

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

XXXI

Congreso Nacional
de la Sociedad Española
de Trombosis y Hemostasia

Valencia 2015

22-24 de octubre

www.sehhseth.com

ARÁN

Programa Educativo



© 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>



PROGRAMA EDUCACIONAL

Coordinadores:

José Antonio Pérez-Simón

UGC Hematología y Hemoterapia

Hospital Universitario Virgen del Rocío-Virgen Macarena

Instituto de Biomedicina (Ibis)/Universidad de Sevilla

Sevilla

Víctor Jiménez Yuste

Instituto de Investigación Hospital Universitario

La Paz (IdiPaz)

Madrid

Sumario

Introducción	5
Diagnóstico diferencial y manejo de las eritroblastopenias	7
Silvia de la Iglesia Íñigo	
Microangiopatía trombótica: diagnóstico diferencial y tratamiento	12
Miguel Fernández Zarzoso, Javier de la Rubia	
Nueva clasificación citogenética y molecular de los síndromes mielodisplásicos.	18
Francesc Solé	
Células madre e ingeniería de tejidos	22
Felipe Prosper	
Dissección de las vías de diferenciación normal de células hematopoyéticas por citometría de flujo.	27
Alberto Orfao, Sergio Matarraz, Quentin Lécrevisse, Antonio López, Juana Ciudad, Susana Barrena, Martín Pérez-Andrés, Juan Flores-Montero, Daniela Damasceno, Carmen Muñiz, Andrea Mayado, Andrés García-Montero, Julia Almeida	
Diagnóstico y monitorización del mieloma múltiple en el año 2015	32
María Victoria Mateos, Verónica Gómez de la Calle, Noemí Puig, Norma Gutiérrez, Ramón García-Sanz	
Tratamiento del linfoma de células del manto	38
Miguel Ángel Canales Albendea	
Profilaxis y tratamiento de la enfermedad tromboembólica venosa en pacientes con cáncer	41
Ramón Lecumberri, Ana Alfonso, Rocío Figueroa	
Presente y futuro del tratamiento profiláctico en hemofilia	44
María Teresa Álvarez Román	
Retos actuales en el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand	48
Javier Batlle, Almudena Pérez-Rodríguez, Irene Corrales, María Fernanda López-Fernández, Ángela Rodríguez-Trillo, Esther Lourés, Ana Rosa Cid, Santiago Bonanad, Noelia Cabrera, Andrés Moret, Rafael Parra, María Eva Mingot-Castellano, Ignacia Balda, Carmen Altisent, Rocío Pérez-Montes, Rosa María Fisac, Gemma Iruín, Sonia Herrero, Inmaculada Soto, Beatriz de Rueda, Víctor Jiménez-Yuste, Nieves Alonso, Dolores Vilariño, Olga Arija, Rosa Campos, María José Paloma, Nuria Bermejo, Teresa Toll, José Mateo, Karmele Arribalzaña, Pascual Marco, Ángeles Palomo, Lizheidy Sarmiento, Belén Íñigo, María del Mar Nieto, Rosa Vidal, María Paz Martínez, Reyes Aguinaco, Jesús María César(†), María Ferreiro, Javier García-Frade, Ana María Rodríguez-Huerta, Jorge Cuesta, Ramón Rodríguez-González, Faustino García-Candel, Rosa Cornudella, Carlos Aguilar, Nina Borràs, Francisco Vidal	

Programa educacional

COORDINADORES: J.A. PÉREZ-SIMÓN. *Sevilla*
V. JIMÉNEZ YUSTE. *Madrid*

Introducción

El Programa Educacional constituye, como no puede ser de otro modo, uno de los aspectos centrales dentro del congreso nacional de la SEHH y la SETH. Hasta este año ha ocupado monográficamente el día inaugural. De manera similar a la mayoría de congresos internacionales, y con el fin de dar mayor presencia a la parte educacional a lo largo del congreso, este año se repartirá entre el jueves y el viernes. Esperamos que este cambio sea provechoso para todos los asistentes y facilite la presencia al mismo.

Junto con el resto del comité científico, hemos pretendido elaborar un Programa Educacional que abarque todas las áreas de nuestra especialidad sin renunciar a revisar algunos de los aspectos más punteros no solo en la Hematología, sino en la Medicina actual. Para ello contamos con expertos de reconocido prestigio nacional e internacional en cada uno de los temas que se abordarán.

La Dra. Silvia de la Iglesia Íñigo revisará el diagnóstico diferencial y el tratamiento de las eritroblastopenias. Además de poder ir de la mano de una gran experta a la hora de repasar estos síndromes, la Dra. De la Iglesia profundizará en nuevos aspectos fisiopatológicos como las mutaciones en las proteínas ribosomales.

Nadie como el Dr. Javier de la Rubia para abordar, con la claridad que requiere un programa educacional, una cuestión tan compleja como el diagnóstico diferencial y el tratamiento de la microangiopatía trombótica, tanto en sus formas primarias como secundarias. Tanto en un caso como en el otro el manejo de estos pacientes es siempre controvertido lo que, sumado a las novedades en este ámbito, hace de esta una ponencia realmente atractiva y del interés general.

Las novedades en el diagnóstico y la clasificación de los síndromes mielodisplásicos hacían obligado abordar este tema dentro del Programa Educacional de este año. El Dr. Francesc Solé, investigador de reconocido prestigio internacional en este área, será el encargado de revisar para todos nosotros la nueva clasificación citogenética y molecular de estos síndromes. Su experiencia es clave para que podamos comprender e identificar el valor pronóstico de las nuevas alteraciones genéticas y moleculares.

El Dr. Felipe Prosper abordará en su ponencia uno de los aspectos más “calientes” de la Hematología en particular y de la Medicina en general en los últimos años: la terapia celular. Dada su prestigiosa trayectoria en este campo, es la persona más indicada para orientarnos en esta complicada área de la Medicina, desde los conceptos más básicos hasta las indicaciones más novedosas.

Terminaremos la sesión de jueves con una de las figuras internacionales más relevantes en el panorama de la Hematología española, el Dr. Alberto Orfao, una referencia mundial en la citometría de flujo con quien navegaremos a lo largo de la hematopoyesis en un viaje que promete ser fascinante, dados el conocimiento y la capacidad didáctica del ponente.

En la mañana del viernes reservaremos un espacio para la hematología clínica de la mano de dos referentes en cada una de las patologías que se revisarán: la Dra. María-Victoria Mateos actualizará el diagnóstico y la monitorización del mieloma múltiple en el año 2015. En un escenario tan cambiante como es el diagnóstico y tratamiento del mieloma múltiple, patología en la que se han producido los avances más llamativos a lo largo de los últimos años, será todo un lujo contar con una de las referencias internacionales del que, seguramente, es el grupo más productivo de la Hematología española, el grupo

español de mieloma. Y además del mieloma, afortunadamente estamos viviendo cambios profundos en el tratamiento de otras patologías, como el linfoma del manto. La trayectoria del Dr. Miguel Ángel Canales en esta área le avala como el ponente idóneo para ilustrarnos sobre el manejo actual y el impacto de los nuevos fármacos en el pronóstico de estos pacientes.

Iniciando el Programa Educativo dedicado a la trombosis y la hemostasia, el Dr. Ramón Lecumberri abordará una de las facetas más interesantes de la trombosis, como es la relacionada con la patología tumoral. Desde su perspectiva, como reputado referente tanto en el campo clínico como de investigación, conoceremos el abordaje profiláctico y terapéutico de la enfermedad tromboembólica venosa asociada al cáncer.

Si existe una patología dentro de la hemostasia que ha evolucionado de forma esperanzadora en los últimos años esta es la hemofilia. Para conocer la realidad actual y el futuro de la profilaxis contamos con una de las referencias internacionales en el campo de las coagulopatías congénitas, la Dra. María Teresa Álvarez. De su mano profundizaremos en el manejo integral y en los cambios que se avecinan en la terapéutica profiláctica de la hemofilia.

Una de las trayectorias más reconocidas dentro del campo de la hemostasia, especialmente en el ámbito de la enfermedad de von Willebrand, ha sido la realizada a lo largo de su carrera profesional por el Dr. Javier Batlle. Nadie como él para poner broche final a este Programa Educativo abordando un tema complejo y con muchas novedades como el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand.

En definitiva, nuestro ánimo no es otro sino que el presente Programa Educativo responda a las expectativas de los médicos hematólogos y especialistas en formación y contribuya a actualizar nuestros conocimientos en una especialidad con un desarrollo tan rápido como es la Hematología-Hemoterapia.

Diagnóstico diferencial y manejo de las eritroblastopenias

SILVIA DE LA IGLESIA ÍÑIGO

Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín. Las Palmas de Gran Canaria

Introducción

La eritroblastopenia, o aplasia pura de células rojas (APCR), es un síndrome descrito inicialmente por Kaznelson en 1922, caracterizado por anemia normocítica normocrómica grave con reticulocitopenia y disminución de eritroblastos en la médula ósea. Puede ser agrupada dentro de los fallos medulares; sin embargo, en la eritroblastopenia pura la aplasia se limita a la serie eritroide, estando las otras líneas generalmente conservadas^{1,2,3}.

Las APCR se clasifican en congénitas y adquiridas, y estas últimas en crónicas y transitorias o en primarias y secundarias (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de las eritroblastopenias (modificada del libro de Sanz-Sabrafén)

Congénitas
Crónicas o transitorias
Idiopáticas o secundarias
Infecciones (parvovirus B-19, VEB, CMV, VIH)
Enfermedades autoinmunes (artritis reumatoide, LES)
Fármacos
Timoma
Síndromes linfoproliferativos y otras hemopatías
Gestación

Las APCR adquiridas también pueden ser clasificadas según su patofisiología en secundarias a infección por parvovirus B19 (aguda o crónica), asociadas a ciertos fármacos o toxinas, asociadas al embarazo o de causa autoinmune. Dentro de las de causa autoinmune se distinguen las mediadas por anticuerpos frente a los eritroblastos (eritroblastopenia transitoria de la infancia, incompatibilidad ABO tras trasplante hematopoyético) o frente a la eritropoyetina, la mediadas por células T y por células NK.

Las APCR autoinmunes pueden ser idiopáticas o estar asociadas a infecciones, enfermedades autoinmu-

nes o neoplasias tales como timoma, linfoma o carcinoma. Así mismo, a veces es la manifestación inicial de un síndrome preleucémico¹.

Eritroblastopenias congénitas

Eritroblastopenia congénita de Blackfand-Diamond o anemia de Blackfand-Diamond (ABD)

Se engloba dentro de los síndromes congénitos de fallo medular. Estos síndromes son un grupo de alteraciones genéticas caracterizadas por la insuficiente producción de una o varias líneas hematopoyéticas, alteraciones físicas y predisposición a neoplasias, tanto sólidas como hematológicas, debido a la activación de P53 y a cierto acortamiento de los telómeros. Incluyen, además de la ABD, la anemia de Fanconi, la disqueratosis congénita, la neutropenia congénita grave, el síndrome de Shwachman-Diamond y la trombocitopenia con ausencia del radio¹⁻³.

La etiopatogenia de algunos de estos síndromes parece estar relacionada, dado que se afecta la formación de los ribosomas. En la ABD se han demostrado alteraciones de los genes que codifican para las subunidades de los ribosomas, mientras que en la disqueratosis congénita se afecta el gen DKC1, que expresa la proteína disquerina, implicada en la pseudouridilación del ARN ribosomal. En el síndrome de Shwachman-Diamond se afecta el gen SDS, que codifica para la proteína del mismo nombre y que está involucrada en la unión de las subunidades ribosomales para formar el ribosoma maduro (80S)⁴.

La ABD es una enfermedad rara, con una incidencia de 7/1.000.000 nacimientos, sin diferencia entre géneros, que se diagnostica normalmente en el primer año de vida (98 % de los casos). Los diagnósticos tardíos, descritos hasta a los 64 años, se corresponden generalmente con anemia crónica no diagnosticada previamente, anemia gestacional o portadores asintomáticos descubiertos durante un estudio familiar. Únicamente un 10 % presenta anemia al nacimiento, siendo muy

poco frecuente la aparición de *hydrops fetalis*. La mayor parte son esporádicos, pero se han descrito casos familiares (10-45 %) que presentan predominantemente una herencia autosómica dominante con penetrancia y expresividad variable. Aunque la anemia es la característica predominante, es frecuente hallar una estatura baja, influida en parte por el tratamiento con corticoides, y alteraciones del pulgar. Se observan malformaciones congénitas en un 25-50 % de los pacientes según las series, viéndose afectados comúnmente la cabeza, las extremidades superiores, el corazón y el sistema urogenital^{1,2,3}.

Actualmente se considera una ribosomopatía, relacionándose en más del 50 % de los casos con una haploinsuficiencia de las proteínas asociadas a la subunidad pequeña o grande del ribosoma. La disfunción ribosomal activa la vía p53, la cual conlleva una acumulación de p21 y la consecuente parada del ciclo celular en los progenitores eritroides. En estos pacientes se ha descrito una mayor incidencia de LMA, SMD y tumores sólidos (cáncer de colon, ginecológico y sarcoma osteogénico fundamentalmente), aunque esta predisposición es menor que la observada en otros síndromes de fallo medular⁵⁻⁸.

Se han descrito más de 200 mutaciones que afectan a los distintos genes que codifican proteínas ribosómicas, siendo la más frecuente la alteración del gen *RPS19* (25 %). Las mutaciones en los genes *RPS7*, *RPS10*, *RPS17*, *RPS19*, *RPS24*, *RPS26*, *RPS29*, *RPL5*, *RPL11*, *RPL26*, *RPL35A* y *GATA1* suponen más del 50 %. Así mismo, los pacientes con malformaciones presentan un mayor porcentaje de mutaciones de los genes *RPL5* y *RPL11*^{6,9} (Tabla 2).

Hematológicamente cursa con anemia macrocítica hiporregenerativa con elevación de la hemoglobina fetal (HbF), que indica reactivación de la eritropoyesis fetal,

y un aumento de la actividad de la adenosina desaminasa (ADA) eritrocitaria, que parece estar relacionada con alteración en la diferenciación eritroide. La médula ósea es normal o presenta celularidad reducida, con eritroblastopenia y normalidad en la línea mieloide y megacariocítica. El principal diagnóstico diferencial que se debe tener en cuenta es la eritroblastopenia transitoria de la infancia^{1,9}.

El manejo de esta patología se basa en un tratamiento multidisciplinar. La mayor parte responden a altas dosis de corticoides (2-4 mg/kg/día) al inicio, permitiendo generalmente su posterior reducción hasta alcanzar la mínima dosis efectiva. Las remisiones son frecuentes (20-25 %), pero un 20 % son resistentes a corticoides, por lo que precisan transfusiones y tratamiento quelante. En estos pacientes se debe plantear el trasplante de médula ósea⁹.

Así mismo, se han utilizado otros inmunosupresores (gammaglobulinas, globulina antitimocito o ciclosporina), interleucina 3, altas dosis de eritropoyetina, andrógenos y antagonistas de la dopamina como la metoclopramida, que produce liberación de prolactina. Más recientemente se ha utilizado el aminoácido leucina como un modulador potencial de la síntesis de proteínas e, incluso, se ha pensado que la lenalidomida pudiera ser útil, dada la eficacia demostrada en los síndromes mielodisplásicos 5q- que presentan alteraciones de los genes que codifican proteínas ribosomales. Así mismo, se ha descrito un caso de remisión tras tratamiento con deferasirox⁹⁻¹³.

El pronóstico de estos pacientes es mejor que el de los que padecen otros síndromes de fallo medular, con una supervivencia media de 56 años y menor riesgo de neoplasia (20 % a los 46 años). Las principales causas de muerte son anemia, sepsis, sobrecarga férrica, leucemia y otras neoplasias. La anemia suele empeorar con el embarazo, lo que puede favorecer las complicaciones maternas y fetales. Se debe realizar un estudio familiar con determinación de HbF, ADA y análisis de mutaciones ribosomales para detectar portadores. Los individuos diagnosticados, aunque sean asintomáticos, deben ser controlados anualmente^{1,9}.

Tabla 2. Genes implicados en la anemia de Blackfan-Diamond (modificada de: Vlachos and Muir, Blood 2010)

Gen	Porcentaje aproximado de casos	Locus
RPS19	25	19q13.2
RPS24	2	10q22-q23
RPS17	1	15q25.2
RPL35a	4	3q29-qter
RPL5	7	1p22.1
RPL11	5	1p36-p35
RPS7	1	8q21.11
RPS26	6	12q13
RPS10	3	6p21.1-21.3
Total	54	

Eritroblastopenias adquiridas

Las eritroblastopenias adquiridas son patologías poco frecuentes, caracterizadas por anemia con reducción grave del número de reticulocitos en sangre periférica y precursores eritroides en médula ósea con el resto de la celularidad conservada, tanto cuantitativamente como morfológicamente.

La eritroblastopenia adquirida puede presentarse como una enfermedad autolimitada, normalmente durante la infancia, la gestación o en el transcurso de infecciones por parvovirus B19 en los pacientes afectos.

tos de anemia hemolítica congénita, o bien como una enfermedad crónica.

También puede ser clasificada, según su etiopatogenia, en idiopática o secundaria^{1,14}.

Eritroblastopenia idiopática

La mayoría de los casos de eritroblastopenia son idiopáticos, de aparición tardía (50-60 años de edad) y de evolución crónica, por lo que normalmente los pacientes no presentan sintomatología hasta que la anemia es grave. En su diagnóstico se deben descartar causas de eritroblastopenia secundaria.

Se han descrito remisiones espontáneas en un 14 % de los casos, sin precisar tratamiento, excepto transfusión y suspensión de los posibles fármacos causantes. En el resto de los pacientes evoluciona de forma crónica. En algunas ocasiones pueden responder al tratamiento con corticosteroides, asociándose ciclosporina o ciclofosfamida si no se obtiene una buena respuesta inicial.

Los pacientes suelen presentar recaídas frecuentes tras la suspensión. En estos casos se ha utilizado inmunoglobulinas, aziatioprina, rituximab y alemtuzumab^{1,14}.

Eritroblastopenias secundarias

Son aquellas en las que se ha identificado una situación subyacente desencadenante de la eritroblastopenia. Podemos distinguir las secundarias en:

Infecciones

El parvovirus B19 es el virus más frecuentemente relacionado y que causa la mayoría de las crisis de **eritroblastopenia aguda** en los pacientes con anemias hemolíticas congénitas (esferocitosis hereditaria fundamentalmente). El parvovirus ataca directamente y destruye los proeritroblastos, uniéndose al receptor del antígeno sanguíneo P. La presencia de proeritroblastos gigantes con cromatina perlada es muy indicativa de la infección por parvovirus B-19. En pacientes inmunodeprimidos (inmunodeficiencias congénitas, infección por VIH, síndromes linfoproliferativos o pacientes trasplantados) esta infección puede producir **eritroblastopenia crónica** o, menos frecuentemente, pancitopenia.

El parvovirus B19, junto con los echovirus y el VHS tipo 6, se ha relacionado con la **eritroblastopenia transitoria de la infancia**, que suele cursar de forma aguda con anemia bien tolerada y recuperación espontánea tras 1-2 meses de evolución. Está causada por anticuerpos frente a los progenitores eritroides y, en algunos casos, se ha objetivado la existencia de un aumento de linfocitos con fenotipo común pre-B que no debe ser confundido con una leucemia linfoblástica aguda^{1,15,16}.

También se han descrito episodios transitorios de eritroblastopenia en el curso de otras infecciones virales, como las causadas por VHA, VHB, VHC, VIH, Epstein-Barr y citomegalovirus, probablemente causados por un mecanismo inmune humoral inducido tras la infección viral¹.

El tratamiento de la eritroblastopenia aguda generalmente solo requiere soporte transfusional, mientras que los casos de eritroblastopenia crónica por parvovirus B19 normalmente precisan la administración de gammaglobulinas específicas¹.

Enfermedades autoinmunes

Se ha descrito la aparición de eritroblastopenia en pacientes afectos de enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide y el lupus eritematoso sistémico, relacionándose su aparición con supresión mediada por anticuerpos o por linfocitos T¹.

Fármacos

Más de 30 fármacos han sido implicados en episodios de eritroblastopenia, pero la mayoría de los artículos publicados recogen casos aislados. Únicamente existe evidencia con la fenitoína, aziatioprina, clorpropamida, isoniacida¹⁷ y agentes estimulantes de la eritropoyesis (fundamentalmente epoetina α). Normalmente la anemia remite tras la suspensión del fármaco causante. Se recomienda la detección de anticuerpos anti-eritropoyetina en los pacientes en tratamiento con eritropoyetina que presenten anemización, y el cambio de formulación, aunque algunos compuestos pueden presentar reactividad cruzada¹⁸.

Timoma

La asociación entre eritroblastopenia y timoma es ampliamente conocida, pero supone menos de un 10 % de los casos en las últimas series publicadas. El mecanismo de la anemia parece ser de causa autoinmune. Se recomienda la resección del timoma, que en algunos casos produce la remisión, pero la mayoría de los pacientes precisan tratamiento inmunosupresor¹⁹.

Síndromes linfoproliferativos y otras patologías hematológicas

Puede ser secundaria a otras patologías hematológicas como linfoma no Hodgkin, leucemia linfocítica crónica, leucemia de linfocitos grandes granulares y macroglobulinemia de Waldenström. La aplasia puede preceder, ser simultánea o aparecer de forma tardía. La mayoría de los casos parecen ser mediados por autoanticuerpos frente a los eritroblastos o la eritropoyetina. Se reco-

mienda el tratamiento de la patología subyacente, aunque la eritroblastopenia puede persistir a pesar de la remisión del síndrome linfoproliferativo^{1,20}.

También se ha descrito la aparición de APCR en pacientes diagnosticados previamente de síndrome mielodisplásico o anemia hemolítica autoinmune y en el transcurso del trasplante de progenitores hematopoyéticos con incompatibilidad ABO. En estos pacientes el injerto y la recuperación reticulocitaria pueden ocurrir de forma espontánea tras semanas o meses, coincidiendo con la disminución de la titulación de las aglutininas¹.

Gestación

La **eritroblastopenia inducida por la gestación** se trata de un síndrome autolimitado que se resuelve tras el parto, con alto riesgo de recurrencia en embarazos posteriores e incluso con la toma de progestágenos. Normalmente precisa transfusiones y tratamiento con corticoides²¹.

Tratamiento de las eritroblastopenias adquiridas

Es conveniente limitar la actitud terapéutica al soporte transfusional y a la retirada de los posibles fármacos causantes durante al menos un mes, dadas las frecuentes remisiones espontáneas. El tratamiento de las APCR primarias o secundarias que no responden al de la patología subyacente se basa en el uso secuencial de varios inmunosupresores hasta que se obtiene la remisión. Se han usado corticoides, ciclofosfamida, ciclosporina A, globulina antitimocito, esplenectomía, plasmaféresis y más recientemente rituximab (anti-CD20) y alemtuzumab (anti-CD52). Se han objetivado remisiones con todos estos fármacos, pero muchos pacientes precisan mantener la inmunosupresión para conservar la remisión. Los corticoides, la ciclofosfamida y la ciclosporina A presentan una eficacia similar pero, dados los efectos secundarios a largo plazo de los corticoides, es preferible optar por la ciclosporina como primera línea de tratamiento¹⁴.

Diagnóstico diferencial de las eritroblastopenias

Aunque la causa más frecuente de APCR en el niño es la **eritroblastopenia transitoria de la infancia**, ante la existencia de una anemia macrocítica hiporregenerativa no carencial debemos investigar la existencia de antecedentes familiares y de malformaciones para descartar una eritroblastopenia congénita, siendo muy importante realizar determinación de HbF y niveles de ADA eritrocitaria. Se aconseja llevar a cabo un aspirado medular para comprobar la integridad de las otras series, cariotipo y estudio de genes implicados en la anemia de

Blackfan-Diamond. Así mismo, es conveniente hacer un diagnóstico diferencial con otros síndromes congénitos de fallo medular (test de fragilidad cromosómica para descartar anemia de Fanconi, fundamentalmente) y realizar serología completa. En el caso de que se trata de un recién nacido con APCR habría que pensar en una infección por parvovirus B19 transmitida por la madre.

En el adulto hay que estudiar las causas más frecuentes de eritroblastopenias secundarias. Realizaremos una historia clínica completa que incluya antecedentes personales, infecciones, toma de fármacos y exposición a tóxicos. Así mismo, solicitaremos pruebas de función hepática, renal y serología frente a parvovirus B19 y otros virus implicados, estudio autoinmune, radiografía/TC de tórax para excluir timoma u otras neoplasias y aspirado de médula ósea. No se debe llegar al diagnóstico de APCR si existen datos de displasia, fibrosis o alteraciones citogenéticas, dado que probablemente se trate de un síndrome mielodisplásico o mieloproliferativo con hipoplasia eritroide¹.

Bibliografía

1. Fisch P, Handgretinger R, Schaefer HE. Pure red cell aplasia. *Br J Haematol.* 2000;111:1010-22.
2. Chung NG, Kim M. Current insights into inherited bone marrow failure syndromes. *Korean J Pediatr.* 2014;57(8):337-44.
3. Shimamura A, Alter BP. Pathophysiology and Management of Inherited Bone Marrow Failure Syndromes. *Blood Rev.* 2010;24(3):101-22.
4. Ruggero D, Shimamura A. Marrow failure: a window into ribosome biology. *Blood.* 2014;124(18):2784-92.
5. Dianzani I, Loreni F. Diamond-Blackfan anemia: a ribosomal puzzle. *Haematologica.* 2008;93(11):1601-4.
6. Wang R, Yoshida K, Toki T, Sawada T, Uechi T, Okuno Y, et al. Loss of function mutations in RPL27 and RPS27 identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol.* 2015;168(6):854-64.
7. Dutt S, Narla A, Lin K, Mullally A, Abayasekara N, Megerdichian C, et al. Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. *Blood.* 2011;117(9):2567-76.
8. Vlachos A, Rosenberg PS, Atsidaftos E, Alter BP, Lipton JM. Incidence of neoplasia in Diamond Blackfan anemia: a report from the Diamond Blackfan Anemia Registry. *Blood.* 2012;119(16):3815-9.
9. Vlachos A, Muir E. How I treat Diamond-Blackfan anemia. *Blood.* 2010;116:3715-23.
10. Payne EM, Virgilio M, Narla A, Sun H, Levine M, Paw BH, et al. L-Leucine improves the anemia and developmental defects associated with Diamond-Blackfan anemia and del(5q) MDS by activating the mTOR pathway. *Blood.* 2012;120(11):2214-24.
11. Boultswood J, Yip BH, Vuppusetty C, Pellagatti A, Wainscoat JS. Activation of the mTOR pathway by the amino acid (L)-leucine in the 5q- syndrome and other ribosomopathies. *Adv Biol Regul.* 2013;53(1):8-17.
12. Narla A, Dutt S, McAuley JR, Al-Shahrour F, Hurst S, McConkey M, et al. Dexamethasone and lenalidomide have distinct functional effects on erythropoiesis. *Blood.* 2011;118(8):2296-304.
13. Sjögren SA, Flygare J. Progress towards Mechanism-Based Treatment for Diamond-Blackfan Anemia. *The ScientificWorld Journal.* Volume 2012, Article ID 184362.

14. Sawada K, Fujishima N, Hirokawa M. Acquired pure red cell aplasia: updated review of treatment. *Br J Haematol.* 2008;142(4):505-14.
15. Young NS. B19 parvovirus. *Baillieres Clin Haematol.* 1995;8(1):25-56.
16. Penchansky L, Jordan JA. Transient erythroblastopenia of childhood associated with human herpesvirus type 6, variant B. *Am J Clin Pathol.* 1997;108(2):127.
17. Thompson DE, Gales MA. Drug-induced pure red cell aplasia. *Pharmacotherapy.* 1996;16(6):1002.
18. Casadevall N, Nataf J, Viron B, Kolta A, Kiladjian JJ, Martin-Du-pont P, et al. Pure red-cell aplasia and antierythropoietin anti-bodies in patients treated with recombinant erythropoietin. *N Engl J Med.* 2002;346(7):469.
19. Thompson CA, Steensma DP. Pure red cell aplasia associated with thymoma: clinical insights from a 50-year single-institution experience. *Br J Haematol.* 2006;135(3):405-7.
20. Vlachaki E, Diamantidis MD, Klonizakis P, Haralambidou-Vranitsa S, Ioannidou-Papagiannaki E, Klonizakis I. Pure red cell aplasia and lymphoproliferative disorders: an infrequent association. *ScientificWorldJournal.* Article ID 475313. 2012.
21. Choudry MA, Moffett BK, Laber DA. Pure red-cell aplasia secondary to pregnancy, characterization of a syndrome. *Ann Hematol.* 2007;86(4):233-7.

Microangiopatía trombótica: diagnóstico diferencial y tratamiento

MIGUEL FERNÁNDEZ ZARZOSO¹, JAVIER DE LA RUBIA^{1,2}

¹Servicio de Hematología. Hospital Universitario Dr. Peset. Valencia

²Universidad Católica de Valencia "San Vicente Mártir". Valencia

Introducción

Las microangiopatías trombóticas (MAT) son un grupo de trastornos que presentan como hallazgo común la formación de trombos en la microcirculación como consecuencia de procesos inflamatorios, con daño asociado del endotelio vascular. Desde el punto de vista del laboratorio, las MAT se caracterizan por la presencia de trombocitopenia de consumo de intensidad variable, anemia hemolítica microangiopática (AHMA) con esquistocitos y marcadores de hemólisis (LDH y reticulocitos aumentados). Clínicamente cursan con disfunción multiorgánica de intensidad variable debido a la isquemia tisular asociada a la obstrucción vascular.

Según su etiología, las MAT se clasifican en primarias, o de etiología conocida, y secundarias o de etiología desconocida. Las principales entidades dentro de la MAT primarias son la **púrpura trombocitopénica trombótica** (PTT), en sus variantes congénita y adquirida, y el **síndrome hemolítico urémico** (SHU) asociado a infección por cepas de *E. coli* enterotoxigénica (STEC-SHU) y el SHU atípico (SHUa), consecuencia de una disfunción congénita en las proteínas que regulan la activación de la vía alternativa del complemento. Entre las MAT secundarias se incluyen una gran variedad de procesos y numerosos fármacos. En este trabajo describiremos brevemente los mecanismos fisiopatológicos, las características clínicas y el tratamiento de las MAT, con atención especial a las formas primarias, PTT y SHUa.

Epidemiología

Entre las MAT primarias, la PTT congénita es una entidad muy infrecuente con poco más de un centenar de casos descritos, si bien es posible que esté infradiagnosticada. La forma adquirida de la PTT que es, con mucho, la más frecuente de las dos, es una enfermedad también poco habitual, con una incidencia estimada de unos 6 casos nuevos por millón de habitante y año. Existe un discreto predominio en mujeres (3:2), con un pico de

incidencia en la cuarta década de vida. En algunas series se ha observado una mayor incidencia en la raza africana-caribeña y la obesidad como factor de riesgo¹. La incidencia de STEC-SHU se sitúa en torno a 2 casos por cada 100.000 habitantes en adultos y de 6 casos por cada 100.000 en niños menores de 5 años. El SHUa supone el 5-10 % de todos los SHU y se considera una enfermedad ultra rara.

Microangiopatías trombóticas primarias

Púrpura trombótica trombocitopénica

Como ya se ha comentado, dos son las variantes clínicas descritas de PTT, la adquirida y la congénita. La PTT adquirida se considera, en la actualidad, un trastorno de origen autoinmune. Su aparición se debe al déficit de una metaloproteasa sérica llamada ADAMTS13 que en condiciones fisiológicas actúa fraccionando los multímeros del factor de von Willebrand (FVW) a través de su acción sobre el dominio A2 de esta molécula. Así se evita la formación de multímeros de gran peso molecular que pudieran servir de sustrato para la adhesión y agregación plaquetar en la microcirculación, con el riesgo asociado de oclusión vascular. El desarrollo de anticuerpos (normalmente de clase IgG, pero también pueden ser IgA o IgM) anti-ADAMTS13 supone un bloqueo de la acción de ADAMTS13. Como consecuencia, se forman multímeros ultragrandes del FVW con la adhesión plaquetar subsiguiente a través del complejo glucoprotéico GPIIb-IIIa y la aparición de trombos, oclusión microvascular e isquemia tisular asociada. Las formas congénitas de la PTT son consecuencia de un déficit en la síntesis de ADAMTS13 debido a mutaciones homocigotas o doble heterocigotas del gen de esta enzima².

Clásicamente, para el diagnóstico de PTT se requería la presencia de AHMA, trombocitopenia, síntomas neurológicos, insuficiencia renal y fiebre. Sin embargo, esta asociación se observa únicamente en aproximadamente el 5 % de los pacientes³. Así, las manifestaciones

neurológicas pueden estar ausentes hasta en un 35 % de los casos y el desarrollo de insuficiencia renal es muy variable (10-75 % según las series) y generalmente leve⁴. Por el contrario, la aparición de síntomas derivados de la afectación miocárdica es especialmente grave y con bastante frecuencia infradiagnosticada. La trombocitopenia es una constante de la enfermedad, habitualmente con recuentos inferiores a $30 \times 10^9/L$. Las formas congénitas suelen presentarse en la infancia, aunque pueden aparecer a cualquier edad y presentan un fenotipo variable. Cuando aparecen en la edad adulta suelen estar asociadas a ciertos desencadenantes, como la gestación.

Síndrome hemolítico urémico

Las formas clásicas (STEC-SHU) suelen ir precedidas de un cuadro de diarrea hemorrágica tras una infección, habitualmente intestinal, por cepas enterotoxigénicas de *E. coli* y normalmente son autolimitadas y asociadas a un buen pronóstico. Más rara vez se asocian a infecciones por ciertas cepas de *Streptococcus pneumoniae*, que cursan sin diarrea previa. Estos cuadros suelen cursar con una AHMA de intensidad variable, trombocitopenia y daño renal, siendo esta la manifestación clínica más típicamente presente. Solamente el 5-15 % de los pacientes infectados por cepas de *E. coli* productoras de enterotoxina desarrollan un SHU, lo que hace suponer la necesidad de otros factores coadyuvantes en la aparición de estos cuadros.

El SHUa supone aproximadamente en el 10 % de todos los SHU y es un cuadro muy grave que se acompaña de una elevada mortalidad y un riesgo, también muy alto (hasta en el 50 % de los casos), de desarrollar enfermedad renal terminal incluso en el primer episodio. Se caracteriza por una activación crónica y no controlada de la vía alternativa del complemento a consecuencia de mutaciones en las proteínas que regulan su actividad sobre ella o, más rara vez, por la presencia de autoanticuerpos dirigidos contra proteínas reguladoras de esta vía. La consecuencia es una formación excesiva de C3b o un defecto en su inactivación, lo que provoca una inflamación y una lesión generalizada del endotelio vascular, activación plaquetaria y leucocitaria, y la aparición de trombosis en la microcirculación, lo que explica las manifestaciones clínicas tan variadas que acompañan a este trastorno. Actualmente se conocen más de 120 mutaciones en las proteínas reguladoras responsable de la aparición de SHUa que afectan a cerca de la mitad de estos pacientes, mientras que en los casos restantes no se ha podido, por el momento, identificar ninguna mutación (Tabla 1). En este sentido, cada vez está más aceptada la hipótesis de que el SHUa no es un trastorno exclusivamente monogénico, es decir, que la mutación de un único gen no bastaría para justificar el desarrollo de la enfermedad y que se necesita la acción

de otros factores asociados para desencadenarla. De hecho, estos factores como infecciones, embarazo o ciertos fármacos se han descrito en más del 50 % de los pacientes con SHUa de inicio en la edad adulta^{5,6}.

Tabla 1. Principales reguladores de la vía alternativa del complemento involucrados en el SHU atípico

Proteína	Gen	Prevalencia (%)	Progresión a ERT (%)
Factor H	<i>CFH</i>	20-30	50-60
Factor I	<i>CFI</i>	4-10	60-70
MCP	<i>MCP</i>	10-15	< 10
Factor B	<i>CFB</i>	1-2	60
C3	<i>C3</i>	4-10	70
Trombomodulina	<i>THBD</i>	2-5	20

ERT: enfermedad renal terminal; MCP: proteína del cofactor de membrana.

Microangiopatías trombóticas secundarias

Las MAT secundarias pueden aparecer asociadas a diferentes factores precipitantes como neoplasias, fármacos, infecciones, enfermedades del tejido conectivo, etc. Estas MAT pueden asociarse a la presencia de anticuerpos anti-ADAMTS13 y/o a valores bajos (< 10 %) de esta proteína y, de manera creciente, se están identificando alteraciones en la actividad del complemento en estos pacientes (Tabla 2).

Tabla 2. Causas más frecuentes de desarrollo de microangiopatías trombóticas secundarias

Tipo de desencadenante	
Fármacos	Quinina, motomicina C, gemcitabina, cisplatino, interferón, ticlopidina, clopidogrel, ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, valaciclovir, anticonceptivos orales
Conectivopatías	LES, síndrome antifosfolípido, esclerodermia
Gestación	HELLP, preeclampsia
Infecciones	VIH, H1N1 (Influenza A), <i>S. pneumoniae</i>
Glomerulopatías	
Trasplante	De progenitores hematopoyéticos o de órgano sólido
Neoplasias	Linfoma, SMD, estómago, páncreas, pulmón, otros tumores sólidos
Pancreatitis	

LES: lupus eritematoso sistémico; HELLP: hemólisis, elevación de enzima hepáticos, trombocitopenia; SMD: síndromes mielodisplásicos.

Diagnóstico diferencial de las MAT

Para realizar el diagnóstico de la MAT se requiere una historia clínica detallada, un examen físico del paciente y una serie de pruebas de laboratorio. La historia clínica exhaustiva será el punto inicial clave como enfoque diagnóstico. Así, la presencia de antecedentes de diarrea y la detección de toxina Shiga apoyarán el diagnóstico de SHU típico. También es muy importante conocer antecedentes de neoplasias o tratamientos previos (anticonceptivos, ticlopidina, quinina, etc.) y descartar la gestación en mujeres en edad fértil. Es necesario, así mismo, realizar un examen físico completo que nos permita valorar la presencia de síntomas y signos característicos de la MAT (sangrados, sintomatología neurológica, fiebre, afectación renal o cardíaca, gastrointestinal, etc.). Por último, las pruebas de laboratorio juegan un papel fundamental en el diagnóstico diferencial de una MAT. El hemograma habitualmente presentará trombocitopenia y anemia; la trombocitopenia al diagnóstico suele ser más grave en los pacientes con PTT (cifras de plaquetas entre $10\text{-}30 \times 10^9/\text{L}$) que en los casos con SHU-STECC o SHUA⁷. Es necesario realizar un frotis de sangre para detectar la presencia de esquistocitos, el sello característico de las MAT. Así, la presencia de un esquistocito por cada 100 hematíes en el frotis de sangre periférica es altamente indicativa de MAT. También es característica la presencia de marcadores de AHMA (Coombs directo negativo, reticulocitos y LDH elevados y niveles bajos de haptoglobina), mientras que los tiempos de coagulación habitualmente son normales. La determinación de serologías víricas es también necesaria para descartar MAT secundaria a infección por VIH u otros virus (Tabla 3).

Actividad de ADAMTS13

La determinación de los niveles plasmáticos de ADAMTS13 se ha convertido en la actualidad en la prueba de laboratorio fundamental para un adecuado diagnóstico diferencial de la MAT. La detección de una disminución de la actividad de ADAMTS13 inferior al 5-10 % de su valor junto a la presencia de inhibidores o autoanticuerpos anti-ADAMTS13 confirma el diagnóstico de PTT adquirida. Unos niveles bajos de actividad de ADAMTS13 (<5-10 %) pero sin la presencia de inhibidores circulares es compatible con el diagnóstico de las formas congénitas de PTT. La especificidad de una deficiencia grave de ADAMTS13 (<5 %) en la distinción entre una PTT y SHU es del 90 %⁸. En otras MAT secundarias y en el SHU atípico suelen aparecer niveles de actividad de ADAMTS13 descendidos, pero su valor suele estar entre el 10 % y el 40 % y no se observan anticuerpos circulantes anti-ADAMTS13 (Figura 1). La detección de la enterotoxina de *E. coli*, bien en muestra de heces o por técnicas de PCR, es indicativa de un

Tabla 3. Pruebas de laboratorio para el diagnóstico diferencial de una microangiopatía trombótica

Pruebas de urgencia
Hemograma y reticulocitos
Frotis de sangre periférica (esquistocitos)
Pruebas de coagulación
LDH
Función renal y hepática
Coombs directo
Troponinas
Test de embarazo
Coprocultivo/toxina Shiga
Pruebas cuyos resultados se obtienen en días
Actividad e inhibidor de ADAMTS13
Haptoglobina
Serología para los virus de la inmunodeficiencia humana y hepatitis B y C
Cribado de enfermedades autoinmunitarias: anticuerpos antinucleares, anti-ADN, anti-antígeno nuclear extraíble
Niveles plasmáticos de vitamina B12, homocisteína en plasma y niveles plasmáticos y urinarios de ácido metilmalónico
Pruebas cuyos resultados se obtienen en semanas
Proteínas y actividad del complemento (C3, C4, CH50, factor I, factor H, factor B)
Autoanticuerpos antifactor H

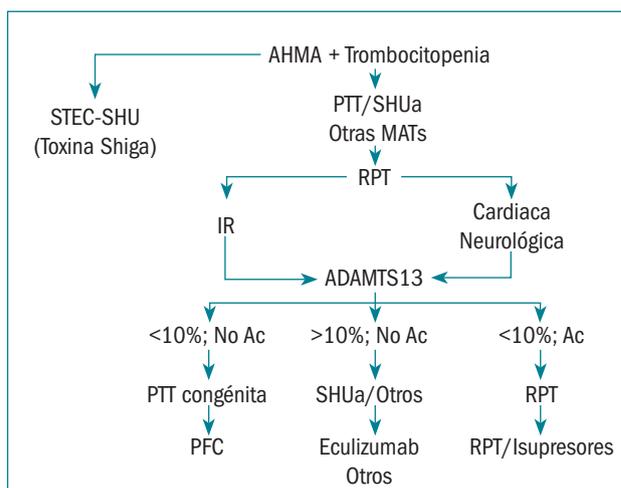


Figura 1. Orientación diagnóstica y terapéutica de un paciente con microangiopatía trombótica (AHMA: anemia hemolítica microangiopática; PTT: púrpura trombocitopénica trombótica; STEC-SHU: síndrome hemolítico urémico asociado a toxina Shiga; SHUA: síndrome hemolítico urémico atípico; IR: insuficiencia renal; Ac: anticuerpos; PFC: plasma fresco congelado; RPT: recambios plasmáticos terapéuticos; Isupresores: inmunosupresores).

STEC-SHU. Finalmente, la presencia de niveles normales o levemente descendidos de ADAMTS13 sin anticuerpos dirigidos contra esta enzima y con estudio de toxina Shiga asimismo negativo debe hacernos pensar que estamos ante una MAT secundaria o ante un caso de SHUa.

El diagnóstico de SHUa deberá sospecharse especialmente cuando se hayan excluido otras causas secundarias de MAT o cuando el tratamiento administrado no se acompañe de una mejoría de la disfunción orgánica o de una normalización de la trombocitopenia y los parámetros de hemólisis en un tiempo razonable. En estos casos hay que realizar el estudio oportuno para detectar la posible presencia de mutaciones en las proteínas de la vía alternativa del complemento, que confirmarán el diagnóstico. Es muy importante, sin embargo, subrayar que estos resultados pueden tardar más de dos meses en estar disponibles, por lo que no deben condicionar la decisión de administrar tratamiento específico a un paciente cuando los signos y síntomas clínicos sean muy sugestivos de SHUa, sin olvidar tampoco que, como ya se ha mencionado, hasta en el 50 % de los pacientes con SHUa no se detecta ninguna alteración en estas proteínas.

TRATAMIENTO DE LAS MAT

Tratamiento de la PTT

La PTT debe ser considerada como una emergencia médica y su tratamiento administrarse de manera inmediata, preferiblemente en las primeras 4-8 horas tras el diagnóstico, ya que la demora en el inicio de la terapia es el factor con mayor impacto en la supervivencia global de estos pacientes.

El tratamiento de primera línea incluye los recambios plasmáticos terapéuticos (RPT) empleando plasma fresco congelado (PFC) como solución de reposición. Este tratamiento ha permitido reducir las tasas de mortalidad del 90 % observada previamente al uso generalizado de los RPT al 10-20 % actual. Los RPT se han mostrado, asimismo, superiores a la infusión de plasma en cuanto a la tasa de respuestas y la supervivencia global⁹ y solo en el caso de que no pudiera iniciarse el RPT se infundiría plasma a dosis de 25-30 mL/kg a la espera de comenzar con los recambios. No se ha establecido un régimen óptimo, aunque existe consenso en cuanto a realizar los RPT diariamente y recambiar 1,5 veces el volumen plasmático del paciente por día hasta alcanzar una respuesta completa, definida como un recuento plaquetar superior a $150 \times 10^9/L$. Solo en casos graves que presenten un curso progresivo o refractario, afectación neurológica o cardíaca podrían utilizarse regímenes más intensivos tales como RPT cada 12 horas, aunque no existen datos sólidos que demuestren que esta aproxi-

mación resulte especialmente útil. Existe alguna controversia en relación con el tipo de plasma que utilizar como solución de reposición durante los recambios, habiendo diferentes estudios que avalan la superioridad del uso de plasma congelado sin inactivadores frente al plasma inactivado con azul de metileno, estando este último asociado a un mayor número de RPT y consumo de plasma para alcanzar la remisión¹⁰.

El uso combinado de corticoides junto a RPT también se considera estándar en el tratamiento de primera línea de los pacientes con PTT adquirida dada la base inmune de la enfermedad. La dosis recomendada es prednisolona 1 mg/kg/día, aunque hay estudios que muestran mayores respuestas a dosis mucho más elevadas.

Rituximab, un anticuerpo monoclonal anti-CD20, al igual que en otras enfermedades autoinmunes, ha mostrado su eficacia en la PTT refractaria o en recaída, aconsejándose su uso en asociación con RPT en estos casos. La dosis habitualmente administrada es de 375 mg/m²/semana durante 4 semanas, aunque se han observado respuestas con dosis inferiores. Algunos grupos apoyan el uso de rituximab incluso en fases iniciales de la enfermedad al asociarse a respuestas más precoces y menor frecuencia de recaídas¹¹, o en pacientes en situación clínica de mayor gravedad como afectación cardíaca o neurológica; sin embargo, la evidencia clínica que apoya estas recomendaciones es muy escasa y actualmente no puede recomendarse el uso de este agente para el tratamiento de primera línea de los pacientes con PTT.

Otros agentes inmunosupresores, como ciclosporina o tacrolimus, también han mostrado eficacia, aunque con pérdida de respuesta tras el cese del tratamiento, y su uso en la actualidad queda relegado para aquellos pacientes que no toleran (o en los que esté contraindicado) el uso de rituximab. Por último, la esplenectomía actualmente está prácticamente en desuso.

Algunos autores han aconsejado el uso de aspirina en pacientes con cifras de plaquetas superiores a $50 \times 10^9/L$, si bien hoy en día no hay datos que avalen su uso rutinario. En la actualidad están en desarrollo nuevas terapias para los pacientes con PTT, entre las que destacan los nanoanticuerpos anti-FVW como el caplazumab, que ha demostrado importante actividad terapéutica en estudios fase II y que podría incorporarse como tratamiento complementario de los RPT en un futuro próximo.

En cuanto al tratamiento de los pacientes con PTT congénita, está indicada la administración periódica de plasma a dosis de 10-15 mL/kg, si bien la frecuencia de su administración debe individualizarse de acuerdo al fenotipo del paciente.

Tratamiento del SHUa

El uso del RPT en el SHUa se basa en el hecho de que dicha terapia elimina las proteínas del complemento

Tabla 4. Dosificación de eculizumab en pacientes menores de 18 años con síndrome hemolítico urémico atípico

Peso (kg)	Fase inicial	Fase de mantenimiento
> 40	900 mg semanales x 4 dosis	1.200 mg la 5ª semana; después, 1.200 mg cada 2 semanas
30 -< 40	600 mg semanales x 2 dosis	900 mg la 3ª semana; después, 900 mg cada 2 semanas
20 -< 30	600 mg semanales x 2 dosis	600 mg la 3ª semana; después, 600 mg cada 2 semanas
10 -< 20	600 mg semanales x 1 dosis	300 mg la 2ª semana; después, 300 mg cada 2 semanas
5 -< 10	300 mg semanales x 1 dosis	300 mg la 2ª semana; después, 300 mg cada 3 semanas

defectuosas y, en aquellos casos en los que existan, los anticuerpos contra los factores reguladores, especialmente el factor H (CFH), a la vez que aporta factores del complemento exógeno normal. Las guías de la Sociedad Americana de Aféresis indican el uso de RPT como primera línea para pacientes con autoanticuerpos anti-CFH y de segunda línea para otras mutaciones del complemento. La excepción es la mutación en la proteína del cofactor de membrana, ya que al encontrarse en la membrana celular y no estar en el plasma los RPT no han mostrado beneficio en estos pacientes¹². A pesar del tratamiento con RPT, la tasa de respuesta es muy variable, dependiendo de la causa subyacente y, sobre todo, no se evita la activación incontrolada y crónica del complemento, por lo que persiste el daño endotelial que se asocia a daño orgánico crónico. En la actualidad disponemos de un anticuerpo quimérico humanizado capaz de inhibir la conversión de C5 a C5a. Diversos trabajos empleando este anticuerpo (eculizumab) en pacientes con SHUa han demostrado la capacidad de suspender el tratamiento con PFC en la mayoría de los pacientes con la desaparición de signos de actividad de la enfermedad (trombocitopenia o signos de anemia microangiopática), y ha permitido incluso en algunos pacientes recuperar la función renal e interrumpir el tratamiento de diálisis que estaban recibiendo. Hay que destacar que previamente al inicio del tratamiento con eculizumab el paciente debe ser vacunado frente a *Neisseria meningitidis*. Asimismo, debe subrayarse que eculizumab bloquea la activación descontrolada del complemento pero no corrige la alteración genética responsable de esta activación, por lo que el tratamiento, una vez iniciado, debe mantenerse de manera indefinida, habiéndose descrito recaídas del SHUa en la mayoría de pacientes en los que se interrumpió el tratamiento. Dados estos resultados tan esperanzadores, se recomienda en pacientes pediátricos iniciar eculizumab una vez descartado el SHU asociado a la toxina Shiga. En adultos es mucho más difícil llegar al diagnóstico de SHUa, de modo que se recomienda iniciar el tratamiento con RPT con PFC hasta completar el diagnóstico. Si tras el tratamiento inicial se han descartado otras causas de MAT sin obtener respuesta se debe comenzar tratamiento con eculizumab. La **Tabla 4**

muestra la posología recomendada de eculizumab en pacientes con SHUa¹³.

Conclusiones

Las MAT son un conjunto heterogéneo de trastornos con datos clínicos y analíticos muy similares pero con hallazgos fisiopatológicos y tratamientos diferentes. Dada la gravedad de muchos de estos cuadros, debe considerarse el inicio precoz del tratamiento con RPT hasta poder establecer un diagnóstico etiológico definitivo que confirme o descarte la utilidad de este procedimiento. Asimismo, el mayor conocimiento de los mecanismos de desarrollo de algunas de estas MAT, como la PTT y el SHUa, ha permitido adaptar las terapias disponibles y mejorar considerablemente el pronóstico de estos pacientes. Precisamente, la disponibilidad de tratamientos dirigidos en algunos de estos procesos, como el eculizumab en los pacientes con SHUa, exigen de los servicios de Hematología el diseño de estrategias que permitan realizar un diagnóstico diferencial e iniciar un tratamiento específico lo más rápidamente posible, lo que evitará potenciales complicaciones a largo plazo y redundará, con toda seguridad, en una mejoría del pronóstico de estos pacientes.

Bibliografía

- Said A, Haddad RY, Stein R, Lerma EV. Thrombotic thrombocytopenic purpura. *Dis Mon.* 2014;60:500-4.
- Contreras E, De la Rubia J, Del Río-Garma J, Díaz-Ricart M, García-Gala JM, Lozano M, por el Grupo Español de Aféresis. Guía diagnóstica y terapéutica de las microangiopatías trombóticas del Grupo Español de Aféresis *Med Clin.* 2015;144:331.e1-331.e13.
- Sayani FA, Abrams CS. How I treat refractory thrombotic thrombocytopenic purpura *Blood.* 2015. pii: blood-2014-11-551580.
- Scully M, Hunt BJ, Benjamin S, Liesner R, Rose P, Peyvandi F, et al. British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the diagnosis and management of thrombotic thrombocytopenic purpura and other thrombotic microangiopathies. *Br J Haematol.* 2012;158:323-35.
- Sinkovits G, Prohászka Z. Update on the role of the complement system in the pathogenesis of thrombotic microangiopathies. *Prilozi.* 2014;35:115-22.
- Noris M, Remuzzi G. Atypical hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med.* 2009;361:1676-87.

7. Tuncer HH, Oster RA, Huang ST, Marques MB. Predictors of response and relapse in a cohort of adults with thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome: a single-institution experience. *Transfusion*. 2007;47:107-14.
8. Zheng XL, Kaufman RM, Goodnough LT, Sadler JE. Effect of plasma exchange on plasma ADAMTS13 metalloprotease activity, inhibitor level, and clinical outcome in patients with idiopathic and nonidiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2004;103:4043-9.
9. Rock GA, Shumak KH, Buskard NA, Blanchette VS, Kelton JG, Nair RC, et al. Canadian Apheresis Study Group. Comparison of plasma exchange with plasma infusion in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med*. 1991;325:393-977.
10. De la Rubia J, Arriaga F, Linares D, Larrea L, Carpio N, Marty ML, et al. Role of methylene blue-treated or fresh-frozen plasma in the response to plasma exchange in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*. 2001;114:721-3.
11. Froissart A, Buffet M, Veyradier A, Poullin P, Provôt F, Malot S, et al. Efficacy and safety of first-line rituximab in severe, acquired thrombotic thrombocytopenic purpura with a suboptimal response to plasma exchange. Experience of the French Thrombotic Microangiopathies Reference Center. *Crit Care Med*. 2012;40:104-11.
12. Schwartz J, Winters JL, Padmanabhan A, Balogun RA, Delaney M, Linenberger M, et al. Guidelines on the use of therapeutic apheresis in clinical practice-evidence-based approach from the Writing Committee of the American Society for Apheresis: the sixth special issue. *J Clin Apher*. 2013;28:145-284.
13. Keating GM. Eculizumab: a review of its use in atypical haemolytic uraemic syndrome. *Drugs*. 2013;73:2053-66.

Nueva clasificación citogenética y molecular de los síndromes mielodisplásicos

FRANCESC SOLÉ

Institut de Recerca contra la Leucèmia Josep Carreras (IJC). Campus ICO-GTIP (Badalona). Barcelona

Introducción

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) comprenden un conjunto de insuficiencias medulares crónicas relativamente frecuentes en la práctica diaria. En general, se manifiestan en personas mayores de 50 años de edad, suelen expresarse en forma de mono, bi o pancitopenia con alteraciones morfológicas y dishemopoyéticas que en un porcentaje variable (20-30 %) evolucionan a una leucemia aguda (LA).

Los SMD son un grupo heterogéneo de neoplasias hematopoyéticas clonales caracterizadas por una diferenciación y maduración celular anómala. Cursan, generalmente, con pancitopenia, médula normo o hiper celular y con una hematopoyesis intensamente alterada en el ámbito morfológico y/o funcional. Presentan un curso clínico variable, con una supervivencia mediana inferior a 2 años que está en estrecha relación con el subgrupo de SMD y, frecuentemente, evoluciona a LA (Greenberg y cols., 1997).

Los SMD se deben a una alteración clonal de las células hematopoyéticas pluripotentes, según se ha podido estudiar con técnicas de biología molecular. Actualmente, se acepta que los SMD se originan como consecuencia de la acumulación de sucesivas lesiones genómicas de las células germinales hematopoyéticas.

El diagnóstico es, esencialmente, morfológico y se basa en la presencia de rasgos displásicos en sangre y médula ósea. Los SMD inciden principalmente en la población adulta, por encima de los 50 años de edad.

Los estudios citogenéticos proporcionan una importante ayuda pronóstica. En la mitad de los pacientes se observan alteraciones citogenéticas y pueden alcanzar el 80 % en los SMD secundarios. La mitad de las anomalías corresponden a hiperdiploidías y el resto son hipodiploidías y cariotipos complejos. La detección de translocaciones equilibradas es muy poco frecuente, pero es muy importante para encontrar nuevos genes implicados en esta enfermedad.

Las principales alteraciones citogenéticas son: deleción 5q, monosomía 7 o deleción 7q, trisomía 8,

deleción 20q, deleción 11q, deleción 12p... Además, las principales anomalías citogenéticas presentan una importante correlación citológica (Tablas 1 y 2).

La detección de alteraciones citogenéticas es un hallazgo importante para el diagnóstico final y el pronóstico de la patología; sin embargo, solo un 50 % de los casos presenta alteraciones cromosómicas, de forma que el 50 % restante (que presenta un cariotipo normal) requiere técnicas diagnósticas adicionales, como la hibridación *in situ* fluorescente (FISH), para poder determinar la posible presencia de alteraciones cromosómicas. La aplicación de técnicas adicionales en aquellos casos que presentaban un cariotipo complejo, normal o sin divisiones ha demostrado que se pueden detectar hasta en un 15 % de los casos alteraciones crípticas, no detectadas por citogenética convencional.

Una de las alteraciones citogenéticas más frecuentes en los SMD *de novo* es la deleción intersticial del brazo largo del cromosoma 5, lo que supone un 10-15 % de

Tabla 1. Principales anomalías citogenéticas con utilidad diagnóstica

Más frecuentes	Otras alteraciones
5q-, del(5q)	t(1;3)(p36;q21)
7q-, del(7q) y -7	t(1;7)(p11;p11)
+8	t(2;11)(p21;q23)
i(17)(q10)	inv(3)(q21q26), t(3;3)(q21;q26)
del(20)(q11q13)	del(9)(q13q22)
-Y	del(11q)
	+11
	12p-, del(12p)
	+13
	13q-
	-18/18q-
	-20
	+21

Tabla 2. Principales anomalías citogenéticas con utilidad para diagnóstico diferencial

Alteraciones citogenéticas sugestivas de SMD en casos con citopenia persistente pero en ausencia de rasgos morfológicos definitivos de SMD:	
-5/5q-	t(11;16)(q23;p13)
-7/7q-	t(3;21)(q26;q22)
i(17)(q10), del(17p)	t(1;3)(p36;q21)
-13, del(13q)	t(2;11)(p21;q23)
del(12p)	inv(3)(q21q26)
del(9q)	t(6;9)(p23;q34)
idic(X)(q13)	
Complejo con alguna de las alteraciones anteriores	

los SMD (Solé y cols., 2005; Haase y cols., 2007; Mallo y cols., 2011; Schanz y cols., 2012). La delección de 5q puede presentarse como alteración aislada o asociada a alteraciones citogenéticas. El 5q- como única alteración junto con rasgos característicos en médula ósea constituye una nueva entidad, reconocida por la OMS, dentro de los SMD, como “SMD con del (5q) aislada“. El término “síndrome 5q-“ se utiliza para designar un subgrupo de casos con anemia macrocítica, plaquetas normales o elevadas e hipoplasia eritroide en médula ósea.

Actualmente hay un nuevo fármaco en el mercado, la lenalidomida, dirigido a aquellas personas con SMD y que como alteración citogenética presentan un 5q-. Ensayos clínicos han demostrado que el fármaco es eficaz en SMD con 5q- como única alteración y acompañada de otras anomalías citogenéticas. La lenalidomida ha demostrado ser muy activa en pacientes con SMD portadores de la delección 5q, dando una independencia transfusional y una respuesta citogenética en el 70 % de los pacientes tratados.

Citogenética convencional e hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

El 50 % de los pacientes diagnosticados de SMD presentan alteraciones citogenéticas. La determinación de estas anomalías se lleva a cabo, inicialmente, mediante la técnica de citogenética convencional, que permite la visualización de todos los cromosomas. En ocasiones el resultado es el de un cariotipo normal; en dichos casos se procede a la aplicación de la técnica de FISH para detectar alteraciones citogenéticas específicas en núcleos en interfase (Haferlach y cols., 2008; Mallo y cols., 2008). La **Tabla 3** muestra el protocolo de estudio de los SMD.

Microarrays genómicos

Los microarrays genómicos se utilizan para el estudio de alteraciones en el número de copias de ADN o

Tabla 3. Protocolo de estudio genético de los SMD

Obligatorio
<ul style="list-style-type: none"> • Estudio citogenético convencional (gold standard). • En los casos en que no tienen divisiones o menos de 10 metafases adecuadas para el análisis, aplicar FISH con 5q y 7q sondas, centromérica de 8 y 20q o considerar la aplicación de CGH array / SNP. • Aplicar FISH para el seguimiento de la enfermedad residual mínima. • Aplicar la sonda FISH 5q- en los casos en que no se detecta 5q- que cumplan con los siguientes requisitos: <ul style="list-style-type: none"> - Sospecha de síndrome 5q. - Ausencia de metafases adecuado para el análisis. - Cariotipo alterada con el cromosoma 5 participación pero sin evidencia de 5q (por ejemplo, monosomía 5). - Cariotipo complejo.
Opcional
<ul style="list-style-type: none"> • Cariotipo complejo: aplicar M-FISH o SKY. • En pacientes con ausencia de divisiones o menos de 10 metafases analizadas se recomienda el estudio mediante CGH o SNP arrays.
Recomendado
<ul style="list-style-type: none"> • Conservación de las muestras biológicas en el tumor/Banco de Tejidos.

para el estudio del genotipo mediante cambios en un único nucleótido (SNP, *single nucleotide polymorphism*). De microarrays genómicos se distinguen dos tipos: microarrays de hibridación genómica comparada (HGC) y de SNP. Los microarrays de SNP permiten detectar, además de cambios en el número de copias, pérdidas de heterocigosidad. La técnica de arrays de CGH/SNP tiene como ventaja su elevada resolución, eficaz en la detección de cambios genéticos pequeños que nos permitirá localizar genes candidatos específicos en los SMD. Además, permite obtener importantes resultados en un único estudio. En la bibliografía podemos encontrar diferentes estudios que aplican la técnica de microarrays genómicos en los SMD (Gondek y cols., 2008; Thiel y cols., 2011; Tiu y cols., 2011) y han mostrado que la aplicación de técnicas con una mayor resolución permite la detección de alteraciones adicionales a las ya detectas por citogenética convencional o, en aquellos casos sin alteraciones citogenéticas, la detección de alteraciones crípticas.

Este conocimiento contribuirá no solo a un mejor tratamiento de los pacientes, pudiéndoles ofrecer una terapia que se ajuste a las características de su enfermedad, sino que también permitirá un mejor diagnóstico de los pacientes estudiados atendiendo a sus características genéticas.

Recientes estudios sobre con CGH array (o SNP arrays) han demostrado que el 87 % de los pacientes con SMD presentan alteraciones citogenéticas o que el 60 % de los pacientes con cariotipo normal presentan ganancias o pérdidas de material genético.

Si bien los arrays de expresión son una herramienta de investigación, la CGH array o SNP arrays formarán pronto parte de las técnicas que deberán incluir los laboratorios de citogenética para utilizarlas en el diagnóstico de las neoplasias hematológicas. Las principales ventajas de estas metodologías son que no requieren células en división, que permiten detectar ganancias y pérdidas de material genético (estas son las principales alteraciones en los pacientes con SMD), que permiten detectar cambios genéticos con una mayor resolución (0,5 Mb frente las 10 Mb de la citogenética convencional) y además la técnica de SNP arrays permite detectar UPD, cambios genéticos que pueden aportar mucha información sobre la etiología de los SMD. Sin embargo, también tienen ciertas limitaciones, entre las que hay que destacar que si la proporción de células tumorales es inferior al 30 % no se detectarán alteraciones genéticas del clon patológico, que no detectan translocaciones equilibradas (poco frecuentes en los SMD, 1 % y muy frecuentes en otras patologías como las leucemias agudas o linfomas) y que tienen coste económico algo más elevado.

Los estudios preliminares utilizando dicha metodología abalan su utilidad. En el año 2007, Gondek y cols., presentaron un estudio sobre pacientes con SMD en los que comparaban los hallazgos citogenéticos detectados por citogenética convencional (cariotipo) frente a SNP arrays. Observaron que mediante SNP arrays el 80 % de los pacientes presentaban alteraciones citogenéticas frente al 50 % de la citogenética convencional, y además en el 68 % de los pacientes con citogenética normal con SNP arrays se detectaban alteraciones citogenéticas. De 5 pacientes que no presentaron mitosis por citogenética, 4 (80 %) presentaron alteraciones citogenéticas por arrays. Además, en el 33 % de los pacientes se observaron LOH o UPD. Un reciente trabajo de Arenillas y cols., sobre una serie de 62 pacientes sin resultado citogenético demuestra mediante la aplicación de los SNP arrays que el 40 % de los pacientes presenta alteraciones citogenéticas y que el resultado detectado con dicha anomalía permite estratificar los pacientes según el IPSS e IPSS-R (Arenillas y cols., 2013).

Estos resultados y su relativo coste económico hacen plantearse la necesidad de aplicar la CGH/SNP arrays en aquellos casos que no sean informativos (ausencia de metafases o cariotipo normal) mediante citogenética convencional.

Aún existen pocas series para establecer el valor pronóstico de las alteraciones citogenéticas detectadas por CGH/SNP arrays, y la nueva propuesta de revisión del IPSS se basará únicamente en los cambios detectados por citogenética convencional.

Secuenciación, next generation sequencing (NGS)

La secuenciación del genoma humano gracias a los secuenciadores de nueva generación está permitiendo

detectar nuevos marcadores genéticos asociados a patologías. La aplicación de la secuenciación a una patología como los SMD, que solo presentan alteraciones citogenéticas en el 50 % de los pacientes con las técnicas convencionales, permitirá demostrar nuevos genes relacionados con el origen de dicha enfermedad. La técnica de secuenciación hasta el momento se ha aplicado en pocos pacientes afectados de otras neoplasias y su uso en SMD es muy limitado (Graubert y cols., 2009, Bejar y cols., 2011; Papaemmanuil y cols., 2011; Yoshida y cols., 2011; Haferlach y cols., 2014) (Tabla 4). Hasta el momento se han realizado estudios aplicando la metodología de la NGS que permite estudiar una selección de genes más implicados en los SMD. Los estudios preliminares han permitido detectar alteraciones moleculares en aproximadamente el 70-80 % de los pacientes. Además, se ha demostrado que dichas alteraciones conllevan valor pronóstico (Tabla 4). En el seno del grupo internacional de estudio de los SMD, IWG-PM (MDS

Tabla 4. Resumen de las principales anomalías moleculares y su valor pronóstico

Gen	Incidencia (%)	Pronóstico
TET2	20	Bueno
ASXL1	14,4	Bueno
RUNX1	8,7	Malo
TP53	7,5	Malo
EZH2	6,4	Malo
NRAS	3,6	Malo
JAK2	3	Intermedio
ETV6	2,7	Malo
CBL	2,3	Malo
IDH2	2,1	Malo
NPM1	1,8	Intermedio
IDH1	1,4	Bueno
KRAS	0,9	Intermedio
GNAS	0,7	Desconocido
PTPN11	0,7	Desconocido
BRAF	0,5	Desconocido
PTEN	0,2	Desconocido
CDKN2A	0,2	Desconocido

ASXL1: additional sex-comb-like-1; BRAF: v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1; CBL: casitas B-cell lymphoma; CDKN2A: Cyclin-dependent kinase; ETV6: ets variant; EZH2: enhancer of zeste homolog 2; GNAS: GNAS complex locus; IDH1: isocitrate dehydrogenase gene 1; IDH2: isocitrate dehydrogenase gene 2; JAK2: janus kinase 2; KRAS: v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog; NPM1: nucleophosmin gene; NRAS: neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog.; PTEN: phosphatase and tensin homolog; PTPN11: protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11; RUNX1: transcriptional core binding factor family name; TET2: ten eleven translocation-2; TP53: protein P53.

Foundation) se está realizando un proyecto multicéntrico para definir el patrón molecular de una amplia serie de pacientes con SMD y determinar su valor pronóstico; dicho *score* se llamará IPSS-M.

Consideraciones finales

- El estudio del cariotipo (citogenética convencional) se debe realizar siempre antes la sospecha diagnóstica de SMD.
- El resultado citogenético es el parámetro con mayor peso en el pronóstico de los SMD (IPSS-R, Greenberg y cols., 2012).
- En pacientes en los que el estudio citogenético falla se recomienda el estudio por CGH o SNP arrays, ya que sus resultados sirven para aplicar el IPSS-R.
- Se recomienda el panel de los principales genes mutados en SMD mediante NGS para definir el pronóstico de los pacientes.

Bibliografía

1. Arenillas L, Mallo M, Ramos F, Guinta K, Barragán E, Lumbreras E, et al. Single nucleotide polymorphism array karyotyping, a diagnostic and prognostic tool in primary myelodysplastic syndromes with unsuccessful conventional cytogenetic testing. *Genes Chromosomes and Cancer*. Oct 7. doi: 10.1002/gcc.22112. [Epub ahead of print]. PMID 24123380.
2. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, García-Manero G, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*. 2011;364:2496-506.
3. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. The French-American-British Cooperative Group: Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 1982;51:18999.
4. Brunning RD, Orazi A, Germing U, Le Beau MM, Porwit A, Baumann I. Myelodysplastic Syndromes. En: Swerdlow SH, Campo E, Lee Harris N, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, editors. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC, Lyon. 2008; pp. 87-107.
5. Gondek LP, Tiu R, O'Keefe CL, Sekeres MA, Theil KS, Maciejewski JP. Chromosomal lesions and uniparental disomy detected by SNP arrays in MDS, MDS/MPD, and MDS-derived AML. *Blood*. 2008;111:1534-42.
6. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, García-Manero G, Solé F, et al. Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R) for Myelodysplastic Syndromes. *Blood*. 2012;120(20):2454-65.
7. Haase D, Germing U, Schanz J, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Hildebrandt B, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood*. 2007;110:4385-95.
8. Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, Okuno Y, Bacher U, Nagae G, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2014;28(2):241-7.
9. Papaemmanuil E, Cazzola M, Boultonwood J, Malcovati L, Vyas P, Bowen D, et al. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N Engl J Med*. 2011;365:1384-95.
10. Schanz J, Tuechler H, Solé F, Mallo M, Luño E, Cervera J, et al. A new, comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes and oligoblastic AML leukemia following MDS derived from an international database merge. *Journal Clinical Oncology*. 2012;30(8):820-9.
11. Solé F, Luño E, Sanzo C, Espinet B, Sanz GF, Cervera J, et al. Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2005;90:1168-78.
12. Tiu RV, Gondek LP, O'Keefe CL, Elson P, Huh J, Mohamedali A, et al. Prognostic impact of SNP arrays karyotyping in myelodysplastic syndromes and related myeloid malignancies. *Blood*. 2011;117:4552-60.
13. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 2011;478:64-9.

Células madre e ingeniería de tejidos

FELIPE PROSPER

Servicio de Hematología y Terapia Celular. Clínica Universitaria de Navarra. Universidad de Navarra. Pamplona

Células madre

Las células madre o troncales son aquellas capaces de dividirse indefinidamente y de diferenciarse en respuesta a señales específicas, dando lugar a diversos tipos de células especializadas funcionales. Generalmente, de las células madre se originan uno o varios tipos celulares intermedios antes de alcanzar el estado totalmente diferenciado propio del tejido adulto. Estos estadios intermedios de diferenciación se conocen con el nombre de “células precursoras” o “células progenitoras”. Otra característica fundamental que comparten todas las células madre es que son capaces de generar copias idénticas de sí mismas durante largos periodos de tiempo, es decir, presentan capacidad de autorrenovación a largo plazo.

Las células madre se han clasificado, fundamentalmente, de acuerdo con dos criterios: el tejido de procedencia del cual son aisladas y su potencial de diferenciación, es decir, su capacidad para producir distintos tipos de tejidos y células. Respecto al tejido del que son aisladas, podemos distinguir las células madre embrionarias (ESC, del inglés *embryonic stem cells*), que forman la masa celular interna de embriones en estadio de blastocisto, aproximadamente 5 días después de la fertilización, las células madre somáticas o de adulto, derivadas de distintos tejidos del organismo adulto o posnatal, y las células madre germinales, aisladas de fetos a partir de la cresta germinal, de la región que dará lugar a las gónadas.

En cuanto a su potencial de diferenciación, se pueden distinguir células madre totipotentes, pluripotentes o multipotentes, aunque estos dos últimos términos a menudo se usan de modo confuso en la literatura científica. Las células madre totipotentes son aquellas capaces de dar lugar a todos los tipos celulares del organismo adulto (derivados de tejido embrionario), así como todos los tipos celulares derivados del tejido extraembrionario (placenta). Las células madre pluripotentes pueden originar células propias de las tres capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo), pero no son capaces de formar tejido placentario. Por

último, células madre multipotentes son aquellas capaces de producir tipos celulares propios de la misma capa embrionaria de la que proceden o, a lo sumo, de dos de las capas, generalmente en concordancia con su localización en los tejidos adultos. En determinados casos, sin embargo, una vez extraídas fuera de sus localizaciones naturales, también se ha descrito cierta capacidad de transdiferenciación hacia células propias de su nueva localización.

En los últimos años se ha descrito la presencia de células madre en numerosos órganos y tejidos (médula ósea, sangre periférica y de cordón umbilical, cerebro, médula espinal, pulpa dentaria, vasos sanguíneos, músculo esquelético, epitelio del tubo digestivo, epidermis, córnea, retina, hígado, páncreas, tejido adiposo, folículo piloso, glándula mamaria, ovario, próstata y testículos). Entre las principales funciones de estas células destaca, con limitaciones y diferencias de unos tejidos a otros, el reemplazo de las células del tejido que mueren de forma natural, como parte de la propia homeostasis de dicho tejido, o a causa de una lesión o enfermedad.

Aplicaciones de la terapia celular

La utilización de células madre como estrategia para la reparación o regeneración de tejidos es una de las áreas de investigación en biomedicina que mayor interés ha despertado en los últimos años. El concepto de la “medicina regenerativa”, basada en la utilización de las células del propio organismo, está adquiriendo cada vez más fuerza. Sin embargo, para la mayoría de patologías más complejas, la aplicación de estas estrategias se encuentra aún lejos de formar parte de la práctica clínica habitual, pues solo se han iniciado ensayos clínicos en algunos de los casos.

Idealmente, las células madre pueden contribuir a la regeneración de tejidos dañados *in vivo*, dada su amplia capacidad de autorrenovación y su potencial para generar progenitores específicos de cada tejido. El uso de las células madre y sus progenitores supone una estrategia prometedora en el ámbito de la terapia celular

y génica de diversas enfermedades degenerativas. Del mismo modo, podrían servir como eficaces adyuvantes para inmunoterapia en algunos tipos de cáncer. La enfermedad de Parkinson, el Alzheimer, enfermedades musculares degenerativas, el fallo cardíaco y el hepático crónico, la diabetes de tipos 1 y 2, así como trastornos de la piel, del riñón, oculares y del sistema hematopoyético podrían ser tratados mediante terapias basadas en el empleo de células madre (Tabla 1).

Enfermedades cardiovasculares

Con excepción del trasplante de células hematopoyéticas en pacientes con enfermedades hematológicas y oncológicas, las enfermedades cardiovasculares figuran como la segunda indicación más extendida de utilización de la terapia celular con células madre. La pérdida

de miocitos ocurre en distintas cardiopatías, como el infarto agudo de miocardio (IAM), la cardiopatía isquémica crónica, la miocarditis y las miocardiopatías. La capacidad que tienen los miocitos adultos de multiplicarse y regenerar el tejido cardíaco dañado es escasa y, si bien existen células progenitoras endógenas (CSC, del inglés *cardiac stem cells*), su capacidad para mantener la homeostasis del corazón y regenerar el tejido afectado tras hipertrofia o fallo cardíaco es también insuficiente. En último término, el déficit estructural y funcional conduce a una insuficiencia cardíaca permanente. Es necesario, por tanto, buscar fuentes alternativas de células para revascularizar y recuperar el tejido muscular necrosado tras un infarto. Así, son diversos los tipos celulares que se han ensayado de forma experimental, como las células embrionarias, las iPS y células derivadas de tejidos adultos, tales como la médula

Tabla 1. Posibles aplicaciones terapéuticas de las células madre de individuo adulto

Enfermedad susceptible de tratamiento basado en terapia celular	Fuente de células madre para terapia celular	Células derivadas
Enfermedades del sistema hematopoyético y leucemias	HSC de médula ósea o de sangre de cordón umbilical	Células de las líneas mieloide y linfoide, plaquetas
	Células madre derivadas del músculo	
Enfermedades hepáticas	HSC de la médula ósea o de sangre de cordón umbilical	Hepatocitos
	Células ovasales	
Enfermedades musculares	MSC de médula ósea o de sangre de cordón umbilical	Mioblastos Células musculares
	Células madre derivadas del músculo	
Osteoporosis, osteogénesis imperfecta y osteoartritis	MSC	Osteoblastos y condrocitos
	ADSC	
Enfermedades vasculares	MAPC	Células endoteliales
	Células madre derivadas del músculo	
Defectos en la mielina	MSC	Astrocitos y oligodendrocitos
	NSC	
Enfermedades del sistema nervioso	NSC	Neuronas Células neurales
	MSC	
	HSC	
	Células madre derivadas del músculo	
Enfermedades cardíacas	MSC	Cardiomiocitos
	ADSC	
	Células ovasales	
Defectos en la córnea	Células madre del limbo del ojo	Células epiteliales de la córnea
Enfermedades de la retina	Células madre del epitelio corneal	Progenitores de la retina
Diabetes mellitus	Células madre del páncreas	Células β productoras de insulina
	Células ovasales	

ADSC: células madre del tejido adiposo; HSC: células madre hematopoyéticas; MAPC: células progenitoras adultas multipotentes; MSC: células madre mesenquimales; NSC: células madre neurales.

ósea (mononucleadas, diversas fracciones con potencial vascular, MSC, etc.), el cordón umbilical, el músculo esquelético y cardíaco o la grasa (MSC o células madre del tejido adiposo [ADSC, del inglés *cultive of adipose stem cells*] y la fracción estromal vascular)^{1,2}.

De entre estos tipos celulares son bastante numerosos los ensayos clínicos que se han realizado con poblaciones derivadas de la médula ósea (células mononucleares [MNC, del inglés *mono-nuclear cells*] y MSC) o mioblastos esqueléticos. También recientemente se han comenzado ensayos con células derivadas del tejido adiposo. La elección de estas poblaciones se ha realizado basándose, además de en su posible beneficio, en la baja morbilidad asociada a la extracción del tejido del paciente, en la sencilla extracción, purificación y/o cultivo de las células, y en la posibilidad de una aplicación autóloga, a partir de tejidos del propio individuo, que evitaría la necesidad de emplear fármacos inmunosupresores y los efectos secundarios que conllevan. Además, gracias a su limitada capacidad de división celular, su utilización supone un riesgo de tumorigenicidad prácticamente nulo. Los resultados de los nuevos estudios aleatorizados que se están realizando actualmente, con un elevado número de pacientes, permitirán determinar con mayor claridad, además del grado de beneficio celular, cuestiones tales como cuáles son las células más adecuadas y cuál es la dosis necesaria, entre otros aspectos.

Respecto al mecanismo de acción de estas células, está comúnmente aceptado que el efecto beneficioso ejercido por las células implantadas es, principalmente, de carácter paracrino, es decir, mediante la secreción de distintos factores como el de crecimiento endotelial (VEGF), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1), EPO o el factor de crecimiento tumoral β (TGF- β), que, entre otros, pueden contribuir a la formación de nuevos vasos, a reducir el remodelado del corazón tras el infarto e, incluso, a la recuperación de cardiomiocitos³.

Enfermedades y lesiones oculares

Existen células madre derivadas del epitelio corneal (CESC, del inglés *corneal epithelial stem cell*) y del limbo del ojo (RSC, del inglés *retinal stem cell*) capaces de incorporarse y reconstituir las superficies oculares lesionadas, por lo que el trasplante de limbo corneal es una práctica ya extendida en oftalmología. En casos de lesión unilateral, cuando solo está afectado un ojo, es posible, además, la terapia autóloga, empleando células del propio paciente procedentes de su ojo sano. En situaciones en las que la córnea está afectada, como en el síndrome Stevens-Johnson, en el penfigoide ocular o en caso de quemaduras graves, el trasplante de CESC combinado con membrana amniótica constituye un tratamiento eficaz para la regeneración de la superficie

ocular⁴. La presencia de la membrana amniótica proporciona a estos injertos propiedades antiangiogénicas y antiinflamatorias, beneficiosas para la correcta recuperación de la integridad de la mucosa y de la agudeza visual del paciente. También se ha logrado la regeneración de superficies corneales quemadas químicamente mediante el empleo de MSC expandidas sobre membrana amniótica en un modelo animal en rata. Además, enfermedades degenerativas de la retina, como el glaucoma, también podrían beneficiarse de la terapia con células madre, como sugieren los resultados obtenidos en algunos trabajos.

Son necesarios, no obstante, estudios adicionales acerca de las propiedades de las CESC y RSC expandidas *ex vivo*, así como sobre las funciones precisas de la membrana amniótica, que permitan establecer los mecanismos moleculares responsables del efecto terapéutico observado. Además, dichos ensayos contribuirán a mejorar las condiciones para la supervivencia de los injertos a largo plazo y a desarrollar terapias más eficaces para las enfermedades oculares.

Lesiones de la piel

En el caso de la reparación de lesiones de la piel (cicatrización de heridas, regeneración de la epidermis en quemaduras, úlceras de pacientes diabéticos, etc.) existe una amplia experiencia desde los trabajos pioneros de Green y cols., en los que se utilizaron por primera vez queratinocitos crecidos *ex vivo* para la generación de injertos de piel. Aunque el material de partida para establecer cultivos primarios de células epidérmicas suele ser piel, existen también evidencias recientes acerca de la existencia de una población de células madre en el folículo piloso con capacidad de generar epidermis interfollicular. El hecho de que estas células se puedan obtener fácilmente de un modo no invasivo y de que presenten gran capacidad proliferativa hace de ellas una fuente óptima para este tipo de terapias. Actualmente existen productos en el mercado que abarcan desde soportes de fibrina hasta fibroblastos de la dermis incluidos en un gel de colágeno, los cuales favorecen el crecimiento de las células epidérmicas y, aun siendo alogénicos (derivados de células de otro individuo), resultan útiles en el caso de afecciones graves, pues proporcionan una cubierta adecuada hasta que se genera en el paciente nueva piel. También se han realizado trasplantes autólogos mediante la creación de "parches" de piel producidos a partir de biopsias de zonas sanas del propio paciente. A partir de estas se aíslan tanto queratinocitos como fibroblastos, que son expandidos *in vitro* e incluidos en una matriz de fibrina obtenida también a partir de muestras de la sangre del paciente.

Por otro lado, también se está utilizando, para el tratamiento de las úlceras de pie en pacientes diabéticos,

un prototipo sustitutivo de piel compuesto por células de la dermis humana incorporadas en una matriz natural de colágeno de tipo I.

Enfermedades del aparato digestivo

La enfermedad de Crohn es un trastorno crónico autoinmune incluido dentro del grupo de enfermedades inflamatorias del intestino (EII) que puede ocasionar serias lesiones en la mucosa intestinal en forma de fístulas, una de las complicaciones más graves asociadas a este grupo de patologías. Recientemente, se ha realizado con éxito el implante autólogo de MSC procedentes de la grasa abdominal (ADSC) para el tratamiento de la patología fistulosa de pacientes con enfermedad de Crohn⁵.

Diabetes mellitus de tipo I

La diabetes de tipo I se produce como consecuencia de la destrucción autoinmune de las células β presentes en los islotes pancreáticos. Estas células son las encargadas de la producción de insulina en respuesta al estímulo de la glucosa, por lo que cuando desaparecen se produce hiperglucemia. Desafortunadamente, la inyección de insulina, incluso cuando se realiza de forma rigurosamente controlada, no es suficiente para prevenir complicaciones a largo plazo; por ello, se han realizado con cierto éxito implantes de páncreas o islotes maduros como terapia alternativa. Sin embargo, la transitoriedad en la efectividad de este método, unida a las complicaciones inherentes al procedimiento quirúrgico y a la necesidad de inmunosupresión, ha llevado a la búsqueda de otras fuentes celulares alternativas. Entre ellas cabe destacar las células madre presentes en el epitelio del ducto pancreático y las células ovales hepáticas, que pueden ser diferenciadas *in vitro* hacia células β ; se ha demostrado que, al ser trasplantadas en ratones diabéticos NOD/SCID, estas células provocan una remisión de la hiperglucemia en dichos animales. También se ha obtenido este tipo celular a partir de ESC e iPS. Por otro lado, se ha analizado el potencial inmunomodulador de las MSC en este contexto, ya que su implante en el momento del diagnóstico, cuando todavía no se ha dado una destrucción total de las células β , parece ayudar a la supervivencia de las células residuales.

Enfermedades del sistema nervioso central y de la médula espinal

Los estudios con células madre han abierto la posibilidad de desarrollar nuevas terapias para diversas afecciones del sistema nervioso para las que, actualmente, solo existen tratamientos paliativos; entre tales trastornos se encuentran la enfermedad de Parkinson, el Alzheimer, la enfermedad de Huntington y lesiones de la médula

la espinal. La estimulación de la propia neurogénesis *in vivo* mediante el aporte de factores de crecimiento específicos y el implante de células madre exógenas constituyen nuevas estrategias prometedoras para el tratamiento de lesiones ocurridas tras un infarto cerebral, un traumatismo o diversas patologías degenerativas. Por ejemplo, se ha demostrado que el implante de células madre humanas derivadas de cordón umbilical revierte eficazmente, principalmente mediante la liberación de factores tróficos, los déficit de comportamiento asociados al infarto cerebral en un modelo de isquemia en la rata mediante oclusión permanente de la arteria cerebral media.

Sin embargo, a pesar de que ya existen algunos avances en esta línea, tal vez sea el sistema nervioso el ámbito de mayor complejidad y en el que, previsiblemente, más tiempo tarden en llegar a la práctica clínica posibles terapias a partir del uso de células madre.

Conclusiones

Los recientes avances en el ámbito de la biología de las células madre han permitido identificar algunas de las cascadas de señalización que operan en los procesos de autorrenovación y diferenciación de dichas células. Cada vez existen más indicios de que mecanismos similares ocurren en los procesos de regeneración tisular después de una lesión. Mediante el uso de las citocinas apropiadas es posible dirigir la diferenciación de las células madre hacia tipos celulares especializados, lo que hace posible trasplantarlas como sustituto celular en diversas enfermedades degenerativas. Por todo esto, la terapia celular es sujeto de un interés creciente en los últimos años como posible tratamiento de numerosas enfermedades cuyas expectativas de curación actuales son escasas o nulas. Sin embargo, queda aún un largo camino por recorrer antes de poder definir y concretar los aspectos tecnológicos de su aplicación clínica eficaz. Se precisan análisis más detallados de las propiedades biológicas de las células madre humanas y de su progenie. También se hace necesario desarrollar nuevos métodos de purificación y trasplante de células, a fin de poder avanzar hacia el cumplimiento de los criterios de seguridad exigidos para cualquier tipo de intervención terapéutica. Igualmente, es importante continuar investigando con el objetivo de identificar marcadores específicos de células madre, así como factores que dirigen su autorrenovación, maduración y migración desde los nichos en que residen. Comprender los fenómenos celulares implicados en el mantenimiento de la homeostasis tisular contribuirá también a determinar aquellos procesos susceptibles de una desregulación y, por tanto, responsables de la aparición de diversas patologías, incluidos algunos tipos de cáncer. Por último, es de vital importancia corroborar los resultados

obtenidos en modelos animales con células humanas, ya que las diferencias interespecíficas podrían provocar una incoherencia entre las observaciones experimentales y el potencial terapéutico real para su uso en clínica.

Uno de los aspectos más delicados es decidir si la realización de ensayos clínicos más amplios está justificada o no a la luz de los conocimientos actuales, aún incompletos en lo que a mecanismos de acción de este tipo de terapias se refiere. Deberíamos encontrar cierto equilibrio que nos permita seguir avanzando con pie firme y de forma paralela en los aspectos básicos y fundamentales, a la vez que en los clínicos y bioéticos de la terapia celular.

Bibliografía

1. Passier R, van Laake LW, Mummery CL. Stem-cell-based therapy and lessons from the heart. *Nature*. 2008;453:322-9.
2. Janssens S. Stem cells in the treatment of heart disease. *Annu Rev Med*. 2010;61:287-300.
3. Gnecci M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res*. 2008;103:1204-19.
4. Shimazaki J, et al. Transplantation of human limbal epithelium cultivated on amniotic membrane for the treatment of severe ocular surface disorders. *Ophthalmology*. 2002;109:1285-90.
5. García-Gómez I, et al. Mesenchymal stem cells: biological properties and clinical applications. *Expert Opin Biol Ther*. 2010;10:1453-68.

Disección de las vías de diferenciación normal de células hematopoyéticas por citometría de flujo

ALBERTO ORFAO, SERGIO MATARRAZ, QUENTIN LÉCREVISSE, ANTONIO LÓPEZ, JUANA CIUDAD, SUSANA BARRENA, MARTÍN PÉREZ-ANDRÉS, JUAN FLORES-MONTERO, DANIELA DAMASCENO, CARMEN MUÑIZ, ANDREA MAYADO, ANDRÉS GARCÍA-MONTERO, JULIA ALMEIDA

Departamento de Medicina. Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC-CSIC/USAL). Instituto Biosanitario de Salamanca (IBSAL) y Servicio de Citometría-NUCLEUS. Universidad de Salamanca. Salamanca

Introducción

Tras el nacimiento, la producción de células hematopoyéticas humanas se localiza de forma primaria en la médula ósea (MO) donde, a partir de una célula madre, se generan precursores comprometidos a las diferentes líneas de células sanguíneas. Dichos precursores abandonan la MO en estadios más o menos precoces (o avanzados) de maduración y circulan por la sangre periférica (SP), dirigiéndose a distintos tejidos del organismo en los que completan su maduración y/o realizan su función¹. Clásicamente, para el estudio de la hematopoyesis se han empleado técnicas citomorfológicas que, en combinación con los cultivos celulares, han permitido identificar distintos compartimientos madurativos de células linfoides y mieloides en MO, timo, SP y órganos linfoides secundarios, entre otros tejidos. Sin embargo, estas técnicas son relativamente poco sensibles y están cargadas de un importante componente de subjetividad, lo cual ha limitado su utilidad a la hora de identificar y caracterizar líneas celulares y compartimientos madurativos poco representados.

En las últimas décadas, la citometría de flujo se ha convertido en una de las aproximaciones más útiles para el estudio de las células hematopoyéticas, proporcionando información sobre los perfiles de expresión proteica mediante análisis simultáneo de los niveles de expresión de varias proteínas para un gran número de células individuales presentes en una muestra². Con este tipo de mediciones puede definirse la mayor o menor proximidad (distancia) fenotípica entre distintas células, lo cual permite establecer con relativa precisión si se trata de células de la misma línea y/o estadio madurativo o si, por el contrario, se trata de células diferentes de las células normales/reactivas (por ejemplo, células tumorales)³. Hasta hace relativamente poco tiempo este tipo de comparación estaba basado fundamentalmente en el conocimiento de un experto en citometría acerca de los perfiles de expresión proteica de las células normales/reactivas, su panel y combinaciones de marcadores favoritos. Tal aproximación introducía un

importante componente de subjetividad y variabilidad en los resultados obtenidos. Recientemente, el Consorcio EuroFlow ha propuesto una nueva estrategia para la interpretación de los datos derivados de los estudios inmunofenotípicos de células hematopoyéticas por citometría de flujo^{2,3}. Esta aproximación combina nuevas herramientas informáticas para el análisis simultáneo de un gran número de marcadores/parámetros fenotípicos, el empleo de paneles optimizados de reactivos y la construcción de bases de datos con casos de referencia de muestras (por ejemplo, de muestras de MO normal/reactiva) marcadas con el mismo panel de anticuerpos, preparadas y medidas de idéntica forma y bajo las mismas condiciones en instrumentos calibrados de forma estandarizada^{2,4}. Mediante la comparación directa de las células presentes en una muestra con la información de la base de datos inmunofenotípica correspondiente puede definirse con gran precisión la línea, el estadio madurativo y el perfil fenotípico (por ejemplo, normal vs. reactivo vs. neoplásico) de las células presentes en esa muestra³.

A continuación revisaremos de forma breve los perfiles fenotípicos de la diferenciación hacia las diferentes líneas hematopoyéticas que ocurren en MO humana normal, haciendo especial hincapié en los perfiles fenotípicos más habituales.

Los precursores hematopoyéticos y su localización tisular

Desde hace tiempo se conoce que, tras el nacimiento, la MO es el órgano que alberga un mayor número de precursores hematopoyéticos¹. Además, se reconoce también que en este tejido la mayoría de las células madre hematopoyéticas están englobadas dentro del compartimiento de células CD34+⁵. No obstante, este compartimiento celular es muy heterogéneo, estando la mayoría de las células CD34+ ya comprometidas a diferentes líneas hematopoyéticas y solo una pequeña parte de ellas integra el verdadero *pool* de células madre hematopoyéticas con capacidad de autorrenovarse y

de diferenciarse a distintos tipos de células linfoides y mieloides⁷. Por otra parte, hoy se sabe que estos precursores CD34+ más indiferenciados (re)circularan, en menor número y con un ritmo circadiano, en SP⁶, probablemente con el fin de rellenar los espacios medulares disponibles en diferentes huesos distribuidos por el organismo.

Más recientemente, se ha identificado la presencia en MO de otro compartimento de células con capacidad de diferenciarse a distintos tejidos, y en especial a tejido adiposo, hueso y cartílago⁷; según algunos autores, estas células podrían guardar también una estrecha relación ontogénica con las células stem hematopoyéticas y las células endoteliales: las células stem mesenquimales⁸.

Características fenotípicas de los precursores hematopoyéticos y de las células stem mesenquimales

En los últimos años se ha acumulado importante información acerca de las características fenotípicas de los precursores hematopoyéticos CD34+ más inmaduros^{5,8}. Hoy se conoce que estas células coexpresan los marcadores (erróneamente denominados) mieloides CD13, CD33 y CD117, además de HLADR^{5,8}. Estos precursores muestran también niveles bajos, pero crecientes, de CD38 y son CD133+ y CD90+, careciendo de positividad para marcadores de línea, entre los que se incluyen los antígenos CD7, CD19, Tdt, MPO, EPO, CD64 y CD36^{5,8}. Este fenotipo, aunque minoritario en MO (<10 % de las células CD34+), es un fenotipo típico de los precursores CD34+ de SP (>80 %)⁸.

Al igual que los precursores CD34+, las células mesenquimales de MO muestran también características fenotípicas heterogéneas, representando alrededor del 0,1 % de la celularidad medular global⁷. En conjunto, las células mesenquimales muestran expresión elevada de CD13 en ausencia de CD11b y son positivas para CD105, CD73, CD90, CD146, CD271, STRO1, MSCA1 y SSEA4; por el contrario, marcadores como CD10, solo están presentes en una fracción de todas las células mesenquimales de MO⁷.

Precursores CD34+ de MO comprometidos a diferentes líneas hematopoyéticas

El compromiso madurativo de los precursores CD34+ hacia las distintas líneas mieloides y linfoides se asocia a cambios fenotípicos, reflejados en una adquisición progresiva de antígenos asociados a distintas líneas y la pérdida de expresión de proteínas asociadas a célula stem⁹. En este sentido, merece destacar que la existencia de precursores comunes mieloides y linfoides parece, desde el punto de vista fenotípico, en el hombre, más

un concepto funcional que fenotípico. Así, por ejemplo, no se observa un fenotipo linfóide común a precursores CD34+ linfoides de MO, sino que, mientras el compromiso hacia la diferenciación B se asocia a adquisición temprana de expresión en el ámbito nuclear de la enzima Tdt, seguida de forma secuencial de positividad para CD79a/CD22, CD19 y CD10, este marcador (Tdt) estaría ausente en los precursores T/NK de MO, definidos a su vez por la coexpresión de CD34 y CD7, en ausencia de CD3 citoplasmático^{5,10}. De forma similar, la expresión de MPO citoplasmática sería el marcador más temprano de compromiso a línea neutrófilo, seguida de la expresión de CD15/CD65, mientras que en la maduración a línea monocítica, CD64 seguido de CD11c definirían el compartimento de precursores más inmaduros⁵. A su vez, los precursores CD34+ de MO que muestran compromiso a línea eritroide y a célula dendrítica plasmocitoide (pDC) presentan expresión de CD36+ asociada a CD105+ y CD123++, respectivamente⁵. Además, mientras que los precursores de las líneas de granulocito neutrófilo (CD34+/MPO+) y eritroide (CD34+/CD36+/CD105+) muestran una pérdida progresiva de la expresión de HLADR y permanecen siendo CD117+, el compromiso a línea monocítica (CD34+/CD64+) y a pDC (CD34+/CD36+/CD123++) se caracteriza por una pérdida rápida de expresión de CD117 en células HLADR+ (Figura 1)^{5,11}. Finalmente, la maduración a granulocito basófilo y mastocito se asocia a coexpresión de triptasa, CD22 y CD203c, precedida en su caso por una pérdida de positividad para HLADR y expresión elevada de CD123++ y CD117++, respectivamente^{12,13}.

En términos numéricos, el compartimento de células CD34+ engloba: a) tres subpoblaciones mayoritarias comprometidas a línea de granulocito neutrófilo, eritroide y linfóide (sobre todo B y, en menor medida, T/NK); b) dos intermedias constituidas por precursores de monocitos y célula dendrítica plasmocitoide; y c) otras muy minoritarias, entre las que se incluyen los precursores CD34+ de mastocito y granulocito basófilo (Tabla 1). Fenotípicamente, las subpoblaciones de células CD34+ comprometidas a línea megacariocítica y a granulocito eosinófilo siguen siendo indetectables (Tabla 1). Esto se debe, al menos en parte, a problemas técnicos relacionados con la identificación temprana de compromiso madurativo a ambas líneas celulares debido a que por ejemplo, aunque la peroxidasa de eosinófilo (EPO) es un marcador altamente específico de la línea de granulocito eosinófilo, su expresión solo se detecta en estadios relativamente avanzados, en el ámbito de precursores CD34-.

Perfiles fenotípicos de diferenciación de células mieloides CD34-

Tras la expresión de MPO y CD15/CD65, y la pérdida secuencial de expresión de CD34 y HLADR, el

precursor comprometido a línea de granulocito neutrófilo muestra expresión elevada de CD117 y de los marcadores CD13 y CD33; con este fenotipo alcanza el estadio de transición entre mieloblasto y promielocito (Figura 1A)¹⁴. A este nivel la expresión de CD15 se hace intensa y, de forma secuencial, disminuye la expresión de CD117 y CD13; en el ámbito del mielocito, el precursor adquiere expresión de CD11b y CD64⁺⁺ (Figura 1A)¹⁴. Posteriormente el metamielocito expresa CD16 y, finalmente, en el ámbito de las células más maduras

se observa positividad (de nuevo intensa) para CD13 y CD10 (Figura 1A)¹⁴. A este nivel por el contrario, la expresión de CD64 y CD33 se hace débil. En paralelo, la diferenciación del precursor CD34⁺/CD64⁺ a monocito se caracteriza por una pérdida rápida de expresión de CD34 y CD117, y la adquisición secuencial de reactividad intensa para CD64⁺⁺, CD36, CD14, CD35 y CD300e (Figura 1B)¹⁵.

La diferenciación de precursores eritroides CD34⁺/CD36⁺ se asocia de forma temprana a expresión transitoria e intensa de CD105 y pérdida de positividad para los marcadores de célula stem CD13, CD33, HLADR y CD34 (Figura 1C); a este nivel, el precursor eritroide muestra además positividad fuerte para el receptor de la transferrina (CD71), se hace CD117 negativo, e inicia la expresión de glicoforina A (CD235) (Figura 1C)^{2,16}. En un estadio posterior los precursores eritroides nucleados pierden la expresión de CD105, manteniendo en su mayoría (> 90 %) una expresión muy elevada de CD36 y CD71 (Figura 1C)^{2,16}.

De forma similar al precursor eritroide CD34⁺, los precursores de pDC también expresan de forma temprana positividad para CD36, habitualmente precedida de expresión intensa de CD123, en ausencia de CD105¹¹; además, a diferencia del precursor eritroide, el precursor de pDC, al perder CD34, pierde también de forma casi inmediata la positividad para CD117, aunque sigue expresando HLADR¹¹. En estadios posteriores la diferenciación a pDC se caracteriza por la pérdida de CD13 y CD33 junto a la adquisición de forma progresiva de expresión de marcadores característicos de esta línea celular como CD4, CD303 y CD304, entre otros¹¹.

Aunque el granulocito basófilo y el mastocito comparten muchas características fenotípicas y funcionales como la coexpresión del receptor de alta afinidad para

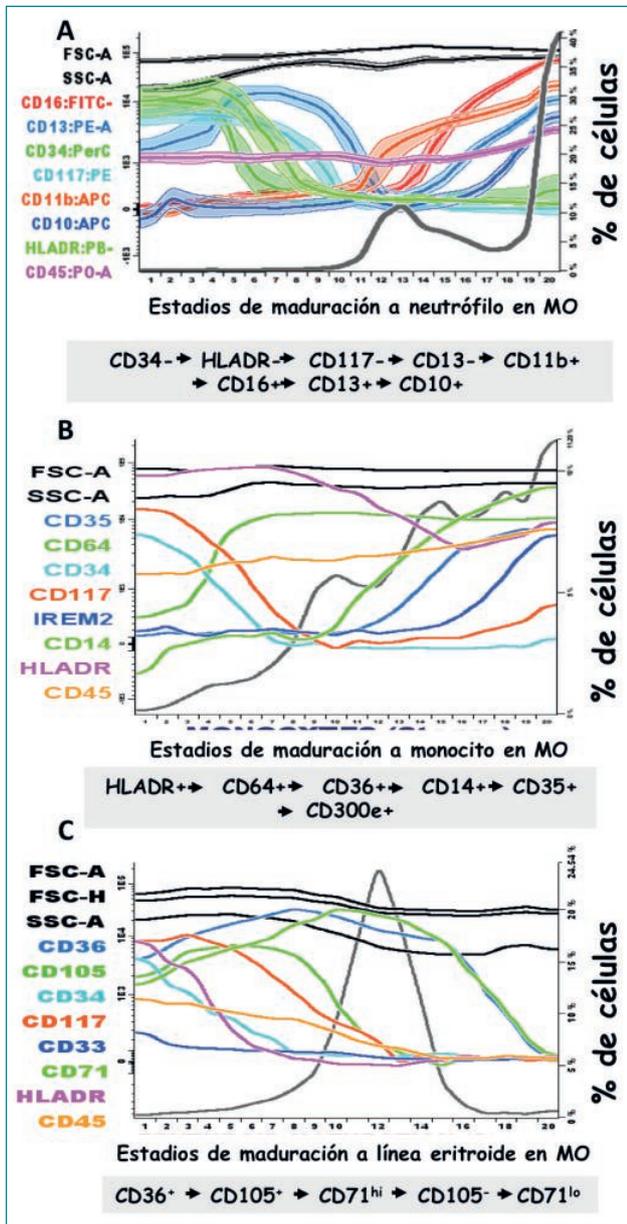


Figura 1. Esquemas representativos de los cambios fenotípicos observados en la expresión de un grupo seleccionado de marcadores a lo largo de la diferenciación a granulocito neutrófilo (A), monocito (B) y serie eritroide (C).

Tabla 1. Distribución relativa de precursores linfoides y mieloides comprometidos a diferentes líneas dentro del compartimiento de células CD34⁺ de médula ósea normal

Línea celular	Frecuencia
Granulocito neutrófilo	31 % (12-39 %)
Eritroide	15 % (5-35 %)
Monocítica	5 % (3-15 %)
Célula dendrítica plasmocitoide	6 % (1-15 %)
Granulocito basófilo	<1 % (<1-3 %)
Mastocito	<1 % (<1 %)
Granulocito eosinófilo	<1 %
Megacariocítica	<1 %
Linfoide B	23 % (<1-45 %)
Linfoide T/NK? (CD7+)	11 % (5-18 %)
Total	92 %

IgE (FC ϵ RI), triptasa, CD22 y CD203c, de forma característica, el mastocito expresa niveles muy elevados de CD117 con expresión débil de CD123, mientras que el granulocito basófilo es CD123++, CD117-negativo. Estas diferencias fenotípicas están presentes ya en el ámbito de los precursores CD34 de ambas líneas^{12,13}. En la diferenciación a granulocito basófilo y mastocito, los precursores CD34+/CD123++ y CD34+/CD117++ pierden de forma temprana la expresión de HLADR y adquieren (de forma secuencial) positividad para CD203c, triptasa y finalmente FC ϵ RI^{12,13}.

Perfiles fenotípicos de diferenciación de células linfoides CD34- en MO

A diferencia de lo que ocurre con los precursores T/NK, que abandonan de forma temprana la MO para llevar a cabo su diferenciación a linfocito T en el timo, las células B realizan su maduración a linfocito B en MO¹⁰. En este sentido, los precursores B de MO representan uno de los compartimientos celulares más estudiados desde el punto de vista madurativo. Así, se sabe que el reordenamiento de los genes de las inmunoglobulinas (célula pro-B), con la producción secuencial de cadena pesada μ citoplasmática (célula pre-B) y de una inmunoglobulina completa (cadena pesada μ y cadena ligera κ o λ) de membrana (linfocito B maduro) va acompañado de importantes cambios fenotípicos¹⁷, distinguiéndose habitualmente desde el punto de vista fenotípico tres compartimientos madurativos B mayoritarios en MO: a) precursores Tdt+, CD34+, CD10++, CD38++, CD20-; b) precursores Tdt-, CD34-, CD10+, CD38++, CD20+/+++; y c) Tdt-, CD34-, CD10-, CD38-/+, CD20++^{17,18}. No obstante, hoy se sabe que existen algunas vías (paralelas) minoritarias de diferenciación B relacionadas con distintas vías de señalización que hacen que no siempre exista una correspondencia absoluta entre la expresión fenotípica de distintos marcadores asociados a un mismo estadio madurativo.

Diferenciación de células hematopoyéticas fuera de la MO

Clásicamente se reconoce que las células linfoides B y T terminan su maduración a linfocito T y B inmunocompetente en la MO y el timo, respectivamente^{10,17,18,19}. No obstante, es bien conocido también que tras el reconocimiento antigénico estas células sufren un nuevo ciclo de diferenciación tisular, especialmente en los órganos linfoides secundarios, para transformarse en linfocitos T efectoras (por ejemplo, células T citotóxicas, productoras de citocinas o T reguladoras) y células plasmáticas productoras de anticuerpos, además de linfocitos T y B de memoria^{10,19}. Este concepto de diferenciación tisular terminal a célula efectora se extiende también

a otras células hematopoyéticas, incluyendo de forma específica al mastocito, la pDC y el monocito, células que son capaces de migrar desde la SP a prácticamente casi todos los tejidos del organismo, donde adquieren características muy diversas²⁰. Por ello hoy el concepto de diferenciación de células hematopoyéticas va mucho más allá de la hematopoyesis propiamente dicha y requiere una integración de información proveniente de prácticamente casi todos los tejidos del organismo. En este contexto, las células de SP acaban por mostrar también fenotipos heterogéneos que reflejan la llegada de células producidas en la MO y el retorno de células terminalmente diferenciadas derivadas de distintos tejidos del organismo.

Bibliografía

- García-García A, Castillejo CI, Méndez-Ferrer S. MBSCs and hematopoiesis. *Immunol Lett.* 2015; S0165-2478(15)30002-X.
- 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.
- Pedreira CE, Costa ES, Lecrevisse Q, van Dongen JJM, Orfao A. On behalf of the EuroFlow Consortium: Overview of clinical flow cytometry data analysis: recent advances and future challenges. *Trends Biotechnol.* 2013;31:415-25.
- Kalina T, Flores-Montero J, van Der Velden VHJ, Martín-Ayuso M, Böttcher S, Ritgen M, et al. EuroFlow standardization of flow cytometry instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia.* 2012;26:1986-2010.
- Matarraz S, López A, Barrena S, Fernández C, Jensen E, Flores J, et al. The immunophenotype of different immature, myeloid and B-cell lineage-committed CD34+ hematopoietic cells allows discrimination between normal/reactive and myelodysplastic syndrome precursors. *Leukemia.* 2008;22:1175-83.
- Menéndez P, Prosper F, Bueno C, Arbona C, San Miguel JF, García-Conde J, et al. Sequential analysis of CD34+ and CD34- cell subsets in peripheral blood and leukapheresis products from breast cancer patients mobilised with SCF plus G-CSF and cyclophosphamide. *Leukemia.* 2001;15:430-9.
- Muñiz C, Teodosio C, Mayado A, Amaral MT, Matarraz S, Barcena P, et al. Ex vivo identification and characterization of a population of CD13high CD105+ CD45- mesenchymal stem cells in human bone marrow. *Stem Cell Res Therapy.* 2015 (en prensa).
- Sousa BR, Parreira RC, Fonseca EA, Amaya MJ, Tonelli FM, Lacerda SM, et al. Human adult stem cells from diverse origins: an overview from multiparametric immunophenotyping to clinical applications. *Cytometry.* 2014;85:43-77.
- Orfao A, Ortuño F, De Santiago M, López A, San Miguel JF. Immunophenotyping of acute leukemias and myelodysplastic syndromes. *Cytometry.* 2004;58A:62-71.
- Bhandoola A, von Boehmer H, Petrie HT, Zúñiga-Pflucker JC. Commitment and developmental potential of extrathymic and intrathymic T cell precursors: plenty to choose from. *Immunity.* 2007;26:678-89.
- Martín Martín L, Almeida J, Hernández-Campo PM, Sánchez ML, Lecrevisse Q, Orfao A. Immunophenotypic, morphologic and functional characterization of maturation-associated plasmacytoid dendritic cell subsets in normal adult human bone marrow. *Transfusion.* 2009;49:1692-708.

12. Teodosio C, Mayado A, Sánchez-Muñoz L, Morgado J, Jara-Acevedo M, Álvarez-Twose I, et al. The immunophenotype of mast cells and its utility in the diagnostic work-up of systemic mastocytosis. *J Leuk Biol.* 2015;97:49-59.
13. Karasuyama H, Mukai K, Ttsujimura Y, Obata K. Newly discovered roles for basophils: a neglected minority gains new respect. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(1):9-13.
14. Van Lochem EG, van Der Velden VH, Wind HK, Te Marvelde JG, Westerdaal NA, van Dongen JJM. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease induced shifts. *Cytometry B Clin Cytom.* 2004;60:1-13.
15. Matarraz S, Almeida J, Flores-Montero J, López A, Orfao A. Introduction to the diagnosis and classification of monocytic-lineage leukemias by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytometry.* 2015 (en prensa).
16. Alves LR, Costa ES, Sorgine MHF, Nascimento-Silva MCL, Teodosio C, Barcena P, et al. Heme-oxygenases during erythropoiesis in K562 and human bone marrow cells. *Plos ONE.* 2011;6:e21358.
17. Van Zelm MC, van Der Burg M, De Ridder D, Barendregt BH, De Haas EF, Reinders MJ, et al. Ig gene rearrangement steps are initiated in early human precursor B cell subsets and correlate with specific transcription factor expression. *J Immunol.* 2005;175:5912-22.
18. Lucio P, Parreira A, van Den Beemd MWM, van Lochem EG, van Wering ER, Baars E, et al. Flow cytometric analysis of normal B-cell differentiation: a frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor B-ALL patients. *Leukemia.* 1999;13:419-27.
19. Pérez-Andrés M, Paiva B, Nieto WG, Caraux A, Schmitz A, Almeida J, et al. Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic. *Cytometry B Clin Cytometry.* 2010;79B:S47-S60.
20. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. *Science.* 2010;327(5966):656-61.

Diagnóstico y monitorización del mieloma múltiple en el año 2015

MARÍA VICTORIA MATEOS, VERÓNICA GÓMEZ DE LA CALLE, NOEMÍ PUIG, NORMA GUTIÉRREZ, RAMÓN GARCÍA-SANZ

Complejo Asistencial Universitario de Salamanca/Instituto Biosanitario de Salamanca (CAUSA/IBSAL). Salamanca

Introducción

El mieloma múltiple (MM) es la segunda enfermedad hematológica maligna en orden de frecuencia, caracterizada por la proliferación clonal de células plasmáticas en la médula ósea (MO). Está precedida habitualmente por una situación premaligna asintomática, que es la gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI)¹. La GMSI es una entidad muy frecuente, presente en el 3-4 % de la población con más de 50 años. Su diagnóstico requiere la ausencia de sintomatología relacionada con la proliferación de células plasmáticas y la tasa de progresión a MM es de aproximadamente 0,5-1 % por año, aunque este puede variar ligeramente en función del tipo de componente monoclonal, la concentración, la ratio de cadenas ligeras libres en suero, la proporción de células plasmáticas con fenotipo aberrante o la presencia de inmunoparesia². El MM *smoldering* o quiescente o asintomático es una entidad intermedia entre la GMSI y el MM, con un riesgo de progresión más alto que la GMSI pero no uniforme, y se han establecido diferentes modelos para predecir el riesgo de progresión a MM. Hasta el momento actual, únicamente los definidos por el grupo de la Clínica Mayo y el grupo español se han validado en un ensayo clínico. Al igual que ocurre con la GMSI, su diagnóstico requiere la ausencia de sintomatología relacionada con el clon de células plasmáticas que proliferan, pero la infiltración observada en médula ósea es superior al 10 % y/o el componente monoclonal es superior a 3 g/dL. Es una entidad biológicamente heterogénea y se incluyen pacientes con un riesgo de progresar muy bajo, similar a las GMSI, y otros con un riesgo alto que sabemos que progresarán a MM en los dos años siguientes al diagnóstico³.

Diagnóstico de mieloma múltiple

Los criterios diagnósticos para la definición de MM han sido recientemente actualizados, debido fundamentalmente a que el MM es una enfermedad cuyo diagnóstico es clínico-patológico y requería la presencia

de sintomatología clínica, como insuficiencia renal o lesiones osteolíticas⁴. Esta sintomatología clínica se ha evaluado tradicionalmente mediante el uso de técnicas convencionales que, en el momento actual, pueden estar obsoletas debido a la introducción, por ejemplo, de nuevas técnicas de imagen para la enfermedad ósea. Además, los pacientes no eran candidatos para recibir tratamiento hasta que desarrollaban alguna sintomatología clínica y, en el momento actual, en la era de nuevos fármacos, hay ya estudios que demuestran un beneficio significativo si el tratamiento se inicia de una manera más precoz, además de técnicas más sensibles para detectar antes sintomatología⁵. Por último, la presencia de componente monoclonal, así como la infiltración en médula ósea, requerían también una revisión.

Por todo ello, la nueva definición de MM incluye la presencia de uno o más biomarcadores que sabemos que, cuando están presentes en el MM *smoldering*, el riesgo de progresión a MM es extremadamente alto como para no iniciar un tratamiento (70-80 % a dos años), así como la revisión de los clásicos criterios CRAB (Tabla 1).

Los tres biomarcadores incluidos ahora en la nueva definición de MM son:

- **Infiltración de células plasmáticas en MO del 60 % o más:** la justificación son tres estudios realizados por el grupo de la Clínica Mayo⁶, grupo Griego⁷ y grupo de la Universidad de Pensilvania⁸, en los que un subgrupo de pacientes con MM *smoldering* (3-5 %) con un 60 % o más de infiltración por células plasmáticas en MO tuvieron una mediana de tiempo hasta la progresión a MM inferior a un año. La infiltración se estimó en aspirado o biopsia de médula ósea, pero no utilizando técnicas de citometría de flujo.
- **Ratio de cadenas ligeras libres en suero igual o superior a 100:** el test de cadenas ligeras libres en suero (FLC, de sus siglas en inglés *free light chain*) es un test automático que identifica y mide las cadenas ligeras libres K y λ en el suero. La ratio

Tabla 1. Criterios actualizados del mieloma múltiple

<p>Infiltración por $\geq 10\%$ de células plasmáticas clonales en médula ósea o plasmocitoma óseo o extramedular demostrado por biopsia*, y uno o más de los siguientes eventos que definen mieloma:</p> <ul style="list-style-type: none"> Eventos que producen daño orgánico y están en relación con la proliferación de células plasmáticas: <ul style="list-style-type: none"> Hipercalcemia, definido por calcio en suero $>0,25$ mmol/L (>1 mg/dL) por encima del valor alto de la normalidad o $>2,75$ mmol/L (>11 mg/dL). Insuficiencia renal, definida por la presencia de aclaramiento de creatinina <40 mL x minuto o creatinina en suero >2 mg/dL. Anemia: hemoglobina >20 g/L por debajo del límite inferior de la normalidad, o por debajo de 10 g/dL. Lesiones óseas: una o más lesiones osteolíticas presentes en la radiología convencional, la TC o PET-TC. Uno o más de los siguientes biomarcadores que predicen, en ausencia de daño orgánico, un riesgo muy alto de desarrollarlo: <ul style="list-style-type: none"> Infiltración por células plasmáticas clonales en médula ósea $\geq 60\%$. Ratio de cadenas ligeras libres en suero afectada vs. no afectada ≥ 100. >1 lesión focal en RMN. <p>*La clonalidad debe establecerse mostrando restricción de cadena ligera K/λ por citometría de flujo, inmunohistoquímica o inmunofluorescencia. El porcentaje de infiltración en médula ósea debe establecerse por biopsia, aunque no es obligado y, en caso de discrepancia, se utilizará el valor más alto. Si la médula ósea tiene $<10\%$ de infiltración por células plasmáticas clonales se necesitará más de una lesión ósea para excluir adecuadamente el diagnóstico de plasmocitoma solitario con mínima infiltración en médula ósea. Las lesiones óseas, para considerarse osteolíticas, deben ser de un tamaño superior a 5 mm.</p>

normal K/ λ es 0,26-1,65, pero en enfermedades de las células plasmáticas en general se produce un exceso de producción de una de ellas, lo cual origina finalmente una ratio anormal. Aproximadamente un tercio de los pacientes con GMSI, 70 % de los MM *smoldering* y más del 90 % de los MM, tienen una ratio de FLC alterada. El grupo de la Clínica Mayo observó en una serie de 586 pacientes con MM *smoldering* que un 15 % de ellos presentaban una ratio de FLC extremadamente desviada (superior a 100), y estos pacientes tenían un riesgo de progresión a MM del 80 % a los 2 años desde el diagnóstico y, además, un 27 % de ellos presentaban insuficiencia renal como manifestación clínica de MM⁹. Estos resultados fueron posteriormente confirmados por otros dos grupos y, aunque ninguno de los estudios estableció un valor mínimo de FLC afectada para reducir la posibilidad de error, los nuevos criterios requieren además que la cadena ligera libre afectada sea de al menos 100 mg/L^{7,8}.

- **Presencia de más de una lesión focal en la resonancia magnética nuclear (RMN):** la RMN es muy eficaz en la evaluación de pacientes con MM *smoldering* y, de hecho, antes era recomenda-

da en el momento del diagnóstico y ahora es obligada, porque la presencia de lesiones focales (que afecta la médula ósea o el hueso) y alteraciones difusas se asocian con un riesgo elevado de progresión a MM. Hillengass y cols., estudiaron 149 pacientes con MM *smoldering* mediante RMN de cuerpo entero y un 28 % de los pacientes tenían lesiones focales¹⁰. Un 15 % presentaban más de una lesión focal y este hallazgo se relacionó con una mediana de tiempo hasta la progresión a MM de 13 meses, equivalente a un riesgo de progresión del 70 % a dos años. El Grupo Griego de Mieloma confirmó estos hallazgos, una vez más, en una serie de 65 pacientes, encontrando un 14 % con más de una lesión focal y un riesgo de progresión de 69 % a dos años¹¹. Un aspecto importante que se ha de considerar es que las lesiones focales detectadas deben tener un diámetro de al menos 5 mm y, en caso de duda, se deben realizar exploraciones complementarias con tomografía computarizada (TC) o tomografía con emisión de positrones-TC (PET-TC) para su confirmación antes de hacer el diagnóstico de MM. El patrón difuso de infiltración se asocia también con un riesgo aumentado de progresión a MM, pero no es adecuado todavía incluirlo como biomarcador para la definición de MM, ya que se necesitan datos y estudios adicionales. Por el momento, Hillengass y cols., reportaron la asociación entre patrón difuso y riesgo más alto de progresar a MM (hazard ratio de 3,5), así como el valor predictivo adicional de la realización de RMN durante el seguimiento de los pacientes con MM *smoldering*, que permitía obtener información dinámica acerca de la proliferación de células plasmáticas en la médula ósea. Por todo ello, en pacientes con MM *smoldering* y RMN con una lesión focal, patrón difuso o hallazgos dudosos se recomienda su repetición en 3-6 meses⁴.

La revisión de los clásicos criterios CRAB (*calcium, renal insufficiency, anaemia or bone lesions*) incluye fundamentalmente la revisión de la evaluación de la afectación ósea, así como de la insuficiencia renal.

Evaluación de la afectación ósea

Los criterios clásicos CRAB definían la afectación ósea como la presencia de lesiones osteolíticas u osteoporosis con fracturas por compresión que se relacionaran con la infiltración de células plasmáticas. La técnica de elección para observar estos hallazgos era la radiología convencional. En el año 2013, el grupo internacional de MM admitió la realización de RMN y TC para clarificar lesiones, pero sin confirmar que estas técnicas

podrían ser usadas para evaluar la enfermedad ósea en los pacientes con MM¹². En el año 2013 se publicó una revisión que comparaba las distintas técnicas para evaluar la enfermedad ósea en MM, incluyendo la RMN, PET-TC, TC de cuerpo entero y baja dosis, así como la radiología convencional. Las nuevas técnicas de imagen demostraron ser más sensibles que la radiología convencional y son capaces de detectar las lesiones óseas presentes en hasta el 80 % de los pacientes. La TC y la RMN demostraron tener una sensibilidad similar y cualquiera de las dos puede usarse, dependiendo de la disponibilidad¹³.

Por ello, los nuevos criterios de diagnóstico de MM incluyen que la enfermedad ósea se define por la presencia de una o más lesiones osteolíticas (de más de 5 mm) observadas en la TC (incluyendo la TC de baja dosis) o PET-TC, independientemente de que sean observadas o no en la serie ósea mediante la radiología convencional. Es importante destacar que en la PET-TC la captación en la PET no es suficiente para considerarlo como lesión osteolítica, sino que tiene que ir acompañada de lesión ósea subyacente detectada en la parte de la TC correspondiente. Hay que tener precaución para evitar sobreinterpretaciones de los hallazgos observados tanto en la TC como en la PET-TC y, en caso de dudas, es preferible esperar y repetir la exploración en 3-6 meses para evitar sobrediagnosticar y sobretratar a pacientes que pudieran no necesitarlo. Aunque la exploración no se repita hasta pasados 3-6 meses, al paciente se le puede hacer un seguimiento más estrecho del resto de sintomatología cada 1-2 meses. Además, los pacientes con componente monoclonal pueden tener otras enfermedades malignas concomitantes que se asocien con metástasis óseas y, por tanto, en caso de duda se puede considerar la opción de la biopsia de la lesión.

Otro aspecto importante es que la osteoporosis o las fracturas vertebrales por compresión de manera aislada sin lesiones osteolíticas no se consideran ya criterios que definan enfermedad ósea en MM. El motivo fundamental es que se han incorporado técnicas nuevas mucho más sensibles como las antes mencionadas y se evita así el sobrediagnóstico de MM en pacientes mayores con GMSI y osteoporosis. No obstante, la presencia de osteoporosis marcada en pacientes jóvenes con componente monoclonal requiere técnicas adicionales como TC o PET-TC para clarificar⁴.

Evaluación de la función renal

Los criterios del año 2003 establecían la insuficiencia renal como la presencia de una concentración de creatinina en suero superior a 173 $\mu\text{mol/L}$ (2 mg/dL) en relación con el MM. Sin embargo, el uso de una concentración fija de creatinina en suero hace que se necesiten establecer diferentes valores en función de

edad, sexo o raza, y fue el motivo por el que, junto con la presencia de este valor fijo de creatinina en suero, se añadiera el aclaramiento de creatinina inferior a 40 mL x minuto como valor para definir la presencia de insuficiencia renal. Se recomienda utilizar las fórmulas MDRD (*modification of diet in renal disease*) o CKD-EPI (*chronic kidney disease epidemiology collaboration*) para el cálculo del aclaramiento de creatinina, y siempre preferiblemente a la creatinina en suero. La insuficiencia renal como manifestación de MM se refiere a la nefropatía producida por las cadenas ligeras, y otras formas de daño renal deben diferenciarse de la insuficiencia renal asociada al MM, pues habitualmente son parte de otras enfermedades con diferentes criterios diagnósticos, pronósticos y, lo más importante, con diferentes opciones de tratamiento. Aunque la biopsia renal no es obligada para el diagnóstico de daño renal por MM, en caso de duda es recomendable realizarla, sobre todo si existe insuficiencia renal posiblemente atribuida al MM, pero los niveles de FLC involucrada en suero no son superiores a 500 mg/L. Este criterio es congruente con la recomendación del grupo de investigación de la gammapatía monoclonal de significado renal⁴.

Monitorización del MM

Una vez hecho el diagnóstico de MM, de acuerdo con los criterios anteriormente presentados, es importante conocer el valor añadido de las técnicas anteriormente mencionadas, así como otras adicionales necesarias para evaluar el pronóstico de cada paciente y monitorizar posteriormente la eficacia del tratamiento. Para ello, la monitorización se centrará en cuatro aspectos: evaluación de la enfermedad en el compartimento medular, componente monoclonal, estudios de imagen y monitorización de la enfermedad mínima residual (EMR).

Evaluaciones para estudiar las células plasmáticas

Morfología

El porcentaje de infiltración por células plasmáticas en la médula ósea se realiza habitualmente por morfología y es clave para llevar a cabo un diagnóstico correcto. Puede hacerse aspirado y/o biopsia y, en caso de discrepancia, se considerará el porcentaje más alto. La morfología es válida en la monitorización en tanto en cuanto los pacientes que alcanzan respuesta completa (RC) deben tener una infiltración <5 % para confirmar esta respuesta¹⁴.

Inmunofenotipo

La citometría de flujo (CMF) nos va a permitir identificar la presencia o ausencia de antígenos específicos

en la superficie o citoplasma de las células plasmáticas presentes no solo en la médula ósea, sino también en la sangre periférica o en cualquier fluido donde se sospeche que puede haber infiltración. Permite distinguir células plasmáticas normales y aberrantes, lo cual lo diferencia de la morfología y, como veremos posteriormente, tiene valor para la detección de enfermedad residual mínima. El porcentaje de células plasmáticas aberrantes en la médula ósea sirve, además, para establecer el riesgo de progresión a MM en los diferentes grupos de pacientes con GMSI y MM *smoldering*¹⁵.

Citogenética

La identificación de alteraciones citogenéticas, mediante el cariotipo convencional o hibridación *in situ* fluorescente, se ha convertido en uno de los factores pronósticos más importantes en el MM. Idealmente, todos los pacientes con MM deberían tener al diagnóstico la información de las alteraciones cromosómicas con valor pronóstico, realizadas mediante hibridación *in situ* fluorescente en células plasmáticas seleccionadas. Las alteraciones citogenéticas primarias en MM se pueden clasificar en dos principales subgrupos, translocaciones afectando al gen que codifica para la cadena pesada de las inmunoglobulinas e hiperdiploidías incluyendo fundamentalmente la presencia de trisomías. Los pacientes pueden presentar una o más de estas alteraciones y, generalmente, a lo largo de la evolución de la enfermedad se produce una acumulación de alteraciones citogenéticas secundarias, como las ganancias en 1q21, deleción de p53 o translocaciones secundarias. En el momento actual se considera que la presencia de t(4;14), t(14;16) y deleción de p53 se asocia con un pronóstico adverso¹⁶. Sin embargo, el uso de nuevas técnicas moleculares capaces de analizar el genoma entero, como la hibridación genómica comparada, arrays basados en análisis de polimorfismos de nucleótidos únicos (SNP), perfil de expresión génica (GEP) y técnicas más modernas de siguiente generación (NGS), están añadiendo información a las técnicas clásicas, aunque por el momento su uso queda restringido a la investigación. Merece la pena destacar que la sensibilidad de la FISH es muy baja y, por lo tanto, no está recomendada para evaluación de la EMR.

Evaluación del componente monoclonal

La medición del componente monoclonal en suero y orina es obligado para todos los pacientes en el momento del diagnóstico, así como durante el seguimiento para evaluar la respuesta de la enfermedad al tratamiento. La electroforesis en gel de agarosa es la técnica de elección para la identificación del componente monoclonal, mientras que la nefelometría es útil

para la medición de los niveles de inmunoglobulinas en suero. La inmunofijación sirve para identificar el isotipo de cadena pesada y ligera del componente monoclonal observado en la electroforesis. Si se observa marcada hipogammaglobulinemia y no hay componente monoclonal hay que descartar la presencia de proteinuria de Bence Jones o un componente monoclonal tipo IgD. El valor del componente monoclonal también es útil para realizar el diagnóstico diferencial con la GMSI y con el MM *smoldering*. La detección de FLC en suero se realiza también en el momento del diagnóstico y es especialmente relevante en los MM *smoldering* para ver si cualifican con los criterios actuales como MM. Igualmente, también para pacientes con amiloidosis o MM oligosecretores o no secretores, en los cuales las FLC en suero son útiles para la monitorización de la respuesta. No obstante, en el MM no debe reemplazar la orina de 24 horas en el momento del diagnóstico¹⁷. Más aún, en la actualización de los nuevos criterios el valor del componente monoclonal ha desaparecido debido a que hay MM no secretores en los que el componente monoclonal no se detecta por electroforesis ni por FLC en suero y, sin embargo, cumplen los criterios para ser diagnosticados de MM.

Existe una nueva técnica llamada *heavylite* que permite discriminar entre los distintos tipos de Ig con su cadena pesada y ligera (IgGK, IgAK...). Esta técnica podría ser superior a las FCL en suero y está siendo investigada en ensayos clínicos.

A lo largo de la evolución de la enfermedad, la variación en el componente monoclonal es uno de los criterios más importantes para evaluar la respuesta de la enfermedad y debería realizarse, idealmente, antes de iniciar cada ciclo nuevo de tratamiento. El componente monoclonal en la orina debe ser también monitorizado, incluso en los pacientes sin proteinuria de Bence Jones al diagnóstico, puesto que se ha observado que la presencia de escape de cadenas ligeras en orina puede ser el primer signo de recaída o progresión de la enfermedad. La categoría de remisión completa (RC) requiere, por ejemplo, la desaparición del componente monoclonal en suero y orina por electroforesis e inmunofijación con menos de 5 % de células plasmáticas por morfología, y la de remisión completa estricta (sRC) requiere, además de los criterios de RC, la normalización de la ratio de cadenas ligeras libres en suero junto con la ausencia de células plasmáticas clonales en médula ósea por inmunohistoquímica o inmunofluorescencia o citometría de flujo de dos colores.

Estudios de imagen

La enfermedad ósea es la manifestación clínica más común en el MM y hasta el 90 % de los pacientes desarrollarán lesiones osteolíticas a lo largo del curso

de su enfermedad. Se ha expuesto en el apartado de diagnóstico del MM las nuevas técnicas aceptadas para la evaluación de la enfermedad ósea en MM, por lo que no se repetirán en este momento.

Monitorización de la enfermedad mínima residual (EMR)

Se sabe que la calidad de la respuesta alcanzada tras el tratamiento en pacientes con MM, tanto jóvenes como mayores de nuevo diagnóstico, o incluso en la recaída, es uno de los factores pronósticos más importantes tanto en la supervivencia libre de progresión como en la supervivencia global. Aunque hay argumentos que pueden cuestionar este principio (algunos pacientes no alcanzan RC y son largos supervivientes; hay pacientes que alcanzan RC y, sin embargo, recaen muy pronto; y también pacientes que sin alcanzar RC tienen supervivencias libres de progresión prolongadas), todo podrían tener un denominador común y es la sensibilidad limitada de técnicas serológicas y morfológicas o inmunohistoquímicas para evaluar la EMR, tanto dentro como fuera de la médula ósea¹⁸.

La normalización de las FLC en suero para la definición de RC estricta tiene un papel controvertido en cuanto a su valor pronóstico en comparación con la RC convencional, y su sensibilidad podría ser similar a la inmunofijación. La inmunohistoquímica o la inmunofluorescencia tienen, igualmente, un nivel de sensibilidad no suficientemente alto como para discriminar células plasmáticas patológicas en un paciente que ha recuperado su compartimento de células plasmáticas policlonales. La CMF multiparamétrica, especialmente en el momento actual en que se utilizan hasta ocho colores, es más sensible que las técnicas anteriores, llegando hasta 10^{-5} . El Grupo Español de MM ha demostrado que la RC por citometría de flujo, tanto de cuatro como de ocho colores, es un factor pronóstico muy importante asociado a supervivencias libres de progresión y globales significativamente más largas que cuando la EMR es positiva¹⁹. Una ventaja de la CMF es que no requiere muestra original del diagnóstico y sería recomendable realizarla únicamente cuando el paciente está en RC convencional. Antiguamente tenía el inconveniente de la sensibilidad más limitada en comparación con la biología molecular, aunque ahora, con la CMF de nueva generación, la sensibilidad alcanzada con ambas técnicas es similar. El único inconveniente real actual sería la falta de estandarización de la técnica, aunque se está trabajando en ello a través del consorcio EuroFlow, así como el proyecto Black-Swan, para convertir la CMF en una técnica automatizada.

Las técnicas de biología molecular también pueden utilizarse para evaluar la EMR. En el pasado se utilizó la PCR con oligonucleótidos aleloespecíficos que, aun-

que tenía alta sensibilidad, la aplicabilidad era reducida y se requería de muestra al momento del diagnóstico para poder hacer el seguimiento posterior²⁰. Además, la técnica es laboriosa y de larga duración. El siguiente paso ha sido el desarrollo de la secuenciación masiva, aplicable en más del 80 % de los pacientes, con sensibilidad similar a la CMF y con un valor pronóstico importante en el MM²¹.

Aunque la ausencia de EMR, por CMF o biología molecular, se relaciona con supervivencias más largas, no es sinónimo de “curación” ni de “erradicación completa tumoral”. Un ejemplo claro es la presencia de un patrón parcheado de infiltración en la médula ósea que puede resultar en un falso negativo o, por ejemplo, la presencia de enfermedad fuera de la médula ósea. Este es el motivo por el que las técnicas de imagen antes descritas como válidas para el diagnóstico de MM empiezan a ser utilizadas en la monitorización de la enfermedad y la respuesta se evalúa no solo en el ámbito medular, sino también fuera de la médula ósea. La RMN se ha utilizado en este sentido, pero hay que tener en cuenta que las lesiones hiperintensas pueden permanecer varios meses activas después de alcanzar al RC hematológica debido a inflamación y/o necrosis. La PET-TC ha mostrado valor pronóstico a los siete días de haber iniciado el tratamiento, aunque el mayor valor lo tiene cuando se negativiza a los 3 meses del trasplante autólogo, como ha demostrado el grupo italiano.

En resumen, la EMR representa la valoración conjunta en distintos ámbitos de la respuesta de los pacientes al tratamiento. El interés de la EMR es creciente y, en el futuro, esperamos que el tratamiento se pueda estratificar de acuerdo con la EMR, particularmente en cuanto a consolidación y/o mantenimiento se refiere.

Conclusiones y futuro en el diagnóstico y monitorización del MM

La definición de MM está cambiando con la aparición de nuevos biomarcadores que complementan los criterios clásicos CRAB y eliminan la necesidad de presentar sintomatología relacionada con el MM para ser definido como tal y requerir tratamiento. No obstante, es posible que nuevos parámetros que predigan un elevado riesgo de progresión precoz en MM *smoldering* puedan ser incorporados en el futuro a la definición de MM. En este sentido, los más prometedores podrían ser: evaluación del compartimento de células plasmáticas en la médula ósea por citometría de flujo, células plasmáticas circulantes en sangre periférica, alteraciones citogenéticas en células plasmáticas, marcadores genómicos, o evolución del componente monoclonal a lo largo de la evolución de la enfermedad.

Con respecto a la monitorización, además de algunos cambios en las pruebas necesarias para el segui-

miento, los mayores avances se están realizando en el campo de la detección de la enfermedad mínima residual, ya que cada vez se están incorporando técnicas con mayor aplicabilidad y, sobre todo, sensibilidad. En el futuro la unión de técnicas medulares (citometría de flujo y/o biología molecular), junto con técnicas de imagen, podrían convertirse en estándar para el seguimiento de los pacientes y quizá podamos plantearnos la toma de decisiones terapéuticas en función de sus resultados.

Bibliografía

1. Palumbo A, Anderson K. Multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2011;364(11):1046-60.
2. Kyle RA, San Miguel JF, Mateos MV, Rajkumar SV. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2014;28(5):775-90.
3. Mateos MV, San Miguel JF. Smoldering multiple myeloma. *Hematological oncology*. 2015;33(Suppl 1):33-7.
4. 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(12):e538-48.
5. Mateos MV, Hernández MT, Giraldo P, De la Rubia J, De Arriba F, López Corral L, et al. Lenalidomide plus dexamethasone for high-risk smoldering multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2013;369(5):438-47.
6. Rajkumar SV, Larson D, Kyle RA. Diagnosis of smoldering multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2011;365(5):474-5.
7. Kastritis E, Terpos E, Moullopoulos L, Spyropoulou-Vlachou M, Kanellias N, Eleftherakis-Papaiakovou E, et al. Extensive bone marrow infiltration and abnormal free light chain ratio identifies patients with asymptomatic myeloma at high risk for progression to symptomatic disease. *Leukemia*. 2013;27(4):947-53.
8. Waxman AJ, Mick R, Garfall AL, Cohen A, Vogl DT, Stadtmauer EA, et al. Classifying ultra-high risk smoldering myeloma. *Leukemia*. 2014;20(8):1183-9.
9. Larsen JT, Kumar SK, Dispenzieri A, Kyle RA, Katzmann JA, Rajkumar SV. Serum free light chain ratio as a biomarker for high-risk smoldering multiple myeloma. *Leukemia*. 2013;27(4):941-6.
10. Hillengass J, Fechtner K, Weber MA, Bauerle T, Ayyaz S, Heiss C, et al. Prognostic significance of focal lesions in whole-body magnetic resonance imaging in patients with asymptomatic multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2010;28(9):1606-10.
11. Kastritis E, Moullopoulos LA, Terpos E, Koutoulidis V, Dimopoulos MA. The prognostic importance of the presence of more than one focal lesion in spine MRI of patients with asymptomatic (smoldering) multiple myeloma. *Leukemia*. 2014;28(12):2402-3.
12. Terpos E, Morgan G, Dimopoulos MA, Drake MT, Lentzsch S, Raje N, et al. International Myeloma Working Group recommendations for the treatment of multiple myeloma-related bone disease. *J Clin Oncol*. 2013;31(18):2347-57.
13. Regelink JC, Minnema MC, Terpos E, Kamphuis MH, Rajmakers PG, Pieters-van den Bos IC, et al. Comparison of modern and conventional imaging techniques in establishing multiple myeloma-related bone disease: a systematic review. *Br J Haematol*. 2013;162(1):50-61.
14. Dimopoulos M, Kyle R, Fermand JP, Rajkumar SV, San Miguel J, Chanan-Khan A, et al. Consensus recommendations for standard investigative workup: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. *Blood*. 2011;117(18):4701-5.
15. Paiva B, Martínez-López J, Vidriales MB, Mateos MV, Montalbán MA, Fernández-Redondo E, et al. Comparison of immunofixation, serum free light chain, and immunophenotyping for response evaluation and prognostication in multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2011;29(12):1627-33.
16. Gutiérrez NC, Castellanos MV, Martín ML, Mateos MV, Hernández JM, Fernández M, et al. Prognostic and biological implications of genetic abnormalities in multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: t(4;14) is the most relevant adverse prognostic factor, whereas RB deletion as a unique abnormality is not associated with adverse prognosis. *Leukemia*. 2007;21(1):143-50.
17. García-Sanz R, Mateos MV, San Miguel JF. Multiple myeloma. *Med Clin*. 2007;129(3):104-15.
18. Mateos MV, Ocio EM, Paiva B, Rosinol L, Martínez-López J, Blade J, et al. Treatment for patients with newly diagnosed multiple myeloma in 2015. *Blood Rev*. 2015;126(7):858-62.
19. Paiva B, Vidriales MB, Montalbán MA, Pérez JJ, Gutiérrez NC, Rosinol L, et al. Multiparameter flow cytometry evaluation of plasma cell DNA content and proliferation in 595 transplant-eligible patients with myeloma included in the Spanish GEM2000 and GEM2005<65y trials. *The American journal of pathology*. 2012;181(5):1870-8.
20. Puig N, Sarasquete ME, Balanzategui A, Martínez J, Paiva B, García H, et al. Critical evaluation of ASO RQ-PCR for minimal residual disease evaluation in multiple myeloma. A comparative analysis with flow cytometry. *Leukemia*. 2013;41(10):894-902.
21. 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.

Tratamiento del linfoma de células del manto

MIGUEL ÁNGEL CANALES ALBENDEA

Servicio de Hematología. Hospital Universitario La Paz. Madrid

Introducción

El linfoma de células del manto (LCM) se caracteriza por la translocación 11;14 que conlleva la expresión de CCND1. Esta alteración se traduce en dos procesos clínicos diferentes, uno de presentación clínica agresiva, asociado a la expresión de SOX11 y otro de curso indolente, con ausencia de expresión de SOX11, caracterizado por linfocitosis periférica y afectación esplénica¹. Ello explica que la actitud terapéutica en pacientes con LCM varíe desde la abstención terapéutica hasta el trasplante alogénico, sin que podamos definir en la actualidad un tratamiento estándar en el LCM.

Factores pronóstico en linfoma de células del manto

Los resultados en LCM se pueden predecir por el Índice Pronóstico Internacional para LCM o MIPI, basado en la edad, situación funcional según ECOG, niveles de LDH y recuento de leucocitos. El MIPI estratifica a los pacientes en 3 grupos de riesgo, con medianas de supervivencia de 29 meses en pacientes de alto riesgo, 51 meses en aquellos de riesgo intermedio y no alcanzada en pacientes de bajo riesgo^{2,3}.

El Ki-67 ha sido usado como marcador de proliferación, con el punto de corte en el 30 %, con valor pronóstico independiente del MIPI⁴. Sin embargo, la interpretación de Ki-67 mediante inmunohistoquímica está sujeta a una enorme variabilidad y en la mayoría de los casos al diagnóstico su valor es inferior al 30 %. Aquellos casos con elevado Ki-67 al diagnóstico tienen asociada la mutación DEL17P/P53, rasgos característicos de la variante blastoide y más frecuentemente detectados en recaídas sucesivas (evolución clonal). Sin embargo, serán la edad y la situación funcional los dos principales factores que determinarán la elección terapéutica en los pacientes con LCM.

Estrategias actuales en el tratamiento del linfoma de células del manto

En pacientes jóvenes candidatos a trasplante, hay un claro consenso, derivado de los resultados de ensayos clínicos y de la práctica clínica habitual, que estrategias más intensivas se traducen en mejores resultados, con notable incremento de la supervivencia libre de progresión (SLP) en comparación con el esquema R-CHOP. En el estudio del NCCN, la SLP a los tres años con R-CHOP fue del 18 % frente al 55-58 % alcanzada con estrategias más intensivas, aunque sin beneficio en supervivencia global (SG)⁵. La combinación HyperCVAD/MA con rituximab ha conseguido tasas de respuestas completas del 87 % con SG a los ocho años del 56 %^{6,7}, si bien los resultados del MD Anderson no se han reproducido en otras series, condicionados por una toxicidad importante, que condiciona que hasta el 63 % de los pacientes no sean capaces de completar el esquema de tratamiento previsto^{8,9}. El beneficio de esquemas de inmunoterapia, con la inclusión de altas dosis de citarabina, seguidos de trasplante autólogo ha sido demostrado en diversos estudios. La combinación de tres ciclos R-CHOP con tres ciclos DHAP en una serie de pacientes menores de 65 años, seguido de trasplante autólogo ha conseguido medianas de supervivencia libre de evento (SLE) y SLP de 84 meses, con SG a los cinco años del 75 %¹⁰. Asimismo, destacan los resultados del grupo Nórdico, con SLE y SG a los 10 años del 43 % y 58 %, respectivamente, similares a los obtenidos por el grupo del MD Anderson, pero con menor toxicidad^{11,12}. El beneficio de los regímenes con altas dosis de citarabina ha sido también confirmado en el estudio aleatorizado de la red europea (European MCL Network).

Sin embargo las recaídas tardías son habituales, lo que apoya el desarrollo de estrategias de consolidación y/o mantenimiento. En este sentido, datos recientes apoyan el mantenimiento con rituximab postrasplante, con aumento de SLP¹³.

En el paciente no candidato a trasplante, R-CHOP ha sido el estándar de tratamiento, con tasas de respuestas globales del 80 %. Sin embargo la proporción de respuestas completas es baja (30-40 %) y la mayoría de los pacientes recaen, con SLP a los dos años del 18-25 % (Tabla 1). En este grupo de pacientes hay dos estrategias que han mejorado los resultados. La administración de tratamiento de mantenimiento con rituximab, tras el tratamiento inicial con R-CHOP, se traduce en mayor duración de la respuesta y SG¹⁴. Por otro lado, el esquema inicial con bendamustina, mejora de forma significativa la SLP (35,4 meses vs. 22,1 meses) comparado a R-CHOP¹⁵; datos que se han visto posteriormente confirmados en el ensayo BRIGHT¹⁶.

Papel de los nuevos fármacos

En la actualidad, hay cuatro fármacos con datos consolidados en el tratamiento de rescate del LCM: temsirolimus, bortezomib, lenalidomida e ibrutinib. En monoterapia, los resultados más modestos parecen asociarse a temsirolimus con tasas de respuesta del 22 % (2 % RC) y mediana de SLP de 4,8 meses¹⁷. Los resultados con bortezomib y lenalidomida son similares, si bien, existen diferencias en las características de los pacientes incluidos en cada estudio^{18,19}. La proporción de respuestas y el impacto sobre SLP y SG se resumen en la Tabla 2. Los resultados más prometedores son los conseguidos con ibrutinib²⁰, un inhibidor de la tirosina cinasa de Bruton. En la actualización de la serie, presen-

tada en la última reunión de la Sociedad Americana de Hematología (ASH), la SLP a los dos años es del 31 % (mediana 13 meses) y la SG a los dos años del 47 % (mediana 22 meses)²¹.

Los resultados mejoran cuando estos fármacos se incorporan al tratamiento inicial de los pacientes con LCM. Así, el estudio pivotal LYM-3002, que compara VcR-CAP (sustituyendo vincristina por bortezomib en el esquema CHOP) con R-CHOP, consigue mayor proporción de respuestas completas y aumento de SLP (24,7 meses vs. 14,4 meses)²². Del mismo modo, se han presentado en forma de *abstract* los resultados de la combinación rituximab y lenalidomida, en una población de pacientes de bajo riesgo, con mediana de edad de 65 años, consiguiendo tasas de respuesta del 84 %, con SLP a los 2 años del 84 % (independientemente del MIPI) y SG del 92 % .

Conclusiones

El LCM es un linfoma agresivo, de mal pronóstico, para el cual no existe en la actualidad un tratamiento estándar. Si bien es cierto que la supervivencia de estos pacientes ha mejorado en los últimos años con la introducción de rituximab, la citarabina y la intensificación con trasplante autólogo, es necesario mejorar los resultados tanto en pacientes jóvenes como en ancianos. En este sentido, será fundamental la introducción de los nuevos fármacos en el algoritmo terapéutico del LCM.

Tabla 1. Resultados con R-CHOP y R-Bendamustina en el paciente anciano y/o no candidato a trasplante

Autor, año	Esquema	Respuestas/RC (%)	Resultados de eficacia	Supervivencia global
Lenz <i>et al.</i> , 2005	R-CHOP vs. CHOP	94/34 75/7	SLP 21 m SLP 14 m	77 % (2 años) 77 % (2 años)
Rummel <i>et al.</i> , 2013	R-CHOP vs. R-Benda	91/30 93/40	SLP 31 m SLP 69 m	No diferencia
Flinn <i>et al.</i> , 2014	R-CHOP/R-CVP vs. R-Benda	84/24 94/51	-	-

Tabla 2. Eficacia de los nuevos fármacos en el LCM en recaída o refractario

	Respuestas/RC (%)	Duración respuesta, meses	SLP, meses	SG, meses
Bortezomib (PINNACLE)	32/8	9,2	6,5	23,5
Temsirolimus (175/75 mg)	22/2	7,1	4,8	12,8
Lenalidomide				
MCL-001	28/8	16,6	4	19
MCL-002	40/5	16,1	8,7	27,9
Ibrutinib	68/21	17,5	13	22

Bibliografía

1. Campo E, Rule S. Mantle cell lymphoma: evolving management strategies. *Blood* 2015;125:48-55.
2. Hoster E, Dreyling M, Klapper W, Gisselbrecht C, Van Hoof A, Kluin-Nelemans HC, et al. A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood*. 2008;111:558-65.
3. Hoster E, Klapper W, Hermine O, Kluin-Nelemans HC, Walewski J, Van Hoof A, et al. Confirmation of the mantle-cell lymphoma International Prognostic Index in randomized trials of the European Mantle-Cell Lymphoma Network. *J Clin Oncol*. 2014;32:1338-46.
4. Determann O, Hoster E, Ott G, Bernd H-W, Loddenkemper C, Hansmann M-L, et al. Ki-67 predicts outcome in advanced-stage mantle cell lymphoma patients treated with anti-CD20 immunotherapy: results from randomized trials of the European MCL Network and the German Low Grade Lymphoma Study Group. *Blood*. 2008;111:2385-7.
5. Lacasce AS, Vandergrift JL, Rodríguez MA, Abel GA, Crosby AL, Czuczman MS, et al. Comparative outcome of initial therapy for younger patients with mantle cell lymphoma: an analysis from the NCCN NHL Database. *Blood*. 2012;119:2093-9.
6. Romaguera JE, Fayad L, Rodríguez MA, Broglio KR, Hagemeister FB, Pro B, et al. High rate of durable remissions after treatment of newly diagnosed aggressive mantle-cell lymphoma with rituximab plus hyper-CVAD alternating with rituximab plus high-dose methotrexate and cytarabine. *J Clin Oncol*. 2005;23:7013-23.
7. Romaguera JE, Fayad LE, Feng L, Hartig K, Weaver P, Rodríguez MA, et al. Ten-year follow-up after intense chemoimmunotherapy with Rituximab-HyperCVAD alternating with Rituximab-high dose methotrexate/cytarabine (R-MA) and without stem cell transplantation in patients with untreated aggressive mantle cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2010;150:200-8.
8. Merli F, Luminari S, Ilariucci F, Petrini M, Visco C, Ambrosetti A, et al. Rituximab plus HyperCVAD alternating with high dose cytarabine and methotrexate for the initial treatment of patients with mantle cell lymphoma, a multicentre trial from Gruppo Italiano Studio Linfomi. *Br J Haematol*. 2011;156:346-53.
9. Bernstein SH, Epner E, Unger JM, Leblanc M, Cebula E, Burack R, et al. A phase II multicenter trial of hyperCVAD MTX/Ara-C and rituximab in patients with previously untreated mantle cell lymphoma; SWOG 0213. *Ann Oncol*. 2013;24:1587-93.
10. Delarue R, Haioun C, Ribrag V, Brice P, Delmer A, Tilly H, et al. CHOP and DHAP plus rituximab followed by autologous stem cell transplantation in mantle cell lymphoma: a phase 2 study from the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *Blood*. 2013;121:48-53.
11. Geisler CH, Kolstad A, Laurell A, Andersen NS, Pedersen LB, Jerkeman M, et al. Long-term progression-free survival of mantle cell lymphoma after intensive front-line immunochemotherapy with in vivo-purged stem cell rescue: a nonrandomized phase 2 multicenter study by the Nordic Lymphoma Group. *Blood*. 2008;112:2687-93.
12. Geisler CH, Kolstad A, Laurell A, Jerkeman M, Råty R, Andersen NS, et al. Nordic MCL2 trial update: six-year follow-up after intensive immunochemotherapy for untreated mantle cell lymphoma followed by BEAM or BEAC + autologous stem-cell support: still very long survival but late relapses do occur. *Br J Haematol*. 2012;158:355-62.
13. Dietrich S, Weidle J, Rieger M, Meissner J, Radujkovic A, Ho AD, et al. Rituximab maintenance therapy after autologous stem cell transplantation prolongs progression-free survival in patients with mantle cell lymphoma. *Leukemia*. 2014;28:708-9.
14. Kluin-Nelemans HC, Hoster E, Hermine O, Walewski J, Trneny M, Geisler CH, et al. Treatment of older patients with mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2012;367:520-31.
15. Rummel MJ, Niederle N, Maschmeyer G, Banat GA, Grünhagen von U, Losem C, et al. Bendamustine plus rituximab versus CHOP plus rituximab as first-line treatment for patients with indolent and mantle-cell lymphomas: an open-label, multicentre, randomised, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet*. 2013;381:1203-10.
16. Flinn IW, Der Jagt Van R, Kahl BS, Wood P, Hawkins TE, MacDonald D, et al. Randomized trial of bendamustine-rituximab or R-CHOP/R-CVP in first-line treatment of indolent NHL or MCL: the BRIGHT study. *Blood*. 2014;123:2944-52.
17. Hess G, Herbrecht R, Romaguera J, Verhoef G, Crump M, Gisselbrecht C, et al. Phase III study to evaluate temsirolimus compared with investigator's choice therapy for the treatment of relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2009;27:3822-9.
18. Goy A, Bernstein SH, Kahl BS, Djulbegovic B, Robertson MJ, De Vos S, et al. Bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma: updated time-to-event analyses of the multicenter phase 2 PINNACLE study. *Ann Oncol*. 2009;20:520-5.
19. Goy A, Sinha R, Williams ME, Kalayoglu Besisik S, Drach J, Ramchandren R, et al. Single-agent lenalidomide in patients with mantle-cell lymphoma who relapsed or progressed after or were refractory to bortezomib: phase II MCL-001 (EMERGE) study. *J Clin Oncol*. 2013;31:3688-95.
20. Wang ML, Rule S, Martin P, Goy A, Auer R, Kahl BS, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2013;369:507-16.
21. Wang ML, Blum KA, Martin P, Goy A, Auer R, Kahl BS, et al. Long-term follow-up of MCL patients treated with single-agent ibrutinib: Updated safety and efficacy results. *Blood*. 2015 (pre-published online June 9, 2015).
22. Robak T, Huang H, Jin J, Zhu J, Liu T, Samoiloova O, et al. Bortezomib-based therapy for newly diagnosed mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2015;372:944-53.

Profilaxis y tratamiento de la enfermedad tromboembólica venosa en pacientes con cáncer

RAMÓN LECUMBERRI, ANA ALFONSO, ROCÍO FIGUEROA

Servicio de Hematología. Clínica Universidad de Navarra. Pamplona

Introducción

En los últimos años estamos asistiendo a un creciente interés en el estudio de la asociación entre cáncer y trombosis. Aunque clásicamente se ha denominado esta asociación como síndrome de Trousseau, en realidad la primera descripción de la asociación parece corresponder a Jean Baptiste Bouillaud, en 1823. Resulta en cierto modo curioso que Armand Trousseau realizó su famosa descripción en 1865 y dos años más tarde él mismo se la autodiagnosticó y falleció al poco tiempo.

Aproximadamente el 20 % de los episodios de tromboembolismo venoso (TEV) están asociados a un cáncer. En la actualidad, las complicaciones trombóticas, en general, constituyen la segunda causa de mortalidad en el paciente oncológico. Aunque existen diferencias en función del tipo de tumor, globalmente se ha estimado que los pacientes con cáncer presentan una incidencia de tromboembolismo venoso (TEV) de 10-13 casos por cada 1.000 personas y año, lo que supone 6-10 veces más que la población general. Se ha observado una tendencia al aumento de esta incidencia en los últimos años, posiblemente relacionada con una mayor supervivencia de los pacientes, con la consiguiente administración de más tratamientos quimioterápicos a pacientes de mayor edad, así como con una mayor sensibilidad de las técnicas diagnósticas¹.

Los pacientes con cáncer activo que desarrollan un TEV, tanto trombosis venosa profunda (TVP) como embolia pulmonar (EP), presentan mayor riesgo de recurrencia trombótica, de hemorragias mayores y de mortalidad asociada al proceso trombótico que los pacientes con TEV no asociado a cáncer². Además, el hecho de sufrir un TEV empeora el pronóstico de la propia enfermedad neoplásica³; por tanto, es necesario mejorar las estrategias dirigidas a la prevención del TEV en los pacientes con cáncer así como avanzar en el manejo del TEV en esta población de alto riesgo.

Las recomendaciones incorporadas en distintas guías de práctica clínica recientemente publicadas puede resultar de gran ayuda para la toma de decisiones por

parte del clínico, pero en muchos aspectos la evidencia disponible es muy escasa^{4,6}.

Profilaxis del TEV en pacientes con cáncer

Cabe diferenciar al menos cuatro escenarios distintos para la profilaxis del TEV en el paciente con cáncer: la cirugía oncológica, la hospitalización por proceso médico agudo, el paciente ambulatorio en tratamiento quimioterápico y la prevención de la trombosis venosa asociada a catéter venoso central (TV-CVC).

Prevención del TEV en cirugía oncológica

Los pacientes con cáncer sometidos a una intervención quirúrgica tienen un riesgo de sufrir un episodio de TEV 2-3 veces superior al de los pacientes sin cáncer. Además, el riesgo persiste durante varias semanas tras la cirugía⁷. Por dicho motivo, todas las guías clínicas recomiendan la utilización de profilaxis antitrombótica farmacológica con heparina de bajo peso molecular (HBPM), empleando dosis “profilácticas de alto riesgo” salvo que exista contraindicación, en cuyo caso se deberá optar por medidas físicas (medias elásticas, dispositivos de compresión neumática intermitente, etc.).

Por otra parte, en los estudios ENOXACAN-II, FAME y CANBESURE, la prolongación de la profilaxis hasta cuatro semanas en pacientes sometidos a cirugía oncológica abdominal o pélvica se asoció con una reducción en la incidencia de complicaciones tromboembólicas. De manera uniforme, las guías clínicas actualmente vigentes incluyen dicha recomendación^{4,6}. Aunque en cirugía laparoscópica apenas existen estudios, las recomendaciones son similares^{4,8}.

Prevención del TEV en pacientes con cáncer hospitalizados

Nuevamente existe unanimidad en las distintas guías, que recomiendan la administración de profilaxis con HBPM a todo paciente con cáncer hospitalizado por

patología médica aguda o con movilidad reducida, en ausencia de contraindicación. Quedarían excluidos los pacientes que ingresan exclusivamente para recibir el tratamiento quimioterápico⁴⁻⁶.

Sin embargo, esta recomendación se basa en la extrapolación de los resultados obtenidos en los estudios MEDENOX, PREVENT y ARTEMIS en pacientes con patología médica en general. El porcentaje de pacientes con cáncer activo incluidos en estos estudios fue escaso (5-15 %). En un reciente metaanálisis enfocado al grupo de pacientes con cáncer de los estudios mencionados anteriormente no se observó beneficio de la tromboprofilaxis farmacológica en términos de reducción de eventos tromboembólicos (RR 0,91; IC95 % 0,21-4,00), aunque había diferencias notables entre estudios⁹.

Varios trabajos han puesto de manifiesto una preocupante infrautilización de la profilaxis antitrombótica en pacientes con cáncer hospitalizados^{10,11}. La utilización de sistemas de recuerdo, como las alertas electrónicas, podría ser de utilidad para mejorar dicha tasa de adecuada tromboprofilaxis. Sin embargo, en nuestra experiencia, la mejoría de la tasa de tromboprofilaxis no se asoció con una clara reducción de eventos durante la hospitalización en los pacientes con cáncer¹¹. Llamaba la atención que una proporción significativa de episodios de TEV en el contexto de hospitalización por cáncer (hasta el 60 % en nuestra serie y también en otras) se desarrollaban a pesar de la tromboprofilaxis farmacológica. Este hecho plantea la hipótesis de que algunos pacientes de muy alto riesgo trombótico y bajo riesgo hemorrágico podrían requerir dosis más elevadas de HBPM. Por ahora no disponemos de herramientas para poder identificar de forma clara a estos pacientes.

Profilaxis antitrombótica en pacientes en tratamiento quimioterápico ambulatorio

Con la excepción de los pacientes con mieloma múltiple en tratamiento con talidomida o lenalidomida, no se recomienda la administración rutinaria de tromboprofilaxis farmacológica en este escenario⁴⁻⁶. Los estudios PROTECHT y SAVE-ONCO, en pacientes ambulatorios con diversos tipos de cáncer, demostraron que la administración de tromboprofilaxis se asociaba con una reducción estadísticamente significativa de la incidencia de TEV, pero la disminución en términos absolutos era escasa y tampoco había diferencias en la supervivencia^{12,13}.

Los resultados son más prometedores en pacientes seleccionados con mayor riesgo de trombosis, de acuerdo con la escala de Khorana (validada para este fin)¹⁴. Están en marcha estudios prospectivos al respecto. En este sentido, recientes guías internacionales sugieren considerar la prescripción de profilaxis antitrombótica

con HBPM en pacientes en tratamiento quimioterápico ambulatorio por cáncer de páncreas o pulmón avanzados, debido a la especial incidencia de TEV en estas neoplasias⁴.

Prevención de TV-CVC

La incidencia actual de episodios sintomáticos de TV-CVC no llega al 5 %. Los resultados de los distintos estudios realizados no permiten recomendar la profilaxis rutinaria en este contexto. Se sugiere que los catéteres de larga duración se inserten preferiblemente en el lado derecho, en la vena yugular, y que la punta del catéter se sitúe en la zona de unión de la vena cava superior con la aurícula derecha⁴.

Tratamiento del TEV en pacientes con cáncer

En general, el tratamiento consiste en anticoagulación. El uso de filtros en vena cava inferior (preferiblemente retirables) debe limitarse a pacientes con contraindicación para el tratamiento anticoagulante. Las HBPM constituyen el tratamiento de elección para el tratamiento inicial y a largo plazo (6 meses)⁴⁻⁶. Los resultados del estudio CATCH han confirmado la superioridad de las HBPM frente a los antagonistas de la vitamina K (AVK), cuyo manejo en el paciente oncológico resulta tremendamente complejo¹⁵. Durante los 6 meses de terapia anticoagulante, el uso de tinzaparina redujo un 40 % la incidencia de recurrencia trombótica en comparación con warfarina, sin aumentar la tasa de hemorragias mayores.

La duración del tratamiento anticoagulante es una cuestión controvertida. En general, se recomienda continuar con el tratamiento anticoagulante mientras el cáncer permanezca activo⁴⁻⁶, pero no existen datos para recomendar de forma tajante el fármaco de elección pasados los primeros 6 meses. Las preferencias del paciente pueden jugar un papel muy importante en la toma de decisiones en este punto. En el recientemente publicado estudio DALTECAN, se evaluó la eficacia y seguridad de dalteparina entre el 6.º y 12.º mes tras un episodio de TEV asociado a cáncer. La incidencia de hemorragia mayor durante el tratamiento con dalteparina disminuía a lo largo del tiempo¹⁶.

Aunque los anticoagulantes orales de acción directa (ACOD) han obtenido resultados positivos en los estudios realizados en el tratamiento del TEV¹⁷, por el momento no se recomienda su utilización sistemática en los pacientes con TEV asociada a cáncer. Además de que el porcentaje de pacientes con cáncer activo en dichos estudios era muy bajo (5,3 %), el brazo comparador en todos ellos fue warfarina. En la actualidad están en marcha estudios que comparan la eficacia y seguridad de algunos de estos ACODs frente a HBPM en el

tratamiento de la trombosis asociada a cáncer. Desde el punto de vista clínico, podría resultar particularmente interesante la utilización de estos fármacos como estrategia de profilaxis secundaria tras los primeros 6 meses de tratamiento con HBPM.

Pero el tratamiento del TEV en pacientes con cáncer puede complicarse mucho si se consideran algunas circunstancias relevantes, como por ejemplo la posibilidad de trombocitopenia secundaria al tratamiento quimioterápico, afectación tumoral primaria o secundaria del sistema nervioso central, insuficiencia renal, etc. Las guías clínicas no dan recomendaciones firmes al respecto, más allá de la necesidad de la evaluación individual de cada caso particular.

Tampoco en el caso de enfrentarnos a una recurrencia trombotica durante el tratamiento anticoagulante existen recomendaciones claras. Las opciones incluyen el cambio de fármaco anticoagulante (sobre todo de AVK a HBPM), aumento de dosis e inserción de filtro en la vena cava inferior. Un reciente registro de la ISTH ha puesto de manifiesto la enorme variabilidad existente en la forma de actuar en esta situación¹⁸.

Conclusiones

La trombosis asociada a cáncer, por su magnitud en términos de frecuencia y sus consecuencias (morbimortalidad, influencia en calidad de vida, consumo de recursos económicos) es un problema que merece mayor atención. Es prioritario trabajar en la implantación de medidas dirigidas a mejorar la prevención de esta patología. Dada la ausencia de evidencia de calidad en muchos aspectos del manejo del TEV asociado a cáncer es fundamental apoyar la investigación en este campo, estimulando la creación de grupos cooperativos.

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por ayudas del Instituto de Salud Carlos III para la evaluación de tecnología sanitarias (PI05/900094) y del FIS (PI09/0700 y PI13/01029).

Bibliografía

1. Timp JF, Braekkan SK, Versteeg HH, Cannegieter SC. Epidemiology of cancer associated venous thrombosis. *Blood*. 2013;122:1712-23.
2. Prandoni P, Lensing AW, Piccioli A, Bernardi E, Simioni P, Girolami B, et al. Recurrent venous thromboembolism and bleeding complications during anticoagulant treatment in patients with cancer and venous thrombosis. *Blood*. 2002; 100: 3484-8.
3. Sørensen HT, Mellekjaer L, Olsen JH, Baron JA. Prognosis of cancers associated with venous thromboembolism. *N Engl J Med*. 2000;343:1846-50.
4. Farge D, Debourdeau P, Beckers M, Baglin C, Bauersachs RM, Brenner B, et al. International clinical practice guidelines for the treatment and prophylaxis of venous thromboembolism in patients with cancer. *J Thromb Haemost*. 2013;11:56-70.
5. Lyman GH, Bohlke K, Khorana AA, Kuderer NM, Lee AY, Arcelus JI, et al. Venous thromboembolism prophylaxis and treatment in patients with cancer: american society of clinical oncology clinical practice guideline update 2014. *J Clin Oncol*. 2015;33:654-6.
6. Muñoz Martín AJ, Font Puig C, Navarro Martín LM, Borrega García P, Martín Jiménez M. Clinical guide SEOM on venous thromboembolism in cancer patients. *Clin Transl Oncol*. 2014;16:1079-90.
7. Agnelli G, Bolis G, Capussotti L, Scarpa RM, Tonelli F, Bonizzoni E, et al. A clinical outcome-based prospective study on venous thromboembolism after cancer surgery: the @RISTOS project. *Ann Surg*. 2006;243:89-95.
8. Vedovati MC, Becattini C, Rondelli F, Boncompagni M, Camporese G, Balzarotti R, et al. A randomized study on 1-week versus 4-week prophylaxis for venous thromboembolism after laparoscopic surgery for colorectal cancer. *Ann Surg*. 2014;259:665-9.
9. Carrier M, Khorana AA, Moretto P, Le Gal G, Karp R, Zwicker JI. Lack of evidence to support thromboprophylaxis in hospitalized medical patients with cancer. *Am J Med*. 2014;127:82-6.
10. Zwicker JI, Rojan A, Campigotto F, Rehman N, Funches R, Connolly G, et al. Pattern of frequent but nontargeted pharmacologic thromboprophylaxis for hospitalized patients with cancer at academic medical centers: a prospective, cross-sectional, multicenter study. *J Clin Oncol*. 2014;32:1792-6.
11. Lecumberri R, Marqués M, Panizo E, Alfonso A, García-Mouriz A, Gil-Bazo I, et al. High incidence of venous thromboembolism despite electronic alerts for thromboprophylaxis in hospitalised cancer patients. *Thromb Haemost*. 2013;110:184-90.
12. Agnelli G, Gussoni G, Bianchini C, Verso M, Mandalà M, Cavana L, et al. Nadroparin for the prevention of thromboembolic events in ambulatory patients with metastatic or locally advanced solid cancer receiving chemotherapy: a randomised, placebo-controlled, double-blind study. *Lancet Oncol*. 2009;10:943-9.
13. Agnelli G, George DJ, Kakkar AK, Fisher W, Lassen MR, Mismetti P, et al. Semuloparin for thromboprophylaxis in patients receiving chemotherapy for cancer. *N Engl J Med*. 2012;366:601-9.
14. Khorana AA, Kuderer NM, Culakova E, Lyman GH, Francis CW. Development and validation of a predictive model for chemotherapy-associated thrombosis. *Blood*. 2008;111:4902-7.
15. Lee AY, Bauersachs R, Janas MS, Järner MF, Kamphuisen PW, Meyer G, et al. CATCH: a randomised clinical trial comparing long-term tinzaparin versus warfarin for treatment of acute venous thromboembolism in cancer patients. *BMC Cancer*. 2013;13:284.
16. Francis CW, Kessler CM, Goldhaber SZ, Kovacs MJ, Monreal M, Huisman MV, et al. Treatment of venous thromboembolism in cancer patients with dalteparin for up to 12 months: the DALTECAN Study. *J Thromb Haemost*. 2015;13:1028-35.
17. Van der Hulle T, den Exter PL, Kooiman J, van der Hoeven JJ, Huisman MV, Klok FA. Meta-analysis of the efficacy and safety of new oral anticoagulants in patients with cancer-associated acute venous thromboembolism. *J Thromb Haemost*. 2014;12:1116-20.
18. Schulman S, Zondag M, Linkins L, Pasca S, Cheung YW, De Sancho M, et al. Recurrent venous thromboembolism in anticoagulated patients with cancer: management and short-term prognosis. *J Thromb Haemost*. 2015;13:1010-8.

Presente y futuro del tratamiento profiláctico en hemofilia

MARÍA TERESA ÁLVAREZ ROMÁN

Servicio de Hematología. Hospital Universitario La Paz. Madrid

Introducción

Actualmente, la profilaxis es el tratamiento de elección para los pacientes con hemofilia^{1,2}.

El concepto de profilaxis en hemofilia surge a partir de estudios que ponían de manifiesto que los pacientes con niveles de FVIII >1 % raramente desarrollaban una artropatía grave^{3,4}. De este modo, mediante la administración del factor deficitario varios días a la semana, se incrementan los niveles plasmáticos de factor, convirtiendo una hemofilia grave en moderada y disminuyendo así la probabilidad de desarrollo de artropatía. A finales de los años 50, en Suecia y en Holanda se comienza a utilizar la profilaxis en estos pacientes, aunque con regímenes menos intensivos que los empleados actualmente^{5,6}.

Varios estudios prospectivos han demostrado que la profilaxis reduce el número de hemartros y de otros sangrados graves, favoreciendo así la integración de los pacientes en el trabajo, deportes y actividades de ocio y mejorando su calidad de vida⁷⁻¹¹.

Definición y objetivo

Se define profilaxis como la administración continuada del factor deficitario un mínimo de 45 semanas al año con el objetivo de prevenir el sangrado. De acuerdo con lo establecido por la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (ISTH), se pueden distinguir tres tipos de profilaxis en hemofilia¹²:

- **Profilaxis primaria:** aquella que comienza precozmente en la infancia, antes de los tres años de vida, en ausencia de enfermedad articular documentada (mediante exploración física y/o técnicas de imagen) y antes de la aparición del segundo hemartros.
- **Profilaxis secundaria:** aquella que comienza después de dos o más sangrados articulares pero sin enfermedad articular documentada mediante exploración física y/o técnicas de imagen.

- **Profilaxis terciaria:** cuando se instaura una vez que ya existe artropatía (puesta de manifiesto por exploración física o radiografía simple) a cualquier edad del paciente.

En función de la edad del paciente y de su estado articular previo, los objetivos de la profilaxis son diferentes. Así, en los pacientes en profilaxis primaria el objetivo es evitar el inicio de la artropatía, debiendo ser próximo a cero el número anual de hemartros. En los pacientes en profilaxis secundaria, en los cuales el riesgo de artropatía es mayor, el objetivo de la profilaxis es minimizar el desarrollo de artropatía y la aparición de articulaciones diana, mediante la reducción de la frecuencia de sangrados. Finalmente, en la profilaxis terciaria se trata de retrasar la progresión de la artropatía, reducir el dolor y la inflamación y mantener la movilidad.

Regímenes utilizados

A lo largo de los últimos años se han venido utilizando diferentes protocolos para el tratamiento profiláctico. Todos ellos consideraban el peso del paciente como única variable a la hora de ajustar la profilaxis. En la [Tabla 1](#) se describen los detalles de los protocolos de Malmö (el más utilizado), de Utrecht y de Canadá. Un reciente estudio que valora los resultados del grupo de Malmö (altas dosis) y el de Utrecht (dosis intermedias) ha mostrado que ambos son eficaces, no habiéndose encontrado diferencias en la calidad de vida de los pacientes. Sin embargo, el coste en el grupo que recibía altas dosis era significativamente más elevado, motivo por el cual concluyen que se debería individualizar el tratamiento, estando únicamente indicada la profilaxis a altas dosis en un determinado grupo de pacientes (aquellos con mayor actividad física o con presencia de articulaciones diana)¹³.

Además de estos protocolos, cabe destacar el régimen de Bremen, cuyo objetivo principal es minimizar el riesgo de desarrollo de inhibidor en los primeros días

Tabla 1. Regímenes de profilaxis más frecuentemente utilizados

Régimen profiláctico	Dosis
Altas dosis (Malmö)	25*-40 UI/kg 3 veces a la semana, comenzando a la edad de 1-2 años, independientemente del fenotipo hemorrágico
Dosis intermedias (Dutch/Utrecht)	15-25* UI/kg 2-3 veces a la semana comenzando habitualmente después del primer hemartros
Dosis escalonada (Canadiense)	50 UI/kg por semana, ajustando a 30 UI/kg dos veces a la semana, o a 25 UI/kg cada 48 h, dependiendo del fenotipo hemorrágico
*25 UI/kg tres veces por semana es la menor dosis usada en el protocolo de Malmö y la dosis más alta del protocolo de Utrecht. Adaptada de: Valentino et al. Haemophilia. 2014; 20: 607-1.	

de exposición al factor. Basándose en las observaciones de los estudios CANAL y RODIN, en los que la incidencia de inhibidor era significativamente menor en el grupo de profilaxis que en el tratado a demanda^{14,15}, el grupo de Bremen propuso iniciar la profilaxis de forma precoz a los 10 meses de vida, administrando una dosis baja de factor (25 UI/kg/semana) en ausencia de “señales de peligro” como vacunaciones, infecciones, periodos de tratamiento intensivo o sangrado que estimularan el sistema inmune durante las primeras 20-50 exposiciones. Cuando el paciente aumentara su actividad física, y en función de su fenotipo hemorrágico, se aumentaría el número de días de administración de factor. Este protocolo mostró una disminución en la incidencia de inhibidor en sus primeros 26 pacientes. Posteriormente, los datos fueron actualizados en 2011 con un total de 40 pacientes, sin que variaran sus resultados^{16,17}. Sin embargo, un estudio prospectivo y multicéntrico diseñado para tratar de corroborar estos hallazgos (estudio EPIC, *Early Prophylaxis Immunologic Challenge*) tuvo que ser suspendido debido a la alta incidencia de inhibidor¹⁸. Ello fue posiblemente debido a las dificultades en la adherencia para el cumplimiento del protocolo.

Profilaxis personalizada

En los últimos años, numerosos estudios han mostrado un mayor beneficio clínico y de coste-eficacia utilizando una profilaxis personalizada en la que se valora la farmacocinética (PK) del factor infundido, así como otras características del paciente, como su estilo de vida, su fenotipo hemorrágico, su estado articular y su adherencia a la profilaxis (Figura 1)^{19,21}.

La PK adquiere más importancia en profilaxis desde que se demostró que la vida media ($t_{1/2}$) del factor infundido tenía importantes variaciones inter e intraindividuales²². Asimismo, conocer otros parámetros de la

PK como los picos o puntos de concentración máxima (Cmáx), los niveles valle y el área bajo la curva, es útil a la hora de planificar la profilaxis. La Cmáx o pico es importante para prevenir los sangrados relacionados con los traumatismos o el ejercicio físico intenso, los niveles valle protegerían de los sangrados espontáneos y el área bajo la curva evitaría la aparición de sangrados subclínicos y maximizaría la ventana de protección.



Figura 1. En la figura se muestran los diferentes factores que debemos considerar a la hora de ajustar la profilaxis.

Durante mucho tiempo se eligió el 1 % como nivel valle adecuado para todos los pacientes con hemofilia en profilaxis, basándose en los estudios que ponían de manifiesto que aquellos con hemofilia moderada desarrollaban menos artropatía y que el tiempo que un paciente estaba por debajo del 1 % de factor era proporcional al número de episodios hemorrágicos²³. Actualmente existe la tendencia a mantener niveles valle más altos, pues se ha observado que a partir de niveles plasmáticos del 3 % el número de episodios hemorrágicos anuales (ABR, del inglés *annual bleeding rate*) desciende bruscamente a menos de dos y es prácticamente cero cuando los niveles son de un 12 %²⁴. El nivel valle debe ajustarse al fenotipo hemorrágico del paciente, el cual depende, por un lado, de factores ambientales (estilo de vida, adherencia al tratamiento, etc.) y biológicos (edad, enfermedad articular preexistente, etc.) y, por otro, de los objetivos de la profilaxis para ese paciente en ese momento²⁵. Conociendo la PK podemos ajustar la dosis del factor infundido y la frecuencia de administración a las características de cada paciente¹⁰.

Aunque la profilaxis ha cambiado la evolución de la enfermedad y es una estrategia recomendada por todos los Comités Científicos tanto en niños como en adultos con hemofilia, quedan por resolver varios problemas, entre otros el alto coste del tratamiento o la baja tasa

de adherencia al tratamiento, debida esta última a la necesidad de administrar el factor por vía intravenosa y al gran número de infusiones necesario por la corta $t_{1/2}$ de los concentrados actuales²⁶⁻²⁸.

Futuro de la profilaxis

La utilización de los nuevos concentrados de $t_{1/2}$ más larga (*long-acting*) ayudará a solventar algunos de estos problemas. Mediante diferentes mecanismos, como la pegilación o la adición de proteínas de fusión (albúmina o fracción constante de las inmunoglobulinas), se ha podido prolongar 1,5-1,7 veces la $t_{1/2}$ en el caso del FVIII y hasta 3-4 veces en el caso del FIX (Tabla 2). Por este motivo, los concentrados *long-acting* del FIX han supuesto un gran avance para los pacientes con hemofilia B, que no ha sido tan manifiesto para aquellos con hemofilia A.

Recientemente se han publicado numerosos trabajos acerca de la utilización de *long-acting* en pacientes con profilaxis, especialmente centrados en los de FVIII, que es donde hay más dudas y controversias^{29,30}. Para su utilización se han propuesto varias estrategias adaptadas a las necesidades del paciente. Así, en aquellos pacientes con malos accesos venosos o con mala adherencia podría ser útil espaciar las administraciones, asumiendo el riesgo que supone estar más tiempo cerca de los niveles valle. Por otro lado, en pacientes con mucha actividad física o en aquellos que han estado previamente en profilaxis primaria y cuyo objetivo sea obtener un ABR de 0, se podría conservar el intervalo de administración, elevando así los niveles valle. Esto último es muy difícil de implantar debido al alto coste económico que conlleva.

Consideraciones finales

En conclusión, las anteriores pautas de profilaxis basadas únicamente en el peso del paciente han sido abandonadas y actualmente se han sustituido por estrategias de profilaxis personalizada. Dicha profilaxis, que se va definiendo como el *gold standard* para el tratamiento de los pacientes con hemofilia, deberá ser adaptada a cada paciente, en función de sus características, de los objetivos fijados

para cada uno de ellos y de la PK del factor administrado. No obstante, aún quedan muchas cuestiones por responder, como por ejemplo si es factible realizar estudios de farmacocinética para ajustar la profilaxis en la práctica clínica habitual, si las estimaciones bayesianas a partir de modelos poblacionales facilitarán la realización de dichos estudios o en qué medida los concentrados de larga duración modificarán el abordaje de la profilaxis.

Bibliografía

1. Srivastava A, et al. Guidelines for the management of hemophilia. *Haemophilia*. 2013;19(1):e1-47.
2. Colvin BT, et al. European principles of haemophilia care. *Haemophilia*. 2008;14(2):361-74.
3. Ramgren O. Haemophilia in Sweden. III. Symptomatology, with special reference to differences between haemophilia A and B. *Acta Med Scand*. 1962;171:237-42.
4. Ahlberg A. Haemophilia in Sweden. VII. Incidence, treatment and prophylaxis of arthropathy and other musculo-skeletal manifestations of haemophilia A and B. *Acta Orthop Scand Suppl*. 1965;Suppl 77:3-132.
5. Nilsson IM, et al. Twenty-five years' experience of prophylactic treatment in severe haemophilia A and B. *J Intern Med*. 1992;232(1):25-32.
6. Van Creveld S. Prophylaxis of joint hemorrhages in hemophilia. *Acta Haematol*. 1969;41(4):206-14.
7. Aledort LM, RH Haschmeyer, Pettersson H. A longitudinal study of orthopaedic outcomes for severe factor-VIII-deficient haemophiliacs. The Orthopaedic Outcome Study Group. *J Intern Med*. 1994;236(4):391-9.
8. Gringeri, A., et al., A randomized clinical trial of prophylaxis in children with hemophilia A (the ESPRIT Study). *J Thromb Haemost*. 2011;9(4):700-10.
9. Manco-Johnson MJ, et al. Prophylaxis versus episodic treatment to prevent joint disease in boys with severe hemophilia. *N Engl J Med*. 2007;357(6):535-44.
10. Valentino LA, et al. A randomized comparison of two prophylaxis regimens and a paired comparison of on-demand and prophylaxis treatments in hemophilia A management. *J Thromb Haemost*. 2012;10(3):359-67.
11. Manco-Johnson MJ, et al. Randomized, controlled, parallel-group trial of routine prophylaxis vs. on-demand treatment with sucrose-formulated recombinant factor VIII in adults with severe hemophilia A (SPINART). *J Thromb Haemost*. 2013;11(6):1119-27.
12. Blanchette VS, et al. Definitions in hemophilia: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost*. 2014;12(11):1935-9.
13. Fischer K, et al. Intermediate-dose versus high-dose prophylaxis for severe hemophilia: comparing outcome and costs since the 1970s. *Blood*. 2013;122(7):1129-36.
14. Gouw SC, van der Bom JG, van den Berg HM. Treatment-related risk factors of inhibitor development in previously untreated patients with hemophilia A: the CANAL cohort study. *Blood*. 2007;109(11):4648-54.
15. Gouw SC, et al., Intensity of factor VIII treatment and inhibitor development in children with severe hemophilia A: the RODIN study. *Blood*. 2013;121(20):4046-55.
16. Kurnik K, et al. New early prophylaxis regimen that avoids immunological danger signals can reduce FVIII inhibitor development. *Haemophilia*. 2010;16(2):256-62.
17. Auerswald G, Bidlingmaier C, Kurnik K. Early prophylaxis/FVIII tolerization regimen that avoids immunological danger signals

Tabla 2. Fármacos de vida media larga y su repercusión en la profilaxis

Long-acting FIX	Infusión cada 10 días/3 semanas (para mantener FIX > 1 %)	Presente: 104 infusiones/año Futuro: 18-36 infusiones/año
Long-acting FVIII	Infusión cada 3-4 días (para mantener FVIII > 1 %)	Actuales concentrados: 182 infusiones/año Futuro: 104 infusiones/año

- is still effective in minimizing FVIII inhibitor developments in previously untreated patients--long-term follow-up and continuing experience. *Haemophilia*. 2012;18(1):e18-20.
18. Auerswald G, et al. The EPIC study: a lesson to learn. *Haemophilia*. 2015.
 19. Collins PW. Personalized prophylaxis. *Haemophilia*. 2012;18 (Suppl4):131-5.
 20. Collins PW, et al. Factor VIII requirement to maintain a target plasma level in the prophylactic treatment of severe hemophilia A: influences of variance in pharmacokinetics and treatment regimens. *J Thromb Haemost*. 2010;8(2):269-75.
 21. Oldenburg J. Optimal treatment strategies for hemophilia: achievements and limitations of current prophylactic regimens. *Blood*. 2015;125(13):2038-44.
 22. Collins PW, et al. Implications of coagulation factor VIII and IX pharmacokinetics in the prophylactic treatment of haemophilia. *Haemophilia*. 2011;17(1):2-10.
 23. Collins PW, et al. Break-through bleeding in relation to predicted factor VIII levels in patients receiving prophylactic treatment for severe hemophilia A. *J Thromb Haemost*. 2009;7(3):413-20.
 24. Den Uijl IE, et al. Analysis of low frequency bleeding data: the association of joint bleeds according to baseline FVIII activity levels. *Haemophilia*. 2011;17(1):41-4.
 25. Valentino LA. Considerations in individualizing prophylaxis in patients with haemophilia A. *Haemophilia*. 2014;20(5):607-15.
 26. De Moerloose P, et al. A survey of adherence to haemophilia therapy in six European countries: results and recommendations. *Haemophilia*. 2008;14(5):931-8.
 27. Thornburg CD, Pipe SW. Adherence to prophylactic infusions of factor VIII or factor IX for haemophilia. *Haemophilia*. 2006;12(2):198-9.
 28. Schrijvers LH, et al. Unravelling adherence to prophylaxis in haemophilia: a patients' perspective. *Haemophilia*. 2015.
 29. Mahdi AJ, Obaji SG, Collins PW. Role of enhanced half-life factor VIII and IX in the treatment of haemophilia. *Br J Haematol*. 2015;169(6):768-76.
 30. Peyvandi, F. and I. Garagiola, Treatment of Hemophilia in the Near Future. *Semin Thromb Hemost*. 2015.

Retos actuales en el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand

JAVIER BATLLE¹, ALMUDENA PÉREZ-RODRÍGUEZ¹, IRENE CORRALES², MARÍA FERNANDA LÓPEZ-FERNÁNDEZ¹, ÁNGELA RODRÍGUEZ-TRILLO¹, ESTHER LOURÉS¹, ANA ROSA CID³, SANTIAGO BONANAD³, NOELIA CABRERA³, ANDRÉS MORET³, RAFAEL PARRA^{2,4}, MARÍA EVA MINGOT-CASTELLANO⁵, IGNACIA BALDA⁶, CARMEN ALTISENT⁴, ROCÍO PÉREZ-MONTES⁷, ROSA MARÍA FISAC⁸, GEMMA IRUÍN⁹, SONIA HERRERO¹⁰, INMACULADA SOTO¹¹, BEATRIZ DE RUEDA¹², VÍCTOR JIMÉNEZ-YUSTE¹³, NIEVES ALONSO¹⁴, DOLORES VILARIÑO¹⁵, OLGA ARIJA¹⁶, ROSA CAMPOS¹⁷, MARÍA JOSÉ PALOMA¹⁸, NURIA BERMEJO¹⁹, TERESA TOLL²⁰, JOSÉ MATEO²¹, KARMELE ARRIBALZAGA²², PASCUAL MARCO²³, ÁNGELES PALOMO⁵, LIZHEIDY SARMIENTO²⁴, BELÉN ÍNIGO²⁵, MARÍA DEL MAR NIETO²⁶, ROSA VIDAL²⁷, MARÍA PAZ MARTÍNEZ²⁸, REYES AGUINACO²⁹, JESÚS MARÍA CÉSAR(†)³⁰, MARÍA FERREIRO³¹, JAVIER GARCÍA-FRADE³², ANA MARÍA RODRÍGUEZ-HUERTA³³, JORGE CUESTA³⁴, RAMÓN RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ³⁵, FAUSTINO GARCÍA-CANDEL³⁶, ROSA CORNUDELLA³⁷, CARLOS AGUILAR³⁸, NINA BORRÀS², FRANCISCO VIDAL²

¹Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, INIBIC. A Coruña, España. ²Banc de Sang i Teixits. Barcelona, España. ³Hospital Universitario y Politécnico La Fe. Valencia, España. ⁴Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona, España. ⁵Hospital Regional Universitario de Málaga. Málaga, España. ⁶Hospital Universitario Dr. Negrín. Las Palmas de Gran Canaria, España. ⁷Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander, España. ⁸Salud Castilla y León. Segovia, España. ⁹Hospital Universitario Cruces. Barakaldo, España. ¹⁰Hospital Universitario de Guadalajara. Guadalajara, España. ¹¹Hospital Universitario Central de Asturias. Oviedo, España. ¹²Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza, España. ¹³Hospital Universitario La Paz. Madrid, España. ¹⁴Hospital Infanta Cristina. Badajoz, España. ¹⁵Complejo Hospitalario Universitario Santiago de Compostela. A Coruña, España. ¹⁶Hospital Universitario Lucus Augusti. Lugo, España. ¹⁷Hospital Jerez de la Frontera. Cádiz, España. ¹⁸Hospital Virgen del Camino. Pamplona, España. ¹⁹Hospital San Pedro de Alcántara. Cáceres, España. ²⁰Hospital Sant Joan de Deu. Barcelona, España. ²¹Hospital Sta Creu i St Pau. Barcelona, España. ²²Hospital Universitario Fundación Alcorcón. Madrid, España. ²³Hospital General de Alicante. Alicante, España. ²⁴Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid, España. ²⁵Hospital Clínico San Carlos. Madrid, España. ²⁶Complejo Hospitalario de Jaén. Jaén, España. ²⁷Fundación Jiménez Díaz. Madrid, España. ²⁸Hospital Nuestra Sra. de Sonsoles. Ávila, España. ²⁹Hospital Joan XXIII. Tarragona, España. ³⁰Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid, España. ³¹Hospital Montecelo. Pontevedra, España. ³²Hospital Río Hortega. Valladolid, España. ³³Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid, España. ³⁴Hospital Virgen de la Salud. Toledo, España. ³⁵Hospital Severo Ochoa. Madrid, España. ³⁶Hospital Universitario Virgen Arrixaca. Murcia, España. ³⁷Hospital Lozano Blesa. Zaragoza, España. ³⁸Hospital Santa Bárbara. Soria, España (†) Jesús M. César falleció el 25 de agosto de 2014

Resumen

La enfermedad de von Willebrand (EVW) es el trastorno hemorrágico hereditario más frecuente y está causada por defectos cualitativos y cuantitativos del factor von Willebrand (FVW). Su diagnóstico puede ser difícil, dada la heterogeneidad de la enfermedad y la necesidad de un panel amplio de pruebas necesarias para concretar su fenotipo. Frecuentemente esta dificultad puede ser solventada mediante análisis genético del FVW.

Mientras que un diagnóstico certero es fácil ante una reducción grave del FVW, el diagnóstico de formas leves debe hacerse sopesando el posible riesgo de un tratamiento excesivo. Con el objeto de profundizar sobre el papel del estudio molecular en el diagnóstico de la EVW, un estudio multicéntrico español reciente analizó 556 pacientes de forma centralizada, confirmándose la EVW en 480.

Se realizó un estudio mediante secuenciación de nueva generación (NGS) del FVW en todos los pacientes reclutados. Se contrastaron el fenotipo y genotipo, estableciéndose un diagnóstico final en cada paciente. Se observaron 238 mutaciones diferentes del FVW, 154 de ellas novedades. Se encontró mutación/es en 463 pacientes, con una buena relación fenotipo/genotipo en el 96,5 % de ellos. Presentaban 2 o más mutaciones 174 pacientes. Diversas razones dificultaron el diagnóstico de 70 pacientes al finalizar el estudio fenotípico central y el estudio NGS facilitó la clasificación adecuada en 63. Los 7 pacientes restantes presentan una mutación novel pendiente de clarificación posterior. En 7 pacientes se sospechó o confirmó la existencia de un síndrome de von Willebrand adquirido. Estos datos parecen apoyar un nuevo paradigma que incluye la NGS como método más rápido y eficiente en la primera línea del diagnóstico de la EVW.

Palabras clave: factor von Willebrand, enfermedad de von Willebrand, diagnóstico, estudio genético, secuenciación NGS.

Introducción

La enfermedad de von Willebrand (EVW) es el trastorno hereditario hemorrágico más frecuente y un modelo de complejidad molecular¹. Se clasifica en tres grandes grupos (Tabla 1): tipo 1 con reducción del factor de von Willebrand (FVW) plasmático, estructuralmente normal; tipo 2, con variantes cualitativamente anormales de FVW; y tipo 3, con ausencia prácticamente completa del FVW². La mayoría de las mutaciones de tipo 2 son sustituciones puntuales que influyen en la estructura multimérica del FVW y en sus interacciones con la glicoproteína plaquetaria colágeno Ib (GPIb α), y el factor VIII (FVIII). Diferentes tipos de mutaciones producen ya sea un fenotipo nulo o secreción anormal de FVW en la EVW tipo 3. Por el contrario, se conocen todavía escasamente los mecanismos patogénicos responsables de la EVW tipo 1.

Diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand

Se requiere evidencia de una historia hemorrágica del paciente, por lo general también presente en otros miembros de la familia. Pueden emplearse cuestionarios objetivos de evaluación cuantitativa estandarizada de la misma^{3,4}.

Diagnóstico de laboratorio de enfermedad de von Willebrand

El diagnóstico de la EVW requiere un panel de pruebas y es difícil en una proporción significativa de pacientes

Tabla 1. Clasificación revisada de la EVW

Tipo	Descripción	Frecuencia
1	Deficiencia cuantitativa parcial del FVW	(65-80%)
3	Deficiencia virtualmente completa del FVW. (1 x millón de habitantes)	
2	Deficiencia cualitativa del FVW	(20-35 %)
2A	↓ de la adhesión plaquetar del FVW y deficiencia selectiva de los MAPM*	
2B	↑ de la afinidad del FVW por la glicoproteína Ib plaquetar	
2M	↓ de la adhesión plaquetar del FVW sin deficiencia selectiva de los MAPM	
2N	↓ de la afinidad del FVW por el FVIII (Normandía)	

Tomado de: Sadler y cols.² MAPM: multímeros de alto peso molecular del FVW.

debido a muchos inconvenientes de las pruebas disponibles^{1,5,6}. Anomalías del FVW pueden acontecer en trastornos que imitan la EVW y que constituyen el síndrome de von Willebrand adquirido (SVWA)⁷.

Existen diversas pruebas que se deben utilizar de manera eficiente^{3,8}. Es aconsejable considerar tres niveles de estas pruebas en el proceso diagnóstico: detección o cribado, confirmación y definición del subtipo (Tabla 2).

Presentan diversas limitaciones e inconvenientes (Tabla 3)⁸.

La medición de FVW antígeno (FVW:Ag) y la actividad del cofactor de la ristocetina (FVW:RCo) son componentes clave en el diagnóstico de la EVW, aunque la introducción de ensayos dependientes de unión directa del FVW a la GPIb α pueden llegar a convertirse en los ensayos funcionales de elección¹. Muchos individuos inicialmente diagnosticados con EVW no presentan un descenso o anomalía del FVW incluso tras su seguimiento.

La asignación de algunos pacientes a las categorías aceptadas puede no ser fácil^{2,9,10}. La disponibilidad de diferentes metodologías aumenta el problema. También algunas pruebas, como la aglutinación plaquetar inducida por ristocetina (RIPA) y el análisis multimérico del FVW, generalmente no se encuentran disponibles en

Tabla 2. Pruebas de laboratorio para diagnóstico de la EVW

Pruebas de cribado
<ul style="list-style-type: none"> · Tiempo de hemorragia (actualmente en desuso) · Análisis de función plaquetar (PFA-100) · Recuento plaquetar · Tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPA)
Pruebas confirmatorias
<ul style="list-style-type: none"> · Antígeno del FVW (FVW:Ag) · Adhesión plaquetar dependiente del FVW*: <ul style="list-style-type: none"> - FVW:RCo. Método convencional, generalmente por ATL - FVW:RCo-Ab. Ensayo mediante anticuerpo frente a epítipo funcional - FVW:RCo-Ib. Prueba que emplea fragmento recombinante de GPIb - FVW:RCo-Sp. Unión espontánea a fragmento de la GPIb con ganancia de función con hiperafinidad por el FVW en ausencia de ristocetina · Actividad del FVIII (FVIII:C)
Pruebas para definición de subtipo
<ul style="list-style-type: none"> · Aglutinación plaquetar inducida por ristocetina (RIPA) · Análisis multimérico del FVW: baja resolución (1-1,2 %) y alta resolución (1,8-2 %) · Capacidad de unión del FVW al colágeno (FVW:CB) · Capacidad de unión del FVW al FVIII exógeno (FVW:FVIIIb) · Estudio de mutaciones del FVW · Propéptido del FVW (FVWpp)
<p>* A la espera de datos de comparación más amplios entre estas diferentes metodologías, así como requerir la validación de grandes series de pacientes, se ha sugerido esta distinción entre ellos (pendiente de aprobación por la ISTH FVW SSC). ATL: agregometría por transmisión de luz.</p>

todos los laboratorios. Dependiendo del ensayo utilizado, algunas mutaciones pueden mostrar valores normales o solo pueden ser detectados mediante el uso de colágenos tipo IV y VI en los pacientes que presentan una historia hemorrágica leve clara^{1,6}. Sin duda, otros defectos potenciales de FVW que causan EVW pueden permanecer sin diagnosticar.

Cribado de la enfermedad de von Willebrand

Deben excluirse otros defectos hemostáticos comunes y descartar la presencia de una enfermedad asociada a un SVWA (tal como presencia de gammapatía monoclonal, trastornos mielo o linfoproliferativos)⁷.

El tiempo de obturación (TO) del PFA-100 es sensible y reproducible en las reducciones graves del FVW, pero no en las leves ni en la EVW 2N⁸. No es específica para las alteraciones del FVW, ya que trastornos plaquetarios hereditarios pueden presentar un TO prolongado.

Confirmación de la enfermedad de von Willebrand

Requiere determinaciones adecuadamente estandarizadas del FVW:Ag y la adhesión plaquetar dependiente del FVW, que son pruebas clave para el diagnóstico. El FVW:RCo sigue siendo el método de referencia para medir la actividad de FVW. Sin embargo, esta prueba es

muy difícil de estandarizar y es relativamente insensible a los niveles de FVW <10 %. Por lo tanto, el reciente desarrollo de ensayos para cuantificar la unión directa de FVW a la GPIIb/IIIa plaquetar parece ofrecer ventajas significativas. Existen varios métodos diferentes para la medición del FVW: RCo¹¹. A la espera de datos de comparación más amplios entre estas diferentes metodologías, y su validación en grandes series de pacientes, se ha sugerido hacer una distinción entre ellos (pendiente de aprobación por la International Society on Thrombosis and Haemostasis - Scientific and Standardisation Committee of von Willebrand Factor (ISTH FVW SSC) (Tabla 2).

Otros hechos complican el diagnóstico de la EVW. Así, por ejemplo, existen variantes polimórficas FVW como la 1472 (p. Asp1472His), en la que a pesar de la demostración de una razón FVW:RCo/FVW:Ag descendida no se asocian a una mayor tendencia al sangrado^{1,9,10}.

Debe titularse el FVIII midiendo la relación FVIII/FVW:Ag. La disminución aislada del FVIII puede acontecer en hemofilia A, pero también en la EVW 2N. Su descenso ocurre también secundariamente cuando existe una disminución o ausencia del FVW, como en los tipos 1 y 3.

Subtipaje de la enfermedad de von Willebrand

La EVW tipo 2 incluye cuatro subtipos cualitativos diferentes (A, B, M y N), que pueden distinguirse mediante pruebas específicas de otras actividades y el análisis multimérico del FVW.

Capacidad de unión del FVW al colágeno (FVW:CB)

Es particularmente sensible en los casos con disminución de los multímeros de mayor tamaño del FVW. Incluso se ha sugerido su empleo como sustituto del FVW:RCo, lo cual no es correcto. Algunas de sus limitaciones guardan relación con el tipo de colágeno empleado en los kits comerciales.

Análisis multimérico del FVW

Es una técnica muy laboriosa y difícil de estandarizar. Es importante resaltar que cambios multiméricos sutiles pueden ser pasados por alto y ser interpretados como normales.

Agglutinación plaquetar inducida por ristocetina (RIPA)

Permite detectar el subtipo de EVW 2B, pero también es positivo en la pseudo-EVW. Hay que señalar que esta prueba no se encuentra disponible en un número significativo de laboratorios.

Tabla 3. Resumen de las limitaciones e inconvenientes de las pruebas del FVW

- 1. FVW:Ag.** Mide el nivel de proteína pero no su funcionalidad
- 2. FVW:RCo.** Precisión pobre, alta variabilidad y baja sensibilidad en niveles bajos de FVW
- 3. FVW:CB.** Medida de actividad con mayor precisión, menor variabilidad y mayor sensibilidad a bajos niveles de FVW. Las pruebas comerciales disponibles difieren en cuanto a sensibilidad a MAPM del FVW, y por lo tanto la discriminación de EVW tipos 1 y 2. Además, no emplean el colágeno tipo IV ni VI, por lo que no detectan algunas mutaciones del FVW no sensibles a los tipos de colágeno I y III
- 4. FVW:Act (IL-Werfen)** No es igual al FVW:RCo ni al FVW:CB, por lo que no proporciona la misma información. Mejor precisión que el FVW:RCo, mejor sensibilidad en bajos niveles de FVW, pero probablemente con menos sensibilidad a MAPM
- 5. FVW:Ac (Siemens)** Diferente a los anteriores, pero posiblemente es lo más parecido al FVW:RCo. Mejor precisión que FVW:RCo y mejor sensibilidad a los bajos niveles de FVW. La sensibilidad a MAPM del FVW es menos clara
- 6. Ensayos de actividad de FVW.** Miden actividades ligeramente diferentes del FVW, por lo que no son estrictamente intercambiables
- 7. Razones actividad/Ag.** Los valores de corte para la discriminación de los tipos 2 de EVW varían con los ensayos (0,5-0,7). Ello influye en la identificación de la concordancia/discordancia y la discriminación de los tipos 1 y 2

Adaptado de: Favalaro, Congreso WFH, Melbourne 2014. MAPM: multímeros de alto peso molecular del FVW.

Capacidad de unión del FVW al FVIII exógeno (FVW:FVIIIIB)

Sirve para detectar la EVW 2N y diferenciarla de la hemofilia A.

Propéptido del FVW (FVWpp)

La medición del FVWpp/FVW:Ag ayuda a identificar las formas de EVW con aclaramiento del FVW aumentado¹².

Estudio genético de la enfermedad de von Willebrand

El diagnóstico fenotípico puede ser difícil en algunos pacientes y el análisis molecular puede permitir aclarar el trastorno a través de la identificación de la mutación. Actualmente, se recomienda el estudio del FVW solo en la EVW tipos 2 y 3¹. Sin embargo, se han desarrollado recientemente métodos genéticos, como la secuenciación de nueva generación (NGS), cada vez más rápidos y progresivamente más baratos, que permiten el estudio más amplio de mutaciones en el FVW a un coste muy razonable¹³⁻¹⁵.

Perfil clínico y molecular de la enfermedad de von Willebrand en España (Proyecto PCM-EVW-ES)

Un estudio multicéntrico de la EVW realizado en España reveló la existencia de dificultades en el diagnóstico en al menos un tercio de los pacientes¹⁶. Recientemente, otro estudio (PCM-EVW-ES) ha investigado una gran cohorte de pacientes de España que fueron analizados de forma centralizada. Se llevó a cabo el estudio por NGS del FVW en todos los pacientes reclutados y contrastado con los datos fenotípicos, concretándose un diagnóstico final en cada uno de ellos. Uno de los objetivos de este proyecto fue investigar el posible papel del estudio genético en la EVW.

Material y métodos

Participaron 38 centros en todo el país y se inició en noviembre de 2010.

Pacientes y controles

Se reclutaron pacientes de cualquier edad previamente diagnosticados de EVW en el ámbito local entre 2010 y 2013. Debían cumplir uno o más criterios de inclusión (Tabla 4). Se incluyeron también en el análisis fenotípico 30 sujetos sanos control sin relación con los pacientes estudiados. Tres centros actuaron como laboratorios centrales.

Evaluación fenotípica

Localmente se determinaron el recuento plaquetar, frotis de sangre periférica, grupo sanguíneo, tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA), FVIII:C, FVW:Ag, FVW:RCo, y, opcionalmente, RIPA a baja concentración (0,4 mg/mL) y el TO del PFA-100[®] para el colágeno/ADP (COL/ADP) y colágeno-epinefrina (COL/Epi). Centralmente se analizaron el FVIII:C, FVW:Ag, FVW:RCo y el FVW:CB en muestras de plasma de todos los individuos reclutados. La FVW:FVIIIIB se evaluó en todos los pacientes con una razón FVIII:C/FVW:Ag <1 y en aquellos en los que se encontró una mutación de tipo 2N. El análisis multimérico del FVW se analizó en los 556 pacientes.

El análisis genético

Se partió de las bases de datos disponibles en relación con cambios genéticos en el FVW^{17,18}. Se diseñó y optimizó un método automático para la amplificación del FVW utilizando la matriz plataforma Access[™] (Fluidigm). Un protocolo anterior NGS para el análisis FVW¹⁴ fue modificado mediante la adición de los adaptadores específicos necesarios para NGS en un secuenciador MiSeq Illumina. Para confirmar las mutaciones identificadas por NGS se amplificó por PCR la región exacta donde se localiza la mutación y se secuenció por el método de Sanger. Las secuencias obtenidas fueron alineadas en contra de la secuencia consenso de tipo silvestre del FVW usando SeqScape (v2.7) de software (Applied Biosystems).

Se realizó amplificación multiplex de ligadura dependiente de sonda (MLPA) en los pacientes en los que las mutaciones detectadas fueron incapaces de explicar el fenotipo clínico y/o de laboratorio. Se empleó MLPA con el fin de detectar deleciones o duplicaciones en el FVW. Se secuenció el *GP1BA* mediante el método de Sanger en pacientes con patrón multimérico 2A o 2B en los que no se detectó mutación en FVW o cuando se identificó una nueva mutación.

Tabla 4. Criterios de inclusión y exclusión del Proyecto PCM-EVW-ES

Criterios de inclusión
· FVW:Ag, FVW:RCo y/o FVW:CB ≤ 30 UI/dL (%), observadas en dos o más ocasiones
· Detección de anomalías multiméricas
· En caso de deficiencia de FVIII aislado era necesario la demostración de una disminución de FVW:FVIIIIB
· Presencia de mutaciones de FVW
· Presencia de RIPA aumentada a una baja concentración de ristocetina
Criterios de exclusión
· Presencia de datos sugerentes de un SVWA

Relación fenotipo-genotipo

Los resultados del estudio genético se contrastaron con el fenotipo central y se estableció un diagnóstico final. La asociación fenotipo-genotipo se evaluó según los criterios reflejados en la [Tabla 5](#).

Resultados

Se reclutaron 556 pacientes de 330 familias diagnosticadas históricamente a nivel local de EVW. Tras su estudio fenotípico central, se confirmó la EVW en 442 pacientes; sin embargo, después del análisis genético 480 pacientes cumplieron algunos de los criterios de inclusión. En un principio, 98 de los 556 pacientes no cumplían criterios, 3 tenían un SVWA, 8 tenían hemofilia A y 5 eran portadores de una mutación en *F8* confirmando EVW en 442 pacientes.

Se constataron discrepancias en el diagnóstico local/central en 205 de 484 pacientes (42,3 %). Tras el estudio fenotípico central no fue posible establecer un diagnóstico claro en 70 pacientes por varias razones, entre otras la no disponibilidad del RIPA en el ámbito local (en el 34 % de los centros participantes). El análisis genético ayudó en la clarificación de 63 de estos pacientes. Los 7 pacientes restantes presentaban una mutación novel en el *FVW*, pendiente de investigación ulterior.

El *FVW:FVIII B* se midió en 64 pacientes, de los cuales 28 mostraron una disminución en la capacidad de unión (16 moderada y 12 grave). En los 36 pacientes restantes, después de realizar el estudio genético del *F8*, se confirmó hemofilia A en 7 de ellos, 5 eran portadoras y 1 quedó pendiente de nuevo estudio. En 23 pacientes los resultados fueron normales.

Estudio genético

Se realizó en todos los pacientes incluidos (556). Para la validación técnica de la metodología de NGS se analiza-

ron 172 pacientes estudiados previamente por técnicas de secuenciación convencionales. Los resultados determinaron que la NGS permitió la confirmación de todas las mutaciones detectadas anteriormente, sin perjuicio de identificar más mutaciones en algunas familias. La única dificultad o discrepancia encontrada en este sentido fue la detección de una gran conversión de genes previamente descrita (c.3835_4105conNG_001212.3: g.6566_6836; p.[(Val1279Ile;Gln1311Ter;Ile1343Val;-Val1360Ala;Phe1369Ile])). Tras el análisis genético, 480 pacientes de 282 familias fueron finalmente incluidos en este proyecto.

Un total de 463 pacientes presentó una o más mutaciones de *FVW*. Se detectaron 723 cambios en el *FVW* debido a 238 mutaciones distintas: 84 descritas previamente en la base de datos de Leiden de la EAHAD¹⁷ y 154 mutaciones candidatas noveles. Se identificaron todos los tipos de mutación puntual y algunas posibles conversiones de genes, a lo largo de todo el gen (incluyendo las que flanquean regiones intrónicas y promotor). No se detectaron mutaciones en 17 pacientes con defectos cuantitativos exclusivamente: 16 tipo 1 y un tipo 1H. Se detectaron alteraciones en los patrones de MLPA, indicativo de una gran delección, en un paciente tipo 3 y en uno tipo 2A.

Mutaciones en pacientes con EVW tipo 1

Se encontraron 212 cambios o mutaciones en 155 pacientes tipo 1 (incluyendo el tipo 1H). 55 pacientes tenían variantes (del promotor) sinónimas, intrónicas o *upstream*. Tres pacientes no relacionados comparten una mutación idéntica sinónima (c.3390C> T), adyacente al extremo 5' del exón 26, que podría crear un nuevo sitio potencial de *splicing*.

Mutaciones en pacientes con EVW tipo 2

Las mutaciones encontradas en pacientes tipo 2 eran en gran parte (80 %) del tipo puntual y 219 de 226 pacientes estudiados tenían al menos una mutación sin sentido, 186 de estas mutaciones se encontraron en el exón 28. En los 7 pacientes restantes, 1 tenía una gran delección heterocigota con desplazamiento de la ventana de lectura (p.Gly386_Ser1873del; exones 11-32) y 3 pacientes mostraron una pequeña delección también con desplazamiento de la ventana de lectura (p.Lys1408del), y 2 pacientes tenían una pequeña inserción (p.Asp1560dup) en el exón 28. El paciente restante presentaba una sinónima y dos variantes intrónicas.

Mutaciones en pacientes con EVW tipo 3

Se encontraron 95 mutaciones en 42 pacientes. En las mutaciones sin sentido la p.Asn2066Ser se encontró

Tabla 5. Categorías de los pacientes en función de la relación fenotipo-genotipo y criterios empleados

Pacientes excluidos: sin ninguno de los criterios de inclusión, o con presencia de mutación no descrita previamente y *FVW* normal, y/o mutación descrita previamente probablemente no causal (asociada a un fenotipo normal)

Pacientes definidos: fenotipo claro correlacionado con una mutación descrita anteriormente o con claro fenotipo tipo 1 sin mutación, pero con antecedentes familiares

Pacientes candidatos: fenotipo claro asociado a una variante no descrita previamente. En este sentido, una variante (como un cambio genético) presente en dos o más pacientes con el mismo fenotipo se considera que es probablemente causal. Además, los pacientes categorizados como EVW tipo 2A/2B con una mutación fuera del exón 28 se consideraron tipo 2A

Pacientes no definidos: fenotipo difícil para asignar a una variante no descrita previamente

seis veces, pero siempre se asoció en Cis con la mutación p.Tyr126ThrfsTer49; sin embargo, todavía no se ha confirmado la contribución real de esta mutación al fenotipo. En 4 pacientes encontramos la mutación sin sentido p.Gln1311Ter siempre en estado homocigoto. Las mutaciones en pacientes de tipo 3 no siempre fueron mutaciones nulas o de empalme: 2 pacientes eran homocigotos de una nueva mutación (p.Cys370Tyr) y una variación controvertida (p.Pro1162Leu) descrita previamente⁹.

Se encontraron también cambios genéticos en 24 individuos entre los 76 inicialmente excluidos, aunque eran principalmente de tipo intrónico sinónimo, cuyo efecto sobre el fenotipo se desconoce por el momento.

Pseudo-EVW

No se detectó ningún paciente con esta entidad.

En la **Figura 1** se muestra la distribución de los pacientes en base al número de mutaciones.

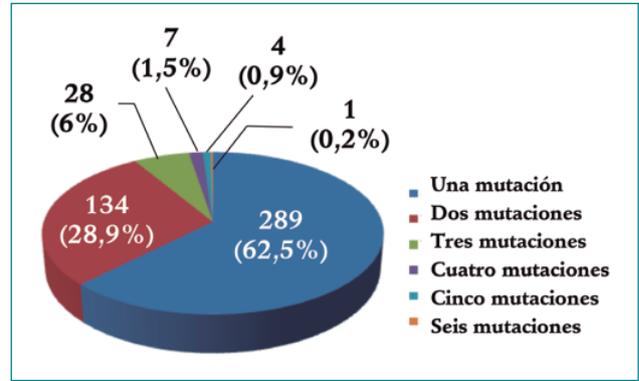


Figura 1. Distribución de los pacientes de acuerdo con el número de mutaciones.

Asociación fenotipo/genotipo

En el fenotipo definido se observó una asociación genotípica congruente en el 77 % de los 480 casos confirmados. Sin embargo, teniendo en cuenta los pacientes definidos y candidatos, la asociación se incrementó a un 96,5 % (**Figura 2**).

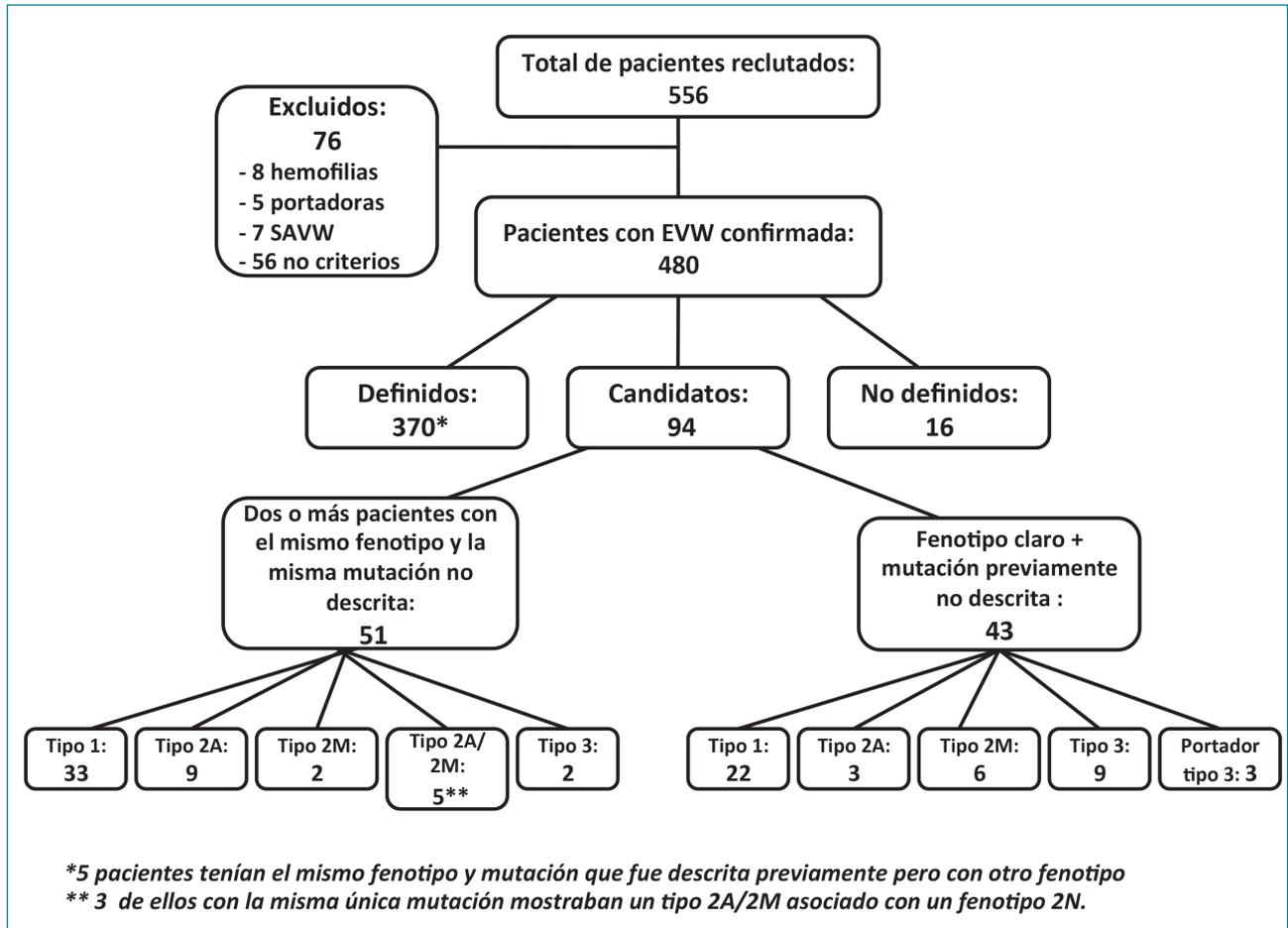


Figura 2. Clasificación de la cohorte de los pacientes según la asociación fenotipo/genotipo.

Discusión

Se observó una mayor discrepancia diagnóstica local/central en el análisis fenotípico que la planteada anteriormente¹⁶. Ello apunta a un mayor grado de dificultad en el diagnóstico de EVW. Es el primer registro de EVW con análisis genético NGS en todos los pacientes reclutados, mostrando una buena asociación fenotipo-genotipo. De los 556 pacientes reclutados 480 cumplían alguno de los criterios de inclusión y en 463 de ellos se encontraron una o más mutaciones del FVW. De estos pacientes, 447 (96,5 %) mostraron una buena relación fenotipo-genotipo. En los restantes 76 pacientes, que al parecer no cumplían los criterios de reclutamiento (13,6 %): a) un análisis de la secuencia F8 confirmó la hemofilia A leve en 8 pacientes y una hemofilia A de estado portador en 5 pacientes; b) 56 pacientes no cumplían con los criterios de inclusión; c) en 7 casos sin mutaciones de FVW y GP1BA se sospechó un SVWA, confirmado en 3 pacientes. Ello indica que en algunos casos puede pasarse por alto un SVWA.

En el tipo 1 de EVW, 17 de 155 pacientes (10,9 %) no mostraban mutación. La proporción de mutaciones en los pacientes tipo 1 de este estudio es significativamente mayor que la publicada previamente^{1,19}.

Aproximadamente el 50 % de los tipo 3 presentaron un patrón de herencia recesiva típica, mientras que los casos restantes parecen mostrar características de herencia co-dominante, con uno o ambos padres que muestran evidencia clínica y de laboratorio de EVW tipo 1.

En nuestra cohorte, la mutación p.Gln1311Ter (derivado de una conversión potencial de genes) se encontró en 8 pacientes (incluyendo los portadores tipo 3) de 6 familias no relacionadas. Esta mutación se había identificado previamente en pacientes romaníes españoles con un probable origen ancestral común y con una alta frecuencia esperada en nuestra población²⁰.

El RIPA no se encuentra disponible en un número significativo de centros, por lo que es difícil distinguir entre los tipos 2A, 2B y pseudo-EVW. En 44 pacientes en los que no se ensayó RIPA el análisis genético por NGS confirmó 25 mutaciones de tipo 2A, 10 tipo 2B, 2 pacientes sin mutación (con un SVWA confirmado en uno de ellos) y 7 pacientes con mutaciones nuevas de FVW, en espera de una mayor investigación. En nuestro conocimiento no se ha confirmado todavía en España ningún paciente con pseudo-EVW.

Se encontraron mutaciones heterocigotas que afectan a la unión del FVW al colágeno en 11 pacientes, en relación con los tipos de colágeno I y III (dos pacientes), tipo IV (1 paciente) y el tipo VI (8 pacientes). El análisis del FVW:CB empleando colágeno tipo VI en estos últimos pacientes confirmó una disminución grave en esta actividad⁶. Tres pacientes de dos familias diferentes mostraron nuevas mutaciones

heterocigotas (p.Ala2498Asp, p.Cys2491Arg, respectivamente) en el exón 44 responsable de la unión FVW-integrina α IIb β 3. Estas mutaciones se encuentran pendientes de demostración de su papel causal e impacto clínico.

En varios pacientes con un fenotipo difícil de clasificar el estudio genético facilitó un diagnóstico apropiado. Varios pacientes con la misma mutación (a veces de la misma familia) mostraron una variación en el grado de anomalía multimérica.

Se observaron 28 pacientes con una mutación 2N. Doce con fenotipo grave (9 homocigotos y 3 heterocigotos, pero presentaban un fenotipo grave debido a la asociación con una segunda mutación deletérea). Los 16 pacientes restantes fueron heterocigotos y presentaban un fenotipo moderado. Curiosamente, en 3 pacientes de dos familias diferentes con mutación única y novel (p.Arg763Ser) se asoció a un fenotipo compuesto (2A/2M) y tipo 2N moderado. Un fenotipo compuesto 2N/2A debido a una mutación única (p.Asn879Asp) había sido descrito previamente. En un paciente tipo 3 se detectó por NGS un estado de portador 2N.

En aquellos pacientes en los que no se sospechó inicialmente un tipo 2N heterocigoto y se encontró una mutación 2N tipo, el FVW:FVIII:B fue anormal. Inversamente, cuando la razón FVIII:C/FVW:Ag era baja y el FVW:FVIII:B era normal no se detectó mutación tipo 2N.

Por otro lado, 116 pacientes presentaron mutaciones previamente asociadas a un aumento del aclaramiento FVW (Tabla 6) por lo que la desmopresina (DDAVP) puede ser inefectiva.

Además, 174 pacientes presentaron dos o más mutaciones con un fenotipo predominante que podría enmascarar la presencia de un segundo defecto.

El papel de NGS en el diagnóstico EVW

El estudio fenotípico EVW presenta varios inconvenientes, como su coste cada vez mayor y las limitacio-

Tabla 6. Número de pacientes que presentaron mutaciones previamente asociadas a un aumento del aclaramiento

Tipo de EVW	n	Mutaciones (n)
1	40	p.Arg1205His (35); p.Val1760Ile (3); p.Ser2179Phe (2)
2A	14	p.Cys1149Arg (11) p.Leu1307Pro (3)
2B	28	p.Arg1308Cys (12); p.Arg1306Trp (7); p.Val1316Met; p.Pro1266Leu (2); p.Arg1306Gln (2)
2M	5	p.Gly1415Asp (5)
2A/2M	29	p.Arg1374Cys (22) p.Arg1315Cys (7)
Total	116	

nes del FVW:RCo comentadas previamente. Nuestros resultados refuerzan la importancia de la combinación de la evaluación fenotipo y genotipo, y apoyan otra estrategia más eficiente y rápida en el diagnóstico de la EVW mediante la inclusión de la NGS en el estudio como método de primera línea de diagnóstico. El costo razonable de NGS (\$ 70/muestra, incluso más barato que la mayoría de las pruebas fenotípicas) apoya firmemente este nuevo escenario. También puede proporcionar información clínica útil (tal como la predicción de un aumento del aclaramiento del FVW) y no está afectado por todos los inconvenientes mencionados anteriormente.

Conclusiones

- El diagnóstico de la EVW es difícil en una proporción significativa de pacientes.
- El coste del diagnóstico fenotípico es cada vez mayor.
- La metodología NGS es rápida y progresivamente más barata, lo que permite el estudio más amplio de mutaciones del FVW a un costo muy razonable.
- En el Proyecto PCM-EVW-ES se observó una discrepancia diagnóstica fenotípica local/central en el 42,3 % de los pacientes, lo que señala las dificultades prácticas en el diagnóstico de la EVW.
- Se observó un 96,5 % de concordancia fenotípica-genotípica, lo que sugiere la posibilidad de incorporar la NGS en el proceso inicial del diagnóstico de la EVW.

El presente trabajo ha sido aceptado para su publicación en *Thrombosis and Haemostasis*²¹.

Agradecimientos

A Baxter/Baxalta SIU, por su importante patrocinio del Proyecto PCM-EVW-ES, así como por el Baxter BioScience Grant (H13-000845) para el estudio genético.

Este trabajo ha sido financiado en parte por la ayuda del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO)-Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (PI1201494 y RD12/0042/0053), España.

Agradecemos a Technoclone GmbH, Austria, Labclinics, SA, España, la donación de un kit VWF:CB (colágeno tipo VI), y a la Dra. L. Rivero y la Dra. T. Fidalgo, del Hospital Universitario, Coimbra (Portugal), por proporcionarnos una muestra de un paciente con pseudo-EVW (con la mutación D235Y).

Finalmente, expresamos nuestra gratitud a todos los pacientes que han participado en este estudio.

Bibliografía

1. Lillicrap D. Von Willebrand disease: advances in pathogenetic understanding, diagnosis, and therapy. *Blood*. 2013; 122(23):3735-40.
2. Sadler JE, Budde U, Eikenboom JC, Favaloro EJ, Hill FG, Holmberg L et al. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. *J Thromb Haemost*. 2006;4(10):2103-14.
3. Castaman G, Goodeve A, Eikenboom J; European Group on von Willebrand Disease. Principles of care for the diagnosis and treatment of von Willebrand disease. *Haematologica*. 2013;98(5):667-74.
4. Tosetto A, Rodeghiero F, Castaman G, Goodeve A, Federici AB, Batlle J, et al. A quantitative analysis of bleeding symptoms in type 1 von Willebrand disease: results from a multicenter European study (MCMDM-1 VWD). *J Thromb Haemost*. 2006;4(4):766-73.
5. Batlle J, Pérez Rodríguez A, López Fernández MF. Classification of von Willebrand disease. En: *Von Willebrand disease: Basic and clinical aspects*. A Federici, C Lee, E Berntorp, D Lillicrap, B Montgomery, editores. Wiley-Blackwell, London: 2011. pp. 74-85.
6. Flood VH. Perils, problems, and progress in laboratory diagnosis of von Willebrand disease. *Semin Thromb Hemost*. 2014; 40(1):41-8.
7. Federici AB, Budde U, Castaman G, Rand JH, Tiede A. Current diagnostic and therapeutic approaches to patients with acquired von Willebrand syndrome: a 2013 update. *Semin Thromb Hemost*. 2013;39(2):191-201.
8. Favaloro EJ, Bodó I, Israels SJ, Brown SA. Von Willebrand disease and platelet disorders. *Haemophilia*. 2014;20(Suppl4):59-64.
9. Bellissimo DB, Christopherson PA, Flood VH, Gill JC, Friedman KD, Haberichter SL, et al. VWF mutations and new sequence variations identified in healthy controls are more frequent in the African-American population. *Blood*. 2012;119(9):2135-40.
10. Johnsen JM, Auer PL, Morrison AC, Jiao S, Wei P, Haessler J, Fox K, et al; NHLBI Exome Sequencing Project. Common and rare von Willebrand factor (VWF) coding variants, VWF levels, and factor VIII levels in African Americans: the NHLBI Exome Sequencing Project. *Blood*. 2013;122(4):590-7.
11. Costa-Pinto J, Pérez-Rodríguez A, del C Gómez-del-Castillo M, Lourés E, Rodríguez-Trillo A, Batlle J, et al. Diagnosis of inherited von Willebrand disease: comparison of two methodologies and analysis of the discrepancies. *Haemophilia*. 2014;20(4):559-567.
12. Sanders YV, Groeneveld D, Meijer K, Fijnvandraat K, Cnossen MH, van der Bom JG, et al. Von Willebrand factor propeptide and the phenotypic classification of von Willebrand disease. *Blood*. 2015;125(19):3006-13.
13. Fokkema IF, Taschner PE, Schaafsma GC, Celli J, Laros JF, den Dunnen JT, et al. LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases. *Hum Mutat*. 2011;32(5):557-63.
14. Corrales I, Catarino S, Ayats J, Arteta D, Altisent C, Parra R, et al. High-throughput molecular diagnosis of von Willebrand disease by next generation sequencing methods. *Haematologica*. 2012;97(7):1003-7.
15. Corrales I, Ramírez L, Altisent C, Parra R, Vidal F, et al. Rapid molecular diagnosis of von Willebrand disease by direct sequencing. Detection of 12 novel putative mutations in VWF gene. *Thromb Haemost* 2009;101(3):570-6.
16. Batlle J, Pérez-Rodríguez A, Pinto JC, Fraga EL, Rodríguez-Trillo A, López-Fernández MF. Diagnosis and management of von Willebrand disease in Spain. *Semin Thromb Hemost*. 2011;37(5):503-10.

17. EAHAD Coagulation Factor Variant Databases. https://grena-da.lumc.nl/LOVD2/VWF/home.php?select_db=VWF. Accessed June 16, 2014.
18. ISTH-SSC VWF Online Database (VWFdb). <http://www.vwf.group.shef.ac.uk/vwd.html>. Accessed June 16, 2014.
19. Goodeve A, Eikenboom J, Castaman G, Rodeghiero F, Federici AB, Batlle J, et al. Phenotype and genotype of a cohort of families historically diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European study, Molecular and Clinical Markers for the Diagnosis and Management of Type 1 von Willebrand Disease (MCMDM-1VWD). *Blood*. 2007;109(1):112-21.
20. Casaña P, Martínez F, Haya S, Lorenzo JI, Espinós C, Aznar JA, et al. Q1311X: a novel nonsense mutation of putative ancient origin in the von Willebrand factor gene. *Br J Haematol*. 2000;111(2):552-5.
21. Batlle J, Pérez-Rodríguez A, Corrales I, López-Fernández MF, Rodríguez Trillo A, Lourés E, et al. Molecular and clinical profile of von Willebrand disease in Spain (PCM-EVW-ES): Proposal for a new diagnostic paradigm. *Thromb Haemost*. 2015 (En prensa).

