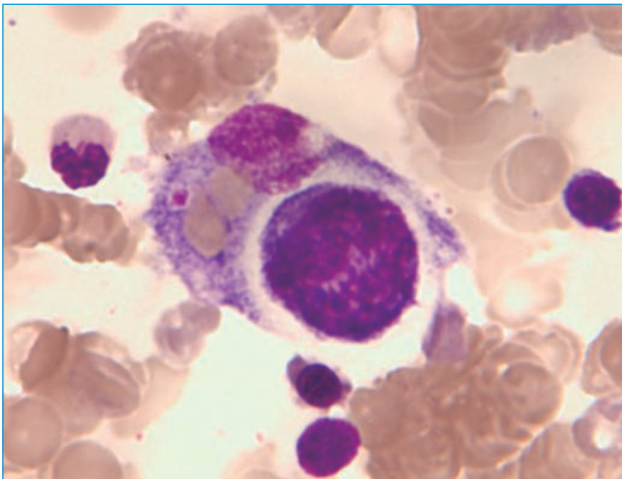


Figura 7. Aspirado de médula ósea (MGG x 1.000). Macrófago fagocitando hematíes, una plaqueta y una célula del linfoma.

se observaban células grandes mononucleadas, muy aisladamente binucleadas, con nucléolos prominentes, tipo células de Hodgkin y RS, en un contexto de abundantes linfocitos pequeños CD3+, eosinofilia y fibrosis reticulínica. En el estudio inmunohistoquímico dichas células grandes mostraron inmunotinción para CD30, MUM1, BOB.1 (+w), EBER1 (ARN no codificante asociado con el virus de Epstein-Barr, VEB) y LMP1 (proteína latente de membrana 1) y negatividad para CD15, CD20, CD79a y EMA (antígeno de membrana epitelial) (Figura 8). Con CD68 se evidenció una gran cantidad de macrófagos, con imágenes de fagocitosis.

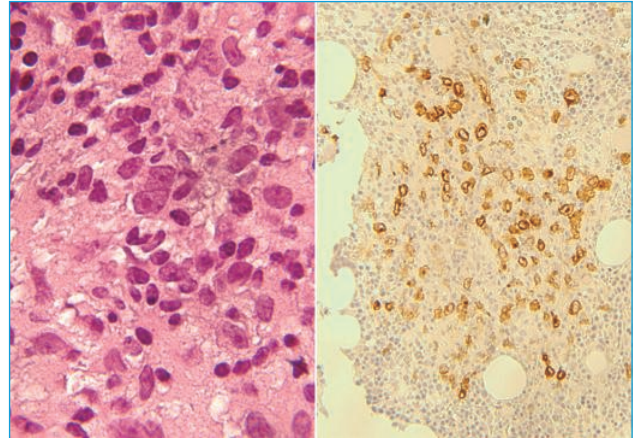


Figura 8. Biopsia de médula ósea. A la izquierda, x 400, tinción de hematoxilina-eosina, nódulo linfomatoso con una célula de RS en el centro. A la derecha, x 250, inmunohistoquímica positiva para CD30 en un nódulo.

Se demostró en la biopsia la expresión del gen viral *BALF5* (ARNm) del VEB. Para ello, se extrajo RNA de una muestra de biopsia de MO y se realizó una RT-PCR (retrotranscripción seguida de PCR). Se empleó un control negativo procedente de otra biopsia de linfoma de Hodgkin (LH).

Diagnóstico

Linfoma de Hodgkin clásico (VEB+) asociado a síndrome hemofagocítico (SHF).

Evolución

La paciente recibió tres ciclos CEP (lomustina, etopósido y prednisona), último al 75% por trombopenia grado IV. Posteriormente se realizó un aspirado de MO de control en el que no se objetivó infiltración linfomatosa, con una tasa de macrófagos inferior a 1:500, y muy excepcionalmente hemofagocitosis de hematíes y eritroblastos. Una semana después falleció (a los tres meses del diagnóstico) por fracaso multiorgánico.

Discusión

El motivo de la presentación es el hallazgo inusual en un aspirado medular de numerosas células de un LH junto a fenómenos de hemofagocitosis por un SHF.

La observación de células de un LH en un aspirado de MO es infrecuente; suelen aparecer aisladas^{1,2}, con una conservación deficiente, y excepcionalmente en porcentaje elevado³. El caso aportado permite examinar numerosas células linfomatosas y reconocer su variabilidad y diversidad morfológica, que podemos

resumir en un gran pleomorfismo, nucléolos grandes y mal delimitados, estructura de la cromatina a menudo reticulada, basofilia citoplásmica, fina vacuolización y proyecciones citoplasmáticas mamelonares. Adicionalmente apreciamos fenómenos de satelitismo linfocitario en torno a muchas de estas células.

El diagnóstico de LH en el aspirado medular se sospecha al ver algunas células gigantes, mononucleadas y binucleadas, con nucléolo grande y prominente, que recuerdan a las observadas en improntas ganglionares de linfomas de Hodgkin, aunque la confirmación se realiza en el examen histológico e inmunohistoquímico de la biopsia medular, en ausencia de adenopatías accesibles. Se aprecia un infiltrado nodular por células grandes, incluyendo formas de RS, CD30+CD15-MUM1+CD20-CD79a- en un fondo inflamatorio con abundantes linfocitos T (CD3+) y eosinófilos, concordante con LH clásico. La positividad para el CD15 puede verse en el 75-85% de los casos en tejido linfoide, aunque su expresión es variable en localizaciones extranodales⁴.

El diagnóstico diferencial principal es con el linfoma difuso de células grandes B (LDCG-B), en particular con la variante virus de Epstein-Barr positivo del anciano (OMS 2008)⁵. Este linfoma es más común en países asiáticos y, aunque pueden verse células gigantes similares a las de Hodgkin y RS, no suele acompañarse de eosinofilia, expresa marcadores B (CD20 y/o CD79a), CD30 es variable y no tan intenso, y habitualmente no se describe asociación con SHF⁶. Otros diagnósticos diferenciales que se manejan incluyen el LDCG-B rico en histiocito/célula T, de morfología similar pero sin eosinofilia, CD20+ y CD30-; y el linfoma de célula grande anaplásico, CD30+ pero con una morfología diferente, normalmente negativo para VEB y que en la mayoría de los casos expresa EMA.

El SHF puede ser primario (genético) y secundario (reactivo). Los criterios de diagnóstico más usados son los revisados en el 2004 por la International Histiocyte Society⁷. Una vez que se descarta el primario por historia familiar o defecto genético conocido, el diagnóstico debe basarse en al menos 5 de 8 criterios. La paciente presenta 6: fiebre, esplenomegalia, citopenia que afecta a 2 series (anemia y neutropenia), hipertrigliceridemia, hemofagocitosis en MO e hiperferritinemia. No se evaluaron otros criterios, como la actividad citotóxica de células NK y CD25 soluble (o receptor de la IL-2 soluble). Cabe destacar que estos criterios fueron validados en linfocitosis familiar y que el diagnóstico de hemofagocitosis es histológico. Más recientemente se han publicado otros criterios de SHF, validados y centrados en el SHF reactivo del adulto, que incluyen hemofagocitosis en el aspirado medular⁸, según los cuales la probabilidad de SHF en esta paciente es del 96%.

El SHF reactivo se asocia típicamente a infecciones, neoplasias linfoides y enfermedades autoinmunes⁹. En el caso aportado coexisten los 3 factores etiológicos posiblemente interrelacionados: un síndrome linfoproliferativo (LH), una infección por VEB (el virus más frecuentemente implicado en SHF) y una poli-mialgia reumática. La presencia del VEB en las células tumorales se demuestra con la expresión de EBER y LMP-1, y la reactivación del VEB con la expresión del gen viral *BALF5*, gen de expresión temprana en el ciclo lítico viral que codifica para una ADN polimerasa del virus¹⁰.

En cuanto a la asociación de LH y SHF, existen descripciones de casos aislados y solo una gran serie de 34 pacientes muestra cómo ambas entidades se correlacionan significativamente con el VEB (94%)¹¹. Se constata que los pacientes presentan un tipo histológico de celularidad mixta o depleción linfocítica, un estadio clínico avanzado, mayoritariamente VIH negativos, y predominio de varones. Esta asociación dificulta la interpretación de la PET/TC, que resulta positiva en ambas entidades¹², describiéndose falsos positivos para recaída de LH en pacientes con SHF por otras causas¹³.

Para recordar

- La presentación simultánea de un linfoma de Hodgkin y un síndrome hemofagocítico es inusual, siendo excepcional su observación en un aspirado medular.
- Dicha asociación obliga a investigar la presencia del VEB en las células tumorales por su alta prevalencia.
- El hecho de que las células del linfoma se conserven adecuadamente en el aspirado medular permite reconocer la diversidad de su morfología con detalle, a diferencia de lo que ocurre generalmente en las improntas de biopsias de tejidos.

Bibliografía

1. Swart L, Shuttleworth MH, Opie JJ, van Schalkwyk WA. Paediatric Hodgkin lymphoma with Reed-Sternberg and mononuclear Hodgkin cells in the bone marrow aspirate. *Br J Haematol* 2012;157:2.
2. Xu Z, Burns BF, Faught C. Reed-Sternberg cells detected in the bone marrow aspirate in a young patient with nodular sclerosis Hodgkin lymphoma. *Eur J Haematol* 2014;92:365-6.
3. Lee SG, Paik SY, Sohn HJ, Kim SY, Kong SY. Numerous Reed-Sternberg cells in bone marrow aspirate from a patient with the syncytial variant of nodular sclerosis classical Hodgkin lymphoma. *Int J Hematol* 2015;101:107-8.
4. Hall PA, D'Ardenne AJ. Value of CD15 immunostaining in diagnosing Hodgkin's disease: a review of published literature. *J Clin Pathol* 1987;40:1298-1304.
5. Nakamura S, Jaffe ES, Swerdlow SH, eds. EBV positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly. En: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, edito-

- ress. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue. Lyon, France: IARC; 2008.
6. Ok CY, Papathomas TG, Medeiros LJ, Young KH. EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly. *Blood* 2013;122:328-40.
 7. Henter JL, Horne A, Aricó M, Egeler RM, Filipovich AH, Imashuku S, et al. HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer* 2007;48:124-31.
 8. Fardet L, Galicier L, Lambotte O, Marzac C, Aumont C, Chahwan D, et al. Development and validation of the HScore, a score for the diagnosis of reactive hemophagocytic syndrome. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:2613-20.
 9. Ramos-Casals M, Brito-Zerón P, López-Guillermo A, Khamashta MA, Bosch X. Adult haemophagocytic síndrome. *Lancet* 2014;383:1503-16.
 10. Weinberger B, Plentz A, Weinberger KM, Hahn J, Holler E, Jilg W. Quantitation of Epstein-Barr virus mRNA using reverse transcription and real-time PCR. *J Med Virol* 2004;74:612-8.
 11. Ménard F, Besson C, Rincé P, Lambotte O, Lazure T, Canioni D, et al. Hodgkin lymphoma-associated hemophagocytic syndrome: a disorder strongly correlated with Epstein-Barr virus. *Clin Infect Dis* 2008;47:531-4.
 12. Kim J, Yoo SW, Kang SR, Bom HS, Song HC, Min JJ. Clinical implication of F-18 FDG PET/CT in patients with secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Ann Hematol* 2014;93:661-7.
 13. Corapcioglu F, Oncel S, Berberoğlu K, Klç SC, Aydoğan A, Doğan S. False positivity of FDG-PET during hemophagocytic lymphohistiocytosis in a child with Hodgkin lymphoma in remission. *J Pediatr Hematol Oncol* 2009;31:74-5.

Gammopatía monoclonal de evolución atípica

M. SAGÜÉS, J. DÍAZ-SANTA, R. LÓPEZ-MARTOS, N. DE LA OSSA, E. TUSET

ICO-Girona/HospitalUniversitari Dr. Josep Trueta. Girona

Historia clínica

Varón de 48 años con antecedentes patológicos de hipertensión arterial, dislipemia tipo hipercolesterolemia e ictus hemorrágico en 2007. El paciente fue diagnosticado de una banda monoclonal IgM en 2008 (componente monoclonal de 5,8 g/L). En el mielograma se observaba una médula con un 5% de células plasmáticas de pequeño tamaño, sin aparente dismorfia, junto a un 7% de linfocitos, algunos de morfología linfoplasmocitaria (Figura 1). Con el diagnóstico de gammopatía monoclonal de significado incierto (GMSI), el paciente siguió controles periódicos hasta junio de 2012, cuando aumentaron los dolores óseos, motivo por el que consultó al Servicio de Hematología.

Pruebas complementarias

Realizadas en junio de 2012.

Hemograma: leucocitos $7,3 \times 10^9/L$ con fórmula normal; Hb 125 g/L, Hto. 36%; plaquetas $215 \times 10^9/L$.

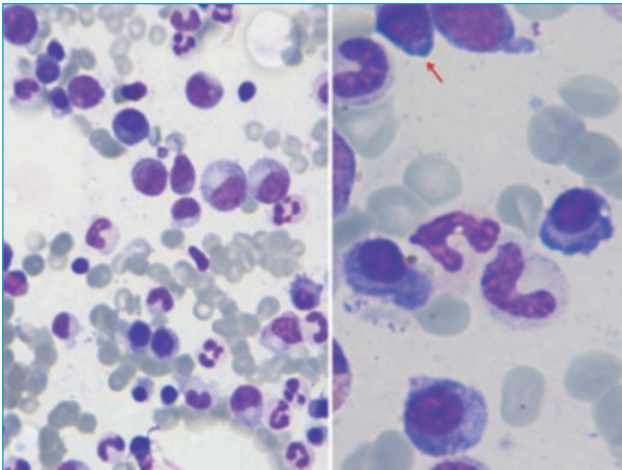


Figura 1. Aspirado de médula ósea 2008. Presencia de algunas células plasmáticas de pequeño-mediano tamaño junto a alguna de aspecto linfoplasmocitario (May-Grünwald-Giemsa $\times 400-1.000$).

Bioquímica plasmática: Cr 1,2 mg/dL; uratos 11 mg/dL; Ca^{++} 12 mg/dL; GGT 227 U/L; GPT 109 U/L; FA 199 U/L; K^* 5,6 mEq/L; proteínas 8,4 g/dL y β_2 -microglobulina 1,7 mg/L. El proteinograma presentaba un pico monoclonal en la banda γ del 26%, equivalente a 19,70 g/L, con una dosificación de IgM 2.400 mg/L. La inmunofijación de cadenas ligeras en suero mostró unas cadenas ligeras λ 18,5 mg/dL, índice $\kappa/\lambda < 0,1$. Proteínas en orina de 1,09 g/24 h y la inmunofijación de cadenas ligeras en orina de 24 h mostró una banda monoclonal λ 37,2 mg/dL.

Se realizó una RM que mostraba lesiones osteolíticas D6-D12 con colapso de cuerpos vertebrales. Presencia en la zona de L2 de un proceso neoformativo.

El mielograma mostraba una médula con celularidad abundante, con disminución proporcional de las series granulocítica y eritroide por la presencia de un 20% de células plasmáticas, en las que se apreciaban formas de pequeño tamaño junto a otras de mayor tamaño binucleadas o con citoplasma amplio. Así mismo, había un 16% de linfocitos algunos de morfología linfoplasmocítica (Figura 2A). El estudio del inmunofenotipo mostraba un 10% de células plasmáticas de fenotipo aberrante: CD19 +20%, CD56 negativo y CD45 débil, así como un 4% de linfocitos B sin expresión anómala de marcadores pan-B. Se observaba una expresión anómala de la cadena de restricción λ , probablemente debido a las células plasmáticas CD19+ (Figura 2B). El cariotipo fue normal, mientras que el estudio de FISH sobre selección de células CD138 mostró reordenamiento de IgH/CCND1.

Evolución

Dada la progresión a mieloma múltiple estadio III de DS/IPS de I, el paciente inició tratamiento con bortezomib y dexametasona por un total de 4 ciclos. Alcanzó la remisión completa con inmunofijación negativa y desaparición de la tumoración de partes blandas. Dada la buena respuesta, se le realizó un trasplante autólogo de progenitores de sangre periférica (TASPE) en diciembre de 2012, permaneciendo

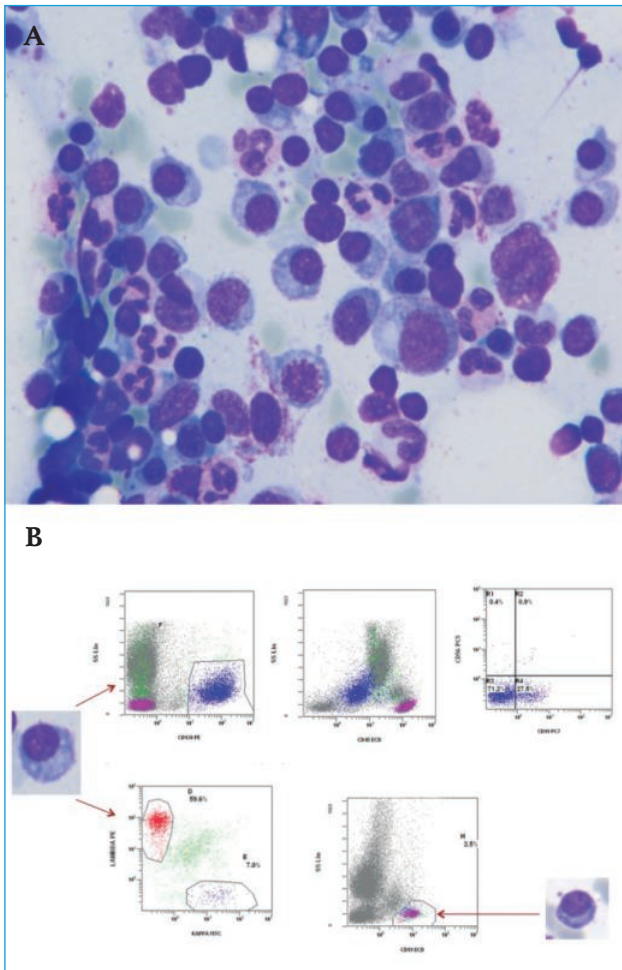


Figura 2. A. Aspirado de médula ósea en 2012 con presencia de abundantes células plasmáticas de morfología y atipia heterogénea junto a algunas linfoplasmocitarias (May-Grünwald-Giemsa \times 600). B. El estudio de inmunofenotipo de médula ósea mostraba 10% de células plasmáticas de fenotipo aberrante (CD19 +20%, CD56 neg y CD45 débil) junto a 4% de linfocitos B (CD19) expresión de marcadores pan-B. Se observaba una expresión anómala de la cadena de restricción λ , en la que probablemente estén las células plasmáticas.

ciendo el paciente en respuesta completa estable clínica y biológicamente hasta junio de 2013. En ese momento se objetivó una nueva progresión biológica con reaparición del componente monoclonal, banda monoclonal 8,1 g/dL con inmunofijación positiva tipo IgM- λ . Se decidió la abstención terapéutica dada la ausencia de síntomas CRAB. Sin embargo, la banda monoclonal fue aumentando progresivamente hasta alcanzar una banda monoclonal IgM de 27 g/dL en julio de 2014. En octubre precisó ingreso por progresión clínica e importante deterioro del estado general, con las siguientes pruebas complementarias:

Hemograma: leucocitos $8,4 \times 10^9/L$ (fórmula normal); Hb 73 g/L; Hto. 21%, VCM 102 fl; plaquetas

$163 \times 10^9/L$. VSG 16 mm/1^a h. Fase plasmática de la coagulación: AP 69%.

Bioquímica plasmática: glucosa 102 mg/dL; urea 106 mg/dL; Cr 5,94 mg/dL; GOT 82 U/L; GGT 353 U/L; K 5,6 mEq/L; proteínas totales 13,6 g/L y β_2 -microglobulina 23 mg/L. El proteinograma mostraba una banda monoclonal- γ de 75 g/dL (60%), con una dosificación IgM 12.500 mg/dL. La inmunofijación de cadenas ligeras en suero mostró unas cadenas ligeras λ 8370 mg/dL, índice $\kappa/\lambda < 0,1$. Las proteínas orina 7,95 g/24 h, con un aclaramiento de creatinina de 11 mL/min y una inmunofijación de las cadenas ligeras en orina con una débil banda monoclonal λ de 1.040 mg/dL.

En la RM se observaba la presencia de lesiones líticas en D8-D9, además de una masa que afectaba partes blandas en la zona epidural y paravertebral derecha.

Se realizó un nuevo estudio de médula ósea en el que se objetivó una infiltración por células plasmáticas del 72%, con distribución irregular así como disminución proporcional del resto de las series. A diferencia de los mielogramas previos, las células plasmáticas eran de mayor tamaño, con notable anisocariosis, así como asincronismo madurativo. Destacaba la presencia de una llamativa y abundante degeneración vacuolar citoplasmática de tamaño variable que, en algunos casos, casi ocupaban todo el citoplasma (Figura 3). Pese a la infiltración observada por citometría, solo se detectó un 7% de células plasmáticas CD138/CD38, con las mismas características fenotípicas que el estudio previo de 2012: CD56neg, expresión débil CD45 y parcial de CD19 así como CD20 88%, fenotipo compatible con mieloma IgM linfoplasmocítico. Al igual que en 2012, el cariotipo de médula ósea fue normal, mientras que

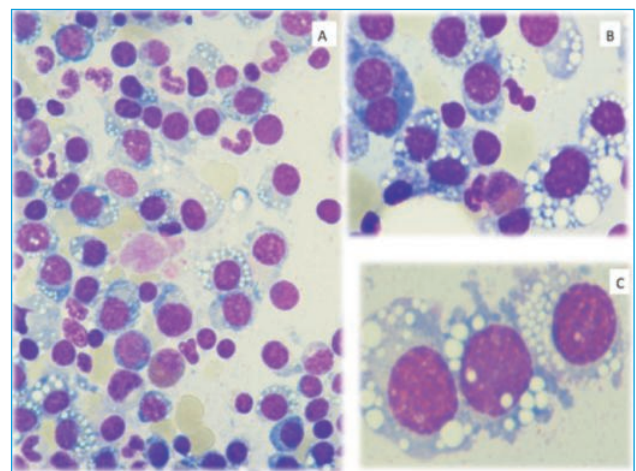


Figura 3. Aspirado de médula ósea 2014. A. Destaca la presencia de abundantes células plasmáticas de tamaño mediano-grande junto a abundantes vacuolas citoplasmáticas (May-Grünwald-Giemsa \times 400). B y C. Imagen con más detalle de dichas células, así como de las vacuolas citoplasmáticas.

el estudio de FISH sobre selección de células CD138 mostraba reordenamiento de IgH/CCND1 positivo con múltiples señales de hibridación (Figura 4). Así mismo, el estudio molecular de la mutación L265P del gen MYD88 fue negativa. La biopsia de médula ósea mostró los mismos resultados que el mielograma, con una intensa expresión de CD138 así como de CD20 de Ciclina D1, mum-1 y lambda (Figura 5).

Pese a la administración de bortezomib y dexame-tasona el paciente fue exitus vitae a las pocas semanas.

Discusión

El mieloma múltiple (MM) tipo IgM y el linfoma no hodgkiniano tipo linfoplasmocítico (LNH-LPL) son dos neoplasias hematológicas que comparten la presencia de una banda monoclonal tipo IgM pero que deben ser diferenciadas¹. El MM IgM es muy infrecuente, 0,5% de todos los mielomas², y esto dificulta su diagnóstico diferencial con las neoplasias linfoproliferativas B (SLPB), que cursan con una banda monoclonal tipo IgM asociada. Este diagnóstico diferencial es fundamental, ya que cursan con presentaciones clínicas diferentes y el tratamiento y pronóstico de ambas entidades no es el mismo.

El MM tipo IgM, al diagnóstico, suele presentar un estadio avanzado con signos clínicos tipo CRAB (hipercalcemia, anemia, insuficiencia renal y lesiones líticas), a diferencia del caso que nos ocupa, que se diagnosticó en fase de GMSI. Dicha clínica CRAB nos permite distinguir esta entidad del LNH-LPL y otros, como el LNH de células del manto con diferenciación linfoplasmocítica (LNH-LCM). La clínica CRAB es sugestiva pero no patognomónica de este u otros mielomas, ya que los SLPB también pueden cursar con daño orgánico, por lo que el estudio citomorfológico medular con aspirado

y biopsia, así como estudios citogenéticos (cariotipo y FISH) y moleculares (reordenamiento de la ciclina D1 y mutación MYD88) son necesarios, ya que nos permiten realizar un mejor y más correcto diagnóstico²⁻³.

En el mielograma del MM tipo IgM normalmente se observa un infiltrado por células plasmáticas superior al 10% con una morfología variable, desde una mínima atipia a signos claros de atipia, una elevada relación núcleo citoplasma, presencia de cuerpos de Dutcher, etc. Además es habitual ver células plasmáticas de pequeño tamaño con diferenciación linfoplasmocítica², tal y como se objetivaba en los sucesivos mielogramas de este paciente durante toda su evolución. En este caso la atipia de las células plasmáticas, así como su tamaño, fueron aumentando. Destacaba la aparición de abundantes y grandes vacuolas citoplasmáticas en el mielograma de 2014, que morfológicamente recuerdan a las observadas en la enfermedad de las cadenas pesadas.

El inmunofenotipo de las células plasmáticas del MM tipo IgM muestra una expresión intensa de CD38 y CD138², así como positividad a CD79a, típicamente encontrado en células plasmáticas normales y mielomatosas; sin embargo, a diferencia del fenotipo habitual de los plasmocitos patológicos, CD56 es negativo, como también es negativo CD5, marcador que nos ayuda a diferenciarlo del LNH-LCM. La expresión de CD20 es positiva en hasta un 40% de los casos y suele relacionarse con la morfología linfoplasmocítica y células plasmáticas de tamaño pequeño, así como a la t(11;14) (q13;q32)⁵, como ocurría en este caso, mientras que CD117 se encuentra expresado en aproximadamente el 30% de los casos, proporción similar a otros mielomas⁶ y por último el CD19 normalmente es negativo^{4,5}.

Respecto a la biopsia de médula ósea del MM IgM, suele mostrar la presencia de infiltración por células

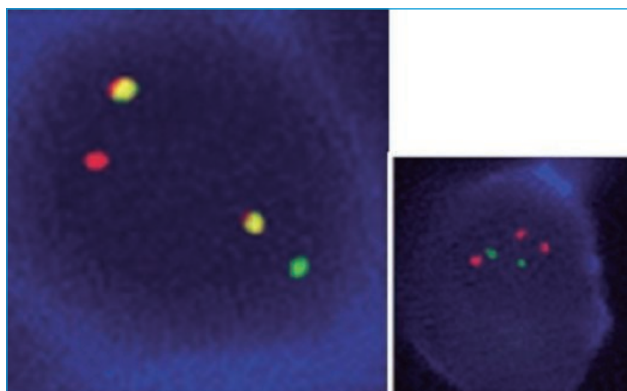


Figura 4. El FISH sobre selección de células CD138 mostraba reordenamiento de IgH/CCND1 positivo con múltiples señales de hibridación.

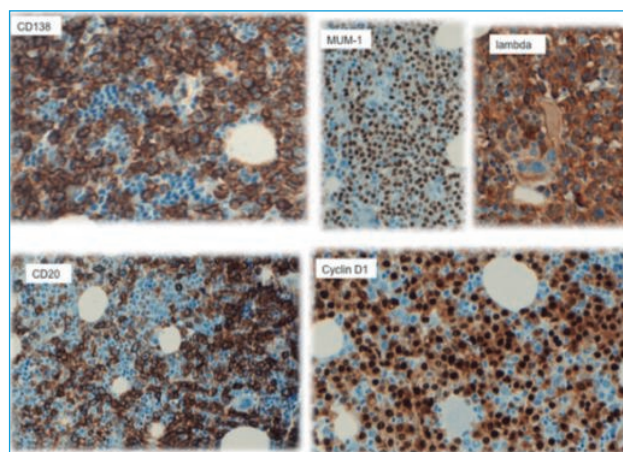


Figura 5. Inmunohistoquímica de médula ósea de 2014. CD138, MUM-1, cadenas ligeras λ , CD20 y ciclina D1.

plasmáticas que por estudios inmunohistoquímicos muestran positividad para CD138/CD38/PAX5/MUN1 y la positividad de CD20 normalmente se relaciona con la presencia de CCDN1^{2,5}, tal y como mostraba este caso.

En el estudio citogenético del MM tipo IgM suele asociarse hasta en el 73% a la t(11;14)(q13;q32)^{2,7}, tanto en el estudio por FISH como en el cariotipo convencional. Esto nos puede ser de ayuda en el diagnóstico diferencial del LNH-LPL, que normalmente no presenta este reordenamiento, pero que nos debería llevar a realizar el diagnóstico diferencial con el LNH-LCM con diferenciación plasmocítica, el cual suele ser de localización extramedular y su inmunofenotipo e inmunohistoquímica típicamente expresan CD5⁸, a diferencia del mieloma en general y del MM IgM en particular. Por lo que respecta a los estudios moleculares, no hay una alteración asociada a este tipo de MM; sin embargo, es de gran interés realizar el estudio de mutaciones somáticas del gen MYD88 L265P, ya que dicha anomalía se objetiva hasta en un 90% de casos del LNH-LPL, por lo que este tipo de estudio es de gran utilidad en el diagnóstico diferencial de estas entidades.

El pronóstico de los MM IgM es, en general, pobre⁹, pero se ha observado un mejor pronóstico en aquellos mielomas IgM que expresan marcadores linfoides B, tales como el CD20 y/o CD79 en ausencia de expresión de CD56¹⁰. La presencia de la t(11;14) (q13;q32) en este subtipo de mieloma se relaciona con una menor incidencia de alteraciones citogenéticas de alto riesgo como la delección del 13q14 (gen del retinoblastoma), o de muy alto riesgo como t(4;14) y t(14;16)¹⁰. Por último, cabe señalar que incluso en los mielomas que presenta la t(11;14)(q13;q32) la expresión de CD20 selecciona un subgrupo de pacientes con un mejor pronóstico (mayor supervivencia global y supervivencia libre de progresión)¹⁰. Dado que no hay bibliografía al respecto por la falta de series, pondría una frase que lo reflejara más o menos. Respecto al tratamiento, dado lo infrecuente de ese subtipo de MM, no hay datos significativos que indiquen una mejor o peor respuesta a los protocolos terapéuticos actuales.

Para recordar

- El mieloma múltiple IgM es excepcional, 0,5-1% de MM.
- Los criterios clínicos CRAB del mieloma pueden dificultar el diagnóstico en estadios más precoces de MM IgM.
- Es muy importante hacer un buen diagnóstico diferencial, sobre todo con SLPB asociados a banda monoclonal IgM y sobre todo con el Linfoma linfoplasmocítico (LNH-LPL).
- Es de gran importancia diagnóstica el estudio citomorfológico de médula ósea (biopsia/mielograma) junto a estudios genéticos moleculares de CCDN1-IgH (ciclina D₁) y mutaciones somáticas de MYD88.

Bibliografía

1. Schuster SR, Rajkumar SV, Dispenzieri A, et al. IgM multiple myeloma: Disease definition, prognosis and differentiation from Waldenström's macroglobulinemia. *Am J Hematol* 2010;85(11):853-5.
2. King RL, Howard MT, Hodnefield JM, Morice WG. IgM multiple myeloma, pathological evaluation of a rare entity. *Am J Clin Pathol* 2013;140:519-24.
3. Mori N, Ohwashi M, Yoshinaga K, et al. L265P mutation of the MYD88 gene is frequent in Waldenström's Macroglobulinemia and its absence in myeloma. *PLoS One*. 2013;8(11).
4. Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica* 2008;93:431-8.
5. Robillard N, Avet-Loiseau H, Garand R, et al. CD20 is associated with a small mature plasma cell morphology and t(11;14) in multiple myeloma. *Blood* 2003;102:1070-1.
6. Li J, Luo SK, Zhang GC, Hong WD, Tong XZ, Zheng AI. Expression of CD117 antigen on multiple myeloma and its significance. *2004;23(8):951-4*.
7. Feyler S, O'Connor SJM, Rawstron AC, et al. IgM myeloma: a rare entity characterized by a CD20-CD56-CD117 and t(11;14). *Br J Haematol* 2008;140:547-51.
8. Visco C, Hoeller S, Malik JT et al. Molecular characteristics of mantle cell lymphoma presenting with clonal plasma cell component. *Am J Sur Pathol* 2001;35:177-89.
9. Fan JL, Fu WJ, Shi HT, Zhou F, Yuan ZG, Zhang CY, et al. *Chinese J Hematol* 2013;34(4):341-4.
10. An G, Xu Y, Shi L, et al. t(11;14) multiple myeloma: a subtype associated with distinct immunological features, immunophenotypic characteristics but divergent outcome. *Leuk Res* 2013;37(10):1251-7.

Mujer joven con hepatoesplenomegalia

C. DE MIGUEL JIMÉNEZ¹, S. GIL¹, E. OJEDA¹, A. LARIO¹, R. FORÉS¹, M.J. COLL², P. IRÚN³, P. ALFONSO³, C. BELLAS⁴, R. CABRERA¹

¹Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda. Madrid. ²Centro de Diagnóstico Biomédico. Hospital Universitario Clínic. Barcelona. ³Departamento de Bioquímica y Biología Celular y Molecular. Universidad de Zaragoza. Zaragoza. ⁴Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda. Madrid

Motivo de consulta

Esplenomegalia.

Antecedentes personales

Mujer de 27 años, fumadora habitual (10 paquetes/año) y sin otros antecedentes personales medicoquirúrgicos de interés. Toma anticonceptivos orales (drospiridona + etinilestradiol). Sin antecedentes familiares de interés. Natural de Madrid. Enfermera.

Enfermedad actual

Remitida desde Atención Primaria para estudio de esplenomegalia asintomática, hallazgo casual a raíz de una ecografía abdominal realizada por infecciones urinarias de repetición en los últimos meses. No presenta síndrome constitucional. Asintomática a la anamnesis por aparatos y sistemas. Aporta ecografía abdominal en la que se observa hepatomegalia leve junto con importante esplenomegalia. Analítica en la que presenta trombopenia leve con $120 \times 10^9/L$ plaquetas. Resto de cifras periféricas en rango normal.

Exploración física

Esplenomegalia palpable de aproximadamente 3 cm bajo el reborde costal.

No hay otros hallazgos reseñables.

Pruebas complementarias

Hemograma: Hb 15 g/dL, VCM 88 fL, leucocitos $6,95 \times 10^9/L$ (55% segmentados, 36% linfocitos, 6% monocitos, 3% eosinófilos), plaquetas $127 \times 10^9/L$.

Bioquímica: colesterol 220 mg/dL. Todos los demás parámetros dentro de la normalidad.

Coagulación: normal.

Serologías: (VHB, VHC, VIH, VHS, CMV, sífilis) negativas.

Frotis de sangre periférica: no hay alteraciones morfológicas en ninguna de las series. No hay agregados plaquetarios (Figuras 1 y 2).

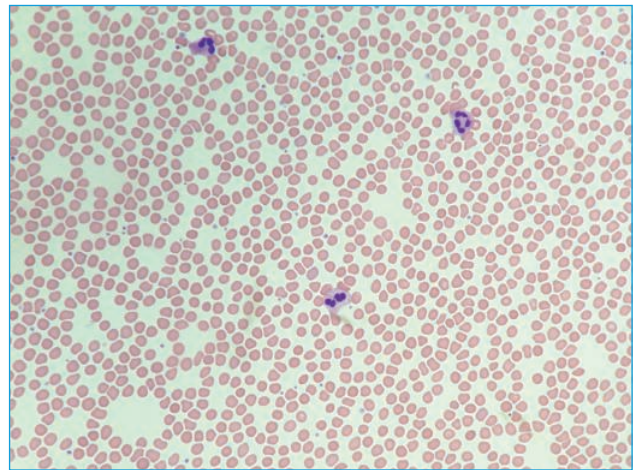


Figura 1. No hay alteraciones morfológicas significativas en ninguna de las series.

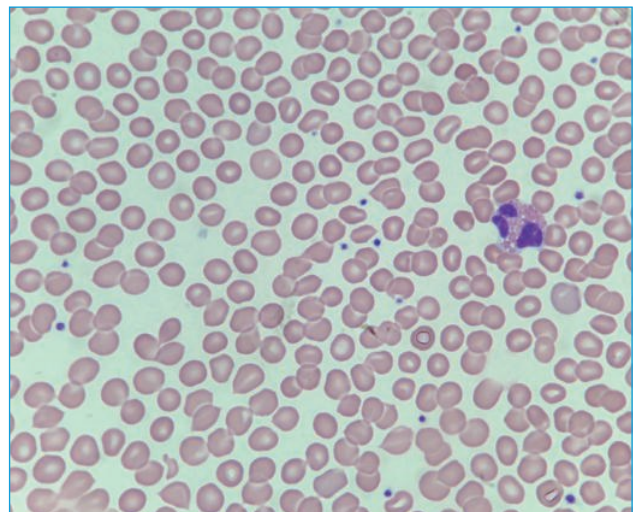


Figura 2. No hay alteraciones morfológicas significativas en ninguna de las series.

Resonancia magnética abdominal: esplenomegalia de 19 cm. Hepatomegalia leve. Resto sin hallazgos significativos (Figuras 3 y 4).

Descartada la causa vascular mediante RM y con analítica prácticamente normal, se decide ampliar el estudio de esplenomegalia con un aspirado y una biopsia de médula ósea.

Aspirado de médula ósea: aspirado normocelular a levemente hipocelular para la edad de la paciente, con presencia de las 3 series hematopoyéticas, incluidos megacariocitos en proporción normal. Se observan numerosas células histiocitarias de gran tamaño, con citoplasma abundante y espumoso y núcleo pequeño, generalmente único y de localización periférica. Estas células muestran tendencia a formar pequeños grupos que se distribuyen de forma regular en todo el aspirado. Junto con estas células coexisten otras del tipo histiociti-

tos azul marino. Algunas de estas células histiocitarias presentan, aparentemente, fenómenos de eritrofagocitosis. El resto de la celularidad del aspirado no presenta alteraciones morfológicas significativas (Figuras 5-10).

Biopsia de médula ósea: cilindro normohipocelular, dada la edad de la paciente. Se observa claramente población de células histiocitarias con tendencia a formar pequeños grupos distribuidos por igual en todo el cilindro. Se distinguen histiocitos con citoplasma abundante, vacuolado y espumoso, junto con otros con citoplasma más homogéneo y liso, asemejando incluso al citoplasma en papel arrugado característico de las células de Gaucher. En ambos tipos de células histiocitarias el núcleo es pequeño, generalmente único y de localización periférica (Figuras 11-15).



Figura 3. Corte de la RM en la que se aprecia la esplenomegalia.

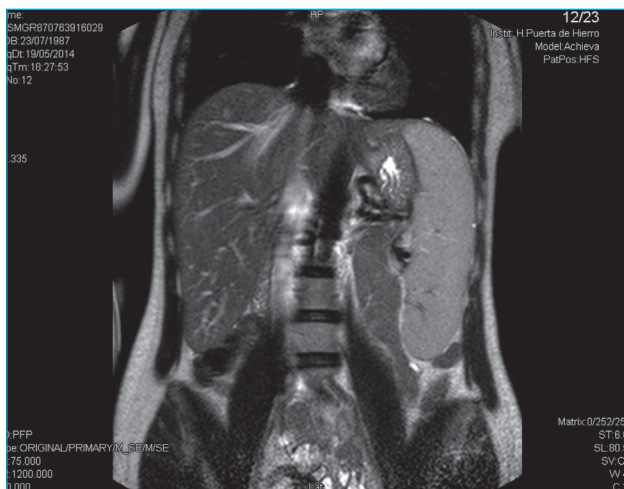


Figura 4. Corte coronal de la RM en la que se aprecia claramente la esplenomegalia.

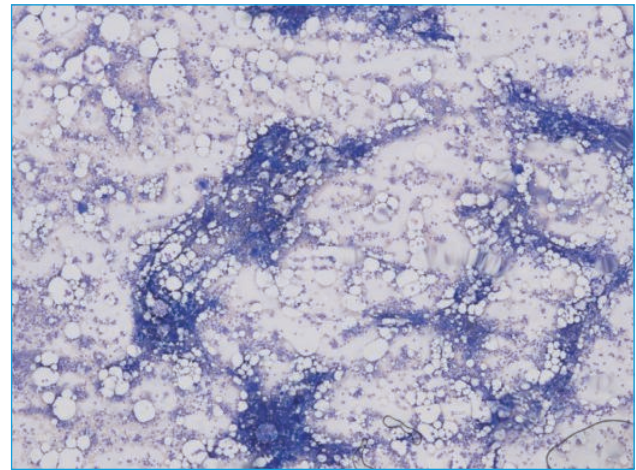


Figura 5. Aspirado medular normohipocelular, con presencia de megacariocitos.

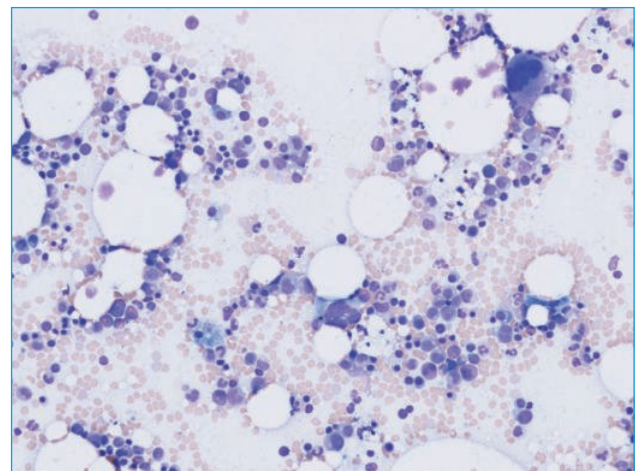


Figura 6. Imagen del aspirado a mayor aumento, donde se puede observar presencia de celularidad de todas las líneas hematopoyéticas. Se observan algunas de estas células histiocitarias con citoplasma espumoso y abundante. Algunas de ellas presentan coloración azul marino en su citoplasma.

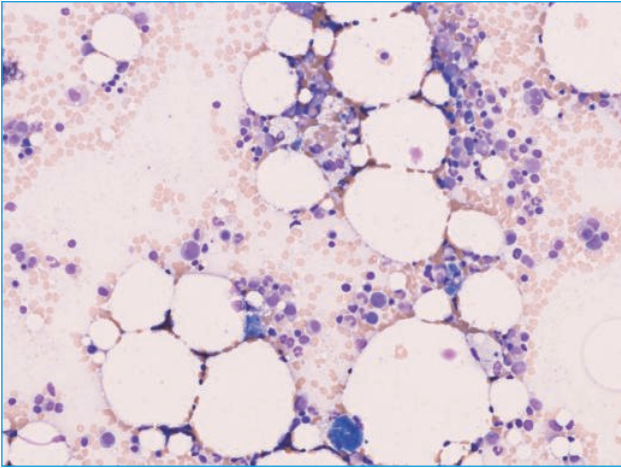


Figura 7. Imagen a mayor aumento en la que se observan histiocitos azul marino (parte inferior de la imagen) junto con histiocitos espumosos, que se distribuyen formando un pequeño grupo en la parte superior de la imagen, con signos de eritrofagocitosis en algunos de ellos.

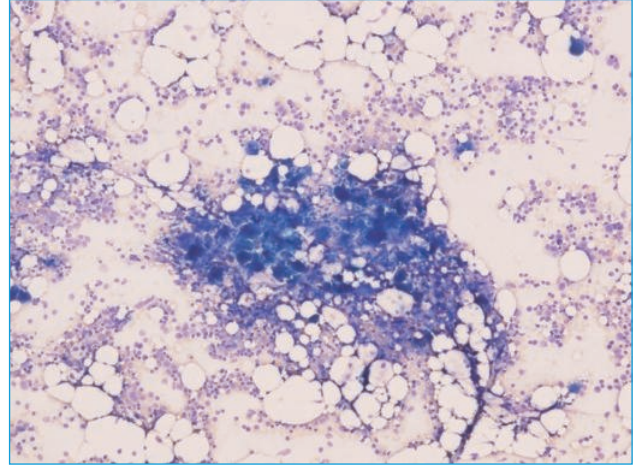


Figura 9. Imagen en la que se puede observar parte del grupo medular ocupado parcialmente por un grupo de histiocitos azul marino, de los cuales se distingue mejor su morfología cuanto más periférica es su situación en el grupo.

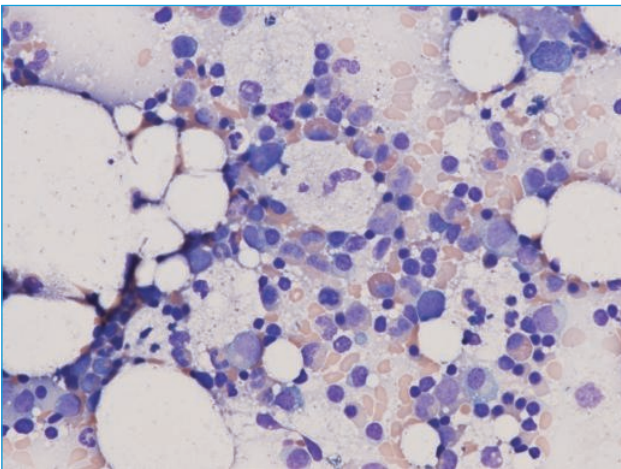


Figura 8. A mayor aumento se puede observar claramente la presencia de histiocitos de citoplasma abundante y espumoso, con núcleo maduro, generalmente único y de localización periférica. Tienden a formar pequeños grupos, como vemos en la imagen, aunque se distribuyen de forma regular por todo el aspirado.

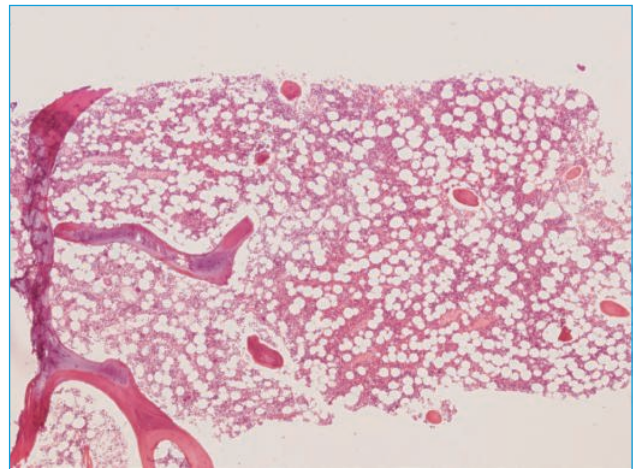


Figura 10. Corte del cilindro de médula ósea en el que se aprecia una médula normohipocelular, dada la edad de la paciente, con pequeñas lagunas grasas distribuidas de forma regular.

Cariotipo en médula ósea: 46, XX (normal).

Inmunohistoquímica: el estudio inmunohistoquímico mostró positividad con inmunoreactividad intensa multifocal para marcadores de diferenciación histiocítica (CD163 y CD68). Sin embargo, fue negativo para S100 (generalmente positivo en células de Langerhans) (Figuras 16-21).

Citoquímica: el comportamiento citoquímico de estas células fue (Figuras 22-41):

- Peroxidasa: débilmente positivo.

- Fosfatasa ácida: fuertemente positivo, siendo muchas de ellas TRAP positivas (resistentes al tartrato).
- Esterasas combinadas: alfa-naftil-butirato esterasa (aNBE) positivas y cloracetato esterasa (CAE) negativas.
- Tinción de Perls: negativo.
- Azul de toluidina: negativo.
- PAS: débilmente positivo.
- Negro Sudán: positivo.
- Rojo-O al aceite: positivo.

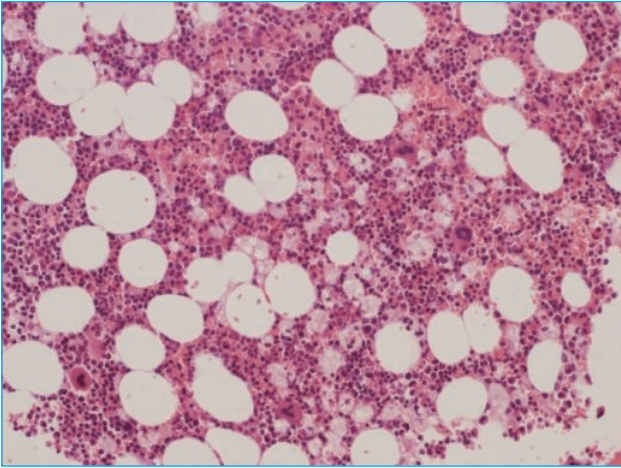


Figura 11. Imagen a mayor aumento en la que se aprecia claramente la presencia de células histiocitarias en cantidad moderada, con tendencia a formar pequeños grupos. Se distinguen histiocitos con citoplasma abundante, vacuolado y espumoso junto con otros con citoplasma más homogéneo y liso.

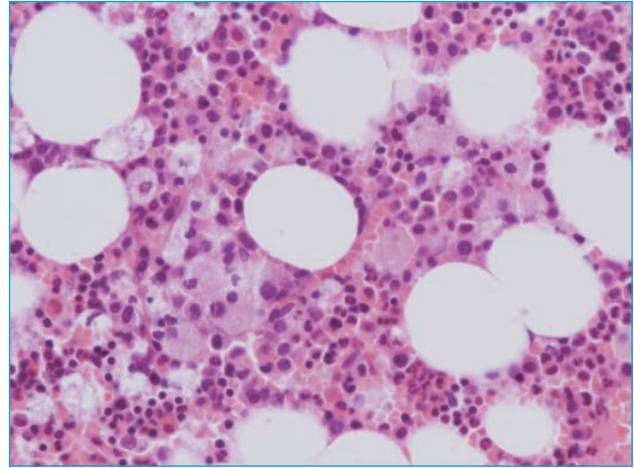


Figura 13. A mayor aumento se siguen distinguiendo los histiocitos, formando pequeños grupos distribuidos de forma regular en la biopsia.

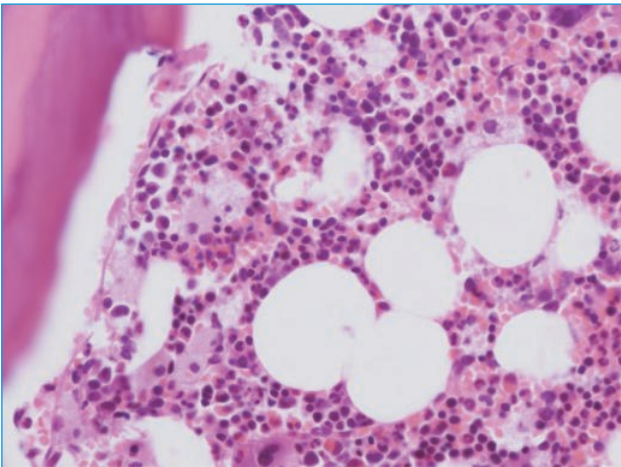


Figura 12. En esta imagen se puede observar la presencia de ambos tipos de histiocitos, adyacentes entre sí, junto a la trabécula ósea.

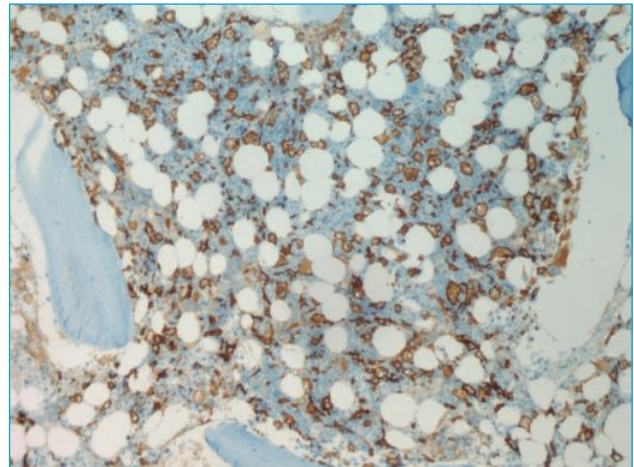


Figura 14. Inmunohistoquímica: CD163 +.

Con el diagnóstico de sospecha de enfermedad de depósito, se decide realizar un estudio para cuantificar la actividad enzimática de la paciente.

Estudio enzimático: la actividad enzimática detectada, comparando la del sujeto a estudio con otro control sano dio los siguientes resultados:

- Glucocerebrosidasa ácida: 6,4 nM/mg.prot.h (81%)
- Esfingomielinasa: 0,394 nM/mg.prot.h (79%)
- Quitotriosidasa: 653 nM/ml x h (RN: 3-32 nM/ml x h)

Del estudio se desprende que la actividad de glucocerebrosidasa ácida está en niveles normales, lo cual descarta la enfermedad de Gaucher. Igualmente, la ac-

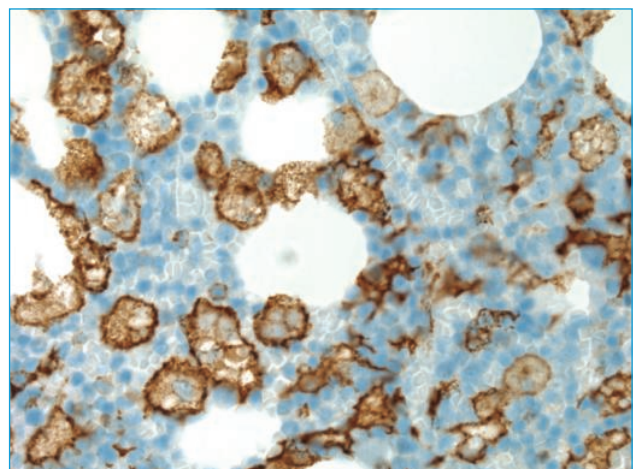


Figura 15. Inmunohistoquímica: CD163+.

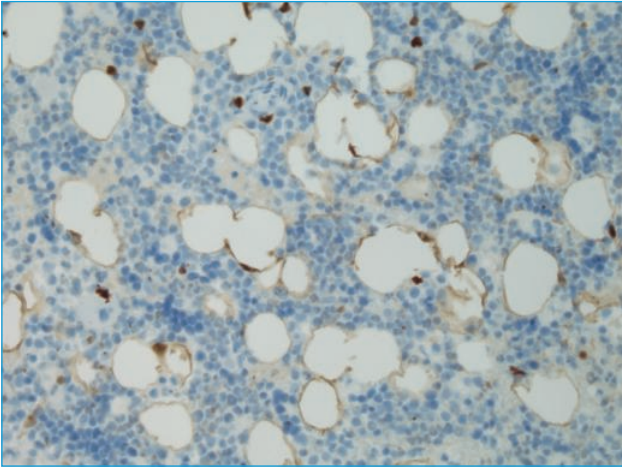


Figura 16. Inmunohistoquímica: S100-

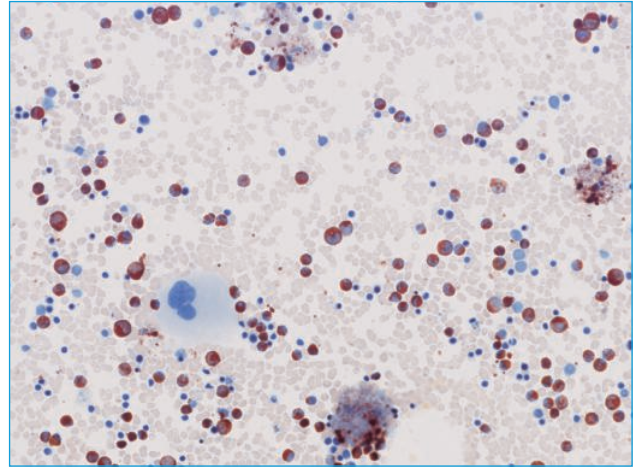


Figura 19. Peroxidasa: claramente positiva en serie granulocítica. Negativa en megacariocitos, como el que se ve en el centro de la imagen. Débilmente positiva en las células histiocitarias, probablemente por el material contenido en el citoplasma.

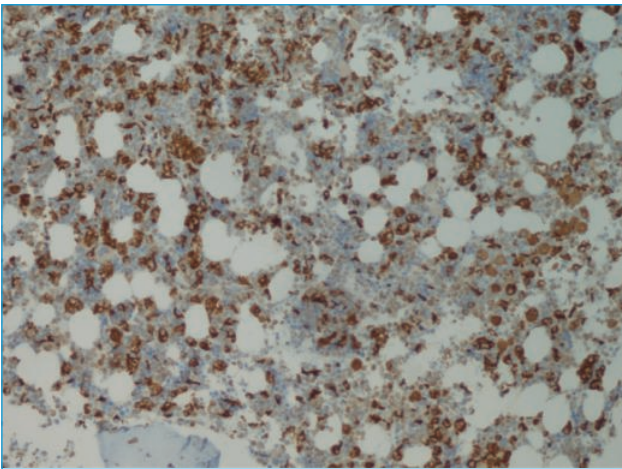


Figura 17. Inmunohistoquímica: CD68+.

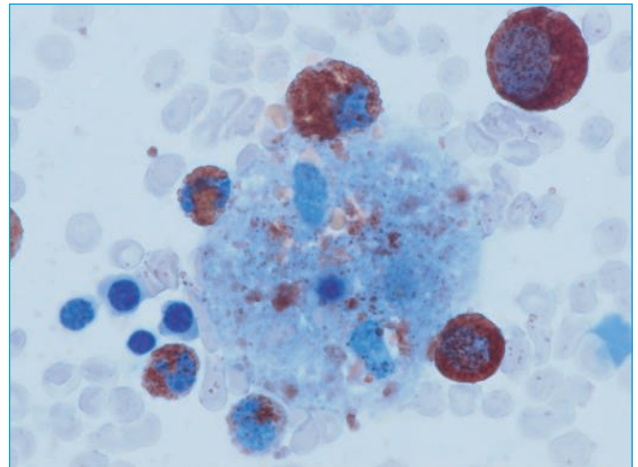


Figura 20. Peroxidasa: débilmente positiva en el histiocito y claramente positiva en granulocitos circundantes.

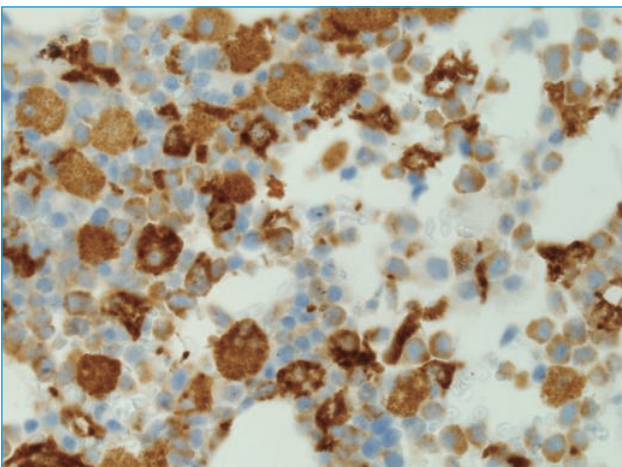


Figura 18. Inmunohistoquímica: CD68+.

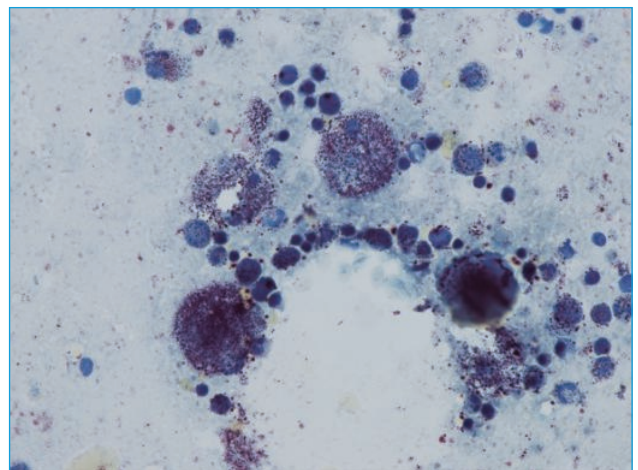


Figura 21. Fosfatasa ácida: histiocitos fuertemente positivos para la fosfatasa ácida.

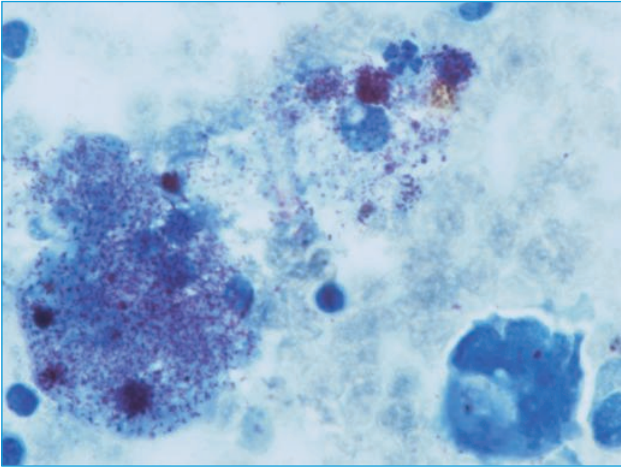


Figura 22. Histiocito fosfatasa ácida + resistente a tartrato (TRAP positivo). Megacariocito negativo en la parte inferior derecha de la imagen.

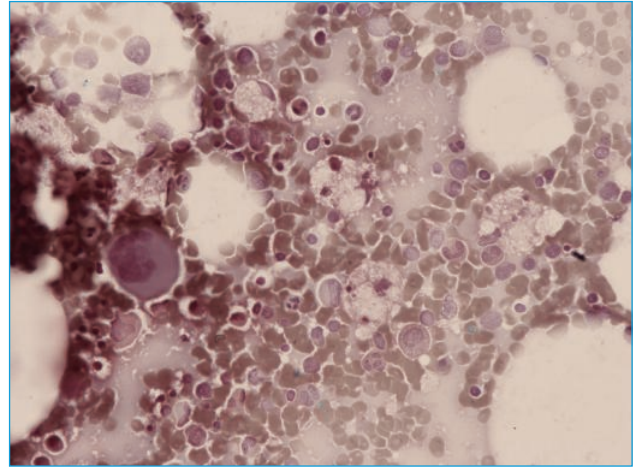


Figura 25. Tinción de Perl: histiocitos negativos. Hierro de depósito prácticamente ausente. Ausencia de siderocitos y sideroblastos.

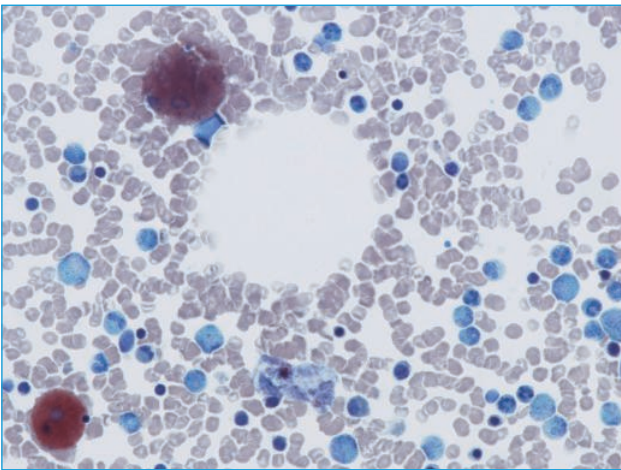


Figura 23. Esterasas combinadas: Histiocitos alfa-naftil-butirato esterasa positivos (α NBE +) y cloracetato esterasa negativos (CAE-). Los granulocitos, al contrario de los histiocitos, con cloracetato esterasa positivos (CAE+).

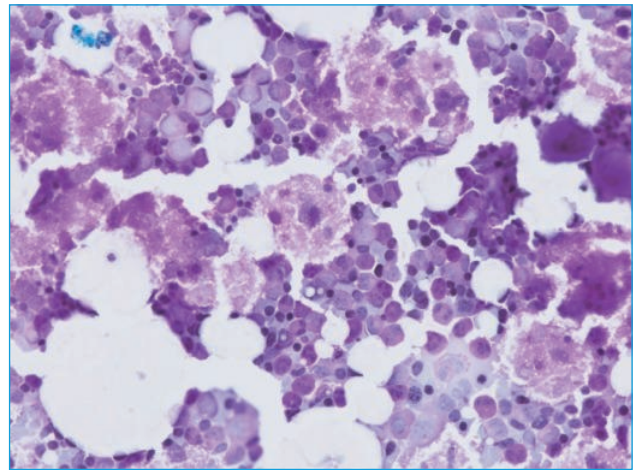


Figura 26. Tinción de PAS: débilmente positiva de forma difusa para histiocitos, fuertemente positiva en granulocitos.

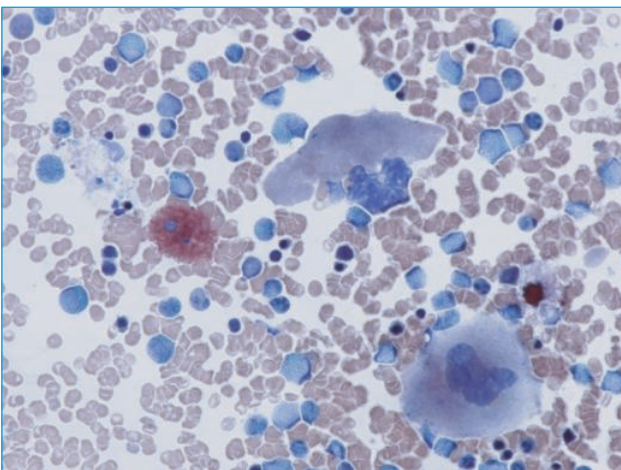


Figura 24. Histiocito α NBE+, junto con granulocitos CAE+. Los megacariocitos son α NBE débilmente positivos de forma difusa.

tividad de esfingomielinasa está en niveles dentro del rango de la normalidad, por lo que se descarta la enfermedad de Niemann-Pick tipos A y B. Sin embargo, la actividad de quitotriosidasa está elevada, aunque no en rango de enfermedad de Gaucher. Esto confirma nuestra sospecha de que se trate de una enfermedad de depósito y, dado que hemos descartado alguna de las más frecuentes con el estudio enzimático, se realiza un estudio molecular.

Estudio molecular: se realiza estudio de biología molecular, encontrando 2 mutaciones compatibles con nuestro diagnóstico de sospecha, ambas en el gen NPC1 (18q11):

- Mutación C177Y en heterocigosidad.
- Mutación N916S, c2747A>G en heterocigosidad, en el exón 18 (cambio de una asparagina por una serina).

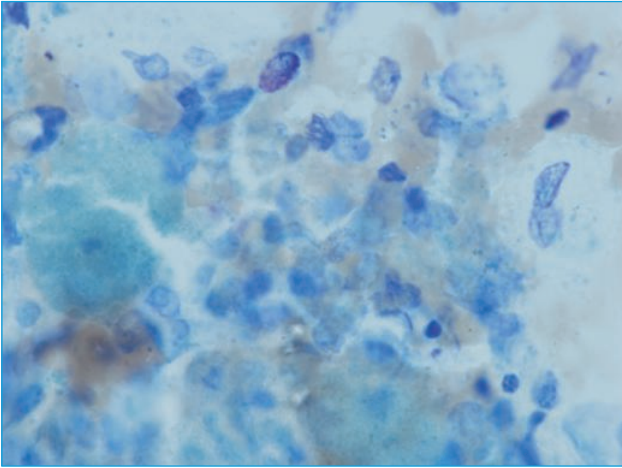


Figura 27. Azul de toluidina: aunque se pueda pensar en una positividad débil por la imagen, estos histiocitos son negativos teniendo en cuenta la ausencia de la metacromasia típica de la positividad para esta tinción, como ocurre con los mastocitos (parte superior de la imagen).

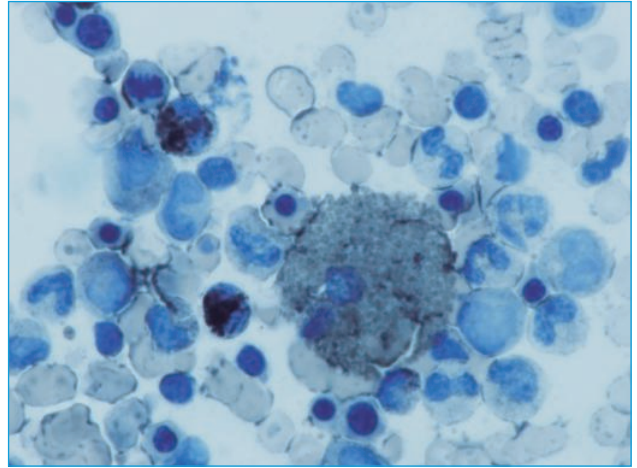


Figura 30. Negro Sudán positivo.

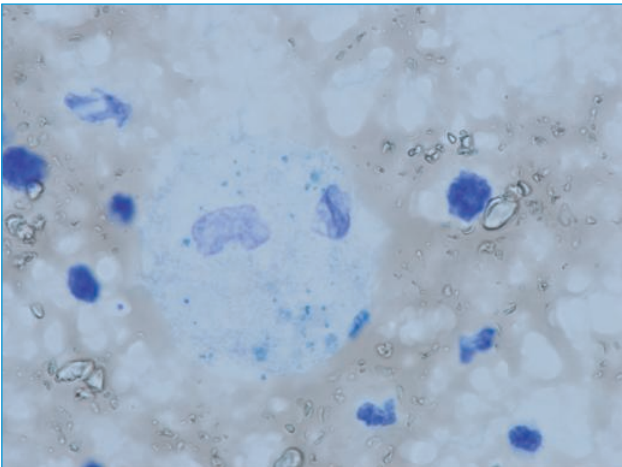


Figura 28. Azul de toluidina: negativo claramente para histiocitos.

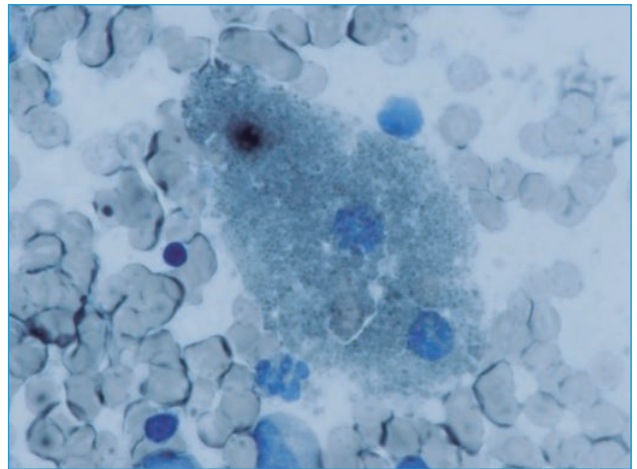


Figura 31. Negro Sudán positivo.

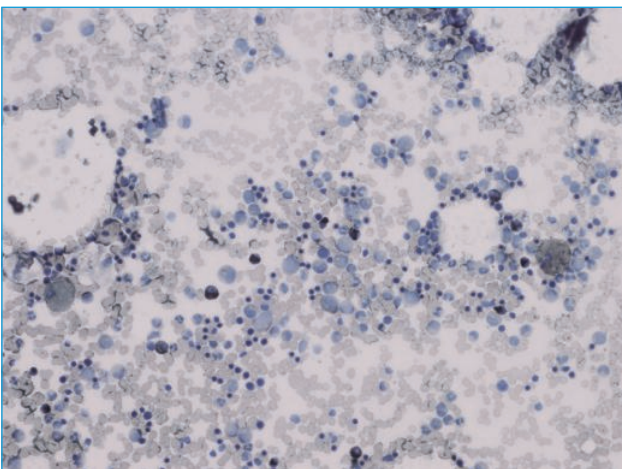


Figura 29. Negro Sudán: positividad de los histiocitos para la tinción de Negro Sudán, probablemente por la naturaleza del material acumulado en su citoplasma.

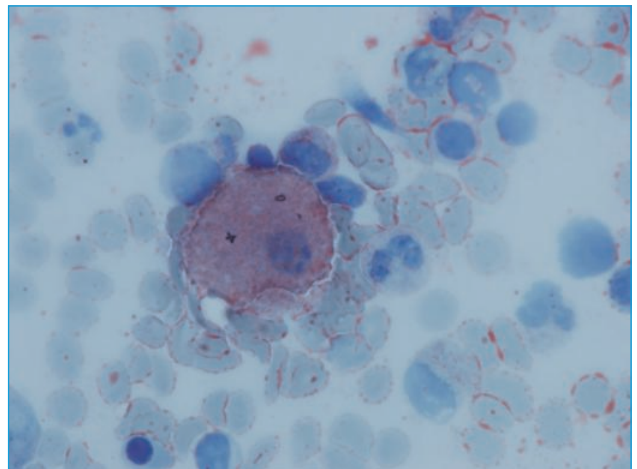


Figura 32. Rojo-O al aceite: positivo para histiocitos, muy probablemente en relación con la naturaleza del material contenido en el citoplasma de los mismos, al igual que ocurre con el Negro Sudán.

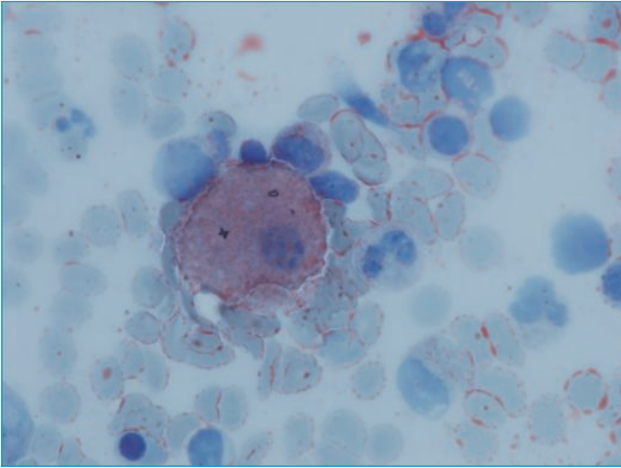


Figura 33. Rojo-O al aceite: positivo para histiocitos. Negativa en granulocitos.

La primera mutación, C177Y, había sido descrita previamente como causante de la enfermedad de Niemann-Pick tipo C, siendo una de las mutaciones más frecuentes en la Península Ibérica. Sin embargo, la segunda mutación, N916S, no había sido descrita previamente en ningún individuo diagnosticado de esta enfermedad hasta el momento, por lo que se analiza mediante un sistema predictor de mutaciones, dando como resultado que la mutación en cuestión es causante de la enfermedad de Niemann-Pick tipo C. Esta última, por tanto, se trata de una nueva mutación, denominada desde este momento como “mutación Majadahonda”.

Diagnóstico

Enfermedad de Niemann-Pick tipo C.

Tratamiento y evolución

Con el diagnóstico definitivo de enfermedad de Niemann-Pick tipo C, y dada la afectación neurológica típica de estos pacientes, se decide ampliar el estudio mediante una exploración neurológica y neurooftalmológica completa y una resonancia magnética de cuerpo entero.

Exploración neurológica y neurooftalmológica: parto normal. Desarrollo psicomotor/cognitivo adecuado. No hay sintomatología neurológica (no crisis, distonía, ataxia, afectación de pares craneales o síntomas psiquiátricos). Reflejos osteotendinosos hipoactivos de forma generalizada. Fuerza, sensibilidad, pares craneales, cebebo, marcha y variantes y fondo de ojo normales.

Resonancia magnética de cuerpo entero: esplenomegalia grave de 19 cm, ya descrita en la resonancia magnética abdominal. No hay otros hallazgos significativos.

En cuanto al tratamiento de esta enfermedad, se

valoró la posibilidad de iniciar tratamiento con miglustat, un inhibidor de la glucosilceramida sintetasa. Este fármaco se ha comenzado a utilizar de forma reciente en pacientes adultos y pacientes pediátricos con manifestaciones neurológicas progresivas con enfermedad de Niemann-Pick tipo C para intentar detener la progresión de los síntomas y mejorar la calidad de vida de los pacientes. Sin embargo, la paciente no presenta ninguna alteración neurológica ni en el ámbito clínico ni en el radiológico, por lo que se decidió no iniciar miglustat de momento y valorar según evolución clínica.

Se contactó con un laboratorio especializado en enfermedad de Niemann Pick tipo C, en el que recomendaron no realizar la técnica del *filipin test* o cultivo de fibroblastos para estudiar el colesterol libre intracelular, mediante la cual se confirma el diagnóstico (junto con el estudio molecular) en pacientes pediátricos pero que tiene muy baja especificidad en pacientes adultos. Se realizó un test de oxisteroles para cuantificar el depósito de colesterol no esterificado intracelular. El resultado fue: oxisteroles en plasma, cholestane-3b, 5a, 6b-triol and 7-ketocholesterol cuantificados mediante *HPLC-ESI-MS/MS*, elevados con respecto a los controles, lo cual apoya el diagnóstico de Niemann-Pick tipo C.

En el momento actual la paciente mantiene un muy buen estado general, continúa trabajando como enfermera y realiza controles periódicos en nuestras consultas.

Discusión

La enfermedad de Niemann-Pick forma parte de un grupo de enfermedades lisosomales por depósito, de herencia autosómica recesiva. Es una enfermedad rara, con una incidencia calculada de 1/150.000 nacimientos.

El grupo de enfermedades conocidas como Niemann-Pick comprende dos entidades distintas. La primera de ellas incluye los tipos A y B, cuya fisiopatología está en relación con un déficit de esfingomielinasa que favorece la acumulación de un metabolito intermedio. La segunda entidad incluye el tipo C¹, en el cual hay una alteración en el procesamiento y transporte del LDL-colesterol.

Dentro de la enfermedad de Niemann-Pick la forma clínica más común es el Niemann-Pick tipo B, que no está asociado a sintomatología neurológica. La afectación neurológica, sin embargo, es habitual en el Niemann-Pick tipo A y tipo C. La esplenomegalia es el hallazgo más frecuente en todos los diagnósticos de Niemann-Pick, sea cual sea el tipo.

La enfermedad tiene una presentación clínica extremadamente heterogénea, con gran cantidad de síntomas inespecíficos que aparecen y progresan en periodos variados de tiempo. La edad de comienzo de la enfermedad influye en su progresión: si los síntomas neuro-

lógicos aparecen en la infancia temprana, la velocidad de deterioro es más rápida y la muerte más precoz. La enfermedad de Niemann Pick tipo C clásica comienza a manifestarse entre los 6 y los 15 años (hay otras formas precoces de comienzo prenatal y en los primeros meses de vida, y formas de adolescentes-adultos de inicio desde los 15 años).

El diagnóstico de sospecha se basa en la clínica y la morfología medular², mientras que el diagnóstico definitivo se establece, en los tipos A y B, mediante estudio enzimático (deficiencia de esfingomielinasa) y en el tipo C mediante la demostración de un acúmulo de colesterol no esterificado en el ámbito intracelular (cultivo de fibroblastos)³. Sin embargo, en pacientes adultos el diagnóstico definitivo no requiere la realización del *filipin test*, siempre y cuando se demuestren las alteraciones genéticas causantes de la enfermedad mediante técnicas de biología molecular (mutaciones en los genes NPC1 y NPC2)^{4,5}. Además de esto puede realizarse un test de oxisteroles⁶ que apoye el diagnóstico.

En la enfermedad de Niemann-Pick tipo C hasta ahora no había tratamientos que modificasen la evolución de la enfermedad, solo tratamiento de soporte para aliviar las manifestaciones clínicas de la enfermedad. De hecho, a día de hoy no hay tratamiento establecido, si bien se utiliza la terapia por inhibición de sustrato (miglustat) en determinados casos para intentar detener la progresión de las alteraciones neurológicas típicas de la enfermedad, siendo especialmente efectivo en las formas adolescentes y adultas.

Miglustat inhibe la glucosilceramida sintetasa, la enzima responsable de la primera fase de la síntesis de la mayoría de los glucolípidos. Además, se ha demostrado experimentalmente *in vitro* la acción inhibidora de una glucosilceramida no lisosomal. Miglustat reduce el acúmulo de gangliósidos GM2 y GM3, glucosilceramida y lactosilceramida. En varios ensayos publicados hasta el momento los resultados han sido estadísticamente significativos a favor de miglustat y fue aprobado por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) en 2009 para casos seleccionados de Niemann-Pick tipo C, buscando detener la progresión de los síntomas neurológicos⁷⁻¹¹. La dosis recomendada para el tratamiento de pacientes adultos y adolescentes con enfermedad de Niemann-Pick tipo C es de 200 mg 3 veces al día. El coste aproximado es de 150.000-200.000 euros al año.

Como conclusión de este caso podríamos pensar que, a pesar de ser una enfermedad rara, probablemente la Niemann-Pick tipo C esté infradiagnosticada, dado que las alteraciones neurológicas con la que en muchas ocasiones debuta no aparecen en una parte considerable de los casos hasta más allá de los 25-30 años de edad^{12,13}. Cada vez se diagnostican más casos con inicio de sintomatología neurológica en la edad adulta avan-

zada. Es por esto que proponemos la necesidad de una monitorización neuropsicológica de pacientes como el de este caso, al menos de forma anual desde la fecha del diagnóstico.

Para recordar

- La enfermedad de Niemann-Pick es una enfermedad muy rara, neurodegenerativa, de curso invariablemente progresivo y finalmente fatal, caracterizada por una alteración del transporte intracelular de colesterol.
- El diagnóstico de sospecha viene dado por la clínica y la morfología medular, con abundantes histiocitos característicos de citoplasma abundante y espumoso, con positividad citoquímica para la fosfatasa ácida TRAP +, las esterases inespecíficas y las tinciones para lípidos (Negro Sudán y Oil Red O) y positividad inmunohistoquímica para marcadores de diferenciación histiocítica (CD163, CD68).
- El diagnóstico definitivo se basa en la determinación del acúmulo de colesterol no esterificado intracelular (*filipin test*) en edad pediátrica e infantil y en el estudio molecular en la edad adolescente y adulta.
- Recientemente se ha iniciado el uso de miglustat en determinados casos, consiguiendo buenos resultados a la hora de detener la progresión de las manifestaciones neurológicas de la enfermedad.

Agradecimientos

A Sandra Sepúlveda Muñoz, Técnico de Laboratorio.

Bibliografía

1. Vanier MT. Niemann-Pick disease type C. *Orphanet J Rare Dis* 2010;5:16.
2. Woessner Casas S, Florensa Brichs L. La citología óptica en el diagnóstico hematológico, histiocitosis acumulativas o tesaurismóticas. 2006. pp. 694-702.
3. Vanier MT, Latour P. Laboratory diagnosis of Niemann-Pick disease type C: The filipin staining test. *Methods Cell Biol* 2015;126:357-75.
4. Ribeiro I, Marcão A, Amaral O et al. Niemann-Pick type C disease: NPC1 mutations associated with severe and mild cellular cholesterol trafficking alterations. *Hum Genet* 2001;109(1):24-32.
5. Bauer P, Balding DJ, Klünemann HH, et al. Genetic screening for Niemann-Pick disease type C in adults with neurological and psychiatric symptoms: findings from the ZOOM study. *Hum Mol Genet* 2013;22(21):4349-56.
6. Ory D, Porter F, Scherrer D et al. Cholesterol oxidation products are sensitive and specific blood-based biomarkers for Niemann-Pick C1 disease. *Mol Genet Metab* 2010;99:S28.
7. Jacklin E, Imrie J, Jones S, et al. Review of 11 patients with NPC1 treated with miglustat. *Mol Genet Metab* 2010;99: S22.

8. Wraith JE, Imrie J. New therapies in the management of Niemann-Pick type C disease: clinical utility of miglustat. *Ther Clin Risk Manag* 2009;5:877-87.
9. Patterson MC, Vecchio D, Prady H, et al. Miglustat for treatment of Niemann-Pick C disease: a randomised controlled study. *Lancet Neurol* 2007;6:765-72.
10. Pineda M, Perez-Poyato MS, O'Callaghan M, et al. Clinical experience with miglustat therapy in pediatric patients with Niemann-Pick disease type C: a case series. *Mol Genet Metab* 2010;99:358-66.
11. Pineda M, Wraith JE, Mengel E, et al. Miglustat in patients with Niemann-Pick disease type C (NP-C): A multicenter observational retrospective cohort study. *Mol Genet Metab* 2009;98:243-9.
12. Dvorakova L, Sikora J, Hrebicek M, et al. Subclinical course of adult visceral Niemann-Pick type C1 disease. A rare or underdiagnosed disorder? *J Inher Metab Dis* 2006;29(4):591.
13. Wassif CA, Cross JL, Iben J, et al. High incidence of unrecognized visceral/neurological late-onset Niemann-Pick disease, type C1, predicted by analysis of massively parallel sequencing data sets. *Genet Med*. 2015 Mar 12. doi: 10.1038/gim.2015.25.

Lactante con bicitopenia, hepatoesplenomegalia, lesiones en piel e infiltrados pulmonares

M. MONSALVE MORENO, M. MORADO, M. GASIOR, V. JIMÉNEZ YUSTE

Unidad de Diagnóstico Hematológico. Hospital Universitario La Paz. Madrid

Resumen

Paciente de 14 meses, natural de Bolivia, que es trasladada a Madrid para estudio por disnea, exantema y bicitopenia. Embarazo normal, parto eutócico, peso al nacer: 2,9 g. Sin alergias. Esquema de vacunación completo. Presentó síndrome febril autolimitado a los 14 días de vida que se resolvió con antibioterapia. Desde los 8 meses presenta múltiples cuadros febriles, algunos con síntomas respiratorios sin aislamiento microbiológico, exantema generalizado con pápulas difusas y exfoliativas y posteriormente petequias y anemia que preciso transfusión. Antecedentes familiares: padres sanos, hermana de 6 años sana.

En el momento de la valoración en este hospital presenta regular estado general, impresiona de enfermedad, peso: 8,1 kg; talla: 70 cm, polipnea crepitantes bibasales, hepatoesplenomegalia y petequias dorsolumbares. En la radiografía de tórax se observan densos infiltrados parahiliares en ambas bases pulmones. La paciente ingresa en Cuidados Intensivos Pediátricos con sospecha de neumonía bilateral, sin necesidad de ventilación mecánica con antibioticoterapia endovenosa empírica (cefepime y teicoplanina) y soporte hemodinámico con ionotrópicos, sin presentar mejoría.

Pruebas complementarias

Hemograma: Hb. 99 g/L, Hto 31.3 %, VCM 89,2 fL, HCM 28,1 pg, CHCM 31,5 g/dL, leucocitos $8,49 \times 10^9/L$ (N:7040, L: 1110, M: 130, E:30), plaquetas $116.000/mm^3$, Reticulocitos: 1.12%.

Metabolismo del hierro: hierro 39 $\mu g/dL$, transferrina 116 mg/dL, capacidad total transporte de hierro 147 $\mu g/dL$, índice de saturación de transferrina 26%, ferritina 1.019 ng/mL.

Bioquímica: glucosa 64 mg/dL, colesterol 96 mg/dL, proteínas totales 6,2 g/dL, albúmina 2,6 g/dL, calcio 8,7 mg/dL, fosfato 4,8 mg/dL, LDH 478 U/L, GOT 42 U/L, GPT 14 U/L, GGT 276 U/L, urato 3 mg/dL, creatinina 0,2 mg/dL, bilirrubina total 1,2 mg/dL, haptoglobina: 201 mg/dL. Coagulación normal.

Serologías: CMV: IgG positivo e IgM negativo; VEB: IgG e IgM negativos; VHB: HbsAg y anticore negativos; anti-Hbs positivo, VHC: negativo; VIH-I/II: negativos. Salmonella, toxoplasma, rubéola y parvovirus negativos, VHS IgG positivo con IgM negativo.

Frotis: anisocitosis, microcitos, macrocitos e hipocromía.

TC de tórax: conglomerados adenopáticos de > 3 cm en todas las cadenas anatómicas (pretraqueal-retrocava, prevascular, ambos hilios, infracarinal, periesofágicas) y múltiples lesiones óseas líticas

Serie ósea: múltiples lesiones líticas en bóveda craneal, arcos cigomáticos malares, palas iliacas, cuellos femorales y algunos metacarpianos.

RM cerebral: ausencia de visualización de la señal de T1 en neurohipófisis sugestiva de diabetes insípida.

Con los anteriores datos clínicos (lesiones en piel, hepatoesplenomegalia, infiltrados pulmonares, lesiones líticas, bicitopenia, probable diabetes insípida) la principal sospecha diagnóstica es histiocitosis de células de Langerhans. Para confirmación histológica realizan aspirado (AMO) y biopsia de médula ósea (BMO) y lavado broncoalveolar (BAL).

El AMO es hiper celular (Figura 1), con presencia de todas las líneas hematopoyéticas en todos los estadios madurativos, discreta hiperplasia granulocítica, histiocitosis con asiladas figuras de hemofagocitosis, emperipolesis y eosinofilia en varios estadios madurativos (Figura 2). Adicionalmente se observa un 2% de células de mediano tamaño, núcleo excéntrico, citoplasma con fina granulación, algunas con prolongaciones sugestivas de células de Langerhans (CL) (Figura 3), que se confirman por inmunocitoquímica (ICQ) con positividad para CD4, HLA-DR y CD1a (Figuras 4, 5 y 6). La citometría de flujo detecta menos de un 0,1% de eventos CD45+/CD1a+. En la BMO se confirma una infiltración del 50% de células de hábito histiocitario con amplios citoplasmas eosinófilos, y núcleos hendidos atípicos mostrando inmunopositividad difusa para CD1A y S100, siendo CD20 y CD3 negativas asociado a una moderada fibrosis reticulínica (Figura 7). En el BAL se observan abun-

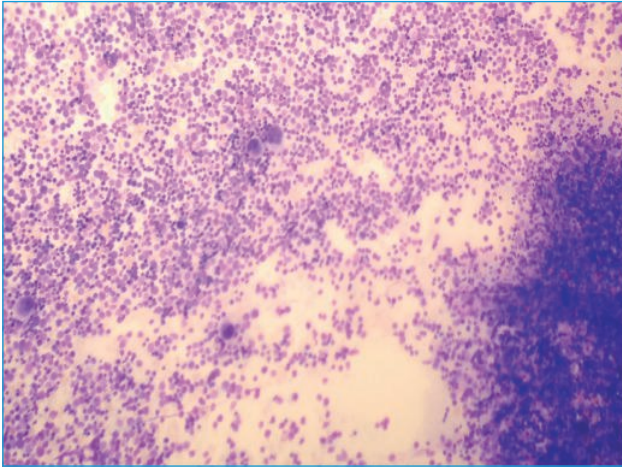


Figura 1. Tinción MGG; medula ósea hipercelular.

dantes histiocitos CD1a positivos (Figura 8) y el estudio mutacional de BRAF V600 resultó positivo.

Diagnóstico

Histiocitosis de células de Langerhans (HCL) multifocal (ósea, adenopática, pulmonar) con afectación de órgano de riesgo (hígado, bazo y médula ósea) y SNC, con presencia de la mutación BRAFV600.

Evolución

Se inicia tratamiento según protocolo LCH-IV con prednisona 1,3 mg/kg/día y vinblastina (0,2 mg/kg), con mejoría parcial. Tras la confirmación de infiltración de órganos de riesgo y la escasa respuesta al tratamiento inicial, se modifica el tratamiento al protocolo stratum III con cladribina 0,3 mg/kg/día y citarabina 33 mg/kg/

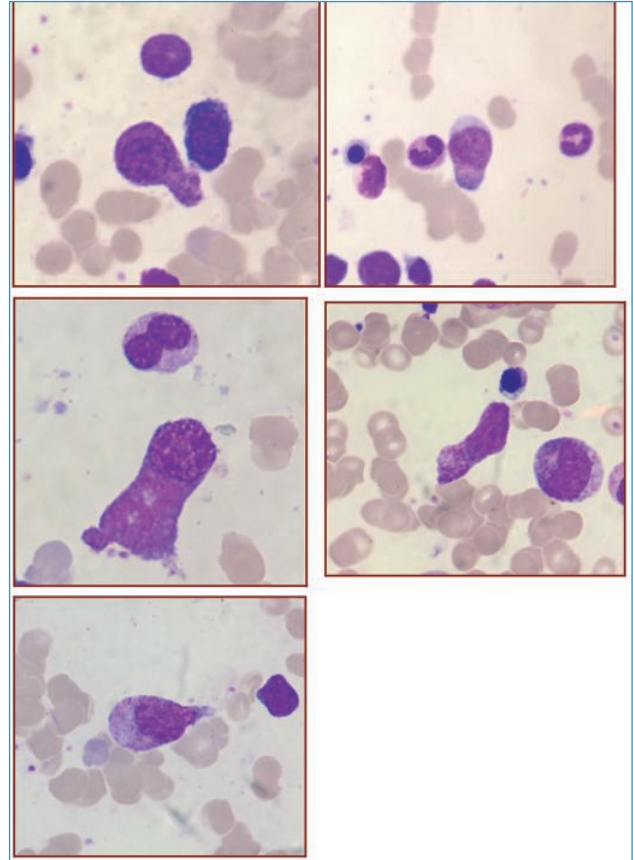


Figura 3. Ejemplos de células de Langerhans (tinción MGG).

día con mejoría clínica progresiva de los síntomas y evolucionando de manera favorable. Tras tres ciclos presenta mejoría de la bicitopenia, los infiltrados pulmonares, las lesiones en piel con y ausencia de infiltración en el ASP-BMO de reevaluación.

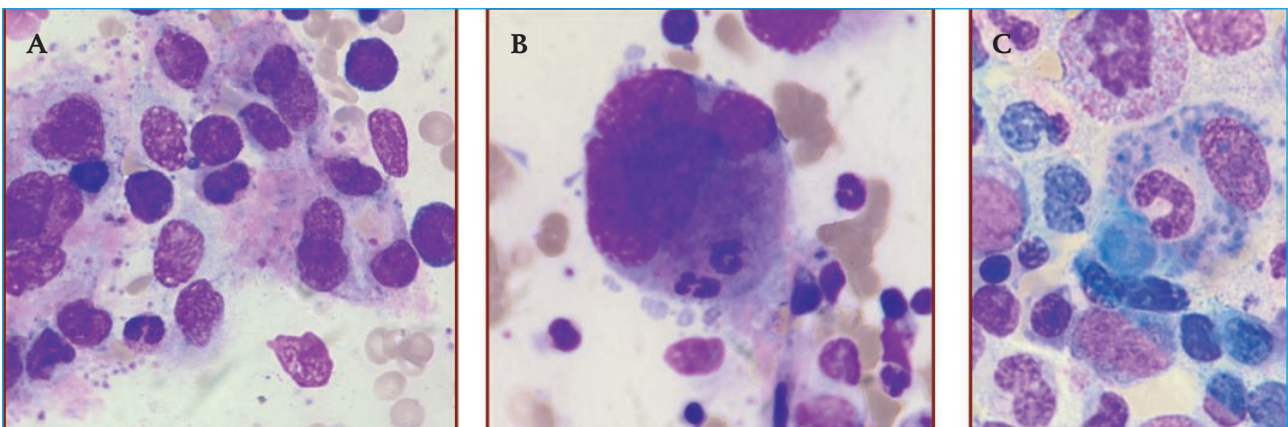


Figura 2. AMO: tinción MGG. A. Algunos histiocitos con núcleo en "huella de zapato". B. Emperipolesis. C. Figuras de fagocitosis.

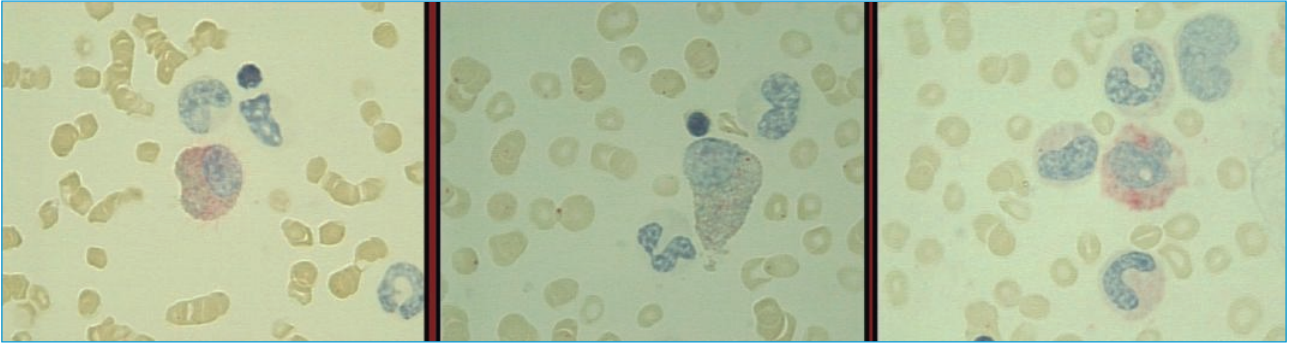


Figura 4. Células de Langerhans CD4+ (immunocitoquímica).

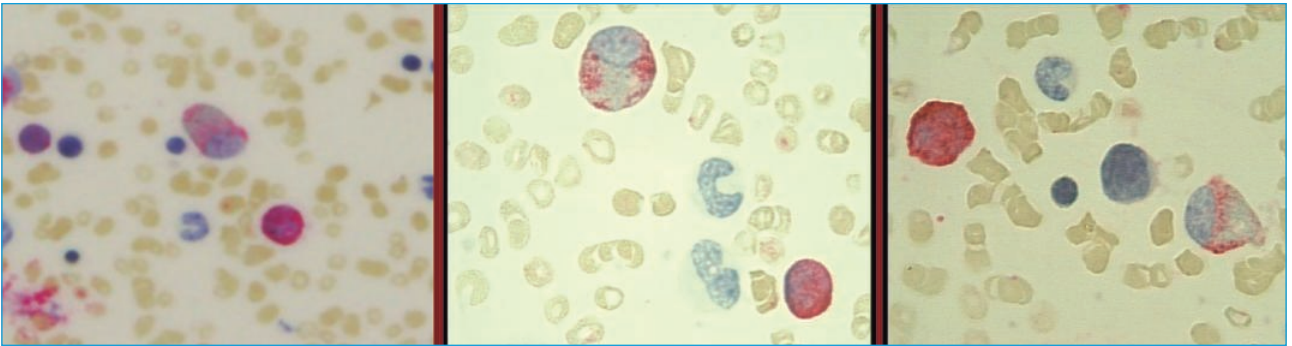


Figura 5. Células de Langerhans HLA-DR++ citoplasmático y linfocitos HLA-DR+ (control interno). Immunocitoquímica.

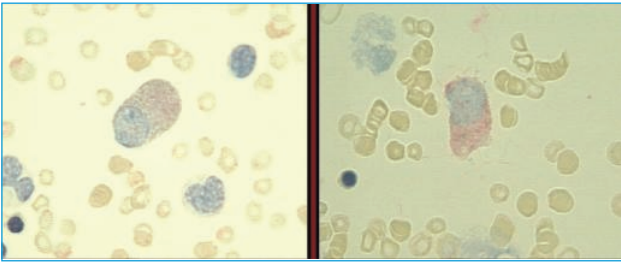


Figura 6. Células de Langerhans CD1a+ (immunocitoquímica).

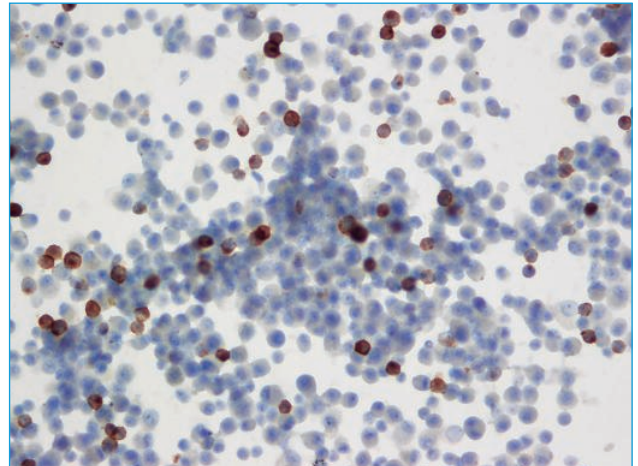


Figura 8. BAL con abundantes histiocitos CD1a positivos.

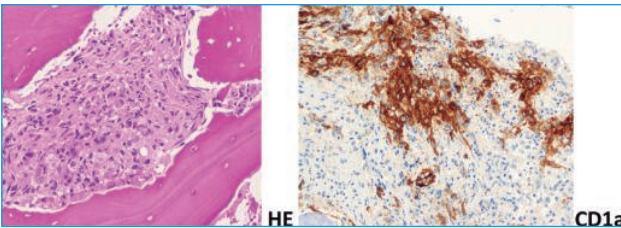


Figura 7. BMO infiltrado por células de Langerhans CD1a positivas.

Discusión

La histiocitosis de células de Langerhans forma parte de un grupo de enfermedades derivadas de histiocitos

y células dendríticas en la que prolifera un tipo de células dendríticas con fenotipo de célula de Langerhans (CD1a, Langerina CD207 y S100^l positivos). Puede afectar a cualquier órgano o sistema, siendo los más

frecuentes hueso (80%), piel (33%), pituitaria (25%), pulmón (20%), hígado, bazo, SNC y médula ósea. El curso clínico puede variar desde una enfermedad autolimitada hasta una rápidamente progresiva que podría llevar a la muerte. La enfermedad “localizada” puede no requerir tratamiento alguno y curarse espontáneamente. La enfermedad multisistémica requiere tratamiento con quimioterapia y/o corticoides, dependiendo de la extensión de la enfermedad y la gravedad de inicio^{2,3}. La expresión BRAF V600E no define los grupos de riesgo clínico, pero se asocia con mayor riesgo de recurrencia. Los últimos estudios parecen confirmar que la HCL es una neoplasia de origen mielóide y que los casos de HCL de alto riesgo se deben a la mutación somática en progenitoras hematopoyéticas, mientras que los de bajo riesgo se deben a una mutación restringida a células dendríticas precursoras tisulares⁴.

Se presenta el caso por la rareza que supone poder observar la infiltración de médula en los casos de HCL. La morfología de las células es típica, si bien resulta difícil distinguirlas de la reacción inflamatoria acompañante, siendo necesarias técnicas de inmunocitoquímica para su correcta tipificación. Los pocos estudios sobre exámen de médula ósea en la HCL se basan en el estudio histopatológico, en los que no se recoge una descripción exacta de los hallazgos morfológicos ni una correcta explicación para las citopenias. Minkov y cols.⁵, analizan la médula ósea de pacientes con HCL y no observan diferencias significativas entre las muestras de HCL y control con respecto a celularidad, número de monocitos, presencia de histiocitos y fagocitosis, pero sí demuestra la utilización de las técnicas de inmunocitoquímica para detectar la infiltración medular, con sensibilidad superior a la citometría de flujo. Para estos autores la presencia de células de morfología dendrítica CD1a positivas es específica y patognomónica de la afectación de la médula en la HCL, aunque se encuentran en un bajo porcentaje y dispersas por toda la muestra. Además, demuestran una correlación estadísticamente significativa entre la presencia de células CD1a positivas y gravedad de la enfermedad (presencia de citopenia y/o afectación hepática y/o afectación del bazo). La citopenia en estos pacientes no se debe a una simple sustitución de la hematopoyesis normal por las células patológicas y su causa aún no está bien entendida⁶.

En conclusión, la presencia de células de morfología dendrítica CD1a positivas parece ser diagnóstica de la afectación de la médula ósea en la HCL, siendo la combinación de citología e inmunocitoquímica la herramienta más fiable para su detección.

Para recordar

- La histiocitosis de células de Langerhans es una proliferación neoplásica de un tipo de células dendríticas de Langerhans que expresan CD1a, langerina CD207 y S100.
- Puede afectar a cualquier órgano o sistema, siendo su curso clínico heterogéneo, variando desde una enfermedad autolimitada a una rápidamente progresiva y mortal.
- La presencia de células CD1a positivas es específica de la afectación de la médula ósea en la HCL.
- La expresión BRAF V600E no define los grupos de riesgo clínico, pero se asocia con mayor riesgo de recurrencia.
- Las opciones de tratamiento varían dependiendo de la extensión de la enfermedad y la gravedad de inicio.

Bibliografía

1. Badalian-Very G, Vergilio JA, Degar BA, Rodríguez-Galindo C, Rollins BJ. Recent advances in the understanding of Langerhans cell histiocytosis. *British Journal of Haematology* 2011;156:163-72.
2. Girschikofsky M, Arico M, Castillo D, et al. Management of adult patients with Langerhans cell histiocytosis: recommendations from an expert panel on behalf of Euro-Histio-Net. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2013;14(8):72.
3. Ablu O, Maarten Egeler R, Weitzman S. Langerhans cell histiocytosis: Current concepts and treatments. *Cancer Treatment Reviews* 2010;36(4):354-9.
4. Berres ML, Phaik Har Lim K, Peters T, Price J, et al. BRAF-V600E expression in precursor versus differentiated dendritic cells defines clinically distinct LCH risk groups. *Journal Experimental Medicine* 2014;7(4):669-83.
5. Minkov M, Potschger U, Grois N, Gardner H, Dworzak MN. Bone Marrow Assessment in Langerhans Cell Histiocytosis. *Pediatr Blood Cancer* 2007;15;49(5):694-8.
6. Galluzzo ML, Braier J, Rosenzweig SD, García de Dávila MT, Rosso D. Bone Marrow Findings at Diagnosis in Patients with Multisystem Langerhans Cell Histiocytosis. *Pediatr Dev Pathol* 2010;13(2):101-6.

Síndromes mieloproliferativos Ph negativos. Síndromes mieloproliferativos crónicos Filadelfia negativos. Manejo integral del paciente y estrategias de futuro en SMPc Ph-

COORDINADORES: **J.C. HERNÁNDEZ BOLUDA.** *Servicio de Hematología Y Oncología Médica. Hospital Clínico Universitario. Valencia*

J.V. GARCÍA GUTIÉRREZ. *Servicio de Hematología. Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid*

Los recientes avances en el conocimiento de la patogénesis de las neoplasias mieloproliferativas crónicas han permitido, por un lado, definir subgrupos de pacientes con un perfil clínico distintivo y, por otro, iniciar ensayos clínicos con nuevos fármacos en un área donde hasta hace poco las opciones terapéuticas eran limitadas. La primera intervención del simposio, a cargo del Dr. C. Besses, se centrará en las alteraciones moleculares implicadas en la patogénesis de las neoplasias mieloproliferativas crónicas, tratando de clarificar en qué medida las mismas deben influir en la toma de decisiones terapéuticas. A continuación, el Dr. F. Cervantes abordará el manejo individualizado de los pacientes con mielofibrosis ajustado al riesgo, detallando los factores que deben tomarse en consideración a la hora de iniciar el tratamiento. A su vez, el Dr. A. Álvarez-Larrán mostrará la frecuencia de complicaciones vasculares en los pacientes con trombocitemia esencial y policitemia vera, para luego analizar las recomendaciones actuales dirigidas a su prevención y tratamiento. Por último, el Dr. R. Mesa pondrá en contexto los resultados de los ensayos clínicos con los nuevos fármacos, así como las estrategias terapéuticas que se han de explorar en los próximos años en los pacientes con neoplasias mieloproliferativas crónicas.

¿Deben las alteraciones moleculares guiarnos en la toma de decisiones en el tratamiento de las neoplasias mieloproliferativas Ph negativas?

C. BESSES

Servicio de Hematología. Hospital del Mar-IMIM. Barcelona

Introducción

El descubrimiento de la mutación *JAK2V617F* en 2005 supuso un cambio conceptual en el conocimiento de la patogenia de las neoplasias mieloproliferativas Ph negativas (NM) y determinó la inclusión de las alteraciones moleculares en los criterios diagnósticos de este grupo de enfermedades. La presencia de la mutación *JAK2V617F* en el 95% de los pacientes con policitemia vera (PV) y la descripción en 2006 de mutaciones en el receptor de la trombopoyetina (*MPL*) en pacientes con trombocitemia esencial (TE) y mielofibrosis primaria (MFP) permitieron la caracterización molecular de un importante porcentaje de pacientes. Posteriormente, la descripción en 2007 de mutaciones en el exón 12 del gen *JAK2* en las PV *JAK2V617F*-negativas y el hallazgo en 2013 de mutaciones en el gen de la calreticulina (*CALR*) han logrado tipificar, desde el punto de vista molecular, a la gran mayoría de pacientes y a su vez establecer un perfil mutacional característico de cada entidad. Actualmente, tan solo un 8-15% de los pacientes con TE y MFP no presentan alteraciones moleculares correspondientes a los genes anteriormente mencionados (pacientes denominados “triple negativos”).

Como consecuencia del conocimiento de un perfil de mutaciones determinado en cada entidad, se ha investigado en primer lugar la correlación de las alteraciones moleculares con las características clínicas y biológicas del paciente y, en segundo lugar, se ha intentado asignar un valor pronóstico a las mismas. Asimismo, se ha analizado la acción de diversos tratamientos sobre la carga mutacional del paciente, con la finalidad de correlacionar la respuesta obtenida con una posible modificación en la expresión de la anomalía genética. En este resumen se describen las correlaciones de las alteraciones moleculares con el fenotipo clínico, así como el valor pronóstico y la posible influencia que podrían suponer las alteraciones moleculares respecto a las decisiones terapéuticas en pacientes con PV y TE. El valor pronóstico de las alteraciones moleculares en los pacientes con mielofibrosis se tratará en otro apartado del simposio.

Correlación de las alteraciones moleculares con el fenotipo clínico

La presencia de la mutación *JAK2V617F* en homocigosis en pacientes con PV (25-45%) y TE (1-5%) identifica a una subpoblación de pacientes de edad más avanzada, con más esplenomegalia y con cifras de leucocitos más elevadas. Los pacientes con TE y mutación *JAK2V617F* homocigota presentan asimismo un mayor riesgo de complicaciones cardiovasculares¹. Vannucchi y cols., mostraron que una carga mutacional de *JAK2V617F* > 75% al diagnóstico en pacientes con PV se relaciona con mayor tamaño esplénico y mayor frecuencia de prurito. Asimismo, este subgrupo de pacientes, que representaba un 18% del total (n = 173), presentaba un mayor requerimiento de tratamiento citorreductor y una tasa más elevada de complicaciones cardiovasculares². Otros autores también han correlacionado la carga alélica de los pacientes con PV con la concentración de hemoglobina, la existencia de leucocitosis y de hiper celularidad medular³. De manera similar, en pacientes con TE se ha confirmado la asociación de *JAK2V617F* en homocigosis con una mayor frecuencia de esplenomegalia y de trombosis arterial al diagnóstico⁴. Una mayor carga alélica de *CALR* al diagnóstico también se ha relacionado con mayor cifra de leucocitos y de plaquetas respecto a los pacientes con valores de carga alélica inferiores⁵.

Respecto a las correlaciones de las mutaciones en *MPL* y las características clínicas en pacientes con TE, se ha observado una relación con cifras inferiores de hemoglobina, mayor trombocitosis y disminución de la celularidad eritroide y global respecto a los pacientes con mutación en *JAK2V617F*, pero sin que estas diferencias fuesen suficientes para definir un fenotipo distintivo^{6,7}.

Recientemente, el análisis de las características clínicobiológicas de los pacientes con TE y mutaciones en el gen de la *CALR* ha revelado rasgos fenotípicos diferenciales respecto a los pacientes con TE y mutación *JAK2V617F*. Así, el perfil de un paciente con mutación en

CALR se asocia a una edad más joven, cifras inferiores de hemoglobina y de leucocitos y mayores cifras de plaquetas. El hecho diferencial más importante es un riesgo acumulativo de trombosis significativamente inferior al que presentan los pacientes *JAK2V617F* mutados^{8,9}.

Valor pronóstico de las alteraciones moleculares

Tres metaanálisis publicados en 2008 y 2009 han mostrado un riesgo de trombosis aproximadamente 2 veces superior en los pacientes con TE *JAK2V617F*-positivos respecto a los pacientes con TE *JAK2V617F*-negativos. El aumento del riesgo trombótico se observa tanto en lo que respecta a la trombosis arterial como a la trombosis venosa¹⁰⁻¹².

En los pacientes con TE y mutaciones en *CALR* se ha observado un riesgo trombótico significativamente inferior al que presentan los pacientes con TE *JAK2V617F*-positiva, que a su vez muestran un riesgo similar de trombosis al de los pacientes con PV⁹. Esta característica clínica también se ha comprobado en pacientes jóvenes. El análisis de una serie de 197 pacientes con TE de edad < 40 años también ha demostrado una incidencia acumulativa de trombosis significativamente inferior en los pacientes *CALR*-mutados respecto a los pacientes *JAK2V617F*-mutados, observándose también que los pacientes con carga alélica de *JAK2V617F* > 50% presentaban mayor riesgo de trombosis comparado con el resto de pacientes¹³. La menor incidencia de trombosis, junto a las diferencias biológicas mencionadas, sugiere que los pacientes con mutaciones en *CALR* podrían constituir una entidad diferente de los pacientes con mutaciones en *JAK2V617F*.

En PV diversos estudios muestran resultados diferentes entre la alta carga mutacional de *JAK2V617F* y el riesgo incrementado de complicaciones vasculares durante la evolución clínica, lo que no permite establecer por el momento una relación consistente entre ambas variables^{2,3}. Por el contrario, sí se ha descrito en PV una correlación entre una carga alélica de *JAK2V617F* > 50% al diagnóstico y un mayor riesgo de evolución a mielofibrosis^{3,14}. Asimismo, el patrón evolutivo de la carga alélica de *JAK2V617F* en los pacientes con PV muestra una asociación entre el mantenimiento persistente de una carga alélica de *JAK2V617F* > 50% y un riesgo incrementado de mielofibrosis¹⁵. En relación con la evolución mielofibrótica de los pacientes con TE y mutaciones en *CALR* respecto a los pacientes *JAK2V617F* mutados, los resultados por el momento son discrepantes y se necesitan más estudios para poder establecer una relación entre el perfil genético de la TE y una mayor tendencia a la evolución mielofibrótica.

Respecto a la posible relación entre las alteraciones moleculares y la supervivencia, un estudio de la Clí-

nica Mayo sobre 559 pacientes con TE y PV mostró que la mediana de supervivencia fue de 19,8 y de 13,5 años para la TE y PV, respectivamente, pero sin que la mayor supervivencia de los pacientes con TE respecto a los pacientes con PV fuese atribuible al estado mutacional de *JAK2*, *CALR* o *MPL*. Por el contrario, en los pacientes con MFP la supervivencia y la transformación blástica mostraron asociación significativa con el estado mutacional; el mejor pronóstico fue para los pacientes con mutaciones en *CALR* (mediana de supervivencia 16 años, transformación blástica 6,5%) y el peor para los pacientes triple negativos (mediana de supervivencia 2,3 años, transformación blástica 25%)¹⁶. En otro análisis de la Clínica Mayo y en una cohorte de 299 pacientes con TE y mediana de seguimiento de 12,7 años, la supervivencia mediana fue de 19 años para los pacientes *JAK2V617F*-positivos y de 20 años para los pacientes con mutaciones en *CALR* ($p = 0.32$) y de 26 y 32 años ($p = 0.56$), respectivamente, para los pacientes de < 65 años, sin observarse diferencias respecto a la progresión leucémica o fibrótica, lo que indica una historia natural similar entre las dos categorías mutacionales¹⁷.

Influencia de las alteraciones moleculares en el tratamiento

Así como se han establecido correlaciones genotipo-fenotipo en TE y PV y un mayor riesgo de evolución a mielofibrosis en los pacientes con PV y elevada carga mutacional de *JAK2V617F*, por el momento no existen recomendaciones consensuadas respecto a la elección de un tratamiento citorreductor en función del perfil genético del paciente, especialmente en lo que se refiere a la TE *CALR* mutada respecto a la TE *JAK2V617F*-positiva. Aunque se ha confirmado en diversas series clínicas que la incidencia de trombosis en los pacientes *JAK2V617F*-mutados respecto a los pacientes *CALR*-mutados es superior, también debe tenerse en cuenta que al presentar estos últimos más trombocitosis es posible que se traten más precozmente con citorreductores, independientemente de la categoría de riesgo trombótico a la que pertenezcan.

Un estudio cooperativo multicéntrico en pacientes con TE menores de 60 años demostró que la administración de dosis bajas de ácido acetilsalicílico (AAS) disminuía el riesgo de trombosis venosa en los pacientes *JAK2V617F*-positivos y el riesgo de trombosis arterial en los pacientes con factores de riesgo cardiovascular. Así, se ha sugerido que la administración de AAS beneficia particularmente a dichos subgrupos de pacientes jóvenes, aunque en el citado estudio también se observó mayor riesgo de sangrado en los pacientes tratados con AAS y cifras de plaquetas > 1.000 x 10⁹/L¹⁸.

El grupo del MD Anderson ha demostrado que los pacientes tratados con interferón pegilado a-2a que no

consiguen obtener una remisión molecular completa presentan mayor frecuencia de mutaciones en otros genes como *TET2*¹⁹. Asimismo, un grupo francés mostró a través del estudio de colonias eritroides en pacientes tratados con interferón pegilado que este fármaco actúa contra las células con mutación *JAK2V617F* sin afectar a las clonas con mutaciones en *TET2*²⁰. Ambos hechos podrían sugerir que en aquellos pacientes candidatos a recibir interferón pegilado con intención de obtener una respuesta molecular el análisis del perfil mutacional previo al tratamiento podría ayudar a discernir la probabilidad de obtener una remisión molecular.

Conclusiones

Si bien en los pacientes con TE y PV las mutaciones en *JAK2V617F* y en *CALR* se acompañan de correlaciones con valores hematológicos y características clínicas en el momento del diagnóstico, así como con determinadas manifestaciones clínicas evolutivas (mielofibrosis), su impacto en las decisiones terapéuticas no está por el momento establecido. Los resultados del estudio prospectivo fase III del Myeloproliferative Research Consortium, que aleatoriza prospectivamente a pacientes de alto riesgo con TE y PV entre hidroxycarbamida e interferón pegilado (NTC01259856), probablemente aportarán información importante entre la asociación de las alteraciones genéticas y la carga alélica en el momento del diagnóstico con la respuesta clínica, hematológica y molecular, así como con la incidencia evolutiva de trombosis y mielofibrosis.

Ayudas: SGR 2014-567, PI10/01807, PI13/00393, PI13/00557, RETICS RD12/0036/0010.

Bibliografía

- Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Rambaldi A, Barosi G, Marchioli R, et al. Clinical profile of homozygous *JAK2V617F* mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Blood* 2007;110:840-6.
- Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Longo G, Pancrazzi A, Ponziani V, et al. Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on *JAK2V617F* allele burden. *Leukemia* 2007;21:1952-9.
- Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Elena C, Boveri E, Arcaini L, et al. A prospective study of 338 patients with polycythemia vera: the impact of *JAK2* (*V617F*) allele burden and leukocytosis on fibrotic or leukemic disease transformation and vascular complications. *Leukemia* 2010;24:1574-9.
- Antonioli E, Guglielmelli P, Poli G, Bogani C, Pancrazzi A, Longo G, et al. Influence of *JAK2V617F* allele burden on phenotype in essential thrombocythemia. *Haematologica* 2008;93:41-8.
- Andrikovics H, Krahling T, Balassa K, Halm G, Bors A, Koszarska M, et al. Distinct clinical characteristics of myeloproliferative neoplasms with calreticulin mutations. *Haematologica* 2014;99:1184-90.
- Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, Bench AJ, Erber WN, Bareford D, et al. *MPL* mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood* 2008;112:141-9.
- Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Guerini V, Barosi G, et al. Characteristics and clinical correlates of *MPL515W>L/K* mutation in essential thrombocythemia. *Blood* 2008;112:844-7.
- Rotunno G, Mannarelli C, Guglielmelli P, Pacilli A, Pancrazzi A, Pieri L, et al. Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia. *Blood* 2014;123:1552-5.
- Rumi E, Pietra D, Ferretti V, Klampfl T, Harutyunyan AS, Milosevic JD, et al. *JAK2* or *CALR* mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood* 2014;123:1544-51.
- Lussana F, Caberion S, Pagani C, Kamphuisen PW, Büller HR, Cattaneo M. Association of *V617F JAK2* mutation with the risk of thrombosis among patients with essential thrombocythemia or idiopathic myelofibrosis: a systematic review. *Thromb Res* 2009;124:409-17.
- Ziakas PD. Effect of *JAK2V617F* on thrombotic risk in patients with essential thrombocythemia: measuring the uncertain. *Haematologica* 2008;93:1412-4.
- Dahabreh IJ, Zoi K, Giannouli S, Zoi C, Loukopoulos D, Voulgaris M. Is *JAK2V617F* mutation more than a diagnostic index? A meta-analysis of clinical outcomes in essential thrombocythemia. *Leuk Res* 2009;33:67-73.
- Palandri F, Latagliata R, Polverelli N, Tieghi A, Crugnola M, Martino B, et al. Mutations and long-term outcome of 217 young patients with essential thrombocythemia or early primary myelofibrosis. *Leukemia* 2015;29:1344-9.
- Alvarez-Larrán A, Bellosillo B, Martínez-Avilés L, Saumell S, Salar A, Abella E, et al. Postpolycythaemic myelofibrosis: frequency and risk factors for this complication in 116 patients. *Br J Haematol* 2009;146:504-9.
- Álvarez-Larrán A, Bellosillo B, Pereira A, Kerguelen A, Hernández-Boluda JC, Martínez-Avilés L, et al. *JAK2V617F* monitoring in polycythemia vera and essential thrombocythemia: clinical usefulness for predicting myelofibrotic transformation and thrombotic events. *Am J Hematol* 2014;89:517-23.
- Tefferi A, Guglielmelli P, Larson DR, Finke C, Wassie EA, Pieri L, et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood* 2014;124:2507-13.
- Tefferi A, Wassie EA, Lasho TL, Finke C, Belachew AA, Ketterling RP et al. Calreticulin mutations and long-term survival in essential thrombocythemia. *Leukemia* 2014;28:2300-3.
- Álvarez-Larrán A, Cervantes F, Pereira A, Arellano E, Pérez-Andreu V, Hernández-Boluda JC, et al. Observation versus antiplatelet therapy as primary prophylaxis for thrombosis in low-risk essential thrombocythemia. *Blood* 2010;116:1205-10.
- Quintas-Cardama A, Abdel-Wahab O, Manshourin T, Kilpivaara O, Cortes J, Roupie AL et al. Molecular analysis of patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia receiving pegylated interferon alfa-2a. *Blood* 2013;122:893-901.
- Kiladjian JJ, Masse A, Cassinat B, Mokrani H, Teyssandier I, la Couedic JP et al. Clonal analysis of erythroid progenitors suggests that pegylated interferon alpha-2a treatment targets *JAK2V617F* clones without affecting *TET2* mutant cells. *Leukemia* 2010;24:1519-23.

Clasificación y manejo de la mielofibrosis ajustado al riesgo

F. CERVANTES

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

Resumen

La mielofibrosis (MF) es una neoplasia mieloproliferativa crónica asociada a una supervivencia mediana cercana a los 7 años, pero con una gran heterogeneidad al respecto. En los últimos años se han desarrollado diversos sistemas de clasificación que permiten identificar subpoblaciones de pacientes con diferente probabilidad de supervivencia: bajo riesgo, intermedio-1, intermedio-2 y alto riesgo. Dicha estratificación ayuda a planificar el tratamiento, fundamentalmente a la selección de pacientes para el trasplante alogénico (TPH). Existe consenso generalizado en cuanto a la indicación del TPH en los pacientes con MF de alto riesgo y en los enfermos relativamente jóvenes de riesgo intermedio-2. El reciente descubrimiento de nuevas alteraciones moleculares, como las mutaciones del gen de la calreticulina y ciertas mutaciones compartidas por otras neoplasias mieloides (las de los genes *ASXL1*, *EZH2*, *IDH* y *SRSF2*), ha ayudado a refinar el pronóstico de la MF y eventualmente podría apoyar la indicación del TPH en algunos pacientes con MF de riesgo intermedio-1. Con todo, dada la edad de la mayoría de los pacientes con MF, pocos son tributarios del trasplante, por lo que en la práctica la elección de la modalidad terapéutica suele venir dictada por las manifestaciones clínicas predominantes.

Introducción

La mielofibrosis (MF), primaria o secundaria a policitemia vera o trombocitemia esencial, es la neoplasia mieloproliferativa crónica (NMP) BCR/ABL-negativa clásica menos frecuente y la de mayor impacto clínico, tanto por la importancia de la sintomatología como por su efecto en la supervivencia de los pacientes. Se trata de una enfermedad poco frecuente que afecta, por lo general, a personas de edad avanzada. Su curso es heterogéneo y se ve complicado por la aparición de anemia, esplenomegalia sintomática, síntomas constitucionales (pérdida de peso, sudoración nocturna, febrícula), manifestaciones de hemopoyesis extramedular y otras

complicaciones. En el 20% de los casos evoluciona a leucemia aguda. Desde el punto de vista molecular, la mayoría de los pacientes presentan mutaciones en los genes *JAK2* de la calreticulina (*CALR*) o del receptor de la trombopoyetina (*MPL*). Además, algunos presentan ciertas alteraciones moleculares compartidas con otras neoplasias mieloides. Por el momento, el trasplante alogénico de progenitores hemopoyéticos constituye la única terapéutica curativa de la enfermedad. Sin embargo, dada la edad de los pacientes, en la práctica este procedimiento solo es aplicable a una minoría de ellos, por lo que en la mayoría de los casos el tratamiento es paliativo y se dirige a controlar los síntomas y mejorar la calidad de vida. En los últimos años se están investigando nuevos fármacos para la MF, alguno de los cuales, como ruxolitinib, un inhibidor de JAK, mejora de manera marcada la sintomatología y prolonga la supervivencia.

En la presente ponencia se discute la elección del tratamiento más adecuado para los pacientes con MF basándose, por una parte, en su elegibilidad para el TPH y, por otra, en las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

Clasificación pronóstica

La supervivencia de los pacientes con MF ha ido aumentando a lo largo del tiempo y en la actualidad se acerca a una mediana de 7 años. No obstante, existe una gran heterogeneidad, ya que algunos pacientes fallecen en 2 o 3 años mientras que otros viven más de 20. Las principales causas de muerte son la evolución a leucemia aguda (20% de los enfermos), la progresión de la enfermedad con caquexia e intenso debilitamiento, la infección, la hemorragia, la hipertensión portal, las trombosis en otros territorios y causas no relacionadas con la MF, fundamentalmente segundas neoplasias.

A la hora de planificar el tratamiento de los pacientes con MF es importante realizar una evaluación pronóstica, sobre todo de cara a establecer la posible indicación de un trasplante alogénico. En los últimos años

se han producido importantes avances en este terreno gracias a los estudios del International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment (IWG-MRT). Así, en la actualidad disponemos de un sistema de clasificación pronóstica inicial, el denominado IPSS (*International Prognostic Scoring System*), que reconoce 4 grupos pronósticos, con una supervivencia mediana de aproximadamente 11, 8, 4 y 2 años, respectivamente. Además, existe un sistema pronóstico dinámico o DIPSS que permite reevaluar el pronóstico de los pacientes en cualquier momento de su evolución. Ambos sistemas utilizan los mismos factores, siendo su única diferencia el mayor peso de la anemia en el DIPSS. Un refinamiento del DIPSS ha sido el DIPSS-plus, que incluye otros 3 factores desfavorables: la dependencia transfusional, la plaquetopenia y ciertas alteraciones citogenéticas. En la [Tabla 1](#) se detallan los sistemas de clasificación pronóstica utilizados actualmente en la MF. Aunque derivados de pacientes con MF primaria, se aplican también a aquellos con MF post-PV y post-TE, si bien se ha señalado que podrían no ser tan discriminantes en estos casos.

Existe información creciente sobre la influencia pronóstica de ciertas alteraciones moleculares en la MF. Así, los sujetos con mutaciones de *CALR* tendrían un pronóstico más favorable, mientras que los de peor pronóstico serían los pacientes “triple negativos”, es decir, aquellos sin ninguna de las 3 mutaciones características de las NMP (*JAK2*, *CALR* y *MPL*). Además, una minoría presenta mutaciones no exclusivas de las NMP, algunas de las cuales (las de los genes *ASXL1*,

EZH2, *IDH* y *SRSF2*) comportarían un pronóstico más desfavorable, en particular las de *ASXL1*. Por ello, recientemente se ha propuesto un nuevo sistema de clasificación pronóstica de la MF que añadiría la información proporcionada por el estudio molecular a los parámetros clinicohematológicos convencionales de valor pronóstico reconocido. Aunque es prematuro recomendar su uso generalizado, esta clasificación podría ser útil en pacientes individuales.

Tratamiento ajustado al riesgo

En la [Tabla 2](#) se presenta un algoritmo terapéutico para la MF basado en el riesgo de los pacientes y en su perfil clínico.

Trasplante alogénico

El TPH constituye la única terapéutica curativa de la MF. Sin embargo, en la práctica dicha posibilidad terapéutica queda restringida a una minoría de pacientes. Cabe destacar que la decisión del TPH no debe basarse exclusivamente en la edad del paciente sino también en su grupo pronóstico, es decir, que el hecho de ser joven no comporta necesariamente que deba realizarse el trasplante. En este sentido, un estudio reciente que comparaba de forma retrospectiva pacientes trasplantados con no trasplantados del mismo grupo pronóstico ha puesto de manifiesto que el TPH proporciona una ventaja de supervivencia a los sujetos con MF de riesgo intermedio-2 y alto, mientras que en los pacientes

Tabla 1. Sistemas de clasificación pronóstica de la mielofibrosis

Variable	IPSS	DIPSS	DIPSS-plus
Edad > 65 años	+	+	+
Síntomas constitucionales	+	+	+
Hb < 10 g/dL	+	+	+
Leucocitos > 25 x 10 ⁹ /L	+	+	+
Blastos en sangre periférica ≥ 1%	+	+	+
Plaquetas < 100 x 10 ⁹ /L			+
Requerimiento transfusional			+
Cariotipo desfavorable: +8, -7/7q-, -5/5q-, i17q, 12p-, 11q23 reord.			+
	1 punto cada uno	1 punto cada uno (Hb: 2 puntos)	El DIPSS del paciente (int-1: 1 punto; int-2: 2 puntos; alto: 3 puntos) más un punto por cada uno de los siguientes: – Plaquetas < 100 x 10 ⁹ /L – Cariotipo desfavorable – Requerimiento transfusional

IPSS: International Prognostic Scoring System; bajo riesgo: 0 puntos; riesgo intermedio-1: 1 punto; riesgo intermedio-2: 2 puntos; alto riesgo: 3-5 puntos; DIPSS: Dynamic IPSS; bajo riesgo: 0 puntos; riesgo intermedio-1: 1-2 puntos; riesgo intermedio-2: 3-4 puntos; alto riesgo: 5-6 puntos. DIPSS-plus; bajo riesgo: 0 puntos; riesgo intermedio-1: 1 punto; riesgo intermedio-2: 2-3 puntos; alto riesgo: 4-6 puntos.

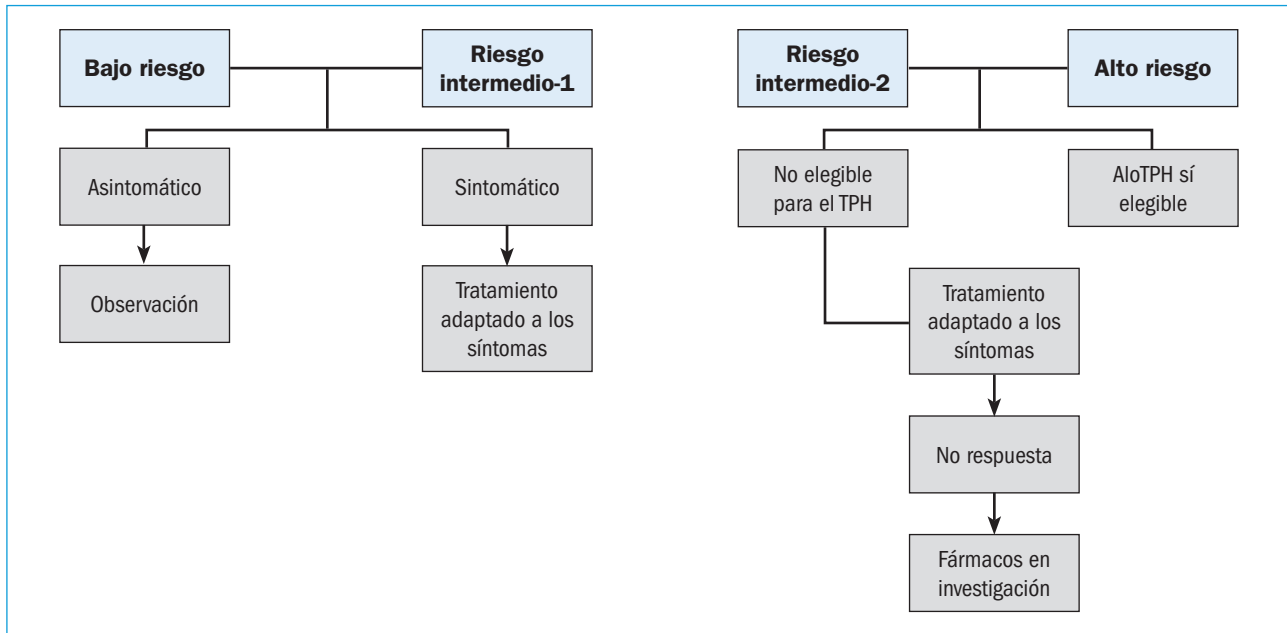


Figura 1. Algoritmo terapéutico de la mielofibrosis ajustado al riesgo.

de riesgo bajo e intermedio-1 la ventaja correspondió a los que no se trasplantaron. Estos datos apoyarían la indicación del TPH en los pacientes con MF de alto riesgo y en los de riesgo intermedio-2, en este último caso especialmente si son jóvenes. Aunque existe cierta controversia con respecto a los pacientes de riesgo intermedio-1, grupo en el que los resultados del trasplante son relativamente buenos, la mayoría de autores consideran excesiva la mortalidad del procedimiento como para recomendarlo, debiendo valorarse en estos casos la posible existencia de alteraciones citogenéticas o moleculares asociadas a un pronóstico desfavorable. Por otra parte, teniendo en cuenta que, incluso en su modalidad con régimen de acondicionamiento de intensidad reducida (RIC, del inglés *reduced intensity conditioning*), el procedimiento conlleva una importante mortalidad y morbilidad, deben considerarse, además, el estado general del paciente y sus posibles comorbilidades, lo cual reviste especial importancia en los sujetos de edad limítrofe para el trasplante (entre 60 y 70 años).

Tratamiento basado en los síntomas

Puesto que la mediana de edad de los pacientes con MF es de 65 años y que una proporción importante de los menores de esta edad no pertenecen a los grupos de riesgo intermedio-2 y alto, únicamente un 10-20% de los individuos con MF son tributarios del trasplante. Ello significa que en la mayoría de los casos la elección terapéutica se basará en las manifestaciones clínicas que presente el paciente. Dada la heterogeneidad de estas manifestaciones en la MF y la ausencia de un tra-

tamiento eficaz para todas, la elección de la terapéutica adecuada deberá tener en consideración el perfil clínico de la MF y el hecho de que el objetivo del tratamiento es fundamentalmente paliativo.

La anemia es un problema frecuente en la MF. Su tratamiento inicial dependerá de los niveles séricos de eritropoyetina ya que, si son inadecuados, el fármaco de elección es un agente estimulante de la eritropoyesis. En cambio, si son adecuados se recomiendan anabolizantes como el danazol. Otra opción serían los agentes inmunomoduladores (talidomida, lenalidomida), habitualmente combinados con prednisona, los cuales provocan efectos adversos frecuentes.

En los enfermos con síntomas constitucionales o molestias por la esplenomegalia hasta hace poco el fármaco más utilizado era la hidroxiurea, con la que se obtienen respuestas en un 40% de los pacientes, pero en general poco profundas y con una duración mediana de alrededor de 1 año. La esplenectomía es otra forma de tratar la esplenomegalia que se asocia a una elevada morbilidad e incluso mortalidad. Por su parte, la radioterapia esplénica es eficaz pero su efecto es transitorio y puede provocar pancitopenia grave y prolongada.

El panorama terapéutico de la MF ha cambiado gracias a la introducción de los inhibidores de JAK, eficaces para controlar las manifestaciones hiperproliferativas de la enfermedad tanto en los pacientes JAK2 positivos como en los negativos. En la actualidad uno de ellos, ruxolitinib, es el único fármaco aprobado para el tratamiento de la esplenomegalia sintomática y los síntomas constitucionales. Se trata de una medicación habitualmente bien tolerada, siendo su efecto adverso

más frecuente la mielosupresión (anemia, plaquetopenia), especialmente en los primeros meses del tratamiento. La principal limitación para su administración es la plaquetopenia. Ruxolitinib y otros inhibidores de JAK, actualmente en fase de desarrollo clínico, reducen de forma importante el bazo y mejoran los síntomas constitucionales. Sin embargo, no hay datos que indiquen que puedan erradicar la clona neoplásica, puesto que no hacen disminuir la carga alélica de la forma mutada de *JAK2* de forma apreciable. No obstante, cabe destacar que con un seguimiento más prolongado se ha observado que ruxolitinib, además de mejorar los síntomas y el estado general de los pacientes, prolonga su supervivencia.

Perspectivas futuras

En la actualidad están en marcha diversos ensayos de combinación de los inhibidores de JAK con fármacos de diferente mecanismo de acción, con el objetivo de conseguir un efecto más profundo en cuanto a la modificación de la historia natural de la enfermedad, y se están ensayando otros agentes para el tratamiento de la mielofibrosis.

Bibliografía

1. Tefferi A. Myelofibrosis with myeloid metaplasia. *N Engl J Med* 2000;342:1255-65.
2. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, et al. A new prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood* 2009;113:2895-01.
3. Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi A, et al. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment. *Blood* 2010;115:1703-08.
4. Gangat N, Pardanani A, Hanson CA, et al. DIPSS-Plus: A refined dynamic international prognostic scoring system (DIPSS) for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count and transfusion status. *J Clin Oncol* 2011;29:392-7.
5. Vannucchi AM, Guglielmelli P, Rotunno G, et al. Mutation-enhanced International Prognostic Scoring System (MIPSS) for primary myelofibrosis: An AGIMM and IWG-MFRT project. *Blood* 2014;124:405.
6. Barbui T, Barosi G, Birbegard G, et al. Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European LeukemiaNet. *J Clin Oncol* 2011;29:761-70.
7. Gupta V, Parameswaran H, Hoffman R. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for myelofibrosis in the era of JAK inhibitors. *Blood* 2012; 120:1367-79.
8. Cervantes F. How I treat myelofibrosis. *Blood* 2014;124:2635-42.
9. Harrison C, Kiladjian JJ, Al-Ali HK, et al. JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. *N Engl J Med* 2012;366:787-98.
10. Cervantes F, Vannucchi AM, Kiladjian JJ, et al. Three-year efficacy, safety, and survival findings from COMFORT-II, a phase 3 study comparing ruxolitinib with best available therapy for myelofibrosis. *Blood* 2013;122:4047-53.

Prevención de sangrados y eventos vasculares en policitemia vera y trombocitemia esencial

A. ÁLVAREZ LARRÁN

Servicio de Hematología. Hospital del Mar. Barcelona

Frecuencia de trombosis y hemorragia

Las neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMP), especialmente la policitemia vera (PV) y la trombocitemia esencial (TE), se caracterizan por una frecuencia incrementada de trombosis y, en menor medida, de hemorragia. Los pacientes con PV/TE y antecedente de trombosis son los que presentan un mayor riesgo de sufrir un nuevo episodio trombotico, habiéndose estimado su incidencia en 5,9 trombosis x 100 años/persona¹. En el extremo opuesto están los pacientes jóvenes sin historia de trombosis, con una incidencia de trombosis en torno a 2 eventos x 100 años/persona². Por otro lado, los pacientes con edad superior a 60 años pero sin historia de trombosis, cuando son tratados con citorreducción, tienen una incidencia similar a la de los pacientes jóvenes (0,9-2,9 eventos x 100 años/persona)³.

La incidencia de hemorragia en pacientes con NMP depende fundamentalmente del tratamiento administrado. Así, los pacientes que reciben citorreducción en monoterapia son los que tienen una incidencia de hemorragia más baja (0,2 eventos x 100 años/persona), seguidos de los pacientes de bajo riesgo en observación total (0,6 eventos x 100 años/persona). Los antiagregantes plaquetarios en pacientes de bajo riesgo que no reciben citorreducción se asocian a una incidencia de hemorragia de 1,26 eventos x 100 años/persona, mientras que los pacientes de alto riesgo que reciben tratamiento combinado con citorreducción y antiagregantes o anticoagulantes tienen una incidencia de 1,37 y 1,7 hemorragias graves x 100 años/persona, respectivamente²⁻⁴.

Patogenia de la trombosis

La etiología de la trombosis en la TE y la PV es multifactorial. En ella intervienen factores independientes de la neoplasia mieloproliferativa como la edad, la coexistencia de factores de riesgo cardiovascular (hipertensión arterial, hipercolesterolemia, diabetes o tabaquismo), los antecedentes de trombosis y, en algunos casos, la coexistencia de alteraciones de la coagulación inducto-

ras de trombofilia. En cuanto a los aspectos propiamente dependientes de la neoplasia mieloproliferativa, cabe destacar el papel de la hiperviscosidad de la sangre en los pacientes con PV, la trombocitosis y las alteraciones del funcionalismo plaquetario, así como la leucocitosis y la activación leucocitaria.

El hematocrito es uno de los parámetros que se ha asociado con mayor claridad a la aparición de complicaciones tromboticas. Estudios observacionales clásicos de la década de los 70 pusieron de manifiesto que la incidencia de trombosis aumentaba de forma paralela al valor de hematocrito en el que se mantenían los pacientes, siendo especialmente remarcable el hecho de que los pacientes que se mantenían con hematocrito < 45% presentaban una baja incidencia de trombosis⁵. Esta observación estableció el hematocrito < 45% como el objetivo terapéutico más importante en los pacientes con PV. Sin embargo, basándose en los datos del estudio ECLAP, la necesidad de mantener el hematocrito < 45% de forma constante fue cuestionada por algunos investigadores⁶. Finalmente, los datos del estudio CytoPV han confirmado que la estrategia de mantener el hematocrito < 45% es la correcta, ya que los pacientes que tuvieron un control más laxo del hematocrito experimentaron mayor frecuencia de trombosis⁷.

Se ha descrito que los pacientes portadores de la mutación *JAK2V617F* tienen un riesgo incrementado de trombosis en comparación con aquellos portadores de mutaciones en *CALR* o triple negativos, lo cual se ha atribuido a una mayor activación de leucocitos y plaquetas que, a su vez, daría lugar a una mayor capacidad de generación de trombina en los pacientes *JAK2V617F* positivos⁸.

Tratamiento de la policitemia vera y la trombocitemia esencial

Objetivo y principios generales del tratamiento

El objetivo principal del tratamiento es la prevención de complicaciones tromboticas y hemorrágicas sin aumen-

tar el riesgo de transformación. Para ello es importante corregir los factores de riesgo cardiovascular, administrar antiagregantes a dosis bajas y, en los pacientes que tienen un riesgo alto de presentar complicaciones vasculares, instaurar tratamiento citorreductor. Además, en los pacientes con PV es necesario controlar el hematocrito realizando flebotomías hasta conseguir mantenerlo por debajo del 45%⁹.

La estratificación de los pacientes según el riesgo de trombosis es muy útil para decidir el tratamiento de los pacientes. Así, los pacientes de alto riesgo (edad > 60 años y/o historia de trombosis) suelen tratarse con citorreducción en combinación con antiagregantes o anticoagulantes, estos últimos en función del tipo de trombosis⁹. Por otro lado, la mayoría de expertos recomiendan administrar antiagregantes a dosis bajas en todos los pacientes de bajo riesgo, siempre y cuando no exista contraindicación para ello⁹.

Las principales indicaciones de citorreducción son la edad > 60 años y/o la historia de trombosis. La necesidad de flebotomías muy frecuentes o la mala tolerancia a las mismas, la presencia de sintomatología microvascular a pesar de los antiagregantes, la esplenomegalia sintomática y la trombocitosis extrema ($> 1.500 \times 10^9/L$) constituyen otras indicaciones de tratamiento citorreductor.

Tratamiento citorreductor en la policitemia vera

Cabe destacar que no existen estudios aleatorizados que hayan evaluado el papel de la hidroxiurea en la PV. El estudio PVSG-08, llevado a cabo entre 1977 y 1986, incluyó 51 pacientes tratados con hidroxiurea presentando una probabilidad de trombosis a los 8 años del 10%, lo cual era notablemente inferior al 33% observado en una cohorte histórica de pacientes con PV tratados con Hu, sin observarse un claro aumento en la incidencia de leucemia. A partir de estos datos, la hidroxiurea se considera el fármaco de elección en la PV¹⁰. Aunque su potencial leucemógeno no está claramente demostrado, la hidroxiurea suele evitarse en pacientes muy jóvenes que requieren tratamiento citorreductor (edad < 40 años). En estos casos el interferón es una alternativa razonable. Actualmente están en marcha 2 estudios aleatorizados que comparan PEG-interferón con hidroxiurea como tratamiento de primera línea en la PV, de los cuales todavía no se han comunicado resultados.

Tratamiento citorreductor en la trombocitemia esencial

Existen 3 estudios aleatorizados que evaluaron el papel de la citorreducción en la TE de alto riesgo. El primero de ellos, publicado en 1995, comparó hidroxiurea con placebo, demostrando un beneficio claro de la citorre-

ducción en la prevención de la trombosis¹¹. El estudio PT1 incluyó 809 pacientes, los cuales se aleatorizaron entre hidroxiurea + AAS y anagrelide + AAS. A los 5 años el brazo de hidroxiurea + AAS se asoció a menor probabilidad de trombosis arterial (6% en el brazo de hidroxiurea frente a 11% en el brazo de anagrelide), mayor probabilidad de trombosis venosa (4% en brazo de hidroxiurea frente a 1% en el brazo de anagrelide), menor probabilidad de hemorragia grave (3% frente a 6%) y menor probabilidad de transformación a mielofibrosis (2% frente a 7%)¹². Recientemente se han publicado los resultados del estudio ANAHYDRET, en el que 259 pacientes se fueron seleccionados aleatoriamente entre hidroxiurea y anagrelide, sin observarse diferencias significativas en la incidencia de trombosis, hemorragia o transformación¹³. Teniendo en cuenta los resultados anteriormente citados, la hidroxiurea suele ser el fármaco de elección en primera línea, reservándose el anagrelide como tratamiento de segunda línea o primera línea en pacientes jóvenes.

Profilaxis secundaria de trombosis venosa: anticoagulación oral

El tratamiento anticoagulante oral en los pacientes con NMP puede indicarse como estrategia de profilaxis primaria o secundaria de la trombosis. En general, en los enfermos con TE y PV que presentan una trombosis venosa, la pauta y duración de la terapia anticoagulante siguen las recomendaciones aplicables a la población general. Sin embargo, la información disponible acerca de la seguridad y eficacia del tratamiento anticoagulante en los pacientes con NMP es muy limitada. Los resultados de un estudio retrospectivo recientemente publicado sugieren que los pacientes con trombosis venosa sin desencadenante, y aquellos con antecedente de trombosis remota, podrían beneficiarse de una anticoagulación indefinida⁴.

Profilaxis primaria de trombosis con antiagregantes en la policitemia vera

Existen 2 estudios que han evaluado el riesgo-beneficio del AAS en la PV^{6,14}. El estudio ECLAP incluyó un total de 518 pacientes, la mayoría de ellos sin antecedente de trombosis, por lo que puede considerarse un ensayo de profilaxis primaria de trombosis⁶. Su principal limitación es el escaso seguimiento, ya que el estudio se suspendió a los 2 años por escaso reclutamiento. En los pacientes con PV sin contraindicación para recibir antiagregantes el AAS a dosis bajas en comparación con el placebo se asoció a una reducción no significativa en el riesgo de eventos trombóticos fatales y de muerte de cualquier causa sin incrementar el riesgo de hemorragia grave⁶. A partir de un metaanálisis, se ha estimado que

el tratamiento con AAS evitaría 19 eventos trombóticos fatales por cada 1.000 pacientes tratados¹⁵.

Profilaxis primaria de trombosis con antiagregantes en la trombocitemia esencial

No existen estudios aleatorizados que hayan evaluado la eficacia-seguridad de los antiagregantes como profilaxis primaria de trombosis en la trombocitemia esencial. Este hecho cobra mayor relevancia en los pacientes de bajo riesgo en los que, debido a la baja incidencia de trombosis, no suele administrarse tratamiento citorreductor. En dichos pacientes la adición de AAS puede incrementar el riesgo de hemorragia, especialmente en pacientes con cifras de plaquetas $> 1.000 \times 10^9/L$.

Con las limitaciones que tienen las observaciones a partir de estudios retrospectivos se puede concluir que los pacientes mayores de 60 años que reciben citorreducción como profilaxis primaria de trombosis se benefician de la adición de AAS a dosis bajas, ya que la reducción en la incidencia de trombosis es mayor que el incremento de hemorragia inducido por el tratamiento².

En cuanto a los pacientes de bajo riesgo, estos suelen manejarse de forma conservadora con antiagregantes a dosis bajas o incluso sin ningún tipo de tratamiento. Existen 2 subgrupos de pacientes en los que el tratamiento antiagregante resultó en menor riesgo de trombosis. En concreto, aquellos pacientes con factores de riesgo cardiovascular en los que el AAS se asoció a una menor incidencia de trombosis arterial y los portadores de la mutación *JAK2V617F*, en los que el AAS redujo la trombosis venosa. En el resto de pacientes de bajo riesgo el tratamiento antiagregante no parece asociarse a un beneficio clínico claro⁵. Este hecho cobra mayor relevancia en la TE con mutación en CALR, que suele afectar a pacientes jóvenes y que con frecuencia se asocia a trombocitosis extrema. Se desconoce si los antiagregantes añaden algún beneficio en el tratamiento de la TE CALR positiva.

Prevención de la hemorragia

En la TE, y en menor medida en la PV, existe un riesgo incrementado de hemorragia. Dicho riesgo se ha asociado a la existencia de una enfermedad de von Willebrand adquirida como consecuencia de la trombocitosis extrema y el uso de antiagregantes plaquetarios^{12,16}. Para prevenir la aparición de hemorragias suele instaurarse tratamiento citorreductor en pacientes con plaquetas $> 1.500 \times 10^9/L$, así como evitar el uso de antiagregantes plaquetarios cuando las plaquetas son $> 1.000 \times 10^9/L$.

Bibliografía

- De Stefano V, Za T, Rossi E, Vannucchi AM, Ruggeri M, Elli E, et al. Recurrent thrombosis in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia: incidence, risk factors, and effect of treatments. *Haematologica* 2008;93(3):372-80.
- Álvarez-Larrán A, Pereira A, Arellano-Rodrigo E, Hernández-Boluda JC, Cervantes F, Besses C. Cytoreduction plus low-dose aspirin versus cytoreduction alone as primary prophylaxis of thrombosis in patients with high-risk essential thrombocythemia: an observational study. *Br J Haematol* 2013;161(6):865-71.
- Álvarez-Larrán A, Cervantes F, Pereira A, Arellano-Rodrigo E, Pérez-Andreu V, Hernández-Boluda JC, et al. Observation versus antiplatelet therapy as primary prophylaxis for thrombosis in low-risk essential thrombocythemia. *Blood* 2010;116(8):1205-10.
- Hernández-Boluda JC, Arellano-Rodrigo E, Cervantes F, Álvarez-Larrán A, Gómez M, Barba P, et al. Grupo Español de Enfermedades Mieloproliferativas Filadelfia Negativas (GEMFIN). Oral anticoagulation to prevent thrombosis recurrence in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Ann Hematol* 2015;94(6):911-8.
- Pearson TC, Wetherley-Mein G. Vascular occlusive episodes and venous haematocrit in primary proliferative polycythaemia. *Lancet* 1978;2:1219-22.
- Landolfi R, Marchioli R, Kutti J, Gisslinger H, Tognoni G, Patrono C, Barbui T, European Collaboration on Low-Dose Aspirin in Polycythemia Vera Investigators. Efficacy and safety of low-dose aspirin in polycythemia vera. *N Engl J Med* 2004;350(2):114-24.
- Marchioli R, Finazzi G, Specchia G, Cacciola R, Cavazzina R, Cilloni D, et al; CYTO-PV Collaborative Group. Cardiovascular events and intensity of treatment in polycythemia vera. *N Engl J Med* 2013;368(1):22-33.
- Rumi E, Pietra D, Ferretti V, Klampfl T, Harutyunyan AS, Milosevic JD, et al. *JAK2* or *CALR* mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood* 2014;123(10):1544-51.
- Barbui T, Barosi G, Birgegard G, Cervantes F, Finazzi G, Griesshammer M, et al. Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European LeukemiaNet. *J Clin Oncol* 2011;29(6):761-70.
- Fruchtman SM, Mack K, Kaplan ME, Peterson P, Berk PD, Wasserman LR. From efficacy to safety: a Polycythemia Vera Study group report on hydroxyurea in patients with polycythemia vera. *Semin Hematol* 1997;34(1):17-23.
- Cortelazzo S, Finazzi G, Ruggeri M, Vestri O, Galli M, Rodeghiero F, et al. Hydroxyurea for patients with essential thrombocythemia and a high risk of thrombosis. *N Engl J Med* 1995;332(17):1132-6.
- Harrison CN, Campbell PJ, Buck G, Wheatley K, East CL, Bareford D, et al; United Kingdom Medical Research Council Primary Thrombocythemia 1 Study. Hydroxyurea compared with anagrelide in high-risk essential thrombocythemia. *N Engl J Med* 2005;353(1):33-45.
- Gisslinger H, Gotic M, Holowiecki J, Penka M, Thiele J, Kvasnicka HM, et al; ANAHYDRET Study Group. Anagrelide compared with hydroxyurea in WHO-classified essential thrombocythemia: the ANAHYDRET Study, a randomized controlled trial. *Blood* 2013;121(10):1720-8.
- Gruppo Italiano Studio Policitemia (GISP). Low-dose aspirin in polycythaemia vera: a pilot study. *Br J Haematol* 1997;97(2):453-6.
- Squizzato A, Romualdi E, Passamonti F, Middeldorp S. Antiplatelet drugs for polycythaemia vera and essential thrombocythemia. *Cochrane Database Syst Rev* 2013;30(4):CD006503.
- Budde U, van Genderen PJ. Acquired von Willebrand disease in patients with high platelet counts. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 1997;23(5):425-31.

JAK inhibitors and new treatment approaches coming for the management of myeloproliferative neoplasms

R.A. MESA

Division of Hematology and Medical Oncology. Mayo Clinic Cancer Center. Scottsdale, Arizona. USA

The development of the JAK-STAT pathway as a therapeutic target for managing patients with myeloproliferative neoplasms is anchored with the discovery 10 years ago of the JAK2 V617F mutation¹. Since that initial discovery, many additional mutations have been discovered: the JAK2 exon 12 mutation, the MPL mutation, mutations in calreticulin, as well as a variety of additional mutations present in many myeloid neoplasms. Many of these mutations have direct or indirect areas of activity on the JAK-STAT pathway and over this decade we have learned that the JAK-STAT pathway is a key driver of the myeloproliferation in these disorders and an important therapeutic target; however, it has also been found that, unlike chronic myeloid leukemia, there is not one single unifying mutation such as BCR-ABL.

The inhibition of JAK2 as a therapeutic target began testing in humans in 2007. Simultaneous testing began with the JAK1-JAK2 inhibitor, ruxolitinib (from Incyte Corporation, Wilmington, Delaware, and subsequently Novartis, New Jersey, USA); XL019 (Exelixis, San Francisco, USA); and TG101348 (subsequently known as fedratinib by Sanofi-Aventis). The initial phase I/II studies of ruxolitinib were performed on individuals with intermediate and high-risk myelofibrosis who had platelet counts of over 100,000 and demonstrated significant ability to improve splenomegaly in symptoms as well as improve functional status. These studies were supported by improvement in overall patient symptom burden as well as individual symptoms associated with a disease such as pruritus, night sweats, and weight loss. The subsequent two phase III studies, COMFORT-I² and COMFORT-II³, helped to establish ruxolitinib as clear front-line therapy for intermediate and high-risk myelofibrosis, in particular, those individuals having issues of splenomegaly and symptoms. This drug, now approved in many countries for myelofibrosis, has become the standard of care and has been available in the US since November of 2012 and elsewhere at different timepoints. Subsequent analysis has demonstrated a continued observation of a survival advantage compared to the control arms when

accounting for crossover⁴. Toxicities of the drug have been primarily around the development of anemia and thrombocytopenia, the impact of which sometimes can be diminished by reduced dosing. In the USA, the indication for the drug has been expanded to include anyone with a platelet count of over 50,000 based on additional phase II testing. Long-term analysis has demonstrated a small but present risk of atypical infections, but has also demonstrated the ability to improve reticulin fibrosis over time.

In the space of myelofibrosis, there are two mature phase III programs currently ongoing. The first was pacritinib (CTI, Seattle, USA; Baxalta, Chicago, USA) is an oral JAK2/FLT-3 inhibitor in which phase II trials⁵ demonstrated ability to improve splenomegaly in symptoms without causing worsening thrombocytopenia or anemia and indeed allowed individuals even with severe thrombocytopenia. The PERSIST-I study, the first of two planned phase III studies, recently had top-level data presented at the American Society of Clinical Oncology where it was demonstrated compared against best alternative therapy, pacritinib was superior for reduction in splenomegaly and symptoms in all subsets, but of particular note, in individuals with platelet counts of < 50,000. Toxicities were primarily grade I, grade II gastrointestinal toxicities which overall tended to subside within a week or two and were well managed by anti-diarrheal therapy. A parallel PERSIST-II study allows individuals with platelet counts of < 100,000 to enroll and can include individuals who previously have failed ruxolitinib and/or other JAK inhibitors. The other advanced phase III program in myelofibrosis is with momelotinib (Gilead, California, USA)⁶, a JAK1 and JAK2 inhibitor that in phase II testing demonstrated ability to improve splenomegaly in symptoms, but potentially also improve anemia. This is currently being tested in a registrational study of ruxolitinib randomized against momelotinib trying to investigate differentiation in the arena of anemia for individuals who are JAK inhibitor naïve who have a platelet count of over 50,000.

In myelofibrosis, in addition to the mature information with ruxolitinib and evolving phase III data with pacritinib and momelotinib, there are multiple ongoing combination studies which will be discussed. Combinations including drugs aimed at trying to improve anemia, including the immunomodulatory drugs which have had single-agent activity such as lenalidomide and pomalidomide⁷ as well as the androgen danazol. Additional combinations have sought to impact patients with high-risk disease or movement toward acute leukemia, including combinations with hypomethylation therapy, including azacitidine and decitabine. Finally, multiple combinations are looking at trying to target additional pathways concurrent with JAK inhibition, all with a backbone of ruxolitinib including PRM151⁸; panobinostat⁹; BKM120¹⁰, a PI3 kinase inhibitor; and LDE225¹¹. All of these combination studies have reported some of their data at the American Society of Hematology Meeting in 2014, but all are ongoing studies without definitive results yet. Combination therapy with JAK inhibition is both interesting and impactful to help economics of combinations likely would need to demonstrate a fairly clear superiority of combination therapy over single-agent JAK inhibition to be a viable option.

JAK inhibition has now evolved beyond the sphere of patients with intermediate and high-risk myelofibrosis. Ruxolitinib was recently tested and found to be successful in helping individuals with polycythemia vera that had advanced disease features defined by having been intolerant or refractory to hydroxyurea as well as potentially having other advanced disease features such as refractory symptoms, significant splenomegaly, and persistent need for phlebotomies¹². Results of this phase III study led to approval in the US of ruxolitinib as second-line therapy. Further expansion of JAK inhibition as single agent or combination therapy into the myeloproliferative neoplasm space will be individuals with earlier myelofibrosis to see whether it can have an impact upon disease progression, possibly in higher risk individuals defined by molecular features. Investigation in subsets of individuals with difficult essential thrombocythemia is not ongoing at the moment, but still remain opportunities.

From 2007 to 2015, there has been a rapid evolution of a broad pipeline of JAK inhibitors that have significant potential impact for patients with myeloproliferative neoplasms of which ruxolitinib is the only commercially available agent at the current time in this space for either myelofibrosis or polycythemia vera. Further understanding of mechanisms of disease progression as well as data from combination studies likely will lead to continued evolving paradigms in the therapy of myeloproliferative neoplasms.

References

1. James C, Ugo V, Le Couedic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005;434(7037):1144-8.
2. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, et al. A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis. *N Engl J Med* 2012;366(9):799-807.
3. Harrison C, Kiladjian JJ, Al-Ali HK, et al. JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. *N Engl J Med* 2012;366(9):787-98.
4. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, et al. Efficacy, safety, and survival with ruxolitinib in patients with myelofibrosis: results of a median 3-year follow-up of COMFORT-I. *Haematologica* 2015;100(4):479-88.
5. Komrokji RS, Seymour JF, Roberts AW, et al. Results of a phase 2 study of pacritinib (SB1518), a JAK2/JAK2(V617F) inhibitor, in patients with myelofibrosis. *Blood* 2015;125(17):2649-55.
6. Pardanani A, Abdelrahman RA, Finke C, et al. Genetic determinants of response and survival in momelotinib-treated patients with myelofibrosis. *Leukemia* 2015;29(3):741-4.
7. Tefferi A, Verstovsek S, Barosi G, et al. Pomalidomide Therapy in Anemic Patients with Myelofibrosis: Results from a Phase-2 Randomized Multicenter Study. *Blood* 2008;112(11):663.
8. Verstovsek S, Mesa RA, Foltz LM, et al. Phase 2 Trial of PRM-151, an Anti-Fibrotic Agent, in Patients with Myelofibrosis: Stage 1 Results. *Blood* 2014;124(21):713.
9. Kiladjian J-J, Heidel FH, Vannucchi AM, et al. Efficacy, Safety, and Confirmation of the Recommended Phase 2 Dose of Ruxolitinib Plus Panobinostat in Patients with Intermediate or High-Risk Myelofibrosis. *Blood* 2014;124(21):711.
10. Durrant S, Koren-Michowitz M, Lavie D, et al. HARMONY: An Open-Label, Multicenter, 2-Arm, Dose-Finding, Phase 1b Study of the Combination of Ruxolitinib and Buparlisib (BKM120) in Patients with Myelofibrosis (MF). *Blood* 2014;124(21):710.
11. Gupta V, Koschmieder S, Harrison CN, et al. Phase 1b Dose-Escalation Study of Sonidegib (LDE225) in Combination with Ruxolitinib (INC424) in Patients with Myelofibrosis. *Blood* 2014;124(21):712.
12. Vannucchi AM, Kiladjian JJ, Griesshammer M, et al. Ruxolitinib versus standard therapy for the treatment of polycythemia vera. *N Engl J Med* 2015;372(5):426-35.

Simposio SEHH + EHA

Third Joint Symposium of the Spanish Society of Hematology and Hemotherapy (SEHH) and the European Hematology Association (EHA): “Education and Research”

COORDINADORES: **J. M. MORALEDA JIMÉNEZ.** *President Spanish Society of Hematology*
J.T. NAVARRO FERRANDO. *Spanish EHA linker*
T. GREEN. *President. European Society of Hematology*

Por tercer año consecutivo ambas sociedades, la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH) y la European Society of Hematology (EHA) organizan un simposio conjunto. Este evento es fruto del interés creciente de las dos sociedades por sumar esfuerzos en la docencia y la investigación, áreas clave para ambas sociedades científicas y sus asociados en las que pretendemos desarrollar una colaboración continuada y progresiva.

El simposio de este año se centrará en los temas de la formación de los especialistas y de la organización de la investigación, dada su gran actualidad y el enorme impacto potencial de los cambios y novedades que se avecinan para la Hematología y la Hemoterapia en España, con el Real Decreto de la troncalidad y la nueva estructura de las agencias de investigación, y en Europa con los nuevos programas marco.

En la primera ponencia la Dra. Ann LaCasce, directora del programa de formación de residentes de Hematología y Oncología Médica del Instituto Dana Farber de Boston, explicará el modelo estadounidense de formación de especialistas. La Dra. LaCasce lleva tres años en este cargo y su presentación ayudará a conocer mejor el sistema de formación de su país y nos permitirá compararlo con los que existen en España y otros países de Europa.

En la segunda ponencia el Dr. Antonio Almeida explicará el modelo de formación basado en el currículum europeo de la EHA, que ha sido creado con la intención de armonizar la formación en hematología-hemoterapia en Europa. El Dr. Almeida trabaja actualmente en Portugal, pero tiene una experiencia de ocho años de trabajo en el Reino Unido. Además, es miembro del *Curriculum Committee* de la EHA, en el que participa activamente en varios proyectos. Todo ello hace que sea un gran experto en la formación en el ámbito europeo y su ponencia nos ayudará a comprender la utilidad y necesidad de un programa que persigue una mayor homogeneidad en la formación y, como consecuencia, en la asistencia sanitaria.

El Dr. Adrián Alegre nos hablará en su ponencia del modelo español de formación MIR y de los cambios que se prevén en nuestro país en el ámbito de la formación especializada. Hará especial énfasis en el nuevo modelo de troncalidad y en cómo incidirá en la formación en la especialidad de Hematología y Hemoterapia. El Dr. Alegre es uno de los grandes expertos de nuestro país en temas de formación, ha sido presidente de la Comisión Nacional de la Especialidad de Hematología y Hemoterapia, y participa en la comisión de elaboración del nuevo programa de la especialidad dentro del sistema troncal.

El Dr. Andreas Engert explicará el nuevo programa de estrategia en investigación que ha elaborado la EHA (*EHA Research Roadmap*). Este programa pretende orientar e influir en los organismos europeos responsables de la investigación, resaltando las principales necesidades y prioridades en investigación en Hematología en Europa. El Dr. Engert es un investigador reconocido internacionalmente y es el coordinador de este proyecto, en el que han participado 300 expertos europeos de la especialidad, incluidos destacados miembros de la SEHH.

En la última ponencia el Dr. Tony Green, actual presidente de la EHA, expondrá un ejemplo de los resultados de una investigación traslacional realizando una revisión del tema de las neoplasias mieloproliferativas. Este grupo de enfermedades es un paradigma de cómo la investigación básica ha servido y sirve para encontrar alteraciones genéticas que dan lugar a fármacos que actúan sobre dianas terapéuticas específicas.

Education in Hematology in USA: The American model

A. LACASCE

Dana Farber/Partners Cancer Care Hematology-Medical Oncology Fellowship Program Director. Boston, Massachusetts. USA

As an internal medicine subspecialty, the training model and certification for hematologists in the United States is governed by the American Board of Internal Medicine (ABIM). In addition, individual fellowship programs are overseen by the Accreditation Council for Graduate Medical Education (ACGME).

In the US, applicants to medical school have successfully completed their undergraduate degrees, typically in 4 year colleges or universities. As long as applicants have completed the required pre-medical science and mathematics courses, they may choose to major in any discipline and many students will focus on other subjects as disparate as art history to economics. In addition, a significant proportion of medical students choose to spend a year or more working, either in the biomedical sciences or other unrelated fields, prior to applying to medical school.

Medical and osteopathic schools are typically 4 years in duration. Most programs focus on the preclinical sciences in the first 2 years with clinical rotations during years 3 and 4. During the 3rd year, students rotate through the major specialties, including internal medicine, and surgery. As 4th year students, individuals pursue additional elective rotations in their areas of interest while applying for residency training. Medical students may also choose to pursue a combined MD/PhD degree. Following the preclinical years, PhD students will spend 3 or more years completing and defending their doctoral thesis before returning to complete their clinical rotations.

Students interested in pursuing a career in hematology and/or oncology first complete training in internal medicine, which consists of a one year internship followed by 2 additional years of residency. During this time, residents rotate through inpatient blocks on a variety of services, including general internal medicine, cardiology, hematology and oncology, and critical care medicine. In addition, residents gain experience in outpatient medicine by following a panel of patients in the ambulatory setting and typically spend elective time in sub-specialty clinics, such as hematology and/or oncol-

ogy. Residents, particularly those who have earned dual MD and PhD degrees, who are interested in careers as physicians scientist (mostly laboratory based) may opt to truncate their internal medicine training by one year and spend an additional two years as a fellow in the Research Pathway.

During the summer of the final year of training, residents apply for training in subspecialty fellowship programs. Individuals submit applications to fellowship programs which are reviewed by fellowship program directors and their committees and a subset are invited to interview. In our program at Dana-Farber/Partner's Cancer Care, we typically receive in excess of 400 applications and interview approximately 50 residents for 14 fellowship slots per year. In the US, there are 138 combined hematology/oncology, 10 oncology only programs and 3 hematology only training programs. In 2010, 12.9% of graduates in internal medicine pursued training in combined programs and 1% and 0.5% in hematology and oncology respectively. The ACGME now requires that applicants to hematology/oncology fellowship programs must have completed training in the US or Canada in an accredited program.

In terms of the structure of programs, if fellows opt to become board certified in both oncology and hematology, the ABIM requires at least 3 years of training. Fellows boarding in hematology or oncology only may complete requirements in two years. Fellows pursuing dual certification must spend 18 months in full time clinical training with 12 months of focus on neoplastic diseases, including the hematologic malignancies and 6 month of training in non-malignant hematology. Fellows must also demonstrate proficiency in performing bone marrow aspirations and biopsies, as well as the administration of chemotherapeutic agents through all therapeutic routes (intravenous, oral and intrathecal). Fellows are required to understand the management and care of indwelling venous access catheters. Single boards requires one year of clinical training. In addition to the procedural requirements listed above which are also applicable to fellows single boarding in oncol-

ogy, fellows boarding in hematology only must also demonstrate proficiency in the interpretation of bone marrow aspirates and touch preparations, peripheral blood smears, and the management of apheresis. Most programs require fellows to perform research, either laboratory based or focusing on clinical research or health services research. During time spent pursuing projects, fellows are required to maintain a minimum of half a day of outpatient continuity clinic.

In addition to the procedural and clinical training time requirements, the ABIM mandates that fellows demonstrated clinical competence in the following domains: patient care and procedural skills, medical knowledge, practice-based learning and improvement, interpersonal and communication skills, professionalism and systems based practice.

The ACGME is responsible for the accreditation of fellowship programs in the US and provides detailed training requirements regarding the structure and content of programs. All trainees are required to work fewer than 80 hours per week and must have a minimum of one day off per week. For fellows pursuing training in both oncology and hematology, the ACGME requires 9 months each of clinical rotations focused on medical oncology and hematology with a minimum of 50% of the time spent in the outpatient setting. Fellows training

in hematology and oncology must demonstrate competence in “prevention, evaluation, diagnosis, cancer staging and management of patients with hematologic and neoplastic disorders” involving every organ system. Programs are required to establish a Clinical Competency Committee to evaluate fellows’ semi-annually. Recently the ACGME has instituted a new framework to evaluate fellows’ performance in terms of 24 “Milestones” organized according to the competencies mentioned above. Milestones are defined as “competency-based developmental outcomes (e.g. knowledge, skills, attitudes and performance) that can be demonstrated by residents and fellows from the beginning of their education through graduation to the unsupervised practice of their specialties” (from the ACGME website). After completing training fellows must pass the ABIM certification exam or exams to earn board certification status. In 2010 in the US, there were a total of 5513 hematologists/oncologists, 2018 hematologists and 5192 medical oncologists. Currently, the ABIM requires physicians to recertify every 10 years. Physicians practicing in academic centers often hold board certification in either hematology or oncology, as their clinical practices are often narrow in focus, whereas community based physicians typically hold dual certification and care for patients with both hematologic and oncologic disorders.

The EHA CV passport as a tool to harmonize the education in Hematology across Europe

A. ALMEIDA

Instituto Português de Oncologia. Lisboa, Portugal

Introduction

Hematology is a discipline which encompasses a wide diversity of areas. These can be broadly subdivided into hemato-oncology, benign hematological disorders, diseases affecting the hemostatic system, laboratory haematology and blood transfusion. Despite the inevitability of sub specialization within such a broad specialty, it is nevertheless essential that a minimum level of knowledge within each field of hematology be defined for those training in this discipline. The achievement of these minimum standards is all the more important in Europe, where an enormous cultural diversity coexists with economic unity and worker mobility.

This definition of minimum competence levels for hematology within Europe has several advantages:

1. The achievement of equivalent professional competences by trainees from different countries, enabling their mobility within Europe
2. The assurance to patients and healthcare systems of the quality of professional competence of hematologists
3. Provides a shared platform to assess and improve the standards of hematology practice in Europe.

These goals are in consonance with the Brussels Declaration on the Recognition of Professional Qualifications, which states that: “The mobility of hematology trainees is of the utmost importance. Mobility stimulates the exchange of knowledge and experience in a profession that has, in terms of research, literature and continuing education, already developed a decidedly international orientation. Moreover, the mobility of trainees from Member States that are challenged in their educational resources allows for increasing competence to the level of best practices in Europe”.

Within European law the responsibility for all education, including professional post-graduate training, lies with the individual Member States. Consequently it is essential that a pan-European project addressing

training in hematology does adopt a strict bottom-up approach in which National Hematology Societies play an initiating and active role in its design and implementation.

Further to this, two projects initiated by the European Hematology Association (EHA) together with National Hematology Societies in Europe, pedagogues, and IT specialist, are supporting the Brussels declaration as well as respecting the national sovereignty on education:

1. The European Network for Harmonization of Training in Hematology (H-NET)
2. The European Hematology Curriculum

The European Network for Harmonization of Training in Hematology (H-NET)

In 2008 the H-NET project was initiated by EHA with the aim of contributing to the harmonization of the hematology training in Europe. It did so through the establishment of a vast network of national and international societies of hematology, pedagogues and information technology specialists. The H-Net Competence Survey was carried out within this network to establish the nature of the heterogeneity of hematology training throughout Europe. The objectives of this survey were to inform, through a bottom-up approach, the network to develop an educational strategy that, in turn, could be used to modify existing educational tools and develop novel ones. This survey revealed that there is a wide diversity of hematology training in various countries in Europe. This results in lack of consistent professional standard across the various states and may act as an impediment to professional mobility.

The European Hematology Curriculum

With the objective of harmonizing the training of Hematology in Europe, EHA, with the support of 27 national societies, has developed a European Hema-

tology Curriculum. Within this document are detailed the different areas which hematologists are expected to cover during their training and expresses the minimum recommended levels of competence that a Hematology trainee should attain on a consensual description of the scope of the specialty of Hematology. The approach is decidedly bottom-up: Member States are free to opt in on (parts) of the curriculum given national circumstances that are disease specific (e.g. prevalence of certain diseases) and reflect professional traditions (e.g. in Austria or Germany the specialty of hemato-oncology exists).

Given the scope of the discipline of Hematology as described in the Hematology Curriculum, H-Net has advised the European Union by recommending the minimum training requirement for Hematology be five years or three years when previous training encompassed the equivalent of at least two years in internal medicine.

The results of the competence-based survey carried out by H-Net have formed the basis for a revision of the passport. The revised version, endorsed by 27 National Societies, is internet-based and includes tags to selected educational material for each section and individualized interactive features which makes it an ideal tool for self-assessment by hematologists in training. This version followed to a much greater extent the WHO ICD10 and WHO 2008 classifications than the first version. The levels of competence were revised and contextual level descriptions were added to increase perspicuity. The diagnostic parts were modified to, where relevant, assess competence in interpretation of diagnostic tests rather than hands-on ability to perform them. With increasing demands for accreditation, in particular within the laboratory specialties, this is a logical development, but it remains to be seen if young hematologists would score better in the new version of the European Hematology Curriculum.

Given the diversity of hematology training in the different European regions and the potential limitations to professional mobility this entails it is paramount that trainees are adequately informed about the competences they are expected to acquire during their training and that they are provided with a tool which enables them to assess their own competence and compare it to that of their peers. This is achievable through the use of the European Hematology Curriculum as an informative self-assessment tool.

It is difficult to underestimate the importance of the European Hematology Curriculum in the context of an integrated Europe. Now, there is professional consensus where the scope, content and minimum competences of our medical specialty are concerned. Meanwhile, Europe is slashing its borders to allow for free movement of its citizens. This development may or may not deliver on its promise of professional mobility, employment opportunities and, finally, greater prosperity and equity for all. But it will definitively affect the geographical scope of training medical specialists and promote equal excellence of care for patients throughout Europe.

References

1. Ossenkoppele G, Evans-Jones G, Jaeger U, Hellström-Lindberg E; Curriculum Update Working Group. Towards a joint definition of European hematology. *Haematologica* 2012;97(5):636-7.
2. Duyvené de Wit T, Hellström-Lindberg E, Jäger U, Evans-Jones G, Smand C. H-Net, the European Network for Harmonization of Training in Hematology, and its policy. *Haematologica* 2012;97(12):1776-8.
3. Strivens J, Hellström-Lindberg E, Bjerrum OW, Toh CH. A European strategy for targeted education in hematology. *Haematologica* 2013;98(7):1000-2.
4. Hellström-Lindberg E, Almeida A, Enoksson F, de Wit TD, Strivens J, Naeve A, et al. Survey of professional competence in hematology in Europe. *Haematologica* 2014;99(3):404-8.

Formación especializada MIR en Hematología y Hemoterapia en España. Troncalidad y nuevo programa formativo

A. ALEGRE AMOR, B. AGUADO BUENO*, I. VICUÑA ANDRÉS*, J. CANNATA ORTIZ*,
 Á. ARRIERO GARCÍA**

*Tutor MIR de Hematología. **Vocal MIR Comisión Nacional. Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Universitario de La Princesa. Madrid, España

Introducción: el sistema MIR

La formación en Hematología y Hemoterapia

La formación médica especializada está regulada en España desde el año 1979, fecha en la que se constituyó el primer Consejo Nacional de Especialidades Médicas y se implantó el sistema MIR (médicos internos residentes). Este hecho supuso un cambio profundo en la formación de especialistas, pues constituyó una ordenación oficial homogénea de esta actividad. El examen único nacional MIR para la elección de especialidad y la vinculación laboral de los postgraduados a un centro acreditado docente, en el cual el aprendizaje se basaba en la adquisición de conocimientos teóricos y habilidades prácticas, han sido la base de este sistema¹⁻⁵. Los resultados obtenidos con los programas MIR son evidentes. Desde sus inicios, la formación MIR fue un sistema muy aceptado y con un gran reconocimiento de referencia mundial. En nuestra opinión, es una de las principales claves de la calidad profesional de los especialistas médicos españoles y del Sistema Nacional de Salud. La situación profesional y relación laboral de los MIR fue regulada mediante el Real Decreto 1146/2006².

La especialidad de Hematología y Hemoterapia está bien definida en el Real Decreto 183/2008, por el que se determinan y clasifican las especialidades en Ciencias de la Salud y se desarrollan determinados aspectos del sistema de formación sanitaria especializada^{3,4}. Es una especialidad a la que solo se puede acceder desde la licenciatura de Medicina y Cirugía y se realiza en un periodo de cuatro años. Los contenidos formativos, el itinerario, las acreditaciones de centros y su homologación y la recomendación del número de plazas anual están supervisadas por la Comisión Nacional de la Especialidad.

Tras 36 años del sistema MIR, la Ley de Ordenación de las Profesiones Sanitarias (LOPS) de 2003 planteó la agrupación de las especialidades en troncos formativos de contenido común para adaptarse al entorno euro-

peo e internacional, es decir, la formación troncal de especialistas¹. Esta propuesta ha supuesto un largo debate que, tras 11 años, se ha plasmado con la publicación del Real Decreto de Troncalidad en julio de 2014⁶. En este artículo revisaremos el impacto de este nuevo escenario y la adaptación del nuevo programa formativo con la nueva regulación, pero antes revisaremos el papel de la Comisión Nacional, así como la trayectoria de la formación MIR en España.

La Comisión Nacional de Hematología y Hemoterapia y el programa actual de Hematología y Hemoterapia

Desde el año 2003, el Consejo de Especialidades Médicas pasó a denominarse Consejo Nacional de Especialidades en Ciencias de la Salud (CNECS)¹. En este Consejo se integran las Comisiones Nacionales de la Especialidad, entre las que se encuentra la Comisión Nacional de Hematología y Hemoterapia (CNHH). La especialidad de Hematología y Hemoterapia ha estado siempre representada desde la creación del primer Consejo, en 1979. La composición de las Comisiones Nacionales viene determinada por la Ley de Ordenación de Profesiones Sanitarias, LOPS, de 2003¹ y están reguladas por el Ministerio de Sanidad y de Educación. En la actualidad la integran 11 miembros, entre los cuales uno ejerce de Presidente y otro de Vicepresidente y a la vez Secretario. La composición es la siguiente:

- Dos Vocales designados por el Ministerio de Educación y Ciencia, uno, al menos, de los cuales deberá ser Tutor de la especialidad.
- Cuatro Vocales propuestos por la Comisión de Recursos Humanos del SNS.
- Dos Vocales en representación de las Entidades y Sociedades Científicas de ámbito estatal legalmente constituidas en el ámbito de la especialidad.
- Dos Vocales en representación de los especialistas en formación MIR, elegidos por estos, en la forma que se determine reglamentariamente.

- Un vocal en representación de la Organización Médica Colegial.

La principal función de la Comisión Nacional es la elaboración y aprobación del programa formativo de la especialidad, así como la aprobación de los centros docentes acreditados. En 1996 se publicó la *Guía para la realización de Programas Docentes de las Especialidades Médicas*. Esta guía comprometía a los comités de cada especialidad a realizar revisiones del contenido de los programas docentes para su actualización. En 2002 se acordó realizar una revisión y actualización de los programas de formación de todas las especialidades. Durante varios años se discutió el programa que está vigente en la actualidad, que se publicó oficialmente en el BOE de 21 de octubre de 2006⁵ (Tabla 1). Ya en esa fecha se presentó en el Ministerio de Sanidad y Educación un programa paralelo que contemplaba el incremento a cinco años de duración del programa formativo, necesidad que sigue existiendo, para poder adaptar el programa al aumento de conocimientos, técnicas y complejidad de nuestra especialidad. Desgraciadamente dicha ampliación no fue considerada por la administración.

Como revisaremos en esta ponencia, el programa actual, que como hemos dicho está vigente desde 2006, ha de revisarse completamente en un plazo de dos años para adaptarse al nuevo escenario de la troncalidad⁶.

Evolución de las plazas MIR de Hematología y Hemoterapia

El número de plazas de Hematología adjudicadas desde el inicio del sistema MIR se refleja en la Figura 1. La evolución del número del orden de elección de la especialidad, así como la tasa de los facultativos extracomunitarios de los últimos años, quedan reflejados en las Figura 2 y Tabla 2. Como se observa, se ha producido una pérdida de atractivo en el orden de elección desde hace años. Esto se debe a múltiples factores, cuyo análisis no son objeto de esta ponencia. Hay que destacar

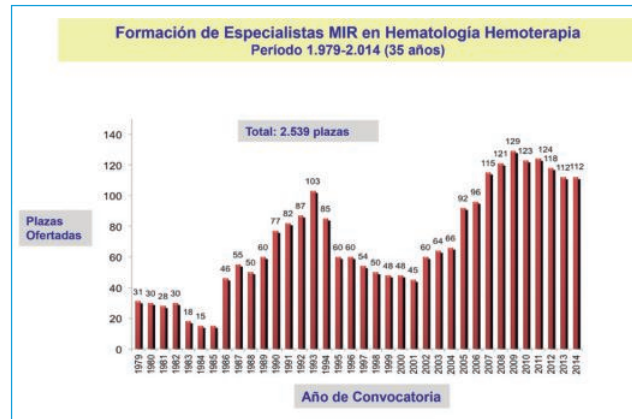


Figura 1. Evolución de las plazas MIR de Hematología y Hemoterapia desde 1979.

Año convocatoria	Promedio de los nº de orden	Mediana de los nº de orden
1983	306	237
1984	147	105
1985	331	209
1986	609	673
1987	621	554
1988	703	658
1989	758	682
1990	1.136	950
1991	988	925
1992	1.313	1.210
1993	1.258	1.176
1994	1.328	1.275
1995	1.152	1.277
1996	1.864	2.122
1997	1.569	1.684
1998	1.843	2.149
1999	1.741	2.026
2000	1.913	2.079
2001	2.172	2.468
2002	2.777	2.927
2003	2.691	2.951
2004	2.778	2.857
2005	3.144	3.234
2006	3.208	3.442
2007	3.324	3.762
2008	2.985	3.231
2009	3.445	3.813
2010	3.391	3.792
2011	3.333	3.732
2012	2.892	3.222
2013	3.040	3.341

Figura 2. Evolución de número de elección MIR de Hematología y Hemoterapia desde 1979.

Tabla 1. Resumen del programa oficial de formación MIR de la especialidad de Hematología y Hemoterapia; BOE 2006

Hematología-Hemoterapia. Programa de formación de 4 años. BOE 2006. Cronograma	
Rotación	Meses
Medicina Interna y Especialidades médicas	12
Hematología clínica: hospitalización y consulta externa	11 (2 en Unidad TPH alogénico) (12 en consultas externas 1 día/semana)
Citomorfolología y biología hematológicas	13
Hemostasia y trombosis	4
Banco de sangre e Inmunohematología	5 (1 en Centro Regional Transfusión)

Tabla 2. Evolución de la adjudicación de plazas de la especialidad de hematología y hemoterapia, en las convocatorias de pruebas selectivas

	Plazas adjudicadas				Primer n.º orden	Último n.º orden	Media n.º orden	Mediana n.º orden
	Españoles	Comunitarios	No comunitarios	TOTAL ADJUDICADAS				
2006-07	84	3	9	96	134	4.836	3.208	3.442
2007-08	88	5	22	115	18	4.927	3.324	3.762
2008-09	91	6	24	121	21	5.124	3.003	3.236
2009-10	70 (56%)	6	50 (40%)	126	81	6.035	3.466	3.815
2010-11	86 (68%)	7	30 (24%)	123	56	5.270	3.391	3.792
2011-12	87(70%)	3	34 (27%)	124	88	5.822	3.333	3.732
2012-13	90 (76%)	3	25 (22%)	118	111	4.820	2.892	3.222
2013-14	97(86%)	5	10 (8%)	112	55	5.040	3.040	3.341

Información actualizada a 26 de mayo de 2014, por el Servicio de Gestión de Formación Sanitaria Especializada Convocatoria 2.015-2.016 (Datos Provisionales):
 Cupo Extracomunitarios: reducción al 4%, Mediana de Elección: 2.750, Primer número: 2, Último número: 4.790.

que este número de orden parece haberse recuperado en las últimas ediciones y también que se ha reducido drásticamente la tasa de licenciados extracomunitarios no españoles. Esto último puede repercutir en el riesgo de una potencial situación excedentaria de especialistas si no se regula el número final de plazas ofertadas.

Respecto al número de plazas ofertadas anuales, hay que indicar que las diferentes CNHH han tratado de adaptar este número a las necesidades futuras, con la dificultad que esto conlleva, ante la ausencia de registros oficiales y estudios precisos. El crecimiento poblacional, la apertura de nuevos centros y la tasa de reposición por edad hicieron que aumentara la cifra hace varios años. En las últimas convocatorias la CNHH ha solicitado su ajuste con el propósito de volver a cifras más ajustadas. La situación de recortes con ajustes de plantilla, no cobertura de jubilaciones y detenimiento poblacional con no apertura de nuevos hospitales obliga a un replanteamiento riguroso y realista de las necesidades de hematólogos en el futuro. En este sentido, la próxima publicación de un registro oficial de especialistas será de gran utilidad. Los criterios de acreditación docente deberían revisarse también para mejorar la formación de nuestros futuros especialistas. En la **Figura 3** se presenta el mapa docente de centros acreditados para docencia MIR en Hematología y su distribución geográfica.

El sistema de troncalidad en la formación MIR

Esquema general de la troncalidad

Durante más de tres décadas el sistema MIR se ha mostrado muy eficaz para proveer al Sistema Nacional de

Salud de profesionales con un grado de competencia muy elevado, reconocido en el ámbito internacional. Sin embargo, la necesidad de mejorar y adaptar la formación a los nuevos tiempos hizo considerar a la Administración hace unos años la necesidad de modificar el sistema MIR, introduciendo el concepto de troncalidad y siguiendo el modelo de otros países europeos. Esto fue recogido por primera vez en la LOPS Ley 44 de 2003 sobre Formación Especializada¹. Según este modelo, las especialidades en Ciencias de la Salud con contenidos formativos comunes se agruparán y tendrán un periodo de formación común, agrupándose en un mismo tronco. Este modelo pretende proporcionar una formación sanitaria con una visión más interdisciplinar y multidisciplinar de abordaje de los problemas de salud, evitan-



Figura 3. Mapa docente con centros acreditados en formación en Hematología y su distribución geográfica.

do el encasillamiento excesivo de los profesionales que en ocasiones se produce. Se ha tardado unos 10 años en publicar el Real Decreto de Troncalidad, de fecha 25 de julio de 2014⁶, lo que refleja la extrema complejidad y dificultad en cambiar un sistema arraigado durante tanto tiempo. A ello se han añadido las dificultades presupuestarias para atender la necesidad de alargar los años de formación para evitar que el hecho de introducir un periodo de formación común vaya en detrimento de la formación especializada.

Este decreto refleja la estructura, casi definitiva, de la nueva organización de la formación sanitaria. Además de la troncalidad, la nueva normativa también desarrolla aspectos como la regulación de la reespecialización troncal y las áreas de capacitación específica (ACE), así como la actualización del catálogo de especialidades.

Según el proyecto del Real Decreto, la troncalidad en el ámbito de las especialidades en Ciencias de la Salud se define como “la adquisición de competencias nucleares y comunes a varias especialidades, a través de un programa formativo de tronco, cuya duración no podrá ser inferior a dos años, facilitando la atención integral del paciente en los procesos preventivos, diagnósticos, terapéuticos y rehabilitadores”. La formación completa en las especialidades en Ciencias de la Salud adscritas al régimen de formación especializada troncal comprenderá dos periodos sucesivos de formación, el troncal y el de formación específica de cada especialidad.

Troncos formativos y especialidades troncales

Las diferentes especialidades han quedado incluidas en cinco troncos: médico, quirúrgico, laboratorio y diagnóstico clínico, tronco de imagen clínica y tronco de salud mental. Ha habido algunas especialidades que hasta el momento no se han adscrito al sistema troncal, como son Anatomía Patológica, Dermatología, Obstetricia y Ginecología, Oftalmología, Otorrinolaringología, Pediatría, Radiofarmacia y Radiofísica. Hematología-Hemoterapia ha sido incluida en el Tronco Médico junto con otras 20 especialidades (Tablas 3 y

Tabla 3. Listado de Troncos Formativos de especialidades en Ciencias de la Salud

Troncos de formación
Tronco Médico
Tronco Quirúrgico
Tronco de Laboratorio y de Diagnóstico clínico
Tronco de Imagen Clínica
Psiquiatría

4). Esta decisión se basa en la necesidad de defender y mantener un campo clínico propio y específico de los hematólogos como especialistas sin que reduzcan sus competencias específicas además en el área de diagnóstico de laboratorio, perteneciente al diagnóstico hematológico tanto de citología y hemostasia, así como en hemoterapia-medicina transfusional. La decisión de incluir la especialidad de Hematología y Hemoterapia en el Tronco Médico ha sido fruto de un intenso debate en el seno de las sociedades que agrupan a los profesionales de nuestra especialidad. Las tres sociedades científicas, la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH), la Sociedad Española de Transfusión Sanguínea (SETS) y la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia (SETH), junto con la CNHH, elaboraron un documento de consenso en 2011 en el que quedaba reflejada la inclusión en el Tronco Médico como la más idónea para la especialidad de Hematología y Hemoterapia⁷. Existía el riesgo de que fuera incluida en el tronco de Laboratorio junto con otras cuatro especialidades (Tabla 5). Este tronco es multidisciplinar y a él pueden acceder otros licenciado en Farmacia, Bio-

Tabla 4. Listado de Especialidades en el Tronco Médico

Troncalidad Médica (21 especialidades)	
Alergología	Medicina Interna
Aparato Digestivo	Anestesiología y Reanimación
Medicina Familiar y Comunitaria	Cardiología
Cardiología	Neumología
Medicina Intensiva	Medicina Física y Rehabilitación
Endocrinología y Nutrición	Oncología Radioterápica
Farmacología Clínica	Reumatología
Nefrología	Geriatría
Hematología y Hemoterapia	Medicina del Trabajo
Oncología Médica	Neurología
Medicina Preventiva y Salud Pública	

Tabla 5. Listado de Especialidades en el Tronco de Diagnóstico y de Laboratorio Clínico

Tronco de Laboratorio y Diagnóstico clínico
Bioquímica clínica
Análisis clínicos
Microbiología
Inmunología
Acceso multidisciplinar: médicos, biólogos, farmacéutico, químicos...

química, Biología, etc., por lo que no podía aceptarse para nuestra especialidad. La inclusión en el Tronco Médico, la adaptación al sistema troncal y sus repercusiones, así como la revisión del programa formativo actual han sido objeto de debate en numerosas reuniones y publicaciones, sobre todo por miembros de la comisión o representantes de la SEHH⁸⁻¹², incluyendo el último Curso para Tutores MIR de Hematología y Hemoterapia de la SEHH¹⁰. Entre las consideraciones y alegaciones presentadas ante el borrador del Real Decreto, cabe destacar, aparte de la defensa radical de las competencias específicas propias triples clínicas, transfusionales y de laboratorio, la necesidad irrenunciable de incrementar el periodo formativo en al menos cinco años completos, pues de otra manera sería imposible elaborar y realizar de forma adecuada el programa específico de la especialidad. De esta manera, además, se seguiría la recomendación de la European Hematology Association (EHA), que establece en el currículum europeo que la duración del periodo de formación de la misma debe ser como mínimo de cinco años en su Declaración de Bruselas de 2011, como comentaremos más adelante¹³.

Con 21 especialidades formando parte del Tronco Médico, las negociaciones para definir las competencias y el itinerario formativo de los años comunes se prevén intensas (Tabla 6). Para tal fin se ha constituido una Comisión Troncal que, además del programa, tendrá que establecer los requisitos de las unidades docentes troncales (UDT) donde tendrán que rotar los MIR; en función de ello se definirá cuál será el ámbito de

cada unidad docente (servicios de un mismo hospital o de varios podrían configurar una UDT).

Elección y asignación de plazas

Según el nuevo sistema el licenciado, una vez obtenido un número de orden en la prueba de acceso a la formación sanitaria especializada, que se mantiene como prueba única para todo el territorio nacional, elegirá el tronco y la unidad docente troncal. En el plazo posterior que se establezca en cada convocatoria se produciría una segunda elección, la de la especialidad dentro del tronco formativo, a elegir en cada unidad docente, de acuerdo con el número de orden obtenido en la prueba de acceso a la formación sanitaria especializada tras superar una nueva prueba. La elección de especialidad se realizaría por tanto al finalizar la formación troncal y estaría limitada a las especialidades y centros adscritos a cada tronco. Es decir, que la elección del tronco en una unidad docente concreta limitaría para las especialidades que posteriormente se podrían cursar. Esto requeriría que en las convocatorias se especificara muy claramente la ubicación del tronco y los centros sanitarios y especialidades a las que puede acceder el aspirante una vez concluida la formación troncal. Esta incertidumbre sobre el futuro MIR, que no sabría qué especialidad cursaría hasta finalizar el segundo año de MIR, es el punto más contestado por los estudiantes agrupados en la CEEM, que han recogido más de 125.000 firmas exigiendo la elección conjunta de tronco y especialidad. El Ministerio de Sanidad parece que ha firmado un acuerdo con la CEEM para modificar el Decreto de Troncalidad y acceder a este cambio sustancial, que se recogería en una disposición adicional aprovechando un próximo Decreto de regulación de los Colegios Profesionales.

Tabla 6. Competencias Genéricas del Tronco Médico

Competencias genéricas

Este documento define las competencias genéricas que adquirir durante el periodo de especialización médica y propone instrumentos adecuados para su evaluación. Algunas competencias se pueden evaluar a distintos niveles (cognitivo y conductual) y por lo tanto se pueden evaluar con más de un instrumento. Al final del mismo se hace una propuesta global del sistema de evaluación.

Las competencias genéricas se agrupan en los apartados siguientes:

- A. Valores y actitudes profesionales. Principios de Bioética.
- B. Comunicación clínica.
- C. Habilidades clínicas generales.
- D. Manejo de fármacos.
- E. Determinantes de salud y enfermedad y promoción de la salud.
- F. Manejo de la información clínica.
- G. Investigación.
- H. Docencia y formación.
- I. Trabajo en equipo.
- J. Gestión clínica y de calidad.
- K. Protección.
- L. Idiomas.

Reespecialización y áreas de capacitación específica

Respecto a la reespecialización, el proyecto del Real Decreto de troncalidad establece que los especialistas en activo, con al menos cinco años de ejercicio profesional como tales, podrán obtener un nuevo título de especialista en una especialidad del mismo tronco que la que posean. El cupo anual de plazas para reespecializarse estará limitado y no podrá superar al 2% de plazas ofertadas para la totalidad de las especialidades troncales. Quienes pretendan acceder al título de especialista por el sistema de reespecialización deberán realizar de forma completa el programa oficial para el periodo de formación específica de la especialidad de que se trate. Para acceder a un tercero o sucesivos títulos de especialista tendrán que pasar al menos ocho años desde la obtención o denegación del anterior.

El nuevo sistema de formación define las nuevas ACE como “aquellas que abarcan el conjunto de co-

nocimientos, habilidades y aptitudes añadidos en profundidad o en extensión a los exigidos por el programa oficial de una o varias especialidades en Ciencias de la Salud". Además, para la creación de una ACE existen ciertos requisitos, como que dicha área represente un incremento significativo de las competencias de los programas oficiales, que exista un interés asistencial, científico y organizativo relevante y que las competencias de dicha ACE no puedan ser asumidas por otras especialidades u otras áreas de capacitación. A este respecto, el previamente citado documento de consenso de las tres sociedades científicas y la CNHH alegó que las ACE relacionadas con la especialidad deberían desarrollarse únicamente para especialistas en Hematología y Hemoterapia.

Aportaciones de la troncalidad. Ventajas e inconvenientes

Resumimos a continuación cuáles pueden considerarse las principales ventajas e inconvenientes del sistema de troncalidad.

Principales ventajas de la troncalidad

- Diversifica la formación, la amplía y favorece el aprendizaje de la resolución de los problemas desde diferentes perspectivas.
- Mejora la continuidad de la atención y la coordinación externa e interna de los procesos en los diferentes ámbitos sanitarios y evita que los pacientes con una misma enfermedad sean atendidos simultáneamente por varios especialistas.
- Puede favorecer la elección informada de la especialidad y así limitar la solicitud de cambios de especialidad.
- Mejora las perspectivas del desarrollo profesional.
- Resuelve las "luchas" entre especialidades sobre el abordaje de problemas "compartidos" y lima la sensación de intrusismo y, por lo tanto, favorece la coalición y no la competitividad.
- Adecua el sistema formativo a las actuales tendencias de empleo y tecnologías sanitarias, al itinerario de los pacientes y a las actuales tendencias de organización sanitaria.
- Es una oportunidad para revisar los programas formativos y mejorar la formación global basada en competencias del especialista.
- Flexibiliza el sistema formativo y favorece la multidisciplinariedad.
- Incrementa las posibilidades de gestión de los recursos humanos en función de las necesidades.
- Permite la adaptación de la formación a la realidad sociosanitaria y al conocimiento científico-técnico actual.

Principales inconvenientes de la troncalidad

- Dificultades logísticas y presupuestarias con revisión de las unidades docentes.
- Posible riesgo de reducción de los tiempos necesarios de formación específica.
- Incertidumbre sobre la especialidad que se va a cursar si se excluye la elección conjunta de tronco.
- Resistencia profesional al cambio.
- Mapas competenciales heterogéneos y no suficientemente definidos en múltiples especialidades médicas.
- No todas las especialidades son susceptibles de ser agrupadas mediante troncos.
- Delimitación demasiado cerrada y clásica de especialidades médicas, médico-quirúrgicas y procedimentales.
- Orientación medicalizada de la troncalidad, generatriz de susceptibilidad en otras profesiones sanitarias.
- Complejidad organizativa de la formación y en los procesos de acreditación.
- Compartimentos estancos de la formación entre grado, formación especializada y desarrollo profesional continuo.
- Riesgo de ruptura de un buen sistema formativo reconocido y prestigiado.
- Introducción de potenciales elementos de desigualdades interespecialidades.

Repercusión de la troncalidad en la formación MIR de Hematología y Hemoterapia

La inclusión de nuestra especialidad en el sistema troncal no ha de repercutir negativamente en el futuro, pues es una especialidad rama de la Medicina Interna con el paciente como eje de todas sus acciones, aunque mantenga sus peculiaridades de diagnóstico especializado de laboratorio y transfusión. En todas las alegaciones presentadas sobre los borradores del decreto se ha puesto énfasis precisamente en este aspecto: aunque la especialidad debe incluirse en el Tronco Médico, existen una serie de peculiaridades formativas únicas de la Hematología y la Hemoterapia por tener además de competencias médico-clínicas, competencias procedimentales en el área de Diagnóstico hematológico (citología hematológica de rutina y especial, estudios de médula ósea, laboratorio de coagulación, etc.), además de la Inmunohematología-Medina Transfusional y Terapia celular. Tras la publicación del decreto de troncalidad se abre un plazo de dos años para elaborar los programas troncales y comunes y revisar y elaborar los nuevos programas formativos específicos de cada especialidad. Por parte de nuestra especiali-

dad, creemos que hay tres aspectos importantes que destacar: en primer lugar, preservar en el programa las competencias específicas indicadas, tanto clínica como de diagnóstico. Por otra parte, es importante que en la formación troncal de las especialidades de Laboratorio no se imparta formación procedimental que sea exclusiva de nuestra especialidad, sino solo la parte hematológica básica que fije el programa pertinente. En este sentido, será necesario revisar el contenido del programa troncal y específico el Tronco de Laboratorio para evitar injerencias en nuestro programa específico. En tercer lugar, se ha solicitado además un aumento de cinco años en la formación para nuestra especialidad, debido al incremento contenidos y la complejidad del programa formativo, por las nuevas tecnologías y por su particularidad como especialidad con una faceta clínica y otra de diagnóstico. Esta solicitud es imprescindible para no perder formación específica con los dos años troncales. Los contenidos del programa formativo troncal son importantes, pero son más importantes los contenidos del nuevo programa formativo y sus competencias específicas para definir el perfil de los futuros hematólogos, respetando y mejorando el programa actual de competencias propias y las bases generales de la especialidad. Como ya hemos indicado, todos estos aspectos han sido objeto de debate en numerosas reuniones y publicaciones, sobre todo por parte de miembros de la comisión o representantes de la SEHH⁹⁻¹².

Creemos que el debate tiene que continuar para seguir evaluando la repercusión. Aunque se puedan expresar reservas, dudas y temores, se impone la idea de que siempre será favorable para la Hematología y Hemoterapia el ser considerada una especialidad troncal médica en lugar de una especialidad de Laboratorio en exclusiva o no troncal, pues en este caso su orden de elección se vería perjudicada, así como existiría el riesgo de una no adaptación al sistema europeo, obstaculizando la movilidad y el reconocimiento, así como impidiendo la obtención de un segundo o tercer título dentro del mismo tronco.

Nuevo programa formativo de Hematología y Hemoterapia basado en competencias y adaptado a la troncalidad

En colaboración con la Fundación de Educación Médica (FEM) (www.educacionmedica.net), la SEHH y la Comisión de la Especialidad decidieron constituir un grupo de trabajo amplio liderado por el Dr. Jordi Gual (FEM), expresidentes recientes de la Comisión Nacional (Dr. Evarist Feliu y Dr. Adrián Alegre), el Presidente de la SEHH, Dr. JM Moraleda, y el Presidente de la CNHH, Dr. Vicente Vicente, para elaborar el nuevo programa de la especialidad siguiendo las nuevas *Guías Oficiales de elaboración de Programas MIR*¹³

Tabla 7. Guía oficial de elaboración de los nuevos programas formativos en el sistema de la troncalidad. Revisado noviembre de 2014 (tomado de: FEM 2013)

Índice
Presentación
1. Introducción/historia y definición de la especialidad/ACE
2. Objetivos del programa
3. Itinerario formativo
4. Elaboración del programa
5. Competencia que adquirir y desarrollar durante el programa
5.1. Competencias genéricas
5.2. Competencias troncales
5.3. Competencias propias de la especialidad
5.4. Competencias propias del Área de Capacitación Específica (ACE)
6. Procedimientos
7. Evaluación de competencias
8. Otros elementos del programa de la especialidad/ACE
Anexo I: Recomendaciones para la definición de competencias
Anexo II: Tabla de relación entre competencias e instrumentos

(Tabla 7). Este grupo está constituido por expertos en todas las áreas de la especialidad (Dra. M. Rozmán, Dr. J. López, Dra. V. Roldán, Dra. L. Vázquez, Dra. M. D. Caballero, Dr. J. Tomás Navarro, Dr. J. M. Raya, Dr. J. Anguita), tanto de clínica como de laboratorio y medicina transfusional, y en la fecha de redactar esta ponencia ya ha mantenido varias reuniones, estando el programa muy avanzado. Con el contenido y cronograma de este nuevo programa se ha de justificar la necesidad de conseguir un quinto año en la formación MIR de Hematología. Este grupo tiene la intención de presentar una maqueta inicial del programa en el LVII Congreso de la SEHH de Valencia 2015, para el cual redactamos esta ponencia. Resumiremos las claves de las guías que se han seguido para elaborar el nuevo programa (Tabla 7):

- El nuevo programa ha de definirse por competencias que serán genéricas o transversales aplicables a todas las especialidades, troncales, aplicables a las especialidades de un mismo tronco y específicas, que han de ser propias de cada especialidad.
- Los contenidos han de definirse usando verbos competenciales entre los que destacan: conocer, identificar, indicar, diagnosticar, tratar, aplicar, etc.
- Para cada competencia se determinarán sus criterios de evaluación, como luego se describirá.
- Una competencia es la combinación de conocimientos, habilidades, actitudes y valores necesarios para llevar a cabo una función en un contexto determinado, según los estándares del momento.

- El objetivo de la guía es facilitar la elaboración de los programas de formación de especialistas en ciencias de la salud. Asimismo se pretende ayudar, desde la vertiente técnica, en la definición de las competencias que cada especialidad definirá, así como las propuestas de instrumento de evaluación que utilizar para garantizar la adquisición de la competencia (Tabla 8).
- Los ocho puntos principales que incluye la Tabla 7.
- Un resumen de las competencias troncales generales se resumen en la Tabla 6. El esquema del itinerario formativo y la duración de competencias se describe de forma resumida en las Figura 4 y Tabla 9.

Para cada uno de estos ocho apartados se describe el que debe ser su contenido y se presentan ejemplos, recomendaciones o información adicional según cada caso.

Cada competencia ha de tener sus sistemas de evaluación, que pueden ser múltiples. Estos instrumentos se resumen en la Tabla 10.

El programa que se está elaborando tiene como marco el currículum europeo de la EHA, que a continuación resumimos. Esta adaptación tiene una gran relevancia, pues permitirá una homogenización con el

entorno europeo con un mayor reconocimiento y garantía de aceptación ante la movilidad para el ejercicio profesional entre países.

El currículum europeo de Hematología

La EHA siempre ha tenido entre sus objetivos armonizar la formación de los hematólogos con un CV común en el entorno europeo (EHA-CV). En 2011, el comité de formación de la EHA, integrado por representantes de 23 países, formuló la Declaración de Bruselas, en la que se recogen los requisitos mínimos para la formación en Hematología y Hemoterapia¹⁴. Para tal fin se ha desarrollado en los últimos años un currículum europeo de Hematología (CEH) que siempre ha tenido en consideración el modelo de formación americano con sistema de formación amplio tras una formación troncal médica¹⁵. Este CV permite a los especialistas en formación o ya ejerciendo una autoevaluación, así como la formación continuada de todas las áreas de Hematología y Hemoterapia para poder alcanzar el EHA Passport. Existen herramientas formativas H-NET para estos objetivos. Las diferentes versiones del EHA-CV se han presentado en varias publicaciones y en los congresos de la EHA^{14,16-19}.

Tabla 8. Instrumentos de evaluación en el nuevo programa formativo

EE	Exámenes escritos
O	Observación
A	Auditoría de registros clínicos
RA	Registro de actividades
F	Feedback 360°
Portafolio	(reflexión + registro actividades)

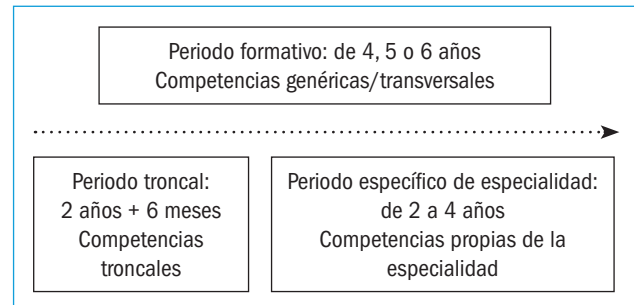


Figura 4. Esquema formativo de especialidades troncales.

Tabla 9. Duración aproximada y competencias en especialidades troncales y no troncales

Competencias para las especialidades médicas troncales y especialidades multidisciplinares troncales		
Competencias	Duración	Comunes a...
Genéricas o transversales	4, 5 o 6 años	Todos los especialistas
Troncales	2 años	Especialidades que configuran cada uno de los cinco troncos
De especialidad	2, 3 o 4 años	Propias del periodo específico de la especialidad
Duración total	4, 5 o 6 años	
Competencias para las especialidades en Ciencias de la Salud no troncales		
Competencias	Duración	Comunes a...
Genéricas o transversales	De 2 a 4/6 años	Todos los especialistas
De especialidad	De 2 a 4/6 años	Propias del periodo específico de la especialidad
Duración total	De 2 a 4/6 años	

Tabla 10. Relación entre competencias e instrumentos de evaluación de los nuevos programas formativos de especialistas médicos, basada en la Guía Oficial de Elaboración de Programas¹³

Anexo III. Relación entre competencias e instrumentos (modificado de: ACGME and ABMS. A product of the joint initiative of the ACGME outcome Project of the Accreditation Council Graduate Medical Education (ACGME), and the American Board of Medical Specialties (ABMS). Versión 1.1, septiembre 2000).

Instrumentos de evaluación

Dominio	Competencia	Análisis de registro	Observación y lista de comprobación	Observación y escalas de puntuación global	Pacientes estandarizados	Simulaciones y modelos	Feedback 360°	Portafolio	PRM	Examen oral	Procedimientos y su registro	Encuesta pacientes
Conocimientos	Investigar y analizar críticamente					2	3			1		
	Aplicar los conocimientos de las ciencias básicas					2	3		1	1		
Aprendizaje basado en la práctica y mejora de la práctica profesional	Autoanalizar la práctica para introducir mejoras	2			2	3	3	1				2
	Usar la evidencia científica	1			3			1	1	1		
	Aplicar la metodología de investigación y estadística		3	3				1	3			
	Usar las TIC				2		1	1			2	
	Facilitar el aprendizaje		2	3			1	3				

1: el más deseable; 2: el siguiente mejor instrumento; 3: instrumento potencialmente aplicable.

Toda la información se encuentra disponible en la página web de la EHA (www.eha.com).

Todos los detalles de este CV europeo se expondrán en otra ponencia de este simposio a cargo del representante oficial de la EHA, el Dr. Antonio Almeida, miembro del EHA Curriculum Committee. Precisamente su ponencia tratará de la utilidad del CV europeo como modelo para lograr la armonización de la Hematología en Europa. No obstante, incluimos en esta ponencia un resumen del CEH actual, pues está sirviendo de guía y marco general para la elaboración del nuevo programa formativo de la especialidad en el sistema MIR de la troncalidad.

Currículum europeo de Hematología actual. CV Passport versión 2.0-2011

El CEH vigente es la versión 2.0 de 2011 y en él se definen tres niveles de competencia, 1, 2 y 3, con una descripción detallada de lo que cada nivel implica. Este CV incluye 8 áreas: hematología benigna, neoplasias mieloides, neoplasias linfoides, trasplante de progenitores y terapias especiales, diagnóstico, trombosis y hemostasia, hemoterapia y habilidades generales.

El CV-E fue revisado por las diferentes sociedades nacionales antes de su aprobación definitiva y finalmente fue avalado por 27 sociedades de países europeos. La segunda versión del CV Passport se editó y divulgó en 2012 y desde 2013 existe una versión *online* en la página web de la EHA (<http://www.ehaweb.org/education-science/eha-online-learning/curriculum-cv-passport/>) que ofrece la posibilidad de utilizarla como una autoevaluación continua de los niveles de competencia. En cada sección y capítulo existen enlaces con material de formación (guías, webcasts, podcasts, casos clínicos, etc.), todo ello ubicado en el *EHA learning center*. Se pretende revisar y editar un nuevo programa a partir de 2016.

La SEHH se ha mostrado muy sensible a los temas de formación y a la relación con la EHA. La actual junta directiva ha impulsado recientemente la creación de un subcomité para asuntos relacionados con la EHA en el seno de la SEHH, coordinado por el Dr. José Tomás Navarro¹², que tiene entre sus objetivos el de difundir las herramientas de formación como el CV Passport y fomentar la participación de los hematólogos españoles en las diferentes actividades de la EHA. Fruto de este creciente interés ha sido la traducción al español del CV Passport y su difusión en las reuniones de los principales grupos cooperativos de nuestra sociedad, así como el establecimiento de enlaces en su página web con los diferentes instrumentos de formación *online* de la página web de la EHA.

Comentarios finales sobre la troncalidad y el futuro de la formación MIR

La formación de especialistas en Hematología y Hemoterapia se realizará de forma exclusiva mediante el sistema MIR en un examen único nacional, siendo imprescindible la licenciatura de Medicina. La formación ha de hacerse en centros acreditados con garantías. A pesar de la implantación de la troncalidad y de la integración de nuestra especialidad en el Tronco Médico, los programas formativos de Hematología y Hemoterapia han de preservar las competencias específicas de la especialidad mantenidas en los últimos años, integrando los nuevos conocimientos diagnósticos y terapéuticos. Estos contenidos han de preservar las competencias clínicas como especialidad derivada de la Medicina Interna y las competencias específicas del Laboratorio de Diagnóstico Hematológico, en Hemostasia y en la Medicina Transfusional. Se está desarrollando un nuevo programa formativo que ha de estar consensuado por la CNHH, la SEHH y los profesionales implicados en la formación de la especialidad, y que ha de estar preparado antes de agosto de 2016. Este programa ha de seguir las guías oficiales fijadas por el Ministerio de Sanidad, indicando con claridad las competencias y objetivos formativos. La adaptación de este nuevo programa al CV europeo es una gran oportunidad para lograr la armonización y el reconocimiento internacional. En este sentido, es irrenunciable lograr la ampliación a cinco años como mínimo de formación para equipararse a otros países y a la normativa europea e internacional.

Respecto a la implantación del modelo de troncalidad, que se prevé para la convocatoria de 2017, creemos que existen numerosos problemas logísticos por resolver, como la elección de especialidad a la vez que el tronco, la organización y definición de las nuevas unidades docentes troncales y otros aspectos relevantes como la necesidad del registro de especialistas para planificar mejor las plazas que ofertar, el reconocimiento de la figura del Tutor, así como la revisión de los criterios de acreditación de centros docentes y los sistemas de evaluación final de los residentes. Todos estos problemas han de resolverse antes de implantar el nuevo modelo MIR, pues la formación de especialistas médicos es un aspecto clave para el futuro del sistema de sanidad de cualquier país y ha de estar por encima de problemas coyunturales, ya que está en juego el mantenimiento y la mejora de la salud de la población.

Dedicatoria de los autores: A todos los especialistas que han contribuido y están contribuyendo a la formación de los hematólogos en nuestro país, con especial mención a la labor fundamental, y desinteresada y poco reconocida de los tutores MIR.

Bibliografía

1. Ley 44/2003 BOE, de 21 de noviembre, de Ordenación de las Profesiones Sanitarias (LOPS). Capítulo III. Formación Especializada en Ciencias de la Salud (18 artícs.)
2. Real Decreto 1148/2006, de 8 de octubre, que regula la Relación Laboral especial de Residencia para la Formación de Especialistas en Ciencias de la Salud.
3. Real Decreto 183/2008, de 8 de febrero, por el que se determinan y clasifican las especialidades en Ciencias de la Salud y se desarrollan determinados aspectos del sistema de formación sanitaria especializada. BOE N° 45, 21 de febrero de 2008. pp. 1020-35.
4. Orden SCO/581/2008, de 22 de febrero, por la que se publica el Acuerdo de la Comisión de Recursos Humanos del Sistema Nacional de Salud, por el que se fijan criterios generales relativos a la composición y funciones de las comisiones de docencia, a la figura del jefe de estudios de formación especializada y al nombramiento del tutor. BOE N° 56, 5 de marzo de 2008. pp. 13586-7.
5. Orden del Ministerio de Sanidad y Consumo 2 de Octubre 2006, por el que se aprueba y publica el Programa formativo de la Especialidad de Hematología Hemoterapia. BOE, 21 de octubre de 2006. pp. 36888-94.
6. Real Decreto 6393/2008, de 25 de julio, por el que se regula la troncalidad, la reespecialización, troncal y las áreas de capacitación específica, se establecen las normas aplicables a las pruebas anuales de acceso a las plazas de formación y otros aspectos del sistema de formación especializada en Ciencias de la salud Febrero, por el que se determinan y clasifican las especialidades en Ciencias de la Salud y se crean y modifican determinados títulos de especialista. BOE N° 190, de 6 de agosto de 2014.
7. Alegre A, Feliu E, Marco P, Plá R. Documento informativo de consenso sobre la troncalidad en la formación de Hematología y Hemoterapia. (CNHH, SEHH, SETH y SETS) Libro Blanco de la Hematología y Hemoterapia. Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia. Madrid: EDIMSA. 2012. pp. 259-61.
8. Alegre A, Villegas A, Barbolla L. La Comisión Nacional de la especialidad de Hematología y Hemoterapia en la historia de la Asociación Española de Hematología y Hemoterapia Asociación Española de Hematología y Hemoterapia: 50 años de Historia. Madrid: Editorial Acción Médica. 2009. pp. 129.
9. Alegre A, Villegas A. La Formación MIR en Hematología. Libro Blanco de Hematología. Madrid: EDIMSA. 2012.
10. Alegre A, Boqué C, Villegas A, Moreno A, Moraleda JM, Burgaleta C, et al. Libro de Ponencias. Adaptación de la Tutoría y de los Nuevos Programas Formativos al Modelo de Troncalidad en Tiempos de Crisis. III Edición para Tutores MIR de Hematología y Hemoterapia de la SEHH. SEHH-Colegio de Médicos. Madrid, 2013.
11. Alegre A. La Troncalidad en la formación MIR de Hematología: Retos y Oportunidades. Informe de la Comisión Nacional. Libro de Ponencia. Simposio: La hematología en tiempos de crisis. IV Reunión Nacional de la SEHH. Sevilla, 2013.
12. Navarro JT, Ribera JM, Grau J, Vives S, Millá F, Feliu E. Armonización de la Formación Continua en Europa: Currículum Europeo. Simposium sobre Formación, Gestión e Investigación. Libro de Ponencias. www.sehh.org. LVI Congreso Nacional de la SEHH. Madrid, 2014.
13. Guía para la Elaboración de los Programas Oficiales de las Especialidades en Ciencias de la Salud y de los Diplomas de las Áreas de Capacitación Específica. Dirección General de Ordenación Profesional. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, MSSSI y Fundación de Educación Médica. FEM, 2013.
14. European Hematology Curriculum (H-Net) EHA. Brussels Declaration 2011.
15. Todd RE. A guide to planning careers in Hematology and Oncology. American Society of Hematology- Education Program Book. 2001. pp. 499-506.
16. Ossenkoppele G, Evans-Jones G, Jäger U, Hellström-Lindberg E. Towards a joint definition of European hematology. *Haematologica* 2012;97:636-7.
17. De Witt TD, Hellström-Lindberg E, Jäger U, Evans-Jones G, Smand C. H-Net, the European network for harmonization of training in Hematology, and its policy. *Haematologica* 2012; 97:1776-8.
18. Strivens J, Hellström-Lindberg E, Bjerrum OW, Toh CH. A European strategy for targeted education. *Haematologica* 2013; 98:1000-2.
19. Hellström-Lindberg E, Almeida A, Enoksson F, de Witt TD, Strivens J, Naeve A, et al. Survey of professional competence in hematology in Europe. *Haematologica* 2014;99:404-8.

The EHA Research Roadmap: A strategic development for coming years

A. ENGERT

University Hospital. Cologne, Germany

The EHA Roadmap for European Hematology Research highlights major achievements in diagnosis and treatment of blood disorders and identifies the greatest unmet clinical and scientific needs in those areas to enable better funded, more focused European hematology research. Initiated by the European Hematology Association, about 300 experts contributed to the consensus document, which will help European policy makers, research funders, research organizations and researchers make better informed decisions on hematology research. It also aims to raise public awareness of blood disorders' burden on European society, which purely in economical terms is estimated at €22.5 billion per year, a cost level that is not matched in current European hematology research funding.

In recent decades, hematology research has fundamentally improved our biological understanding of blood disorders, has improved diagnostics and treat-

ments, sometimes in revolutionary ways. The progress highlights the potential of focused basic research programs such as this EHA Roadmap.

The EHA Roadmap distinguishes nine 'sections' in hematology: normal hematopoiesis, malignant lymphoid and myeloid diseases, anemias and related diseases, platelet disorders, blood coagulation and hemostatic disorders, transfusion medicine, infections in hematology, and hematopoietic stem cell transplantation. These sections span 60 smaller groups of diseases or disorders.

The EHA Roadmap identifies priorities and needs across the hematology field, including those to develop targeted therapies based on genomic profiling and chemical biology, to eradicate minimal residual malignant disease, and to develop cellular immunotherapies, combination treatments, gene therapies, hematopoietic stem cell treatments, and treatments that are better tolerated by elderly patients.

MPN pathogenesis: From JAK2 to CALR

T. GREEN

Department of Haematology, Cambridge Institute of Medical Research and Wellcome Trust/MRC Stem Cell Institute, University of Cambridge, United Kingdom

The human myeloproliferative neoplasms (MPNs) are a spectrum of clonal haematological malignancies which arise in the haematopoietic stem cell compartment. These disorders are experimentally tractable, permit clonal analysis and provide a window on the earliest stages of tumorigenesis. A single somatic gain-of-function mutation in JAK2 is present in most MPN patients. This observation emphasised the significance of the JAK signalling pathway which plays a key role in stem cell biology and has now been implicated in many human malignancies. The Green lab is focusing on

the pathogenesis of the MPNs and particularly on the molecular and cellular consequences of JAK2 mutations. These studies have had rapid clinical impact with new approaches to both diagnosis and therapy. Additional highlights of general relevance for stem cell and cancer biology include unexpected insights into chromatin biology, clonal evolution and haematopoietic stem cell function. Most recently, the discovery of CALR mutations, in JAK2-unmutated patients, has identified a new cancer gene and revealed an unexpected link with endoplasmic reticulum biology.



2015 
Valencia
LVII Congreso Nacional de la SEHH
XXXI Congreso Nacional de la SETH