



*Santiago de Compostela*

LVIII | 20-22 de octubre | SOCIEDAD  
Congreso Nacional | 2016 | ESPAÑOLA DE  
SOCIEDAD DE | Trombosis y  
ESPAÑOLA DE | Hemostasia  
HEMATOLOGÍA Y | Congreso Nacional  
HEMOTERAPIA | XXXII  
www.sehhseth.es

---

# Ponencias Programa Educativo



#sehseth16

*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.*

*Las opiniones aquí publicadas son responsabilidad de sus autores.*

---

# Programa Educativo

## *Coordinadores*

**DR. JORGE SIERRA**

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

**DR. JAVIER CORRAL**

*Hospital Universitario Morales Meseguer. Murcia*

---

# Sumario

- **Hematological disorders in the economically less developed world. . . . . 7**  
Mammen Chandy
- **El hematólogo como consultor:  
alteraciones hematológicas secundarias a otras enfermedades . . . . . 11**  
Joaquín Díaz Mediavilla
- **Secuenciación del genoma y su impacto en hematología . . . . . 18**  
R. García Sanz, C. Jiménez, M.E. Sarasquete, M.C. Chillón, A. Balanzategui, L.A. Marín,  
N. Puig, M. García-Álvarez, I. Prieto-Conde, Marcos González, M. Alcoceba
- **Linfomas cutáneos: entre la dermatología y la hematología . . . . . 37**  
Ramón M. Pujol
- **Más allá de los genes codificantes en la fisiopatología del sistema hemostático . . . 40**  
M.ª Eugenia de la Morena-Barrio, Javier Corral, José Rivera, Vicente Vicente
- **Leucemia aguda refractaria y en recaída: ¿cómo afrontarla?. . . . . 49**  
Jaime Pérez de Oteyza
- **Inmunoterapia de las hemopatías malignas: de los monoclonales a las células CART . 53**  
Javier Briones
- **Complicaciones tardías del trasplante alogénico de progenitores  
hematopoyéticos: ¿qué debemos recordar? . . . . . 57**  
Ildfonso Espigado Tocino
- **Nuevos sistemas de diagnóstico en hemostasia y trombosis. . . . . 66**  
José María Bastida Bermejo, José Ramón González Porras, Juan Tamargo
- **Nuevos medicamentos en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares . . . 77**  
Juan Tamargo

---

## Introducción

### Coordinadores

**DR. JORGE SIERRA**

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

**DR. JAVIER CORRAL**

*Hospital Universitario Morales Meseguer. Murcia*

La hematología ha experimentado extraordinarios avances en las últimas décadas. Es importante que la evolución del conocimiento básico y los avances clínicos sean inteligibles, tanto para los hematólogos generales como para aquéllos que en la práctica se han sub-especializado. Este es un objetivo prioritario del programa educacional del congreso de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia y de la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia. Pero también lo es ayudar a resolver situaciones clínicas prácticas complejas, comunes o poco frecuentes. Finalmente, también conviene abrir los ojos ante una hematología cada vez más globalizada, ya que los flujos de personas hace que nos enfrentemos cada vez más a enfermedades hasta hora minoritarias en nuestro medio pero habituales en los países en desarrollo.

Comenzando por este último aspecto, El **Dr. Mammen Chandy**, Director del Tata Medical Center de Calcuta y, sin duda, el hematólogo que trabaja en India de mayor prestigio, resume la situación de las enfermedades hematológicas en ese país. Es impresionante conocer el gran número de personas con ferropenia o talasemia mayor en India y también lo es ser consciente de que el nivel socioeconómico de las familias determina el acceso a la atención hematológica. Otros aspectos, como la limitada posibilidad de tratar las coagulopatías congénitas y los esfuerzos por mejorar el pronóstico de los niños con leucemia linfoblástica infantil en un país de más de 1.300 millones de habitantes, han de ayudarnos a descubrir que los problemas de la hematología en el mundo van mucho más allá de lo que nosotros vivimos en nuestro medio.

El **Dr. Díaz Mediavilla** refleja en su ponencia su condición de extraordinario internista-hematólogo. “El hematólogo como consultor: alteraciones hematológicas secundarias a otras enfermedades” es un compendio de experiencia y sentido común, frente a situaciones del día a día asistencial. Con frecuencia, alteraciones en teoría sencillas y muchas veces sin gravedad conllevan un exceso de exploraciones y de visitas de seguimiento indicadas, tanto por el especialista que consulta como por el hematólogo. Para ser un buen consultor hay que tener un conocimiento profundo de la hematología en

su conjunto. Lamentablemente, la formación en nuestra especialidad con frecuencia se enfoca más a aspectos complejos o técnicamente avanzados que a los de espectro más amplio. Por ello, la ponencia del Dr. Díaz Mediavilla tiene un interés particular en un simposio educacional.

Las técnicas de diagnóstico molecular en hematología han evolucionado muy rápidamente en pocos años. El análisis del genoma, exoma, transcriptoma y epigenoma mediante secuenciación masiva ha supuesto un cambio radical, disruptivo, en la capacidad de caracterizar molecularmente las enfermedades y permite descubrir dianas terapéuticas nuevas. El **Dr. García Sanz** conoce a fondo estas técnicas y describe de forma comprensible su complejidad en una ponencia en la que pone de relieve “lo que el clínico debe saber”. También, en su ponencia se analiza el papel de la “next generation sequencing” (NGS) frente a otras opciones de estudio molecular en hemopatías benignas y malignas. La NGS se introduce con fuerza para la caracterización inicial de leucemias, mieloma y linfoma, para el seguimiento de la enfermedad residual, así como para el diagnóstico de enfermedades congénitas de la serie roja y de la hemostasia.

El **Dr. Ramón Pujol**, uno de los dermatólogos de mayor prestigio de nuestro país, con interés y experiencia acreditada en los linfomas que afectan a la piel, revisa esta temática y resalta la necesidad del abordaje conjunto de los pacientes, del hematólogo y el dermatólogo. Es común que nosotros desconozcamos las características y tratamiento de las fases iniciales de la enfermedad y es necesario que el tratamiento sistémico, del que somos expertos, no se demore para que se pueda obtener la mejor respuesta. En su ponencia, el Dr. Pujol analiza la frecuencia y características de los diferentes tipos de linfoma cutáneo e incorpora las novedades al respecto de la nueva clasificación de la OMS.

Una de las situaciones clínicas más difíciles de afrontar, tanto para el hematólogo como para el paciente, es la leucemia mieloide aguda refractaria. El **Dr. Perez de Oteyza** tiene una amplia trayectoria hospitalaria para abordar este tema y revisa los resultados con quimio-

rapia convencional, con mucho recorrido por mejorar, así como los agentes en investigación clínica como nuevos citotóxicos, tratamiento dirigido a dianas moleculares y nuevos anticuerpos monoclonales.

La inmunoterapia de las hemopatías malignas tiene ya una larga trayectoria, que comenzó con las vacunaciones antitumorales en leucémicos de los años 60 y 70 del pasado siglo y con la evidencia del efecto injerto contra el tumor del trasplante hematopoyético alogénico. En la década de los 90 se dispuso por primera vez de rituximab para el tratamiento de los linfomas B. En estos últimos 20 años, y sobre todo en los últimos 5, ha habido grandes avances en el campo de la inmunoterapia, con la introducción de nuevos anticuerpos monoclonales para las proliferaciones linfoides B, el mieloma, la leucemia mieloide aguda, el linfoma de Hodgkin y la hemoglobinuria paroxística, entre otras hemopatías graves. Se han desarrollado anticuerpos bi-específicos y en el campo de la terapia celular han aparecido resultados muy prometedores con la administración de linfocitos T modificados genéticamente. Con la técnica más reciente se puede conseguir que los linfocitos T y otras células inmunes tengan un receptor quimérico (CAR) que incluya la porción variable de un anticuerpo monoclonal, en la superficie de la célula, y el dominio de señalización del receptor T en el interior de ésta, ligado a moléculas coestimuladoras. Esta inmunoterapia permite alcanzar una remisión completa en más del 90% de pacientes con leucemia linfoblástica infantil refractaria o en recaída. Las experiencias más numerosas son con células T CAR frente a neoplasias linfoides CD19, pero están en desarrollo otras frente a mieloma, enfermedad de Hodgkin y leucemia mieloide aguda, entre otras. El **Dr. Javier Briones** tiene quince años de experiencia en investigación en inmunoterapia y hace una excelente revisión del tema en su ponencia "Inmunoterapia de las hemopatías malignas: de los anticuerpos monoclonales a las células CART".

Con la mejora de los resultados del trasplante hematopoyético aumenta el número de largos supervivientes y se ponen de manifiesto consecuencias a largo plazo. El **Dr. Ildefonso Espigado**, con una gran y dilatada trayectoria en trasplante alogénico, hace énfasis en que la incidencia acumulada de alteraciones crónicas de salud entre los supervivientes a este procedimiento es del 64% a 10 años y 71% a 15 años y las complicaciones crónicas severas o amenazantes de la vida tienen una incidencia acumulada próxima al 40% a los 10 años postrasplante. En su revisión, el Dr. Espigado sistematiza y tabula las posibles complicaciones tardías del alotrasplante y actualiza las recomendaciones para su detección, seguimiento y terapia.

En lo referente a la trombosis y hemostasia, hay que tener en cuenta que sus alteraciones incluyen desórdenes complejos y heterogéneos cuyo abordaje es difícil, tanto en el aspecto de conocimiento básico, como en los procedimientos diagnósticos y en el abordaje terapéutico. Cada día aparecen nuevos elementos y factores implicados en la distorsión del sistema hemostático, se desarrollan nuevos métodos diagnósticos con mayores posibilidades y se amplía el arsenal terapéutico. Y estas novedades deben ser transmitidas no solo a especialistas sino a todos los hematólogos y profesionales que trabajan en este campo, y especialmente a los que están en periodo de formación (residentes y estudiantes predoctorales). En este programa educativo pretendemos actualizar estos avances ofreciendo esta nueva visión, y hacerlo de la mano de especialistas en estas materias, seleccionando tres ponencias relacionadas con la hemostasia.

1. Desde los conceptos básicos de la biología, pero con grandes implicaciones clínicas se pretende romper una perspectiva clásica del dogma central de la biología molecular, y que ha otorgado quizás demasiado protagonismo al gen codificante de una proteína. La **Dra. de la Morena-Barrio** es una joven investigadora con extenso currículum en un campo también relativamente joven: las modificaciones postraduccionales. En su ponencia, la Dra. de la Morena-Barrio hace una descripción detallada, pero fácil de seguir, de las principales modificaciones postraduccionales, enfocándose en su importancia fisiológica, patológica y terapéutica, con ejemplos que nos demuestran que debemos ir más allá de los genes codificantes.

2. La segunda ponencia es diagnóstica. El **Dr. Bastida** hace un repaso actualizado de los métodos diagnósticos empleados tanto para desórdenes de sangrado como trombóticos, mostrando tanto sus posibilidades como limitaciones, y acercándonos al futuro inmediato que pasa por los estudios moleculares masivos. El Dr. Bastida ofrece la experiencia de un grupo que ha ido evolucionando con su tiempo y la visión de un joven que apuesta por un futuro diagnóstico molecular.

3. Finalmente, el **Prof. Tamargo** realiza una brillante revisión de los nuevos medicamentos en enfermedad cardiovascular. No se trata de una simple actualización del arsenal terapéutico disponible para estas complejas enfermedades. El Prof. Tamargo plantea una apasionante discusión sobre la cronicidad, la polipíldora, los efectos adversos, la recuperación de viejos fármacos, la farmacogenética, el abandono del tratamiento o la formación continua del prescriptor, temas de enorme trascendencia y actualidad.

## Hematological disorders in the economically less developed world

MAMMEN CHANDY

Tata Cancer Hospital. Kolkata. India

Providing cost effective yet state of the art care for haematological disorders in the economically less developed world is a challenge: compounded by the numbers that need care in a large population, limited infrastructure and trained medical personnel and political compulsions which prevent proper utilization of available resources. Wealth is not uniformly distributed in the developing world and this is a problem but it also provides an opportunity to treat the less privileged with the infrastructure that has been developed for world class treatment for those who can afford it: this implies that state of the art treatment must be available in the developing world, even though we have to live with the ethical dilemma of this being available for only a few. India will be the context in which management of blood disease in the developing world is discussed in this paper.

Table 1 illustrates the stark differences in the demographic profile of three regions of the world: USA with a population of 321 million, per capita GNP of \$55,000 and adequate resources to provide health care for all, India

with a massive population of 1.3 billion and per capita GNP of \$5760 should be able to provide basic health care for all but would find it difficult to provide for high cost treatment for diseases like leukaemia and haemophilia, and countries like Sierra Leone where even though the population is small political instability and limited resources make it difficult to even provide basic health care<sup>(1)</sup>. However even in India the disparity in terms of resources is marked and this is illustrated in Table 2: a child with leukaemia or haemophilia in profile III can afford to be treated like any child in the developed world, while a child in profile I would be able to afford only basic health care provided by the state. However there is a rapidly expanding middle class as illustrated by profile II where high quality treatment can be provided with some financial assistance<sup>(2)</sup>. The health care infrastructure provided by the state consists of primary health centres, secondary health care in district hospitals and tertiary care in medical college hospitals located in the large cities. Most patients in profile II and III would however seek medical care from private practitioners and a







**Table 1. Demographic differences between three countries of the world**

	USA		India		Sierra Leone	
	1999	2015	1999	2015	1999	2015
Population-m	272	321.2	986	1314.1	5.3	6.5
Births/1000	15	13	28	21	47	37
Deaths/1000	9	8	9	7	30	14
Infant mortality	7	6	72	42	136	92
% Population < 15	21	19	36	29	45	41
% Population > 65	77	15	60	5	48	3
GNP/CAP-US\$	29,080	55,860	370	5760	160	1830
Health expend per cap (% PVT)-US\$		8713 (46)		141 (60)		96

Spain: 2015 population 46.4 m, birth rate 9/1000, death rate 9/1000, infant mortality 2.9/1000 live births, % population < 15 15%, population > 65 18%, GNP US\$ 32,860, Health expenditure per capita US\$ 2581 (74% provided by the state)

Data from: 2015 World Population Data Sheet, Population Reference Bureau, USA

**Table 2. Population profiles in India (a three tier society)**

	Profile I	Profile II	Profile III
<b>Age</b>	3 years	5 years	10 years
<b>Father</b>	Farm labourer	Baker	Businessman
<b>Mother</b>	Farm labourer	Housewife	Housewife
<b>Education</b>	Both illiterate	Literate: completed schooling	Graduates
<b>Siblings</b>	Six	Two	One
<b>Monthly income</b>	\$50	\$150	\$15000
<b>% Population</b>	70	28	2
<b>The child</b>			
<b>His home</b>			

network of corporate hospitals, most with well trained health care professionals and good equipment. The priority for health services provided by the state would be disease prevention by provision of clean water and sanitation and immunization, family planning, nutrition and treatment for infectious diseases.

### Nutritional anaemia

Iron deficiency remains the most important haematological problem in the developing world with a prevalence of 70-90% in pregnant women contributing significantly to maternal and infant mortality and a prevalence of 50% in children which is tragic since this can affect cognitive skills and development<sup>(3)</sup>. Poor nutrition is the most important cause with the diet predominantly consisting of cereals (polished rice) with a high phytate content which inhibits absorption of available iron. The National Nutritional Anaemia Eradication Programme was initiated in 1970, implemented by the Government of India through its network of primary health centres and funded by UNICEF. The target population included pregnant and lactating women and children between the age of 1 to 11 and the aim was to provide adults with one tablet containing 60 mg of elemental iron and 500 mcg of folic acid daily for 100 days/year to adults and one tablet of 20 mg iron

with 100 mcg folic acid for 100 days to children. Evaluation by the Indian Council of medical Research in 1985 showed poor implementation and acceptance of the program<sup>(4)</sup>. Innovative new approaches like supplementation of iron in wheat and increased public awareness coupled with availability of low cost iron and folate which is purchased by the population (anything given free is not valued) is required particularly in rural India.

### Thalassemia

India has a population of 20 million thalassemia carriers and every year 10,000 children with transfusion dependant thalassemia major are born resulting in a major burden on the family and the health care infrastructure<sup>(5)</sup>. Like Cyprus India needs a national thalassemia control program in regions of the country where the carrier rate is high based on screening with HPLC and antenatal diagnosis available for all carrier couples. However till such time as this is implemented treatment for children born with thalassemia major with adequate transfusion and chelation should be made available. The cost of looking after a child with transfusion and chelation per annum would be in the region of US\$ 2000 while a transplant at a cost of \$15-20,00, and the possibility of good quality life free of the burden of transfusion is appealing to parents who worry about



the care that the child will have access to when they are old. Results comparable to the best in the world can be achieved by transplant centres in India if the child is properly transfused and chelated pre transplant<sup>(6)</sup>.

---

## Haemophilia

With a population of 1.3 billion and an estimated prevalence of 6 per 100,000, India would have 80,000 persons with severe haemophilia: to provide even the minimum requirement of 20,000 units of factor VIII per patient per year the country would have to procure 1.6 billion units and the annual cost of plasma derived product at 30 cents/unit would be US\$ 480 million which would be 10% of the total health budget for 2015-16. In comparison in 1999 Sweden with 231 patients with haemophilia (222 on continuous prophylaxis) would have to spend US\$ 30 million per year representing 0.2% of the health budget<sup>(7)</sup>. However despite the enormity of the task, the Hemophilia Federation of India maintains a registry of patients and provides education and subsidized factor to patients. Increasingly state governments are making a specific allocation for haemophilia in their budgets. The country has centres where comprehensive haemophilia services are available including surgery and antenatal diagnosis. Education and physiotherapy remain the planks of haemophilia care when resources for factor replacement are limited<sup>(8)</sup>.

---

## Childhood acute lymphatic leukemia

The overall incidence of acute lymphoblastic leukemia in children in the developed world is 3-4/100,000 children (SEER Database): India with a population of 438 million children below the age of 15 will have approximately 15,000 new cases of childhood ALL in India every year<sup>(9)</sup>. Treatment of childhood ALL has been one of the important success stories of modern chemotherapy with over 85% of children being cured in the developed world and this success is largely due to the fact that most children are treated with nationally accepted protocols. In the developing world this is not so because standardized diagnostic facilities and treatment are available in only a few centres and treatment abandonment is high<sup>(10)</sup>. However it is possible to improve results by strict adherence to protocols, provision of financial assistance to those who need help and improving diagnostic facilities and this has been clearly demonstrated in Latin America and a centre in India where the 5 year EFS in the favourable risk group (age 1-9 years, WBC count less than  $20 \times 10^9/L$  and prednisolone good response was  $73.1 \pm 4.9\%$ <sup>(11,12)</sup>. However in the interim in the developing world we will have to

live with the fact that children in profile III will receive treatment appropriate to their risk status similar to any child in the developed world while treatment for children in profile II and III would have to be individualised particularly in high risk and patients<sup>(2)</sup>.

---

## Acute myeloid leukemia

Treatment for acute myeloid leukaemia in a young patient with good risk disease (t 8:21 with no Flt3 or C-kit mutation) with 3 + 7 induction and 3 cycles of high dose cytosine arabinoside as consolidation would cost approximately US\$ 10-15,000 in India and most patients in profile II and III would not be able to afford this and this is why 70% of patients diagnosed with AML in a tertiary referral centre in India do not receive treatment<sup>(13)</sup>. Only patients in profile I with high risk disease (young age, monosomy 7 or complex karyotype) would be able to afford treatment with induction followed by an allogeneic stem cell transplant. The haematologist practicing in India needs to be innovative and the management of acute promyelocytic leukaemia (APML) is a case in point where arsenic trioxide (ATO) initially produced in the hospital pharmacy has been transferred to industry which now makes the drug available at US\$ 12 per dose while Trisenox<sup>®</sup> manufactured under a US patent for which royalties are paid to MSKCC costs US\$ 400 per dose. With a program of accurate diagnosis including molecular monitoring and ATO and adequate blood product support, we have been able to show that long term survival is possible in most patients with low risk APML<sup>(14)</sup>.

---

## Haematopoietic stem cell transplantation (HSCT)

There has long been a debate that treatments like HSCT are not appropriate in the developing world where sanitation, nutrition, immunization and provision of basic health care services are the priority<sup>(15)</sup>. This is not true since provision of such services in the developing world would increase local expertise and allow a patient to have treatment in his own country at a considerably lower cost (US\$ 15-20,000 for a matched sibling donor HSCT)<sup>(16)</sup>. In 2014 there were 37 transplant centres in India with a total of 1000 transplants being done in the country (reported to the Indian Stem Cell Transplant Registry).

---

## Multidrug resistant gram negative infection

The high prevalence of carbapenem resistant enterobacteria (CRE) will make it difficult to adminis-

ter chemotherapy where neutropenia is prolonged and severe. Stool surveillance cultures in 168 patients planned for HSCT at the Tata Medical Center in Kolkata, India, between 2011 and 2015 showed that 52% of patients were colonized with extended spectrum beta lactamase producing gram negative bacteria while 26% were carbapenem resistant<sup>(17)</sup>. Increasing colistin resistance will mean that we do not have any effective antibiotic for septic neutropenic patients and this will increase the morbidity and mortality in stem cell transplantation<sup>(18)</sup>.

## Conclusion

Treating patients with blood diseases in the developing world is a challenge but the haematologist must ensure that an accurate diagnosis is made using cytogenetics and molecular tests where appropriate. When resources are scarce precision in diagnosis is essential in order to risk stratify and choose the appropriate treatment.

## References

1. Population Reference Bureau: 2015 World Population Data Sheet. Available at: [www.prb.org](http://www.prb.org).
2. Chandy M. Childhood acute lymphoblastic leukemia in India: an approach to management in a three-tier society. *Med Pediatr Oncol* 1995; 25 (3): 197-203.
3. Anand T, Rahi M, Sharma P Ingle GK. Issues in prevention of iron deficiency anemia in India. *Nutrition* 2014; 30 (7-8): 764-70.
4. Evaluation of National Nutritional Anaemia Prophylaxis Programme. Report of a Task Force Study. New Delhi: Indian Council of Medical Research; 1989.
5. Madan N, Sharma S, Sood SK, Colah R, Bhatia HM. Frequency of  $\beta$ -thalassemia trait and other hemoglobinopathies in northern and western India. *Indian J Hum Genet* 2010; 16 (1): 16-25.
6. Mathews V, Srivastava A, Chandy M. Allogeneic stem cell transplantation for thalassemia major. *Hematol Oncol Clin N Am* 2014; 28 (6): 1187-200.
7. Chandy M. Treatment options in the management of hemophilia in developing countries. *World Federation of Hemophilia*; 2005.
8. Chandy M. Ethics of haemophilia care in the developing world. *Haemophilia* 2002; 8 (3): 439-40.
9. Age-Adjusted SEER Cancer Incidence and U.S. Death Rates, 2009-2013.
10. Friedrich P, Lam CG, Itriago E, Perez R, Ribeiro P, Arora RS. Magnitude of treatment abandonment in childhood cancer. *PLoS One* 2015; 10 (9): e0135230.
11. Howard SC, Pedrosa M, Lins M, Pedrosa A, Pui CH, Ribeiro RC, Pedrosa F. Establishment of a pediatric oncology program and outcomes of childhood acute lymphoblastic leukemia in a resource-poor area. *JAMA* 2004; 291 (20): 2471-5.
12. Bajel A, George B, Mathews V, Viswabandya A, Kavitha ML, Srivastava A, Chandy M. Treatment of children with acute lymphoblastic leukemia in India using a BFM protocol. *Pediatr Blood Cancer* 2008; 51 (5): 621-5.
13. Philip C, George B, Ganapule A, Korula A, Jain P, Alex AA, Lakshmi KM, et al. Acute myeloid leukaemia: challenges and real world data from India. *Br J Haematol* 2015; 170 (1): 110-7.
14. Mathews V, George B, Lakshmi KM, Vishwabandya A, Bajel A, Balasubramaniam P, et al. Single-agent arsenic trioxide in the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: durable remissions with minimal toxicity. *Blood* 2006; 107: 2627-32.
15. Dennison D, Vaughan WP, Chandy M, Srivastava A, Pulimood B. Bone marrow transplantation in India: appropriate or inappropriate technology? *Int third world studies J Rev* 1990; 2: 1-5.
16. Chandy M. Stem cell transplantation in India. *Bone Marrow Transplantation* 2008; 42: S81-S84.
17. Bhattacharya S, Goel G, Mukherjee S, Bhaumik J, Chandy M. Epidemiology of antimicrobial resistance in an oncology center in Eastern India. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2015; 22: 1-2.
18. Goel G, Hmar L, Sarkar De M, Bhattacharya S, Chandy M. Colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae*: report of a cluster of 24 cases from a new oncology center in eastern India. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2014; 35 (8): 1076-7.

## El hematólogo como consultor: alteraciones hematológicas secundarias a otras enfermedades

JOAQUÍN DÍAZ MEDIAVILLA

Unidad de Hematología. Hospital Ruber Internacional. Madrid

### ¿Por qué nos preguntan tanto nuestros colegas de otras especialidades?

De los componentes de la sangre, son de nuestra competencia las células, muchas de sus proteínas (coagulación, inmunoglobulinas, citocinas y albúmina), determinados aspectos del transporte de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, y 3 moléculas muy especiales: Fe, fólico y vitamina B<sub>12</sub>. La sangre se mueve y transporta nutrientes, desechos metabólicos e información desde y hasta la última célula viva de nuestro cuerpo.

La sangre es líquida y sus órganos nodriza (médula ósea, ganglios linfáticos, bazo y otros focos linfoides) no son líquidos, pero casi todos son blandos o “pastosos” y eso nos permite a los hematólogos tomar muestras para su estudio en el diagnóstico y en todos los momentos evolutivos de la enfermedad, analizar las células individualizadamente y en colectivos purificados, separar y estudiar sus organelas, su genética y epigenética, sus alteraciones químicas, cultivarlas y someterlas *in vitro* a terapias experimentales. Estas facilidades nos aportan un conocimiento biológico especialmente profundo de las enfermedades de nuestra competencia y de las repercusiones de las demás enfermedades sobre la sangre y, por todo ello, es mucho más fácil el progreso que en las demás y, con más frecuencia, las cosas nuevas y revolucionarias ocurren en nuestra especialidad. A modo de ejemplo, baste recordar que los primeros tumores malignos diseminados (no extirpables quirúrgicamente) que pudieron ser curados fueron algunas leucemias agudas y que eso empezó a ocurrir en los años sesenta del pasado siglo con 30-50 años de antelación respecto a la oncología de tumores sólidos diseminados. De hecho, en el momento actual, ante casi todas las enfermedades malignas de nuestra competencia, disponemos de ofertas de curabilidad en una proporción creciente de pacientes y en edades cada vez más avanzadas. Creo que este bagaje en casi todas las facetas de la enfermedad (genética, degenerativa, autoagresiva, tóxica, infecciosa y neoplásica –y hasta me atrevería a afirmar que traumatológica, por los componentes hemorrágico y trombótico–) confiere a los

hematólogos desde hace muchos años una perspectiva con más fundamento biológico.

Todas estas circunstancias justifican que nuestros colegas de otras especialidades nos consulten mucho y que nuestras respuestas, si cuidamos los detalles, les resulten muy satisfactorias y, sobre todo, beneficiosas para sus pacientes.

### Sistematización de las consultas que el internista demanda de los hematólogos

Ya en el año 1976 se publicó un libro de 545 páginas sobre *Haematological Aspects of Systemic Disease*, coeditado por MCG Israëls y IW Delamore, que coordinaron a 23 autores (Figura 1). Desde entonces, múltiples capítulos se publican sobre “Aspectos hematológicos de...” en distintas especialidades médicas<sup>(1,2)</sup>.

Como puede verse en la Tabla 1, los motivos de consulta son muy diversos y competen a muchos aspectos de la hematología y a una amplísima gama de situaciones clínicas.

Intentar abordarlos todos de forma sistemática y detallada es imposible en esta sesión educacional, por lo que haremos una selección de los mecanismos fisiopatológicos, de su diagnóstico y de los tratamientos que me parecen más importantes o menos conocidos. A veces, detrás de la alteración hematológica motivo de la consulta se encuentra una verdadera “enfermedad de nuestra especialidad”. Más veces se trata de manifestaciones hematológicas de las

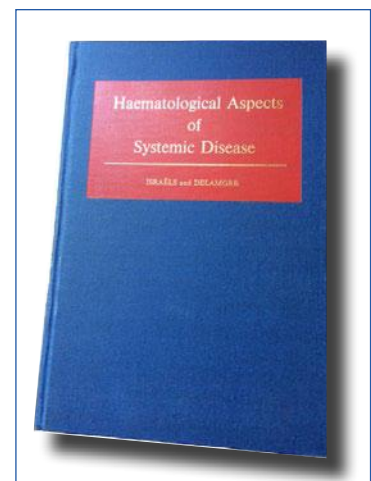


Figura 1. Portada del libro de Israëls y Delamore.

**Tabla 1. Situaciones clínicas y motivos de consulta hematológica**

Situaciones clínicas	Motivos de consulta hematológica
Enfermedades inflamatorias	Anemia
Cáncer	Poliglobulia
Enfermedades autoinmunes	Leucopenia
Enfermedades renales	Leucocitosis
Enfermedades endocrinas	Trombopenia y pseudotrombopenia
Enfermedades hepáticas	Trombocitosis
Infecciones (virus, bacterias, hongos, protozoos)	Combinaciones de las anteriores: ¿SMD?
Síndrome hemofagocítico (linfocitosis)	Gammapatía monoclonal
Síndrome inflamatorio sistémico, sepsis, <i>shock</i>	Diátesis hemorrágica sistémica
Síndrome antifosfolípido	Diátesis hemorrágica focal <sup>d</sup>
Microangiopatía trombótica (MAT)	Abortos y trombosis sin causa aparente
SAFC <sup>a</sup> , MAT <sup>b</sup> y TIH <sup>c</sup>	Síndrome adenopático
Alcoholismo	Esplenomegalia y asplenia
Fármacos	
Edad avanzada	

<sup>a</sup> Síndrome antifosfolípido catastrófico; <sup>b</sup> MAT: PTT, SUH, HELLP y CID; <sup>c</sup> Trombopenia inducida por heparina; <sup>d</sup> Epistaxis asociada a gestación, angiodisplasia asociada a estenosis aórtica

**Identificar los mecanismos implicados**  
**Basar decisiones terapéuticas en “evidencias” y “precisión personalizada”**

otras enfermedades cuyos mecanismos hay que tratar de identificar. Otras veces, especialmente cuando se trata de mecanismos muy comunes, puede concurrir más de un mecanismo y requerir tratamiento que tenga en cuenta esta circunstancia. Un buen ejemplo de esto es la anemia ferropénica, que puede no responder bien a la ferroterapia, si el paciente tiene además una inflamación crónica o insuficiencia renal.

En cualquier caso, es importante que el hematólogo trate de explicar al consultor de la otra especialidad cuál es el mecanismo (o los mecanismos) que opera en su paciente y debe tratar de argumentar si es o no necesario aplicar alguna medida correctora. Lo primero servirá para completar el diagnóstico del paciente y descartar otras posibles enfermedades asociadas y lo segundo para no empeñarse en corregir alteraciones que tienen escasa o nula repercusión clínica.

Para esta presentación, se seleccionarán algunos temas de motivos de consulta hematológica y de situaciones clínicas que las provocan, dejando fuera por razones de espacio muchas de ellas, en especial aquellas relacionadas con la trombofilia, los síndromes adenopáticos y la patología del bazo.

## La anemia

De las anemias, las hemolíticas y carenciales suelen tener expresión clínica y analítica bien definida y suelen ser fáciles de identificar y tratar. Conviene tener en cuenta la existencia de anemias pluricausales, que requieren su identificación. Conviene recordar que la mayoría de los pacientes con niveles bajos de B<sub>12</sub> en

suero no tienen anemia, ni macrocitosis, ni neuropatía, y no requieren tratamiento con vitamina B<sub>12</sub>; se trata de niveles bajos de esta sustancia, espúreos, que no esconden ninguna enfermedad<sup>(3)</sup>.

La anemia que se asocia a procesos inflamatorios crónicos (infecciosos o no) o tumorales suele caracterizarse por déficit moderado de hierro sérico, con saturación de transferrina normal o baja y ferritina normal o alta. Su incidencia es altísima, a corta distancia de la ferropénica. En su mecanismo parece influir el aumento de síntesis hepática de hepcidina mediado por ciertas citocinas, que bloquea la función de la ferroportina e impide el tráfico de hierro entre compartimentos, dificultando la absorción intestinal y la disponibilidad de Fe para eritropoyesis. El tratamiento de la enfermedad causal cura este tipo de anemia pero, si ello no es posible, lo cual es frecuente, la eritropoyetina, sola o combinada con ferroterapia, puede producir mejoría muy significativa. Es conocido que el 30% de los casos de anemia del anciano queda sin identificación del mecanismo: es probable que también sea una anemia emparentada con la inflamatoria. Suele ser de escasa gravedad, pero en personas con edad avanzada o pluripatología puede tener repercusión clínica. Su tratamiento, también con eritropoyetina asociada o no a hierro oral o parenteral, debe adecuarse al grado de repercusión clínica en cada paciente concreto.

Mucho más frecuente de lo comúnmente admitido, es la anemia ferropénica refractaria a hierro oral, también conocida como IRIDA (*iron refractory iron deficiency anemia*). Existe una forma rara de IRIDA, congénita, causada por la mutación TMPRSS6, que provoca deficiencia de matriptasa-2 y aumento de hepcidina, que

a su vez frena el transporte de hierro entre compartimentos. Otras formas de IRIDA mucho más frecuentes son provocadas por causas adquiridas, como gastrectomía, diferentes formas de cirugía bariátrica, infección por *H. Pylori*, enfermedad celíaca, gastritis autoinmune y enfermedad inflamatoria intestinal. La eritropoyetina actuaría a través de la matriptasa-2 para frenar la producción de hepcidina y, combinada con hierro oral o intravenoso, puede mejorar a muchos pacientes<sup>(4-6)</sup>.

---

### Poliglobulia

La causa más frecuente de poliglobulia es la hipoxemia crónica, sea por insuficiencia respiratoria o por *shunt* arteriovenoso, y está mediada por sobreproducción fisiológica de eritropoyetina. No suele ser causa de consulta con hematología, salvo para la indicación de sangrías: no existen criterios validados para establecer en qué nivel de hematocrito o de hemoglobina (Hb) es bueno para estos pacientes realizar sangrías, puesto que la poliglobulia no deja de ser un mecanismo de adaptación a la hipoxia. En mi opinión, esta decisión debe ser tomada de forma compartida por el hematólogo y el neumólogo o por el hematólogo y el cardiólogo, y con vigilancia muy estricta para tratar de calibrar el beneficio percibido por el paciente e intentar establecer en qué nivel de Hb se encuentra más confortable.

La poliglobulia secundaria a sobreproducción patológica de eritropoyetina es muy infrecuente y suele asociarse a alteraciones del sistema excretor de los riñones (hidronefrosis) o a secreción de eritropoyetina por tumores (renales, sistema nervioso central –SNC–, etc.). Su tratamiento consiste en eliminar el tumor responsable y, cuando ello no es posible, hacer sangrías tratando de mantener la tasa de Hb en niveles normales.

No debe olvidarse que los pacientes que reciben tratamiento crónico con andrógenos (orales, parenterales o transcutáneos) pueden desarrollar poliglobulia con Hb de 19-20 g/dL. La supresión del fármaco resuelve el problema en pocas semanas.

---

### Leucopenia

Valorar si se acompaña de trombopenia y/o anemia. Si se trata leucopenia aislada, valorar si es preferentemente de neutrófilos o de linfocitos. Tener en cuenta que la mayoría de las leucopenias son moderadas y no requieren tratamiento, aunque sí conviene que sean explicadas para completar el diagnóstico del paciente. Las neutropenias severas (< 500/ $\mu$ L) son menos graves si se acompañan de monocitosis, especialmente si la suma de ambos es superior a 500. La administra-

ción de estimulantes de granulopoyesis no suele ser necesaria y ha de tenerse en cuenta que, si funcionan, su efecto es muy transitorio. La neutropenia primaria crónica puede cursar con niveles muy bajos de neutrófilos, pero no hay que empeñarse en elevarlos a toda costa si no se acompañan de verdadera alta incidencia de infecciones bacterianas o aftas orales de repetición y debe recordarse que, con frecuencia, se asocia a enfermedades autoinmunes que pueden cursar con episodios febriles no infecciosos que se controlan bien con antitérmicos. La linfopenia es peor conocida, pero tener cifras muy bajas de linfocitos CD4 se puede acompañar de inmunodeficiencia T y requerir profilaxis antiinfecciosa, especialmente contra virus herpes y levaduras.

---

### Leucocitosis

La leucocitosis, muy conocida por la mayoría de los médicos como sugerente de infección, si es neutrofilica suele ser por infección bacteriana, fúngica o por protozoos. Conviene recordar que hay neutrofilias persistentes y con cifras superiores a 15.000/ $\mu$ L, asociadas a inflamación no infecciosa, tumores, tabaquismo, gestación o tratamientos con glucocorticoides administrados por casi cualquier vía (oral, parenteral o inhalada). El examen microscópico del frotis de SP es obligado para interpretar estos casos.

Si la leucocitosis es de predominio linfocítico, con anomalías morfológicas (linfocitos activados, células linfomonocitoides), suele tratarse de infecciones virales y, en caso contrario, conviene demostrar o excluir clonalidad.

---

### Trombopenia y pseudotrombopenia

El hallazgo de trombopenia no conocida previamente, en pacientes asintomáticos, obliga al laboratorio de hematología a descartar pseudotrombopenia, relacionada o no con los tubos de EDTA, sin que tenga que ser solicitado por otros colegas. Para ello, conviene revisar el frotis en busca de agregados plaquetarios, hacer recuentos plaquetarios precoces y tardíos y repetirlos en sangre anticoagulada con citrato sódico. La asociación de trombopenia con hepatopatía y esplenomegalia ha de ser conocida y debe prestarse especial atención al soporte transfusional intensivo en torno a eventuales intervenciones quirúrgicas.

La mayoría de las demás trombopenias suele ser seguida por los hematólogos, que conocen bien los procedimientos obligados de diagnóstico y los criterios de seguimiento, así como el momento en que es necesario iniciar el tratamiento.

## Trombocitosis

La mayoría de las trombocitosis que se ven en la práctica clínica son secundarias o reactivas. Dos estudios publicados en 1994 recogieron como reactivas el 82 y el 70%, autónomas (neoplasia mieloproliferativa crónica –NMPC– o síndrome mielodisplásico –SMD–) el 14 y el 22% y mixtas o indeterminadas el 4 y el 8%, respectivamente. Las causas de las reactivas, por orden de frecuencia, son: infección, cirugía, cáncer, hemorragia, esplenectomía o hipoesplenía y anemia ferropénica, y parece que en su patogenia está implicada la liberación de trombopoyetina o de IL-6. La trombocitosis casi siempre desaparece cuando se resuelve la circunstancia que la provocó y, en el caso de la esplenectomía, se atenúa al cabo de meses o años. Está bien comprobado que el peligro de trombosis, hemorragia o fenómenos vasomotores (cefaleas, trastornos visuales, eritromelalgia, etc.) en las trombocitosis reactivas es mucho menor que en las asociadas a NMPC y, por ello, casi nunca requieren tratamiento antiagregante ni anticoagulante. La trombocitosis reactiva no contraindica cirugía ni exige preparación especial. De todas formas, es prudente recordar que algunas trombocitosis aparentemente secundarias al final resultan siendo diagnosticadas de NMPC con toda su expresión clínica y biológica (esplenomegalia, mutaciones, etc.).

## Gammapatías monoclonales

Dos aspectos merecen ser destacados en este apartado. En primer lugar, la existencia de gammapatías monoclonales de significado indeterminado (GMSI) de “bajo riesgo” que son identificadas fácilmente: se consideran de bajo riesgo los pacientes con componente monoclonal IgG < 1,5 g/dL y ratio normal de cadenas ligeras libres en suero. En ellos, el riesgo de transformación en mieloma es inferior a 5% en un plazo de 20 años y no requieren seguimiento hematológico. Los demás pacientes deben ser revisados cada 1-2 años, con hematemetría, cuantificación de componente M en sangre y orina, creatinina y calcio sérico. En aquellos con ratio anormal de cadenas ligeras libres y/o proteinuria en rango nefrótico y/o NT-proBNP elevada sin otra justificación, la vigilancia debe ser más estrecha. En cualquier caso, es importante detectar los siguientes datos clínicos: dolor óseo, síntomas constitucionales (fiebre, pérdida de peso y sudor nocturno), síntomas neurológicos, hemorragias, macroglosia, miocardiopatía, aparición de adenopatías, hepatomegalia y esplenomegalia, anemia, creatinina elevada o hipercalcemia. La aparición de alguna de estas alteraciones debe ser motivo de reconsiderar el diagnóstico inicial y plantear una posible evolución a mieloma, enfermedad de Waldenström,

amiloidosis, otros síndromes linfoproliferativos y otros tumores.

Es importante recordar que en aquellos pacientes que tengan síntomas neurológicos o insuficiencia renal potencialmente relacionados con la GMSI, o miocardiopatía sin causa justificada, aunque no tengan mieloma o síndrome linfoproliferativo, deben discutirse conjuntamente con nefrólogos, cardiólogos o neurólogos para refinar el diagnóstico inicial y valorar el posible beneficio de tratamiento antiproliferativo o plasmaféresis.

## Diátesis hemorrágicas sistémicas y focales

Una historia clínica realizada con cuidado y un buen laboratorio de hemostasia permiten explicar bien el mecanismo y dirigir el tratamiento de la mayoría de las diátesis hemorrágicas sistémicas.

Las hemorragias focales desafían con relativa frecuencia a los hematólogos. Algunas mujeres, durante el embarazo, sufren epistaxis frecuentes y a veces abundantes que tienen relación con cambios microvasculares de la mucosa nasal, que desaparecen tras el parto. Existen angiodisplasias de mucosa digestiva, en pacientes de edad avanzada, que sangran reiteradamente y con frecuencia creciente y que no se resuelven con cauterización local, que incluso puede ser perjudicial; en ellos, conviene descartar la existencia de estenosis aórtica severa que condiciona sangrado debido a 2 fenómenos independientes: a) cambios de presión y dilatación de vasos de pequeño calibre en mucosa de estómago o intestino; y b) despolimerización de factor de von Willebrand (VW) provocado por el choque constante de la molécula VW con la válvula estenosada, que facilita el sangrado<sup>(7)</sup>. Ambos problemas se resuelven mediante sustitución de la válvula enferma.

## Síndromes sistémicos potencialmente causantes de alteraciones hematológicas

Existen una serie de síndromes de naturaleza infecciosa, inflamatoria o autoinmune en los que aparecen alteraciones hematológicas y son causa frecuente de consulta. Algunos son frecuentes, como el **síndrome metabólico**, el **síndrome inflamatorio sistémico**, la **sepsis** y el **shock**, y otros, aunque infrecuentes, son importantes por su potencial evolución dramática que compromete rápidamente la vida de los pacientes y obliga a diferentes especialistas a ser muy activos en su manejo diagnóstico y terapéutico, ya que, si se trabaja rápida y coordinadamente, se puede reducir la mortalidad de forma muy significativa: se pueden agrupar bajo el epígrafe de **microangiopatía trombótica (MAT)** y tienen en común su gravedad, rápidamente

progresiva, manifestaciones renales, neurológicas, hematológicas y metabólicas y, aunque cada uno tiene peculiaridades patogenéticas y clínicas propias, tienen similitudes de expresión clínica y de respuesta a tratamientos emparentados: **síndrome antifosfolípido catastrófico (SAFC)**, **púrpura trombótica trombocitopénica (PTT)**, **síndrome urémico hemolítico (SUH)**, **síndrome HELLP (hemolisis microangiopática, *elevated liver enzymes* y *low platelets*)**, **coagulación intravascular diseminada (CID)** y **trombopenia inducida por heparina (TIH)**. Por eso, es una excelente idea agruparlos como ha hecho recientemente. I. Rodríguez Pintó, del Grupo de Enfermedades Autoinmunes del Hospital Clinic de Barcelona, en una excelente publicación felizmente integradora. Finalmente, el **síndrome hemofagocítico o linfocitosis hemofagocítica** puede incluirse en este apartado.

#### Síndrome metabólico y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica con sepsis y shock séptico

Conviene estar familiarizados con estos síndromes no siempre bien definidos y que a lo largo de los años se han ido depurando pero que, incluso ahora, no son aceptados por muchos autores y que cada cierto tiempo se refina su definición. En realidad, son asociaciones de circunstancias etiológicas y clínicas que, sin ser verdaderas enfermedades, se asocian y causan repercusiones concretas, muchas de las cuales son de tipo hematológico.

#### El síndrome metabólico

Existen varias definiciones de este síndrome. La más reciente, de 2005, conocida como NCEP (National Education Cholesterol Program), incluye a aquellos pacientes con 3 o más de las siguientes características: hiperglucemia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, aumento de perímetro abdominal (> 102 cm en hombres y > 88 cm en mujeres) e hipertensión arterial. Se trata

de una situación proinflamatoria y protrombótica con niveles elevados de PCR, IL-6 e inhibidor de activador de plasminógeno (PAI)-1, que condiciona riesgo cardiovascular, diabetes de tipo II, esteatosis hepática, riesgo de colangiocarcinoma, insuficiencia renal, ovario poliquístico, hiperuricemia y trastornos del sueño. Varias consecuencias hematológicas han sido relacionadas con este síndrome, pero de ellas, por ser frecuente y no siempre obvia, debe destacarse la sobrecarga férrica dismetabólica (DIOS, *dysmetabolic iron overload syndrome*), que se acompaña de aumento de citocinas (TNF-alfa, IL-1 e IL-6), adipocinas (leptina, resistina) y hepcidina. Todo ello trae como consecuencia anemia por malabsorción de hierro y por alteración del tráfico de este metal entre diferentes compartimentos. La feroterapia oral suele ser poco eficaz y con frecuencia se producen buenas respuestas tras Fe intravenoso asociado o no a eritropoyetina<sup>(9)</sup>.

#### Sepsis y shock séptico

El concepto de síndrome séptico (sepsis) surge de la concurrencia, en pacientes individualizados, de alteraciones fisiológicas, patológicas y químicas inducidas por infección. El SIRS (*systemic inflammatory response syndrome*), la sepsis y el *shock* séptico son 3 niveles de gravedad. Los intensivistas e internistas lo miden con un *score* (SOFA: Sequential –Sepsis-Related– Organ Failure Assessment Score) que incluye varios parámetros “protagonistas”: respiración (PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>, mmHg), coagulación (cifra de plaquetas), hígado (bilirrubina sérica), cardiovascular (presión arterial media), estado mental (Glasgow) y fallo renal (nivel de creatinina y diuresis) (Tabla 2)<sup>(9)</sup>. Su utilidad consiste en que identifica situaciones clínicas aparentemente dispares, frecuentes en medicina intensiva, de origen infeccioso/inflamatorio, que cuantifica el riesgo de mortalidad en función de los puntos del *score* que acumule. Actualmente, se sabe que este síndrome tiene 3 ondas de mortalidad, una que tiene su máximo en los primeros 10 días, la segunda entre el día 20 y el 30

**Tabla 2. Score SOFA (Sequential –Sepsis-Related– Organ Failure Assessment Score)<sup>(9)</sup>**

Sistema	0	1	2	3	4
PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub>	≥ 400	< 400	< 300	< 200	< 100
Plaquetas 10 <sup>3</sup> /μL	≥ 150	< 150	< 100	< 50	< 20
Bilirrubina mg/dL	< 1,2	1,2-1,9	2-5,9	6-11,9	> 12
TA media mmHg	70	< 70	Dopamina o dobutamina	Dobutamina < 15 o epinefrina < 0,1	Dopamina > 15 o epinefrina > 0,1
Glasgow	15	13-14	10-12	6-9	< 6
Creat./Diuresis	1,2	1,2-1,9	2,0-3,4	3,5-4,9	> 5

**Tabla 3. Selección de test para diagnóstico de MAT, SAFC y TIH<sup>(13)</sup>**

Microscopia del frotis de SP Radiografía de tórax Examen de fondo de ojo Actividad y anticuerpos ADAMTS13 Coprocultivo Anticuerpos antifosfolípido	Aspirado/Biopsia de médula ósea PET Anticuerpos: anti-HPF4, DNA, Sm, RNP y FL Biopsia de tejido afectado Complemento, factor H, factor B y factor I Coagulación: TP, TTPA, D-dímero, fibrinógeno
---	---

y la tercera entre el primer y el tercer año siguientes al episodio inicial<sup>(10)</sup>. Con frecuencia, estos pacientes muestran manifestaciones hematológicas, en ocasiones graves, que afectan a la cifra de leucocitos (leucopenia o leucocitosis), trombopenia, anemia, trastornos de la coagulación y predisposición a complicaciones trombóticas. Por otro lado, muchos pacientes presentan alteraciones inmunológicas, tanto de inmunodeficiencia como por hiperrespuesta inmune. Finalmente, estos pacientes requieren frecuentemente terapia de soporte hematológico y de prevención de trombosis y, en los últimos años, se insiste en el posible beneficio que puede tener la aplicación de fármacos inmunomoduladores, como la administración de GM-CSF, que parece reducir la mortalidad, la estancia hospitalaria y el tiempo de ventilación mecánica que necesitan los pacientes<sup>(11)</sup>.

#### Microangiopatía trombótica (MAT)

La MAT es un síndrome clínico y analítico que puede ser hereditario o adquirido, afectar a niños o adultos, de comienzo repentino o gradual, que se caracteriza por la existencia de anemia hemolítica microangiopática, trombopenia y lesión de 1 o más órganos dependiente de trombosis arteriolar o capilar<sup>(12)</sup>. Criterios dispares de etiología, patogenia y enfermedades asociadas han permitido establecer agrupaciones de pacientes con límites no bien definidos pero que son bien conocidos por los hematólogos: SAFC, PTT, SUH, HELLP, CID y TIH<sup>(13)</sup>. Su diagnóstico de sospecha depende mucho de la sagacidad del clínico responsable y de que en el laboratorio de hematología exista una vigilancia estrecha de las alarmas de la hematimetría rutinaria que avisen de la obligada revisión microscópica del frotis de SP sospechoso de MAT. Si los datos clínicos y microscópicos son sugerentes, se tendrá que poner en marcha una batería diagnóstica completa (Tabla 3) y, cuanto más pronto se disponga de estos datos, antes se establecerá un diagnóstico y un tratamiento con bases racionales. Ha de tenerse muy en cuenta que estos síndromes tienen una alta tasa de mortalidad y que con frecuencia evolucionan hacia un empeoramiento acelerado que, si no se interrumpe precozmente, alcanza una gravedad irreversible e insensible a las medidas terapéuticas disponibles. El tratamiento se adaptará a la situación

de cada paciente: ocasionalmente, basta con la administración de glucocorticoides pero, con frecuencia, es necesario cambiar o añadir anticoagulante, realizar plasmaféresis, administrar gammaglobulina intravenosa o inmunomoduladores (rituximab, eculizumab o caplacizumab)<sup>(14,15)</sup>.

#### Linfohistiocitosis hemofagocítica

Es un síndrome descontrolado de activación inmune que, en muchos casos, tiene un componente familiar/genético, poco frecuente, pero que está aumentando (inexplicablemente) tanto en niños como en adultos en los últimos años. Las claves diagnósticas son: a) clínicas (fiebre y esplenomegalia); b) bioquímicas (aumento de triglicéridos y ferritina y descenso de fibrinógeno); y c) citológicas (bi- o tricitemia, hemofagocitosis en médula ósea, disminución de células NK y aumento de células CD25 en SP). Puede ser idiopático, pero con frecuencia se asocia a enfermedades autoinmunes, tumores malignos (hematológico o no) o infección (virus, bacterias o protozoos). Además del tratamiento de la enfermedad asociada, requiere una terapia específica, con etopósido, dexametasona y tacrolimús. En casos refractarios o recidivantes, se debe valorar el trasplante alogénico de médula ósea<sup>(16)</sup>.

#### Bibliografía

1. Israëls MCG, Delamore IW. Haematological aspects of systemic disease. London: W.B. Saunders Company Ltd.; 1976.
2. Metha AB, Hoffbrand AV. Haematological aspects of systemic disease. En: Hoffbrand V, Catovsky D, Tuddenham EGD. Postgraduate haematology. Fifth edition. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.; 2005.
3. Stabler SP. Vitamin B<sub>12</sub> deficiency. N Eng J Med 2013; 368: 149-60.
4. Camaschella C. Iron-deficiency anemia. N Eng J Med 2015; 372: 1832-43.
5. Bartnikas TB. Matriptase-2 links erythropoietin to iron. Blood 2016; 127: 2270-71.
6. Hershko C, Camaschella C. How I treat unexplained iron deficiency anemia. Blood 2014; 123: 326-33.
7. Loscalzo J. From clinical observation to mechanism: Heyde's syndrome. N Eng J Med 2012; 367: 1954-56.
8. Aigner E, Feldman A, Datz C. Obesity as an emerging risk factor for iron deficiency. Nutrients 2014; 6: 3587-600.



9. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for sepsis and specific shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; 315: 801-10.
10. Delano MJ, Ward PA. Sepsis-induced immune dysfunction: can immune therapies reduce mortality? *J Clin Invest* 2016; 126: 23-31.
11. Mathias B, Szpila BE, Moore FA, et al. A review of GM-CSF therapy in sepsis. *Medicine* 2015; 94: 1-10.
12. George JN, Nester CM. Syndromes of thrombotic microangiopathy. *N Eng J Med* 371; 2014: 654-65.
13. Rodriguez-Pinto I, Espinosa G, Cervera R. Catastrophic APS in the context of other thrombotic microangiopathies. *Curr Rheumatol Rep* 2105; 17: 1-10.
14. Ortel TL, Erkan D, Kitchens S. How I treat catastrophic thrombotic syndromes. *Blood* 2015; 126: 1285-93.
15. Peyvandi F, Scully M, Kremer Hovinga JA, Cataland S, Knöbl P, Wu H, et al.; TITAN Investigators. Caplacizumab for acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Eng J Med* 2016; 374: 511-22.
16. Schram AM, Berliner N. How I treat hemophagocytic lymphohistiocytosis in the adult patient. *Blood* 2015; 125: 2908-14.

---

## Secuenciación del genoma y su impacto en hematología

RAMÓN GARCÍA SANZ, C. JIMÉNEZ, M.E. SARASQUETE, M.C. CHILLÓN, A. BALANZATEGUI, L.A. MARÍN, N. PUIG, M. GARCÍA-ÁLVAREZ, I. PRIETO-CONDE, M. GONZÁLEZ, M. ALCOCEBA

Servicio de Hematología. Hospital Universitario de Salamanca

---

### Introducción

El desarrollo de la tecnología de secuenciación de nueva generación (*next generation sequencing*, NGS) está permitiendo el acceso al diagnóstico por secuencia en los laboratorios clínicos, facilitando numerosas aplicaciones que tiene la secuenciación del genoma en muchas patologías<sup>(1)</sup>. El crecimiento exponencial de la capacidad para secuenciar el ADN<sup>(2)</sup> ha mejorado la comprensión de la variación genética del ser humano y la identificación de miles de variantes que pueden afectar a su salud. Es de esperar que el avance de la tecnología genómica y su conocimiento permitan su integración en práctica clínica. En hematología, la NGS permite abordar gran número de entidades, tanto benignas como malignas, en las que llevar a cabo estudios que ayuden en el diagnóstico, la evaluación pronóstica y la monitorización de nuestros pacientes, e incluso permitan la orientación terapéutica directa. Por otro lado, la NGS va a competir de forma directa con otras metodologías plenamente instauradas en los laboratorios clínicos (*fluorescence in situ hybridization* –FISH–, secuenciación Sanger...) a las que, con el tiempo, podría desplazar si se cumplen las expectativas y se consolidan las ventajas que esta metodología promete aportar. La aplicación de estas nuevas tecnologías a individuos y poblaciones ofrece una oportunidad sin precedentes para identificar y caracterizar variantes funcionales del ADN humano en una gran diversidad genómica. A continuación, revisaremos los fundamentos de la variación del ADN y los enfoques habituales de secuenciación, enfatizando la aplicación de la tecnología NGS en nuestra especialidad.

---

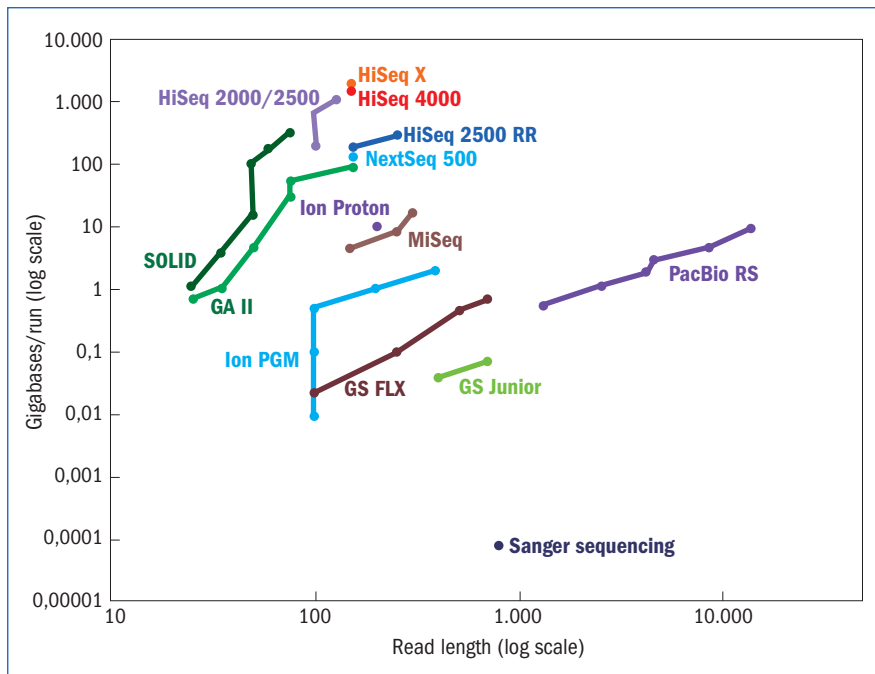
### Aspectos generales del ADN

El ADN es un polímero largo de doble cadena compuesto de 4 nucleótidos que forman pares de bases complementarias (pb) entre sí: adenina (A) con timina (T), y guanina (G) con citosina (C). Al conectar el extremo 5' al 3' (en referencia al quinto y tercer carbonos de la desoxirribosa), estos 4 nucleótidos constituyen los

ladrillos que construyen el ADN. El ADN está organizado en grandes moléculas lineales, altamente estructuradas, que forman los cromosomas. La regulación de su función se basa en su organización física y proteínas asociadas, que configuran la cromatina. Los genes son las regiones de ADN que codifican las proteínas. Las regiones codificantes de las proteínas se definen por la presencia de exones, leídos 5' a 3', compuestos de tripletes de nucleótidos (codones), cada uno especificando un aminoácido o una señal de terminación de la traducción. Los tramos de ADN sin codificación proteica entre los exones son los intrones. Los sitios de empalme marcan los límites exón-intrón y regulan la escisión de los intrones del ARN mensajero.

Hay muchos elementos en el ADN que no codifican pero regulan la expresión génica. Los promotores, que se encuentran inmediatamente por encima de los genes, son imprescindibles para su transcripción. Los reguladores del ADN, que aumentan o reprimen la expresión génica, suelen estar cerca de (o dentro de) intrones de genes estructurales, pero también puede estar a gran distancia. Algunos pueden controlar grandes regiones genómicas, con muchos genes, como la globina<sup>(3)</sup>. Además, hay numerosas regiones del ADN que transcriben ARN funcionales no codificantes, como ARN de transferencia, ARN ribosómico y micro-ARN. Se puede modificar químicamente los nucleótidos del ADN de forma reversible (por ejemplo, metilación) y afectar a los elementos que influyen en la expresión durante el desarrollo o en un tejido concreto, como ocurre en la impronta genética o en la diferenciación celular<sup>(4)</sup> (Figura 1).

El ADN es una molécula que cambia constantemente. Se replica en cada mitosis y se recombina y segrega con cada meiosis. Aunque los procesos de replicación del ADN son muy fieles, no son perfectos, ni pueden serlo<sup>(3)</sup>. Por tanto, aunque raro, es inevitable que durante la copia o la unión de extremos libres, se produzcan variaciones del ADN. También se pueden producir errores del ADN durante la reparación de ADN dañado por exposición ambiental a un exceso de radiaciones ionizantes, ultravioleta –UV– o agentes químicos. Los procesos de reparación de ADN dañado generalmente son menos

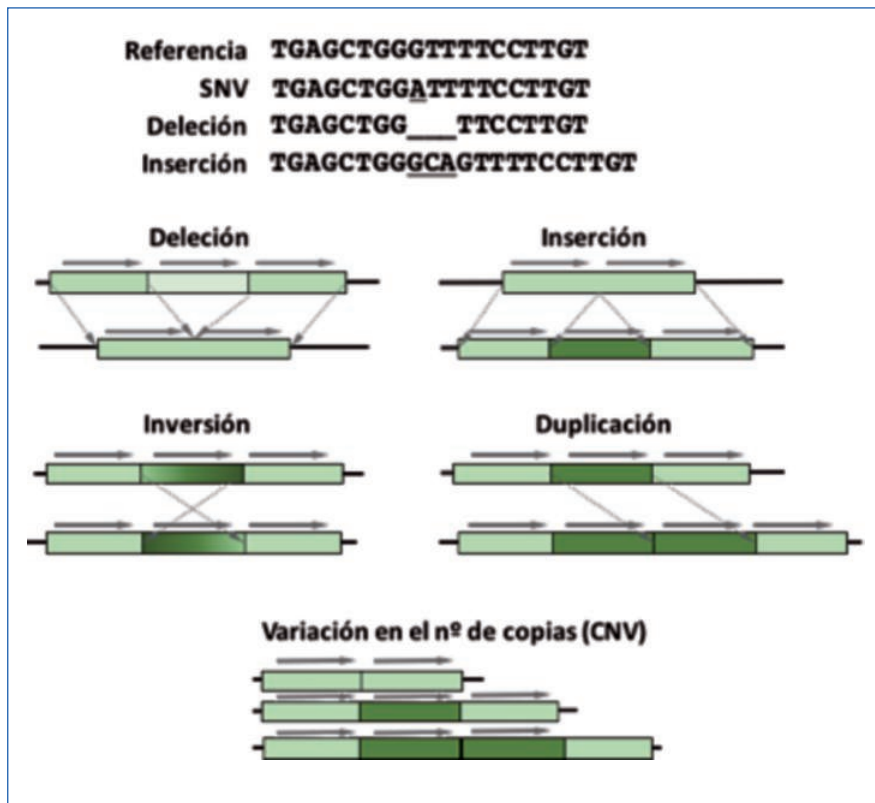


**Figura 1.** Avances en secuenciación de alta capacidad. SOLID® es una plataforma de Applied Biosystems; Ion PGM® e Ion Proton® son plataformas Ion Torrent; GA II® (ThermoFisher en España); HiSeq®, NextSeq® y MiSeq® son plataformas de Illumina; GS FLX® y GS Junior® son plataformas de Roche; y PacBio RS® es una plataforma de Pacific Biosciences<sup>(2)</sup>.

fieles que la replicación del ADN<sup>(5)</sup>. Se cree que esta permisividad es necesaria para posibilitar la reparación funcional de genomas producidos a partir de un ADN molde corrupto sin que el proceso de reparación se interrumpa, pero puede dar lugar a daños con variaciones adquiridas en el ADN. Estas variaciones se acumulan a medida que el tiempo avanza durante generaciones (variación de la línea germinal) o dentro de un mismo individuo a lo largo de muchas divisiones celulares (variación somática). La gran mayoría de las variantes de ADN no causan ninguna variación fenotípica. Sin embargo, algunas variantes sí son funcionales y pueden alterar el fenotipo.

Cualquier diferencia en la secuencia de ADN en comparación con una secuencia de referencia común se considera una variante de ADN (Figura 2). El tipo más simple de variación del ADN es el cambio de un solo nucleótido, conocido como “variante de nucleótido único” (*single nucleotide variation, SNV*). Cuando una SNV es frecuente en la población (> 1%), se considera un “polimorfismo de nucleótido único” (*single nucleotide polymorphism, SNP*). Otro tipo de variación del ADN es la inserción o deleción (conocido como indel) de un tramo de nucleótidos. Las variantes estructurales (por lo general > 1.000 pb) son variantes de ADN que incluyen indels grandes, así como reordenamientos más complejos del ADN, tales como inversiones (un trozo de ADN se corta, gira y reempalma) y traslocaciones (2 regiones genómicas distantes se unen). Las variaciones del número de copias (*copy number variation, CNV*) son un tipo de variación estructural producido por la ganancia o pérdida de toda una región de ADN por deleción o duplicación.

Todas las variaciones del ADN pueden modificar la expresión o la función de los genes. Las SNV pueden alterar la traducción en aminoácidos al dejar sin sentido un codón (con sentido perdido, *missense*), crear



**Figura 2.** Tipos de variaciones del ADN. A: variantes de nucleótido único (SNV): sustitución de una base, mientras que la inserción o deleción (indel) afecta a varios nucleótidos; B: variaciones estructurales (por lo general afectan a > 1.000 pb): incluyen grandes indels, inversiones, duplicaciones y variaciones del número de copias (CNV).

un codón de STOP (sin sentido, *nonsense*), o alterar los sitios de empalme. Las SNV también pueden afectar a la función de genes al variar la secuencia de promotores, elementos reguladores o ARN no codificantes. Los indels pueden alterar el marco de lectura al cambiar registros de codones y crear nuevas secuencias de aminoácidos hacia abajo. Si los indels son muy grandes, pueden destruir genes completos, afectar a regiones genómicas enteras o alterar la estructura de la cromatina. Las inversiones y traslocaciones alteran los genes de origen y pueden dar lugar a genes y/o elementos reguladores nuevos. Finalmente, las CNV, que se traducen en pérdidas o ganancias de copias completas de ADN funcional, pueden afectar al fenotipo a través de un efecto de dosis genética diferencial. Por tanto, cualquier tipo de variante del ADN puede afectar a su función y todos los tipos de variantes de ADN han sido implicados en enfermedad.

## Tecnologías de secuenciación de ADN

### Era presecuenciación

En la era pregenómica se utilizaron varias tecnologías para identificar alteraciones genéticas asociadas a enfermedad (citogenética, FISH) o alelos de susceptibilidad (análisis de variaciones del ADN basados en estudios de relaciones familiares –microsatélites– o en genotipado de ciertos genes en individuos no emparentados –análisis de polimorfismos de longitud, fragmentos de restricción, PCR alelo específica–).

La finalización del Proyecto Genoma Humano<sup>(6)</sup> y el desarrollo de *arrays* de marcadores genómicos con múltiples SNP permitió mejorar el diseño de los estudios de asociación genética de trazado complejo (Figura 2). Estos avances tecnológicos han permitido buscar polimorfismos frecuentes en el genoma humano que se pueden asociar con ciertos rasgos clínicamente relevantes, marcando el comienzo de la era de los estudios de asociación de genoma completo (*genome wide association studies*, GWAS). En el diseño GWAS, se estudiaron muchos sitios variables por todo el genoma humano con respecto a su asociación con fenotipos cuantitativos o cualitativos, directa o indirectamente (por desequilibrio de unión). Aunque muchas de las variantes genéticas que se encontraron asociadas a funciones hematológicas se encuentran dentro o cerca de genes que se sabía que participan en la etiología de la enfermedad o fisiología hemática, la evaluación GWAS ha llevado al descubrimiento de *loci* antes desconocidos que se asocian con cambios en la patobiología<sup>(7)</sup>. La hibridación genómica comparada (CGH) ha permitido comparar el ADN de muestras y controles mediante marcaje y cohibridación, encontrando CNV asociadas a enfermedades<sup>(8)</sup>.

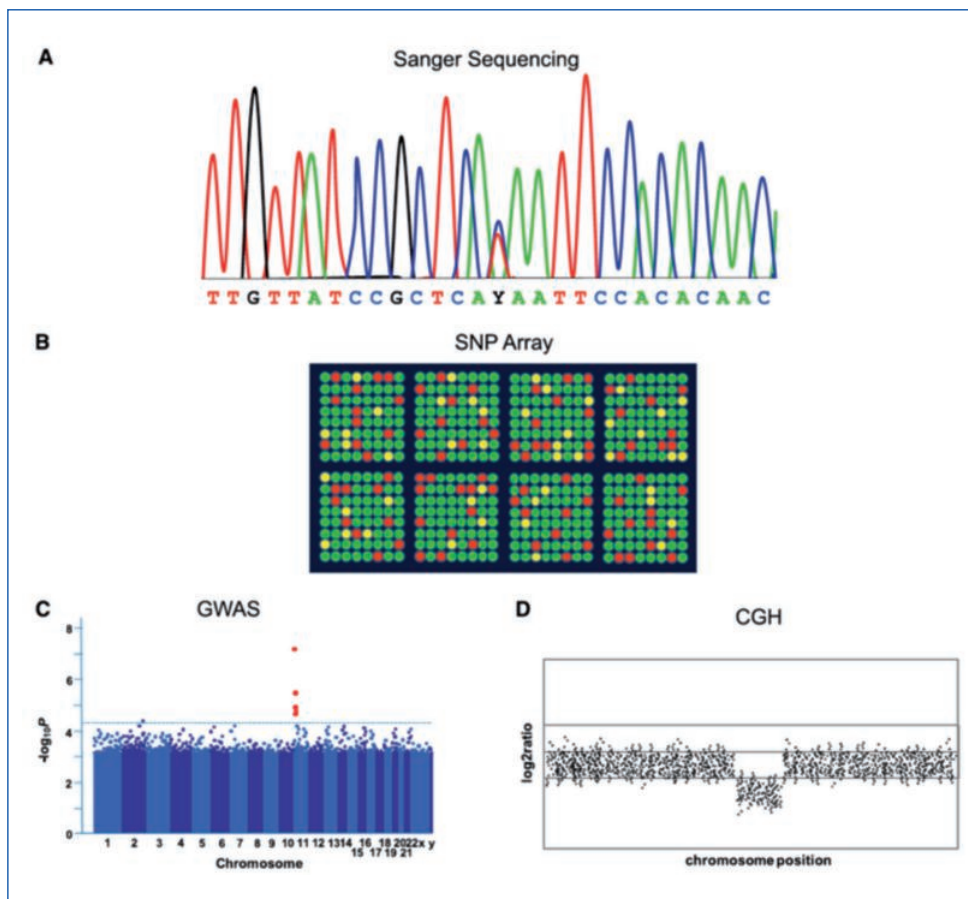
El GWAS generalmente ha testado variantes comunes del ADN, en general no codificantes, identificando muchos *loci* nuevos relacionados con hematología. Sin embargo, es probable que variantes raras del ADN, particularmente las que están dentro de la secuencia codificante, también contribuyan a la variabilidad poblacional interindividual en fisiología y patología hemática. Los recientes avances de la tecnología de secuenciación de ADN de nueva generación permitirán la detección integral de variantes raras del ADN.

### Secuenciación de primera generación

Siempre se ha querido secuenciar el ADN para hacer un análisis genético correcto, ya que sólo la secuencia puede proporcionar el genotipo en cada posición<sup>(6)</sup>. De hecho, la secuenciación capilar fluorescente, conocida como Sanger, sigue siendo uno de los pilares en el análisis rápido de cualquier región pequeña en unas cuantas muestras<sup>(1)</sup>. En ella, primero se amplifica por PCR la región de interés a partir del genoma. Al amplicón resultante se le añaden nucleótidos estándar (A, C, G, T) y una mezcla de terminadores, nucleótidos modificados marcados cada uno con un fluoróforo diferente (dideoxinucleótidos, *big dye terminators*...). Desde el cebador inicial, la polimerasa va sintetizando el ADN, copiando el molde e incorporando terminadores marcados al azar. Al incorporar un terminador, la extensión se detiene de tal manera que se genera una escalera de productos de diferente tamaño en los que cada uno termina con una base marcada. Este paso se repite como en la PCR, dando origen a muchas copias de productos, permitiendo su detección gracias a la base marcada que finaliza el fragmento. Al someter la escalera resultante a una electroforesis capilar de alta resolución, capaz de detectar diferencias de una sola base, se va detectando la fluorescencia del terminador en cada fragmento más corto al más largo, identificando la secuencia del fragmento de ADN que queríamos conocer (Figura 3), con un tamaño de hasta 800 pb. La secuenciación Sanger sigue siendo el estándar de oro para conocer la secuencia del ADN, sobre todo en situaciones de diagnóstico. Por tanto, esta tecnología sigue siendo de uso común, aunque las tecnologías de mayor rendimiento ya se están integrando en los laboratorios clínicos.

### Secuenciación de nueva generación

El desarrollo de la secuenciación de nueva generación (NGS) ha cambiado la amplitud del análisis genético humano y reducido los costes de la secuenciación de un genoma<sup>(2)</sup>. Hoy en día sería posible llegar a secuenciar todo el exoma (sólo regiones codificantes: *whole exome sequencing*, WES) o el genoma (codificante y no codificante: *whole genome sequencing*, WGS) durante la evalua-



**Figura 3.** Secuenciación de 1.ª generación y tecnologías genómicas por asociación. A: representación esquemática de la secuenciación Sanger: electroferograma que muestra una heterocigosidad para T/C en la posición Y; B: figura de la matriz de genotipado por SNP (SNP array) que muestra la detección de la hibridación diferencial (verde -AA- o roja -BB- para homocigosos, amarillo para heterocigosos -AB-) del ADN marcado; C: representación de resultados de la matriz de datos. En GWAS, se utiliza el Manhattan Plot para resumir un gran número de valores de  $p$ , representado por coordenadas genómicas (cromosomas) en el eje X y por el logaritmo negativo del valor de  $P$  para cada SNP en el eje Y. El umbral de significación estadística se sitúa en el valor  $2\log$  de  $P$  (línea discontinua). Los SNP con valores significativos aparecen por encima de la línea (en rojo); D: matriz de CGH, para ver ganancias y pérdidas de ADN que se dan como un cociente y representación respecto al genoma. Este ejemplo muestra la pérdida de una región respecto a la referencia<sup>(1)</sup>.

ción clínica de un paciente. Elegir entre exoma o genoma dependería en última instancia del precio, de modo que a día de hoy se prefiere el WES al WGS, ya que al no necesitar el ADN no codificante es mucho más barato, aunque esto puede cambiar en el futuro. No obstante, hoy por hoy se prefiere utilizar paneles de genes diana, en cuya optimización cada vez se trabaja más.

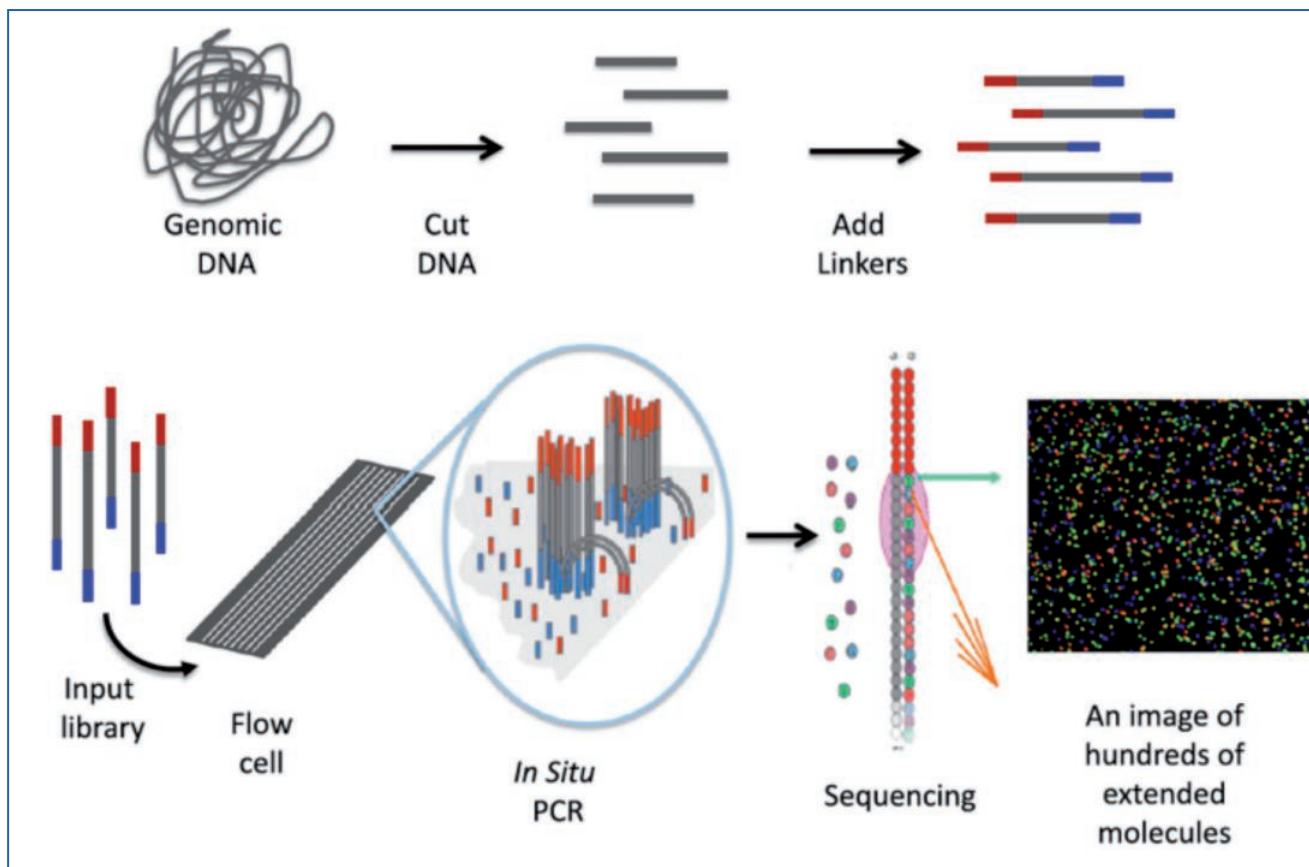
#### Preparación de la muestra y construcción de bibliotecas

Se trata de preparar un grupo de fragmentos de ADN listo para ser secuenciado, como hojas escritas aisladas que hay que leer; de ahí su nombre *library* en inglés y que se suele traducir como librería, aunque es más correcto decir biblioteca. En la aplicación clínica de la NGS éste es el paso más importante para utilizar correctamente la tecnología, ya que es aquí donde se decide qué se quiere secuenciar: todo, unas pocas veces (30x, 50x, 100x → WES, WGS), mucho, muchas veces (300x, 1.000x, 5.000x → secuenciación dirigida por paneles de captura o amplicones), o poco, muchísimas veces (10<sup>6</sup>x, 10<sup>7</sup>x → amplicones de una región pequeña de alto interés, enfermedad mínima residual -EMR-). Ante ello consideraremos primero varios pasos básicos que son comunes a todos los métodos de secuenciación

masiva paralela (Figura 4)<sup>(1,2)</sup>. El primer paso es generar una biblioteca de la muestra: ADN genómico o ARN convertido en ADN (cADN). La calidad de la biblioteca es fundamental en la eficiencia de la determinación de la secuencia. Lo primero es fragmentar físicamente el ADN, aunque también se puede hacer químicamente de una forma más sencilla, con transposasas, en un proceso de se denomina *tagmentación*, ya que además de fragmentar el ADN se le incluyen identificadores o adaptadores<sup>(9)</sup>. El rendimiento de la NGS se ha incrementado hasta el punto de que se pueden secuenciar muestras de diferentes individuos en la misma carrera insertando secuencias conocidas durante la construcción de la biblioteca que luego actúan como códigos de barras que identifican a cada individuo una vez que se conocen las secuencias completas. Una alternativa para generar bibliotecas de ADN para NGS es mediante PCR múltiple, que está muy estandarizada para ciertas aplicaciones.

#### Amplificación

Tras preparar la biblioteca, sus moléculas son amplificadas para generar suficientes copias que garanticen una detección robusta. La amplificación es uno de los



**Figura 4.** Esquema de una forma de secuenciación de nueva generación (NGS). El proceso se inicia mediante la fragmentación aleatoria del ADN genómico (o de cADN) en fragmentos cortos (longitud de unos cientos de bp). Luego se añaden oligonucleótidos vinculantes a los fragmentos para generar una biblioteca in vitro. Las bibliotecas se introducen en un portaobjetos con canales de flujo que contienen en su superficie oligonucleótidos complementarios vínculos de las bibliotecas. Al hibridar la biblioteca se adjuntan millones de moléculas individuales en ubicaciones concretas del porta. A continuación, se lleva a cabo un PCR in situ que amplifica los fragmentos individuales de la biblioteca en grupos. Tras ello, se procede a dejar los productos en cadena simple y sintetizar la cadena complementaria de nucleótidos marcados de tipo terminador. En cada ciclo la ADN polimerasa añade a cada clúster una única base y se lee (imagen final). En el siguiente ciclo se elimina el fluoróforo y se permite añadir un nuevo nucleótido único y se vuelve a leer. Es decir, se van haciendo extensiones de una base en una base. Cada ciclo se repite unas 100 veces desde un extremo de la molécula y 100 veces de la otra ( $100 \times 2$ ).

pasos en los que se producen sesgos, ya que disminuye la cobertura de secuencia para algunas regiones, como aquellas ricas en GC donde hay promotores y exones iniciales, introduciendo errores antes de la secuenciación. Los errores que se producen durante el proceso de copia son aleatorios y su presencia hace que cada lectura sea menos precisa. Estos errores generalmente no son detectados como variantes, ya que la secuencia final se determina en última instancia por consenso de muchas lecturas individuales, que son lecturas distinguibles por su posición genómica, secuencia y/o longitud únicas. Sin embargo, cuando se desean detecciones de bajo nivel, como ocurre al secuenciar el tumores sólidos, que dan ADN mezcla de distintas poblaciones, los errores introducidos durante la amplificación deben ser considerados. Por eso, para dar mayor confianza a la variante observada y estar seguro de que está realmente presente y no es un artefacto del proceso, las variantes tumorales de bajo nivel sólo se consideran cuando se

ven al menos 2 veces. Por tanto, es necesaria una mayor profundidad ( $300\times$  o más) en las lecturas únicas cuando se están explorando muestras heterogéneas, como ocurre en el cáncer<sup>(10,11)</sup>. Este aspecto se convierte en algo relativo en hematología, donde con frecuencia se utilizan muestras leucémicas o muestras seleccionadas, en las que la muestra es mucho más homogénea.

### Secuenciación

Hay varios formatos y química utilizados en NGS. Muchos utilizan fluorescencia de una forma similar a la secuenciación Sanger. La detección de las secuencias por NGS se realiza en canales, cámaras, nanopocillos o en nanobolas ensambladas. Lo que varía sustancialmente entre plataformas es el método utilizado para obtener la secuencia. Una de las tecnologías más usadas (Illumina®) utiliza la secuenciación reversible con marcaje terminador<sup>(12)</sup>. En este sistema, las moléculas de la bi-

biblioteca son capturadas en un canal y cada una de ellas se amplifica para generar un pequeño grupo (clúster). A continuación, la ADN polimerasa y los 4 colorantes terminadores se hacen fluir a través del canal, lo que resulta en la adición de una base fluorescente para cada clúster. La lectura de la fluorescencia identifica la base incorporada en cada uno de los cientos de millones de grupos que se encuentran en el canal. Una vez leído, se invierte el flujo de reactivos en el canal para eliminar el fluoróforo y reparar el nucleótido, dejando la base lista para incorporar otro nuevo. Este proceso constituye un ciclo, que se repite a continuación. Típicamente se leen secuencias de 75-100 pb para cada agrupación, aunque es posible leer longitudes de 50 a 300 pb. Una carrera entera con múltiples canales puede generar unos 600 gigabases (Gb) de secuencia en unos 11 días. Con las nuevas actualizaciones se pueden leer 120 Gb en 27 horas, o lo que es lo mismo, un genoma diario completo (WGS) con una cobertura  $\sim 30\times$ . Hay otros sistemas de secuencia genómica completa que no usan la secuenciación por síntesis, que es la que hemos visto, o no usan luz para hacer las lecturas.

#### Otras plataformas de secuenciación de nueva generación y secuenciación de tercera generación

Hay otras plataformas NGS disponibles y algunas más en desarrollo<sup>(2)</sup>. Algunas tienen capacidad suficiente para secuenciar un exoma y en general todas son capaces de secuenciar paneles de genes específicos o el ARN. El Ion Torrent® (Life Technologies) es la única que se basa en su capacidad para detectar mínimos cambios de pH que tienen lugar al añadir una base un momento puntual<sup>(13)</sup>. El 454® (Roche) detecta la adición de una base por la generación de un pirofosfato<sup>(14)</sup>. Otra plataforma es la de Pacific Biosciences, que mide la incorporación de una base fluorescente a moléculas individuales en tiempo real<sup>(15)</sup>. Aunque el rendimiento no es tan alto como el de otras plataformas, puede llegar a leer hasta 25 kilobases (Kb) de longitud y detectar directamente la metilación del ADN. Esta capacidad de lectura tan larga es muy ventajosa cuando se secuencian regiones muy complejas del genoma humano. También se pueden intentar secuenciaciones de una sola molécula, donde se pretenden longitudes de lectura muy larga, aunque por ahora sólo es un área de desarrollo activo de la tecnología. Por ejemplo, en la secuenciación con Nanopore®<sup>(16)</sup> las moléculas individuales de ADN van pasando por un estrecho poro y permiten la detección de cada base en tiempo real, ofreciendo el potencial de generar lecturas tan largas como una molécula. Si bien esta y otras plataformas son sólo promesas de futuro, las tecnologías NGS existentes también están trabajando hacia lecturas más largas que permiten mejorar el ensamblaje de secuencias individuales del genoma y la

detección de variantes difíciles, tales como inserciones y deleciones grandes y variantes estructurales.

#### Ensamblaje de la secuencia

Una vez que lee la secuencia generada por una plataforma NGS, ésta debe ser ensamblada y alineada frente a una secuencia de referencia humana que servirá como un andamio donde colocar la lectura. Para ello, se utiliza una indexación rápida que encuentre la mejor coincidencia y tenga en cuenta los errores y variantes de lecturas. Aunque esta forma de encaje no es perfecta, es eficaz y rápida para montar las enormes cantidades de datos de la NGS. De hecho, la mayoría del genoma ( $\sim 90\%$ ) se puede asignar de forma fiable con este enfoque.

No todas las variantes genómicas están representadas en la secuencia de referencia y las secuenciaciones de lectura corta pueden plantear problemas de ensamblaje. Los indels grandes son particularmente difíciles, así como las variaciones estructurales, ya que no pueden ensamblarse con la alineación simple frente a la secuencia de referencia. Se precisan nuevas herramientas para identificar y caracterizar estas variantes emergentes, como añadir otras secuencias al montaje y/o usar algoritmos alternativos<sup>(2)</sup>. Los genes con homología (secuencias muy similares) plantean muchos problemas cuando la secuencia es corta, ya que se leen fragmentos muy similares procedentes de genes diferentes. La lectura del otro extremo del mismo fragmento (*paired-end*) permite resolver problemas de este tipo. El uso de enfoques híbridos para secuenciar y montar el genoma también puede mejorar el ensamblaje mediante combinación de tecnologías de lecturas cortas y largas o el ensamblaje molecular de lecturas cortas dentro de otras más largas<sup>(1)</sup>. Por otro lado, el uso de ensamblaje de secuencias *de novo*, que construye secuencias sin referencia y/o la aplicación de nuevos enfoques para resolver haplotipos, podría también mejorar nuestra capacidad de analizar estas regiones tan difíciles.

#### Detección de variantes

Una vez acoplado el ADN, se buscan variantes en los datos. Al principio de la NGS, las variantes se identificaban al contar el número de veces que aparecían en una lectura por encima de un umbral establecido. Por ejemplo, si una región tenía 30 lecturas superpuestas y 15 se leen como C en la posición 1 y 15 como T en la misma posición, la lectura completa sería considerada como un variante heterocigótica C/T, ya que cada haplotipo debe estar representado igualmente si los datos se consiguieron de manera no sesgada. Dado que en la realidad las lecturas obtenidas sí que pueden estar sesgadas, hay que tenerlo en cuenta durante el análisis de los datos.

La precisión para detectar SNV es muy alta para la mayoría de las plataformas de NGS, pero aún hay variaciones significativas entre las plataformas debido a que los perfiles de error y los esquemas de decodificación son diferentes. Los indels (pequeños y grandes) y las CNV son problemáticos tanto en especificidad como sensibilidad. Se están aplicando nuevos sistemas de aprendizaje estadístico y de máquina para hallar variantes y buscar los genotipos de forma más precisa y reproducible. Muchos nuevos algoritmos pueden ahora jugar con diferentes tipos de variantes, incluyendo indels y CNV. Los paneles dirigidos de secuenciación que ya se usan en cáncer permiten una cobertura de secuencia más profunda para cada base, aumentando la sensibilidad y la especificidad para identificar variantes nuevas. También se están desarrollando nuevos enfoques para identificar mutaciones somáticas presentes a bajo nivel en la muestra.

Por lo tanto, la capacidad para buscar variantes es ya muy buena para algunos tipos de variantes, como la SNV, aunque aún quedan desafíos importantes, como la búsqueda de las variantes más grandes. El rápido ritmo de desarrollo de la metodología promete una mayor sensibilidad y especificidad para identificar variaciones muy complejas mediante NGS en un futuro próximo, aunque ya hay realidades concretas que permiten su uso diagnóstico directo<sup>(17-19)</sup>.

### Aplicaciones de la secuenciación de nueva generación en hematología

A aplicar la NGS a gran escala en genética humana aún estamos aprendiendo. La secuenciación del exoma humano y grandes paneles dirigidos ha revelado que el nivel de variaciones raras en el genoma humano es mayor de lo esperado<sup>(1)</sup>. La NGS también ha confirmado que las variantes más raras en la población humana son los ancestros más jóvenes y probablemente los más nocivos. Estos hallazgos han estimulado el desarrollo test de alto rendimiento para resecuenciar genes en miles de muestras con los mismos métodos de captura que se han aplicado con éxito en WES. Simplificar e incrementar la rentabilidad es un área clave en el desarrollo de la tecnología. Un ejemplo típico es la PCR múltiple para amplificar cientos, incluso miles, de dianas en una sola reacción. Esto, combinado con muchos códigos, permite secuenciar cientos de muestras y miles de regiones. Ya hay sistemas como sondas de inversión molecular que ofrecen nuevas formas de avanzar en NGS y facilitar la secuenciación de los miles de individuos, algo necesario para descubrir variantes raras en genética humana.

En resumen, la gran expansión de nuestro conocimiento del genoma humano gracias a los rápidos avances tecnológicos en las tecnologías de secuenciación del

ADN ha llevado a la identificación de variantes genéticas responsables de cientos de enfermedades. En hematología esto puede aplicarse a varios campos que, por motivos de conveniencia, resumiremos en 4 apartados: hematología benigna, coagulación, neoplasias mieloides y neoplasias linfoides.

### Aplicaciones de la secuenciación de nueva generación en hematología benigna

Los avances en la secuenciación del ADN que hemos visto antes se pueden aplicar, entre otros, a los trastornos hematológicos benignos, incluyendo los que afectan a la serie roja, neutrófilos y otras líneas hematopoyéticas<sup>(20)</sup>. Las aplicaciones en este campo son tantas que se escapan a una revisión exhaustiva, pero a continuación se proporcionan ejemplos relevantes de cómo se puede utilizar este enfoque para diagnosticar enfermedades, descubrir nuevos genes relevantes y estudiar situaciones de riesgo complejas. En este campo, la NGS ya ha pasado de ser una promesa a tener un impacto relevante en la atención clínica.

### Simplificación del diagnóstico de enfermedades

Como hemos dicho, cuando disponemos de la NGS para afrontar utilidades diagnósticas podemos hacerlo secuenciando fragmentos limitados de ADN muchas veces (miles, millones de veces) o secuenciando mucho ADN menos veces (30, 50, 100, 300 veces). En este segundo apartado tenemos la WGS y la WES, que nos permiten abordar todo el genoma de un individuo para llegar al diagnóstico de un trastorno general. Así, esta aproximación es una excelente herramienta para identificar mutaciones causantes de enfermedades monogénicas, especialmente en trastornos con herencia recesiva o dominante, o mutaciones *de novo* que afectan a todo un individuo (ADN germinal). Los trastornos que se benefician especialmente del uso del WES/WGS son aquellos que tienen una gran variabilidad genotípica, es decir, aquellos en los que hay muchos genes cuya mutación puede conducir al mismo fenotipo clínico y/o donde el *loci* genético de interés es muy grande y la secuenciación tradicional no puede abarcar un campo tan amplio. En hematología, los ejemplos más típicos son la anemia de Fanconi (AF), la neuroacantocitosis (NA) y la anemia de Diamond-Blackfan (ADB).

La AF es una insuficiencia medular heterogénea con predisposición al cáncer. Los individuos afectados tienen una reparación defectuosa del ADN y suelen tener anomalías congénitas asociadas<sup>(21)</sup>. Generalmente de herencia autosómica recesiva, se habían descrito hasta 15 genes acusantes de AF. El uso de WES permite detectar mutaciones en estos genes y además ha identificado varios genes nuevos asociados a la AF<sup>(22)</sup>. Por ejemplo,



el gen *XRCC2*<sup>(20)</sup>, homólogo de *RAD51*, que actúa en la vía de reparación homóloga del ADN, en el que se han encontrado mutaciones que truncan su producto<sup>(23)</sup>. Algo parecido puede decirse de la NA, donde hay más de 5 *loci* responsables de las distintas manifestaciones de la enfermedad<sup>(24)</sup>.

De este modo, el WES puede ser una herramienta muy útil para obtener un diagnóstico preciso especialmente cuando hay fenotipos complejos, como en casos raros de asociaciones (por ejemplo, un caso de albinismo oculocutáneo asociado a neutropenia congénita, que se confundía con síndrome Hermansky-Pudlak)<sup>(25)</sup>.

### Descubrimiento de nuevos de genes responsables de enfermedades

En muchos trastornos hematológicos la etiología genética sigue siendo desconocida. La WES nos da la oportunidad de definir y ampliar el espectro de mutaciones que causan una enfermedad en particular. El ejemplo típico aquí es la ADB, anemia hipoplásica caracterizada por reducción tanto de hematíes maduros como de sus progenitores. El 50-70% de los casos se atribuye a mutaciones en genes de hasta 10 proteínas ribosomales diferentes. Con NGS dirigida a las proteínas ribosomales (hasta 80 diferentes) se pueden diagnosticar el 88% de los casos<sup>(26)</sup>, pero aún se escapan algunos casos. En éstos, el WES es la alternativa al diagnóstico, que además puede encontrar nuevas vías para justificar la enfermedad, como las alteraciones del gen *GATA1* encontradas en algunos casos<sup>(27)</sup>. Es interesante destacar que este descubrimiento ha dado pie a entender mejor otras entidades como anemias diseritropoyéticas, talasemias, porfiria eritropoyética y macrocitopenia, donde se han encontrado mutaciones con sentido perdido en el gen *GATA1*.

Otro ejemplo ilustrativo es la anemia ferropénica refractaria a hierro (IRIDA); es una anemia microcítica hipocrómica de herencia autosómica recesiva que no responde a suplementos orales de hierro y lo hace lentamente al hierro parenteral<sup>(10)</sup>. Mediante secuenciación dirigida se identificaron mutaciones en el gen *TMPRSS6*, una serina proteasa transmembrana con un papel crítico en la regulación negativa de la hepcidina, que luego se han confirmado en estudios con WES.

Y así podríamos seguir hasta varios cientos de genes cuyas mutaciones han sido identificadas mediante WES como causantes de enfermedades mendelianas, muchas de ellas hematológicas (esferocitosis hereditaria, neutropenia congénita, mielofibrosis infantil primaria...) y que, desde una orientación fenotípica, hoy son accesibles a un diagnóstico preciso que ayude tanto en la orientación terapéutica como en el consejo genético de los pacientes y sus familiares<sup>(28)</sup>. Es importante hacer un buen balance de la metodología diagnóstica, ya que

en muchos casos resulta más rentable, incluso desde el punto de vista económico, hacer una NGS que una secuenciación convencional. Por ejemplo, si estamos examinando a un joven con sospecha de neutropenia congénita, uno podría centrarse primero en el análisis de genes ya conocidos en esta patología como *ELANE*, *HAX1*, *CXCR4*, *WAS*, *SBDS*, *GFI1*, *G6PC3*, *GATA2* y *VPS45*. No obstante, tal número de genes puede resultar excesivo para una secuenciación Sanger, pero un WES podría ser hoy aún excesivo. Lo más razonable podría ser una NGS con un panel dirigido y dejar el WES para aquellos casos en los que las mutaciones no son identificadas, siempre y cuando la información fenotípica, familiar y de laboratorio indique una alta probabilidad de causa genética para la enfermedad<sup>(20)</sup>.

### Estudio genético de los factores de riesgo complejos

Los estudios de GWAS han mostrado de forma pertinaz, con algunas excepciones, que las variantes poblacionales frecuentes tienen efectos fenotípicos modestos, y a menudo requieren decenas o cientos de miles de pacientes para tener poder estadístico suficiente en la detección de asociaciones significativas<sup>(29)</sup>. Así, se ha puesto de manifiesto que, en la mayoría de las enfermedades, las variantes frecuentes sólo explican una pequeña fracción de riesgo genético, a menudo irrelevante desde el punto de vista clínico. Baste como ejemplo lo que ha sucedido con una variación que inicialmente se pensó altamente valiosa como del FVL, cuyo valor actual está muy debatido<sup>(30)</sup>.

No obstante, sigue habiendo ejemplos que demuestran una potencial utilidad de los estudios genéticos como factores de riesgo en enfermedades complejas (hipertensión, hipertrigliceridemia y colesterol). En hematología también hay algunos ejemplos. Así, la secuenciación de genes candidatos cerca de *loci* relacionados con la hemoglobina fetal (HbF) descubrió que algunas variantes raras en *MYB* (*locus* 6q23) se asocian con niveles de HbF<sup>(31)</sup>. También por GWAS se descubrió que algunas variantes de *MPL* se asocian con mayor número de plaquetas o *LCT* con mayor recuento de leucocitos<sup>(11)</sup>. Esos estudios ayudan a mejorar el conocimiento de la funcionalidad genética, pero por ahora el número de sujetos necesarios para validar estos estudios es insuficiente, en especial porque por ahora las bases de datos de referencia son insuficientes y, en tanto no hay suficiente número de sujetos evaluados por WES, es posible que haya variantes frecuentes aún no bien conocidas.

### Análisis de la secuencia genómica en coagulopatías congénitas

Los genes que codifican las proteínas de los factores de la coagulación fueron de los primeros genes humanos

caracterizados hace ya más de 25 años<sup>(32)</sup>. Desde entonces, se ha progresado mucho para aplicar esta información a los 2 trastornos de la coagulación hereditarios más comunes, las hemofilias A y B (HA y HB). En estos trastornos ligados al cromosoma X, la caracterización genética de las mutaciones causantes ya se ha incorporado a la asistencia y la información genética se usa para estratificar el riesgo de complicaciones por el tratamiento. Ya hay bases de datos electrónicas con más de 2.100 mutaciones distintas para HA y más de 1.100 para la HB, por lo que son las enfermedades hereditarias mejor caracterizadas. Por el contrario, la experiencia en trastornos de la coagulación poco comunes está poco avanzada. Es aquí donde la tecnología NGS está proporcionando la oportunidad de confirmar el diagnóstico. También se han identificado nuevos *loci* mutados en trastornos plaquetarios hereditarios, con hallazgos que ya se están aplicando al diagnóstico genético de estas enfermedades. Además, en la investigación de pacientes con fenotipos hemorrágicos sin diagnóstico genético, las estrategias de WGS pueden facilitar no sólo el diagnóstico, sino la identificación de genes relevantes en la hemostasia que antes no eran conocidos.

Para una revisión en la que se pretende repasar la utilidad traslacional de la NGS, dividiremos los trastornos hemorrágicos en 3 grupos: los más frecuentes como HA, HB y enfermedad de von Willebrand (EvW), las deficiencias raras de la coagulación y los trastornos plaquetarios hereditarios.

### Hemofilias A y B y enfermedad de von Willebrand

En la hemofilia, el análisis molecular sigue siendo la única fórmula para proporcionar un diagnóstico preciso, que supere la variabilidad y la incoherencia de algunos datos proporcionados por métodos basados en la cuantificación de factores de coagulación<sup>(33)</sup>. En clínica, la identificación de las mutaciones causantes de la hemofilia tiene 2 propósitos: el diagnóstico definitivo tanto prenatal como del estado de la portadora y la estimación del riesgo de desarrollo de anticuerpos inhibidores del factor sustitutivo<sup>(34)</sup>. Hasta ahora, los enfoques diagnósticos se basaban en secuenciaciones parciales o de grandes regiones de ADN que para la secuenciación Sanger se antojan muy complejas. Así, se están desarrollando nuevos algoritmos de diagnóstico que incluyen la NGS y permiten identificar la variante genética etiológica en el 99% de los sujetos, ya sean afectados o portadoras<sup>(35)</sup>. La inclusión de la NGS en el algoritmo clásico permite mejorar el diagnóstico molecular en términos de velocidad y coste, así como en eficiencia. Ello se debe a que los resultados clásicos (<http://www.factorviii-db.org/statistics.html.php>) impiden descubrir la mutación responsable en el 2-5% de los pacientes con HA grave y hasta en el 10% en los casos leves a moderados<sup>(36)</sup>. Por

el contrario, las nuevas aproximaciones con NGS detectan prácticamente todas las variantes patógenas tanto en HA como HB. Además, los casos sin diagnóstico pueden abrir nuevas vías de estudio como WGS o de estudios de mecanismos postranscripcionales<sup>(19)</sup>.

Es frecuente además que este tipo de estudios permita la identificación de nuevas variantes, incluyendo la detección de regiones de alta frecuencia mutacional independientes de la herencia, es decir, de riesgo de aparición de hemofilias *de novo*. El análisis molecular puede predecir el riesgo de desarrollar inhibidores<sup>(37)</sup> no sólo en casos severos<sup>(38)</sup>. Esto también apunta a la necesidad de hacer un estudio mutacional en pacientes con HA leve a moderada, ya que una mutación específica puede definir el riesgo de desarrollar inhibidores y exigir un seguimiento más intensivo.

Por otro lado, las nuevas estrategias permiten diferenciar el entre EvW de tipo 2N y HA leves a moderadas, algo crucial para un buen asesoramiento genético y una terapia correcta<sup>(39)</sup>, ya que el análisis simultáneo de los genes del *F8* y el factor de von Willebrand (FvW) ayuda a clasificar mejor a los pacientes. Además, se pueden identificar variantes intrónicas que justifiquen la ausencia de variantes en regiones codificantes, como la variante c.1010-842G > A, que afecta al 7.º intrón en varios pacientes no relacionados y es extremadamente infrecuente en bases de datos públicas (<http://www.1000genomes.org/>)<sup>(35)</sup>.

El gen del FvW (VWF) fue clonado un año después del gen del FVIII. Al igual que el gen del *F8*, es muy grande (178 Kb, 52 exones), pero la secuencia de VWF es muy polimórfica (> 300 SNP) y el análisis de su secuencia se complica por la presencia de un pseudogén parcial en el cromosoma 22<sup>(40)</sup>. El análisis genético de la EvW no está indicado salvo casos en los que el resultado podría cambiar el manejo terapéutico del paciente. Por ejemplo, para identificar grandes deleciones en pacientes de tipo 3 que tienen un gran riesgo de desarrollar anticuerpos neutralizantes y reacciones anafilácticas, o como diagnóstico prenatal de estos tipos tan graves.

En subtipos como el VWD en los que las pruebas fenotípicas son difíciles, los resultados de análisis genéticos por lo general sólo sirven para añadir complejidad al reto diagnóstico.

### Deficiencias raras de factores de la coagulación

Estas deficiencias (*rare bleeding disorders*, RBD) son trastornos autosómicos recesivos que incluyen las deficiencias hereditarias de factores como fibrinógeno, factor (F) II, FV, FVII, FX, FXI, FXIII, la deficiencia combinada de factores dependientes de la vitamina K y la deficiencia combinada de FV y FVIII<sup>(32)</sup>. Las RBD constituyen el 3-5% de las deficiencias hereditarias de la coagulación, con una prevalencia que va del 1/500.000 del

FVII al 1/2.000.000 del FXIII. Las más frecuentes son la del VII y la del XI, que son el 30% de todas las RBD. Las del II, V + VIII y FXIII son las más raras, siendo del 1 al 6% de todas las comunicadas por la European Network of RBD.

Las mutaciones más frecuentes son las *missense*, que son el 50-80% de todas las identificadas, salvo las variantes LMAN1, donde lo más frecuente son inserciones y deleciones (50%). Por contra, las inserciones/deleciones representan el 20-30% de las variantes de los genes de *fibrinógeno*, *FV*, *MCFD2* y *FXIII*, y el 15% del resto de las mutaciones de los demás genes de la coagulación. Las variantes de *splicing* y las mutaciones sin sentido son el 5-15%. La rareza de estas anomalías las hace especialmente atractivas para un análisis genético profundo que permita identificar y diagnosticar correctamente el trastorno y definir bien la enfermedad. Para ello, se impone el empleo de una secuenciación por NGS que permita secuenciar el gen diana, o mejor aún, una WES o WGS que permita no sólo identificar presuntas anomalías de la secuencia en el gen problema, sino en otros puntos que justifiquen alteraciones pre- o postranscripcionales en los que puede radicar el mecanismo patogénico, como ocurre en los defectos combinados (FV + FVIII y de proteínas dependientes de la vitamina K) donde hay defectos en el transporte intracelular de factores o en las enzimas encargadas de la actividad postranscripcional de la vitamina K.

### Trombopatías hereditarias

El papel central de las plaquetas en la hemostasia hace que cualquier variación genotípica que les afecte pueda dar lugar a alteraciones fenotípicas y enfermedad por sangrado o por trombosis<sup>(41)</sup>. La variación fenotípica resultante puede dar lugar a casos raros con grandes defectos o casos frecuentes con efectos pequeños. Las variantes raras serían mutaciones claves en genes como los de los receptores plaquetarios (integrinas  $\alpha$ IIb-*ITGA2B*- o  $\beta$ 3-*ITGB3*-, causantes de trombostenia de Glanzmann). Por el contrario, las variantes comunes, como SNP, no son capaces de producir anomalías fenotípicas visibles, pero sí se podrían favorecer efectos acumulativos o sinérgicos de múltiples SNP en genes claves pudiendo alterar la capacidad de respuesta plaquetaria ante diversos agonistas o inhibidores.

### Variantes comunes con efectos pequeños

Desde hace varias décadas se acepta que la capacidad de respuesta plaquetaria a 1 o más agonistas varía en función de la herencia y varios estudios de *microarrays* han mostrado genes candidatos (*GP6*, *ITGA2*, *P2Y12*, *ADRA2A* y *CYP2C19*) para explicarlo<sup>(32)</sup>. Sin embargo, estos resultados no han sido reproducidos por la falta de

un único fenotipo reproducible que represente la función plaquetaria, el escaso número de sujetos estudiados o el conocimiento incompleto actual de la genética.

Se está impulsando el desarrollo de una base de datos global con NGS para descifrar exomas y genomas completos de cientos de miles de donantes de raza diversa con el fin de disponer de una secuencia humana completa<sup>(42)</sup>. Ello ayudará a saber si estos polimorfismos son o no realmente útiles para descifrar la patología que pueda surgir de los polimorfismos genéticos en la función plaquetaria.

### Variantes raras con grandes efectos

Hoy en día se han caracterizado varios trastornos de la función plaquetaria con origen paucigénico e incluso monogénico. Hasta ahora, no todas estas variantes genéticas se identificaban y validaban, ya que no siempre se encontraban evidencias para encontrar alteraciones en genes candidatos. El empleo de NGS ya ha permitido pasar página y facilitar enormemente el diagnóstico de estos casos, al permitir un análisis molecular de gran número de genes. Ya se ha demostrado que el uso de paneles dirigidos como el de ThromboGenomics® permite el diagnóstico preciso de este tipo de patologías<sup>(18)</sup>. En este estudio, se secuenciaron 300 muestras de 260 sujetos no relacionados con 4 grupos: 1) seguro, conocido, con fenotipo y genotipo conocidos (n = 159); 2) seguro, sospechado, con fenotipo conocido y genotipo desconocido (n = 61); 3) incierto (n = 76), con fenotipos con anomalías de laboratorio pero que no podían ser incluidos en un RBD conocido debido; y 4) parientes no afectados, posibles portadores. En el grupo 1, la plataforma encontró todas las anomalías genéticas con un impresionante 100% de sensibilidad y especificidad. En el grupo sospechado, llegó al diagnóstico de nada menos que 56 de 61 sujetos, incluyendo pacientes con trombostenia de Glanzmann (n = 4), síndrome de Bernard-Soulier (n = 1), síndrome de Hermansky-Pudlak (n = 9), anomalía de May-Hegglin (n = 4) y deficiencias de factores (n = 26). Además, en el grupo "incierto" se detectaron anomalías genéticas con poca sensibilidad (10,5%), por lo que en estos casos se imponen otras estrategias de diagnóstico, entre las que la secuenciación del genoma completo puede ser una opción. Este tipo de estrategias también están disponibles en nuestro país<sup>(43)</sup>.

De este modo, la iniciativa del proyecto ThromboGenomics® (<http://haemgen.haem.cam.ac.uk/>), promovida por la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia, ha permitido introducir un enfoque genómico en el diagnóstico de los trastornos hereditarios de la coagulación cumpliendo varios objetivos gracias a la NGS: descubrir nuevos genes relevantes en este campo, desarrollar una adecuada base de datos de referencia y probar que la NGS facilita el diagnóstico de este tipo de trastornos.

### Aplicaciones de la genómica en hemopatías malignas mieloides

Las neoplasias mieloides son trastornos clonales de la médula ósea que afectan a la célula hematopoyética troncal y a su diferenciación produciendo manifestaciones clinicopatológicas diversas. Las lesiones genómicas somáticas recurrentes más frecuentes han sido ampliamente caracterizadas en su mayoría, revelando un papel central para mutaciones específicas que dirigen características biológicas propias<sup>(44)</sup>. Hay otros mecanismos de patogénesis, como los que afectan al genoma no codificante, al epigenoma o al microambiente medular, pero se escapan de esta revisión.

El estudio genómico de las neoplasias mieloides ha revelado varios principios básicos<sup>(45)</sup>: 1) las mutaciones afectan a un conjunto central de vías celulares, a menudo relacionadas entre sí, que incluyen transcripción, señalización y empalme de ARN, así como respuesta al daño del ADN; 2) las alteraciones epigenómicas que caracterizan a las neoplasias mieloides se deben, al menos en parte, a mutaciones genéticas en los modificadores epigenéticos; 3) algunas mutaciones causan inestabilidad genética y promueven la adquisición de más lesiones genéticas; y 4) la adquisición secuencial de alteraciones genéticas permite el desarrollo de varios subclones genéticamente relacionados durante la evolución de la enfermedad.

### Mutaciones somáticas recurrentes en vías biológicas específicas

Las mutaciones somáticas son de baja frecuencia en las células progenitoras hematopoyéticas (CPH), pero sí se producen durante la replicación del ADN normal. La mayoría de las mutaciones son corregidas rápidamente por los mecanismos de reparación del ADN, pero las que persisten se propagan durante la autorrenovación. Cada CPH acumula ~0,13 mutaciones somáticas cada año, lo que significa que, a los 60 años, cada CPH habrá acumulado unas 8 mutaciones que pueden alterar la secuencia proteica<sup>(46)</sup>. En una célula con capacidad de autorrenovación, cualquier alteración genética que causa ventaja selectiva en relación con otras células autorrenovables dará lugar a dominancia clonal. En las neoplasias mieloides, tales mutaciones se ven de forma recurrente en un pequeño grupo de genes y se denominan mutaciones “conductoras”. Otras en cambio no tienen ningún impacto en la dominancia, no son recurrentes o no aparecen en genes relevantes: se denominan mutaciones “pasajeras”. Si una mutación somática aparece en un gen particular con una frecuencia mayor de la que cabría esperar según la frecuencia general, ello es una evidencia genética de su papel etiopatogénico. En las neoplasias mieloides esto afecta a pocos genes. Así,

tras una exhaustiva caracterización, en la leucemia aguda mieloide (LAM) apenas hay 13 genes que aparecen mutados en más del 5% de los casos (*DNMT3A*, *FLT3*, *NPM1*, *IDH1*, *IDH2*, *CEBPA*, *RUNX1*, *ASLX1*, *U2AF1*, *EZH2*, *TET2*, *KMT2A-PTD* y *TP53*)<sup>(44,47)</sup>, aunque a ellos hay que añadir los genes involucrados en traslocaciones y grandes deleciones o inserciones, que hasta ahora no eran accesibles al estudio por NGS y que hoy ya se pueden analizar por esta vía. Hay clases de genes bien conocidas que están alteradas en enfermedades mieloides malignas como efectores de vías de señalización de las cinasas, receptores de citocinas y reguladores de la transcripción de las CPH y función de las células progenitoras conocida.

Todos ellos han sido clasificados en hasta 8 categorías funcionales<sup>(44)</sup>:

1. Genes de señalización de receptores tirosina cinasa de clase III, como *FLT3*: confieren una ventaja proliferativa a través de la vía de señalización RAS-RAF, JAK-STAT, y PI3K-AKT.

2. Genes de factores de transcripción mieloide (*RUNX1*) y reordenamientos que fusionan factores de transcripción, tales como t(8;21)(q22; q22); *RUNX1-RUNX1T1*: provocan desregulación de la transcripción y diferenciación hematopoyética deficiente.

3. Gen de la nucleofosmina (*NPM1*), que codifica una proteína de ida y vuelta nucleocitoplásmica multifuncional; sus mutaciones dan como resultado una localización citoplasmática aberrante tanto de *NPM1* como de las proteínas que interactúan con ella.

4. Genes del spliceosoma, como *SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1* y *ZRSR2*, involucrados en la desregulación del procesamiento del ARN.

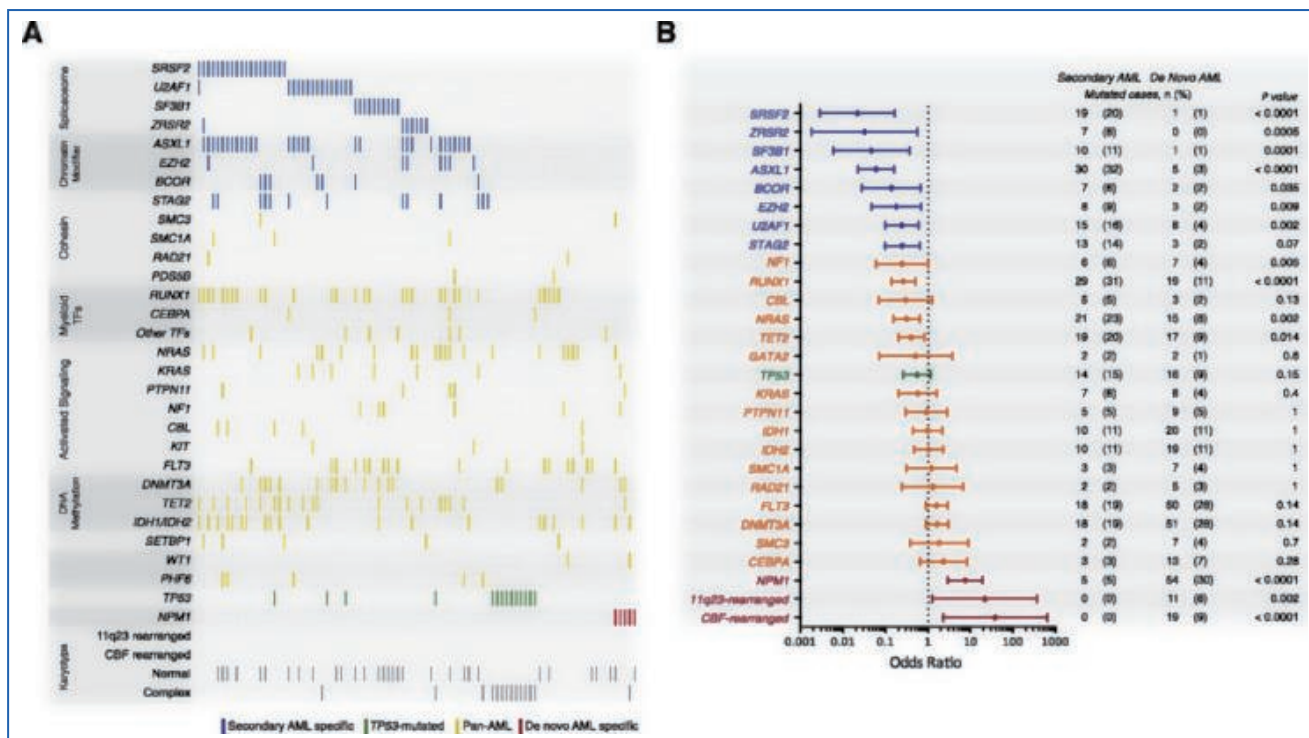
5. Genes del complejo de la cohesina, como *STAG2* y *RAD21*, cuyas mutaciones ponen en peligro la segregación cromosómica precisa y la regulación transcripcional.

6. Genes implicados en la homeostasis epigenética de células, tales como *ASXL1* y *EZH2*, que al mutar provocan desregulación de la modificación de la cromatina (por ejemplo, metilación de histonas H3 y H2A en los residuos de lisina K79, K27 y K119, respectivamente), así como fusión de genes *KMT2A-MLL3*, que pueden alterar otras metiltransferasas como DOT1L (DOT1-like, similar a la histona metiltransferasa H3K79).

7. *DNMT3A* y *TET2*, así como *IDH1* e *IDH2*, cuyas mutaciones, al producir el oncometabolito 2-hidroxiglutarato (2HG), pueden desregular la metilación de ADN.

8. Genes supresores de tumores, tales como *TP53*, cuyas mutaciones desregulan la transcripción y alteran la degradación a través de los homólogos de MDM2 y PTEN murinos.

Resulta además interesante destacar el valor pronóstico de todas estas anomalías en la evolución de la



**Figura 5.** Espectro y especificidad ontogénica de mutaciones conductoras mieloides en leucemia aguda mieloide (LAM)<sup>(52)</sup>. A: gráfico de mutaciones no sinónimas en genes individuales, agrupados en categorías (izquierda). Las mutaciones se representan por barras de color y cada columna representa 1 sujeto secuenciado. Los colores reflejan la especificidad ontogénica de las mutaciones, descrita en B; B: relación entre genes individuales mutados y definición clínica de LAM o LAMn, según el cociente de probabilidad en una escala log10. Los colores indican los genes con > 95% de especificidad para el LAMs (azul), > 95% de especificidad para la LAMn de novo (rojo) o < 95% de especificidad para ambas (amarillo o verde). A la derecha, número y frecuencia de casos con mutaciones en cada gen en LAMn y LAMs.

leucemia. Hasta hace poco se consideraban sólo 3 marcadores moleculares (mutaciones de *NPM1* y *CEBPA* y las duplicaciones en tándem de *FLT3*) de uso clínico siguiendo las recomendaciones de la European Leukemia Network (ELN)<sup>(46)</sup>. Sin embargo, la reciente publicación de más de 1.500 pacientes evaluados por NGS con un gran panel dirigido ha hecho que no sólo se añadan nuevos marcadores sino que se planee cambiar completamente la clasificación de las LAM<sup>(49)</sup>.

Los síndromes mielodisplásicos han sido también evaluados por NGS para detectar la presencia de mutaciones y han arrojado resultados hasta cierto punto similares a los de las LAM, aunque no del todo<sup>(50,51)</sup>. Los genes más frecuentemente mutados son *SF3B1*, *TET2*, *SRSF2*, *SRSF2* y *ASXL1*. Luego les siguen *DNMT3A*, *RUNX1*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *STAG2* y *TP53*. Lo más llamativo respecto a la LAM es la casi completa ausencia de fusiones en los síndromes mielodisplásicos (SMD) y la diferente frecuencia en deleciones, ya que en SMD son frecuentes la del(5q) y el cariotipo complejo. También es interesante destacar que los genes alterados en SMD se agrupan bastante en 4 vías metabólicas: *splicing* (afectada en el 64% de los casos), metilación del ADN (47%), modificación de la cromatina (28%) y regulación de la transcripción (27%), seguidas a distancia por recepto-

res de cinasas, cohesión, vía de RAS y reparación del ADN ( $\leq 15\%$  de los casos)<sup>(51)</sup>. Se cree que las anomalías en el *splicing* o en la metilación son primarias mientras que las de modificación de histonas, factores de transcripción y vías de señalización son secundarias<sup>(50)</sup>. En cuanto a su valor pronóstico, las mutaciones de *SF3B1* (~25%) tienen valor pronóstico favorable, mientras que las de *TP53* (5-10%) lo tienen desfavorable. También tiene valor pronóstico el número de mutaciones que haya, ya que cuanto mayor sea la proporción de genes mutados sobre genes analizados (carga mutacional), peor es el pronóstico.

En el campo de la aplicación clínica quizás resulta más interesante la utilidad de la presencia de estas alteraciones para distinguir entre LAM *de novo* (LAMn) y LAM secundaria (LAMs), en especial cuando no hay antecedentes de tratamiento leucemógeno o SMD conocido anterior, pero se sospechan. Hay un estudio que compara los datos de mutaciones en 194 pacientes LAMn o LAMs bien definidos y 105 pacientes con LAM no seleccionada<sup>(52)</sup>. La presencia de mutaciones en *SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *ASXL1*, *EZH2*, *BCOR* o *STAG2* fue altamente específica (> 95%) para el diagnóstico de LAMs. Además, se demostró que estas mutaciones se producen pronto en el desarrollo de la leucemia y a menudo per-

sisten durante la remisiones. En casos de LAM transformada desde SMD y en ancianos con LAMn, estas alteraciones definen un subtipo que comparte propiedades clinicopatológicas con la LAMs, segregando un subgrupo de pacientes con peores resultados clínicos (menor proporción de remisión completa, necesidad más frecuente de reinducción y corta supervivencia libre de evento).

Cada cáncer es extraordinariamente complejo, con gran diversidad celular, genética y fenotípica. Al identificar variantes somáticas individuales y enumerar sus frecuencias alélicas, la secuenciación por NGS permite definir la arquitectura clonal de cada neoplasias e inferir su evolución clonal (Figura 5). Si agrupamos las mutaciones por su frecuencia alélica podemos definir subclones genéticamente distintos del clon progenitor o de los subclones hermanos. Un clon de progenitores y todos los subclones derivados comparten varias mutaciones somáticas (pasajeras y conductoras), mientras que los subclones únicos se definen por las variantes añadidas que se desarrollaron después de la iniciación del tumor. La secuenciación del genoma demostró que la mayoría de las muestras de LAMn poseen un clon fundador y al menos un subclon derivado<sup>(47)</sup>. La secuenciación genómica de los SMD y LAMs demostraron oligoclonalidad similar, identificando una media de 2,4 y 3,1 clones, respectivamente<sup>(53)</sup>.

Las técnicas unicelulares pueden evaluar la heterogeneidad genética mejor que la secuenciación del tumor mayoritario<sup>(54)</sup>. Sin embargo, esta metodología aún no se ha extendido completamente.

### Aplicaciones de la genómica en hemopatías malignas linfoides

Si hay un ejemplo de cambio en el conocimiento de la patogenia del cáncer por la NGS, éste es sin duda el de las neoplasias linfoides<sup>(55)</sup>. Tras los primeros estudios hechos en unos pocos casos con WGS y WES, han sido muchos los que han seguido con secuenciación genómica completa o dirigida para, del transcriptoma y del epigenoma, identificar alteraciones genéticas recurrentes estructurales y mutaciones de secuencia dirigidas a vías celulares clave en la leucemia aguda linfoblástica (LAL) y los linfomas. Cada categoría de enfermedad tiene su propio paisaje genómico, pero hay varias vías celulares que están alteradas en varios subtipos, como la regulación transcripcional de la diferenciación, la señalización del receptor de antígeno, la señalización tirosina cinasa y Ras, y las modificaciones epigenéticas, y hay varios genes que están mutados en varios tipos tumorales distintos, en particular *TCF3*, *NOTCH1*, *MYD88* y *BRAF*. Este conocimiento nos da una mejor comprensión de la tumorigénesis pero también proporciona nuevos marcadores de diagnóstico y pronóstico, así como pistas para el tratamiento. Hay varias alteraciones genéticas que puede ser acometidas intuitivamente con los

agentes existentes, las lesiones activadoras de cinasas en LLA de alto riesgo, *NOTCH1* en leucemias y linfomas, y *BRAF* en tricoleucemia. Aunque todo este conocimiento es inabordable para una revisión como ésta, repasaremos los distintos tipos neoplásicos intentando sintetizar los hallazgos genómicos principales.

### Leucemia aguda linfoblástica

La LAL comprende varias entidades con distintas alteraciones genéticas somáticas, que incluyen aneuploidía, reordenamientos cromosómicos que desregulan la expresión génica como resultado de la expresión de proteínas de fusión quiméricas, deleciones y ganancias de ADN y mutaciones<sup>(56)</sup>. Curiosamente, la LAL es una de las neoplasias con menos mutaciones, ya que la secuencia mutada promedio es de tan sólo 10 a 20 mutaciones codificantes (1.200 mutaciones totales) en el momento del diagnóstico y sobre el doble en el momento de la recaída<sup>(57)</sup>. Muchas mutaciones alteran procesos celulares relevantes en los linfocitos, como la regulación transcripcional del desarrollo y diferenciación linfoides, la regulación del ciclo celular, la vía de TP53-retinoblastoma, la señalización del receptor del factor de crecimiento, RAS, PI3K y JAK-STAT, el metabolismo de los nucleósidos y la modificación epigenética. Estos 2 últimos procesos están frecuentemente alterados en las recaídas<sup>(57)</sup>.

Las LAL pueden ser de precursores B o T. Con frecuencia, las LAL pediátricas de células B tienen hiperdiploidía alta (> 50 cromosomas) por ganancias cromosómicas no aleatorias, con un pronóstico excelente. La hipodiploidía (< 44 cromosomas) es poco frecuente (2-3% de los niños) y se asocia con mal pronóstico. Cuando es una hipodiploidía baja (30-39 cromosomas), se asocia con mutaciones *TP53* que suelen ser heredadas, siendo una manifestación de síndrome de Li-Fraumeni<sup>(58)</sup>.

Las traslocaciones cromosómicas y reordenamientos son eventos precoces, posiblemente iniciadores de la leucemia. Algunos se pueden detectar en muestras de sangre neonatal años antes de que aparezcan las manifestaciones de la leucemia<sup>(59)</sup>. Estas traslocaciones y reordenamientos suelen estar presentes en todas las células leucémicas y permanecen en la recaída, generalmente con alteraciones genéticas añadidas<sup>(57)</sup>. Hay 2 tipos funcionales de traslocaciones: 1) traslada regiones reguladoras de los oncogenes a zonas de transcripción activa, sobreexpresando una proteína intacta como las traslocaciones que ponen a *C-MYC* bajo el control de la cadena pesada de inmunoglobulina (*IGH*) o ligera (*IGK* e *IGL*)<sup>(56)</sup>; y 2) traslocaciones que yuxtaponen 2 genes y generan una proteína quimérica con funciones distintas de las proteínas iniciales, como la fusión *ETV6-RUNX1*, que fusiona 2 factores de transcripción hematopoyéticos, o la fusión *BCR-ABL* de la t(9;22)<sup>(60)</sup>. Estas fusiones

son de gran interés por sus implicaciones terapéuticas, como en el caso de la t(9;22), susceptible de ser tratada con inhibidores de la tirosina cinasa (ITK).

A excepción de la leucemia reordenamiento MLL de los lactantes, cada uno de estos subtipos tiene típicamente otras muchas alteraciones genéticas. Estas alteraciones se dirigen comúnmente a genes que codifican proteínas implicadas en la señalización celular, supresión tumoral y diferenciación linfocítica. Los 2 genes diana más comunes que rigen el desarrollo linfocítico B son *PAX5* (mutado en el 35% de los casos de LAL en niños) e *IKZF1* (mutado en el 15%)<sup>(56)</sup>. Aparte, hay más de 50 regiones con alteraciones recurrentes en el número de copias de ADN, generalmente deleciones focales limitadas a 1 o a pocos genes que participan en el desarrollo linfocítico (*PAX5*, *IKZF1*, *EBF1*, *LEF1*), la supresión tumoral (*CDKN2A*, *CDKN2B*, *RB1*, *TP53*), la señalización linfocítica (*BTLA*, *CD200 TOX*), la transcripción y la coactivación (*TBL1XR1*, *ERG*), y la estructuración cromatínica y la regulación epigenética (*CTCF*, *CREBBP*). Varias de estas alteraciones se asocian con mal pronóstico por mayor riesgo de fracaso terapéutico y recaída, en particular las supresiones de *IKZF1* (*Ikaros*)<sup>(61)</sup> y la deleción o mutación de *CREBBP*<sup>(62)</sup>. Todas estas anomalías son accesibles a estudios de NGS, pero aún no se ha encontrado la mejor forma de aplicarlos.

Caso distinto es la aplicación de la NGS a los estudios de EMR gracias a la identificación de reordenamientos clonales *VDJH* o *VJL*, exclusivos de cada célula tumoral y que, una vez conocidos al diagnóstico, pueden ser detectados durante la evolución con una especificidad del 100% y una sensibilidad de hasta  $10^{-6}$ - $10^{-7}$  gracias a una secuenciación dirigida sobre un único fragmento con muy alta profundidad ( $10^7 \times 10^8 \times$ )<sup>(63)</sup>. Este tipo de estrategia es aplicable a todas las neoplasias linfocíticas en lugar de la ASO-RQ-PCR convencional, a la que está sustituyendo poco a poco, aunque más rápidamente en neoplasias maduras respecto a la LAL.

En 2009, 2 grupos diferentes identificaron un subtipo especial de LAL, denominada *BCR-ABL1-like*, en algunos niños y en especial adolescentes, en ausencia de la traslocación pero con un GEP parecido al de este tipo de leucemias, con *IKZF1* frecuentemente delecionado y un pronóstico peyorativo<sup>(64,65)</sup>. Supone un 10-15% de las LAL de niños y adolescentes, tienen activación de la vía de tirosina cinasa y casi la mitad tienen reordenamientos de *CRLF2* y con frecuencia alteraciones de *JAK1* y *JAK2*. Los demás casos suelen tener muchas otras anomalías, pero en general todos tienen la vía de JAK-STAT. Esto los hace candidatos a tratamientos con ITK, incluso en ausencia de la t(9;22).

### Linfomas

Los estudios genómicos afianzan la idea de que los linfomas tienen una gran heterogeneidad no sólo clínica,

sino también molecular, y comprenden una amplia gama de entidades, incluso dentro de estirpes homogéneas como podría pensarse para los linfomas no Hodgkin (LNH) de célula B. Hoy en día ya hay una extensa literatura que describe perfiles basados en *microarrays* de ARN, alteraciones genéticas estructurales y la secuenciación de genes candidatos. Una revisión extensa de estas anomalías es inabarcable, pero sí podemos dar algunas ideas de interés.

### Linfoma difuso de célula grande B

Los estudios de GEP han identificado 3 subtipos de linfoma difuso de célula grande B (LDCGB) con distinto perfil y presunto origen celular: célula B activada (ABC), célula B centro germinal (CG) y el linfoma mediatístico primario B (células B de origen tímico). Hay múltiples estudios que han utilizado paneles dirigidos, WGS, WES y el ARNseq para identificar alteraciones genéticas recurrentes y reordenamientos en estos linfomas<sup>(55,66)</sup>. Hay que destacar que en los linfomas ABC hay más frecuentemente mutaciones en la señalización de BCR (*CD79b*) y NF- $\kappa$ B (*CARD11* y *MyD88*), mientras que en los linfomas CG son más frecuentes las de genes de modificación de histonas (*CREBBP*, *EP300*, *EZH2*, *MEF2B*, *MLL2/3*). La alta frecuencia de mutaciones en genes modificadores de histonas refuerza su papel central en la patogénesis de las neoplasias linfocíticas, pero también pone de relieve que puede haber distintas funciones para la misma alteración en diferentes tumores. Por ejemplo, las mutaciones de *CREBBP* son parecidas a las de la LAL pero, a diferencia de ellas, aquí se observan en el clon predominante al diagnóstico y pueden actuar reduciendo la acetilación de *TP53* y *BCL6*. Del mismo modo, aunque *EZH2* se encuentra mutada tanto en LNH<sup>(67)</sup> como en LAL, el tipo de alteración tiene consecuencias funcionales diferentes. En LDCGB y folicular, la alteración más común es una mutación con sentido perdido en p.Tyr641, que es una mutación de incremento de función, que aumenta la trimetilación de la lisina 27 de la histona 3 y, con ello, provoca su represión transcripcional. Por el contrario, las alteraciones *EZH2* en LAL pre-T precoz suelen ser deleciones o mutaciones de secuencia que ocasionan una pérdida de la función y se predice que tienen el efecto contrario.

Hay más anomalías en el LDCGB. Un estudio con más de 40 casos y 13 líneas celulares ha revelado que el número de genes mutados significativamente en esta entidad asciende a 74, encontrando 40 no informados previamente, incluyendo algunos interesantes como los genes receptores (*CD70*, *CD83*), genes de receptores purinérgicos (*P2RY8*, *P2RX5*) y receptores acoplados a proteína G<sup>(68)</sup>. No obstante, cada día se publican más y más datos; así ocurre con un reciente estudio del grupo LYSA que ha desarrollado un panel (Lymphopanel)

informativo en el 96% de 201 pacientes analizados, confirmando la subdivisión arriba descrita, ya que los subtipos ABC, GCB y mediastínico primario son afectados por mutaciones de las vías NF- $\kappa$ B, modificación epigenética y JAK-STAT, respectivamente<sup>(69)</sup>. Además encuentran nuevas mutaciones de *ITPKB*, *MFHAS1* y *XPO1* en el mediastínico. Además, los pacientes ABC tratados con R-CHOP y que tenían mutaciones de *TNFAIP3* y *GNA13* tuvieron un pronóstico desfavorable.

#### Linfoma de células del manto

El linfoma de células del manto (LCM) se caracteriza por 2 hallazgos moleculares relevantes: presencia de células con poca hipermutación somática (SHM) y presencia de la t(11;14). La primera es una característica propia de una célula que aún no ha presentado la reacción folicular y, por tanto, no ha sufrido el proceso de SHM. No obstante, hasta el 70% de los linfomas del manto tiene mutaciones somáticas, pero con menor densidad que la leucemia linfocítica crónica (LLC) mutada. Además, la selección de segmentos génicos IgH está notablemente condicionada (*VH4-34* y *VH3-21* “no mutados”; *VH4-59* y *VH3-23* “mutados”). Por ello, en el LCM el reordenamiento monoclonal IgH es una diana fácil de detectar tanto para el diagnóstico como para el seguimiento de la EMR.

Se considera que la t(11;14) aparece en la totalidad de los LCM, siendo detectable en casi todos ellos por FISH<sup>(70)</sup>. Es una lesión genética que yuxtapone el gen IGH a la región MCL del cromosoma 11, motivando la sobreexpresión de ciclina D1. Los raros casos en que no hay t(11;14) ni sobreexpresión de ciclina suelen sobreexpresar ciclina D2 o D3 por otras traslocaciones – por ejemplo, t(2;12)–.

Los estudios de ultrasecuenciación son aún escasos en LCM, pero ya han dado algunos resultados donde destaca la identificación de mutaciones de *NOTCH1* (15%) y de *CCND1* (20%)<sup>(71,72)</sup>.

#### Linfoma folicular

De forma análoga al anterior, se caracteriza también por 2 hallazgos: la presencia de células con SHM cambiante en los genes IgH (*ongoing mutation*) y la presencia de la t(14;18)<sup>(73)</sup>. La primera es una característica propia de una célula que ha presentado la transformación tumoral justo en el momento en que tiene contacto con el antígeno en el centro germinal, sin que haya sido capaz de completarlo: célula de origen germinal o centrofolicular. Por ello, la detección de reordenamientos clonales en ese linfoma es difícil, ya que la abundancia de mutaciones somáticas impide el alineamiento de los cebadores utilizados en la reacción de PCR. Así, para detectar el reordenamiento monoclonal en todos los casos hay que usar varios *primers* en varias dianas. Su ori-

gen centrogerminal es además responsable de que este linfoma tenga una firma propia en los estudios de *arrays* de expresión, que al trasladarla a otros tipos de linfoma se asocia a buen pronóstico.

La t(14;18) aparece en el 90% de los foliculares con técnicas de FISH (50% por PCR) y es responsable de la sobreexpresión de la proteína antiapoptótica BCL2, que confiere inmortalidad al clon tumoral. No obstante, ni la expresión de la proteína BCL2 ni la presencia de la t(14;18) son específicas del linfoma folicular. No obstante, la t(14;18) puede ser una excelente diana para el seguimiento de la EMR por PCR.

Hay ya algunos estudios amplios de ultrasecuenciación en el linfoma folicular<sup>(74,75)</sup>. Gracias a ello se sabe que puede haber mutaciones de *TP53* en el 6% de ellos, o de *TNFRSF14* o *MEF2B* en ~15%, pero destaca la elevadísima frecuencia de mutaciones en *MLL2*, donde se llega al 89% aunque, de nuevo, no sea algo específico del linfoma folicular. Recientemente, Pastore *et al.* describieron un nuevo índice pronóstico usando 7 genes cuyas mutaciones se asocian con el pronóstico: malo, en el caso de mutaciones de *EP300*, *FOXO1*, *CREBB* y *CARD11*; y bueno, en el caso de las mutaciones de *EZH2*, *ARID1A* y *MEF2B*.

#### Linfoma marginal esplénico

Los genes de los receptores muestran siempre reordenamientos clonales, con el 50% de los casos con mutaciones somáticas, incluyendo casos con mutación cambiante. Se ha postulado una preferencia de selección *VH1-2*. Hay deleciones de 7q31-3 en el 40% de los casos. Otras anomalías son poco frecuentes, aunque estudios recientes indican que son frecuentes las mutaciones de *MLL2* (también conocido como *KMT2D*; 34%), *PTPRD* (20%), *NOTCH2* (20%) y *KLF2* (17%)<sup>(76,77)</sup>.

#### Tricoleucemia (leucemia de “células peludas”)

El estudio de los genes IgH muestra la presencia de reordenamientos monoclonales en todos los casos, con un 90% de ellos con mutaciones somáticas (célula posfolicular). Hay preferencia clara por la familia VH3. No hay traslocaciones o aberraciones cromosómicas características.

Gracias a estudios genómicos se ha descrito la mutación V600E del gen *BRAF*<sup>(78)</sup>, que aparece en la práctica totalidad de los casos de tricoleucemia y casi nunca en otros síndromes linfoproliferativos de estirpe B (SLP-B). La mutación se presenta de forma heterocigota en las células tumorales, aunque puede aparecer homocigota en el 8% de los casos. Se trata de un gen que codifica una proteína cinasa de la familia RAF/MIL. Dicha proteína participa en la regulación de la vía RAS/RAF/MEK/ERK que afecta a la división, la diferenciación y la secreción. Hasta ahora se habían descrito mutaciones de este gen



en el síndrome cardiofaciocutáneo y en asociación con LNH, cáncer colorrectal, melanoma, carcinoma de tiroides, carcinoma pulmonar de célula pequeña y adenocarcinoma de pulmón. La presencia de esta mutación provoca una activación constitutiva de la actividad cinasa de BRAF, que aumenta 500 veces su capacidad cinasa y, con ello, un aumento de las formas fosforiladas de MEK y ERK. Tiene gran interés porque hay inhibidores específicos de esta cinasa que podrían tener utilidad terapéutica.

### Macroglobulinemia de Waldenström

En este caso, los genes IgH muestran reordenamientos monoclonales con SHM no cambiante en el 90% de ellos (célula posfolicular). A diferencia del mieloma, son células con incapacidad funcional para desarrollar el cambio de clase, por lo que serían células que aún no han completado la reacción del centro germinal, donde es necesario completar este proceso que desemboca en la producción de células de la memoria. Hay preferencia por el segmento *VH3-23*<sup>(79)</sup>. Entre el 30 y el 40% de los casos tiene la delección del brazo largo del cromosoma 6 y un 10-15% de los casos puede tener del(13), trisomía 11 y traslocaciones en 14q32.

Gracias a estudios de ultrasecuenciación<sup>(80)</sup> y confirmación con secuenciación convencional se sabe de la mutación L265P del gen *MYD88* como un proceso altamente específico de la macroglobulinemia de Waldenström (MW)<sup>(81)</sup>, ya que aparece en el ~90% de los casos, frente a casos anecdóticos en otros SLP (9% en marginales, 3% en LLC...), aunque aún resulta difícil saber su significado clínico patológico definitivo.

### Leucemia linfocítica crónica

Al igual que ocurre con todos los SLP, la LLC tiene como hecho común la presencia de un reordenamiento monoclonal IgH, habitualmente monoalélico, pero también lo hay bialélico e incluso con más de 1 clon (biclonalidad). Alrededor del 50% de los casos tiene SHM en el segmento reordenado de los genes de *IGH*. Cuando hay SHM se sugiere un origen posfolicular (la célula originaria ha tenido contacto con el antígeno en el centro germinal del folículo linfóide) y es indicativo de madurez celular, generalmente asociada a enfermedad indolente, de muy buen pronóstico, que algunos denominan LLC de tipo II o posgerminal. Frente a estos casos, hay otro grupo de pacientes en los que los genes *IGH* no tienen SHM y, por tanto, la LLC surgiría a partir de células pregerminales (tipo I), sin memoria inmunológica o “vírgenes”, y son leucemias con mucho peor pronóstico<sup>(82)</sup>.

También se ha descrito que en la LLC se seleccionan con una frecuencia especial algunas regiones VH concretas, tales como *IGHV4-34*, *IGHV4-39*, *IGHV1-69* y *IGHV3-21*, éstas últimas asociadas con pronóstico espe-

cialmente malo, pese a que la *IGHV3-21* suele ser un segmento con mutaciones somáticas. Además, se sabe que algunos de los reordenamientos tienen el mismo “estereotipo”, es decir, serían presumiblemente generados por una reacción inmune frente a un mismo antígeno, hecho que sugiere que la LLC es el resultado de una reacción anómala dentro de una respuesta inmune persistente<sup>(83)</sup>.

Aunque en LLC no existe un marcador molecular específico, en casi un 80% de los pacientes se detectan alteraciones citogenéticas, siendo las más frecuentes la del(13q) (gen *RB*) (55% casos), del(11q) (gen *ATM*) (18%), trisomía 12 (16%) y la del(17p) (gen *P53*) (7%). Otras alteraciones serían del(6q) (5%) y traslocaciones que afectan a la región 14q32, donde está *IgH*. Algunas de estas anomalías tienen importancia pronóstica, en especial las delecciones de p53 y de 11q, siendo la primera asociada a resistencia a alquilantes y análogos de las purinas, y supervivencia corta<sup>(82)</sup>.

La expresión génica por técnicas moleculares (RT-PCR cuantitativa, *arrays* de expresión) ha proporcionado información que ha conducido a descubrimientos de gran relevancia clínica, como el mal pronóstico de la expresión de ZAP70 o de CD38, o de gran interés biológico, como la identificación del patrón de célula en LLC tanto mutada como no mutada. Sin embargo, aún es pronto para que esta metodología pueda ser utilizada en el campo de diagnóstico rutinario.

En la actualidad, ya se están utilizando las nuevas metodologías de secuenciación genómica masiva para identificar anomalías en genes concretos. En concreto, un reciente estudio del grupo español ha permitido identificar varios genes con mutaciones recurrentes en LLC y valor clínico: *NOTCH1* (12,67%), *ATM* (11,1%), *SF3B1* (8,6%), *BIRC* (8,9%), *CHD2* (6%) y *TP53* (5,3%)<sup>(84-87)</sup>. Estudios posteriores han permitido confirmar la presencia de pronóstico desfavorable para los casos con mutación de *TP53*, *NOTCH1* (+ región 3'), *ATM*, *BIRC3*.

Junto a los datos clínicos y morfológicos que diferencian la leucemia prolinfocítica (LPL) B de otros SLP, desde el punto de vista genético destaca la gran intensidad con que expresan las inmunoglobulinas de superficie, la presencia de anomalías que afectan al brazo largo del cromosoma 14 (60% de los casos), así como a los cromosomas 6 y 1. Los cariotipos complejos son frecuentes. Son comunes las delecciones de 13q14 y de 17p, y algo menos las de 11q23, pero la trisomía 12 es rara. Aunque al principio se describieron casos con t(11;14), hoy se consideran casos de linfoma del manto en fase leucémica. El estado mutacional de *IgH* es similar al de la LLC, aunque no parece tener un significado pronóstico especial (en la LPL-B, todos los pacientes son de mal pronóstico) mientras que las alteraciones de *TP53* son mucho más frecuentes (50-75%).

### Mieloma múltiple

Nuevamente, los genes *IgH* muestran reordenamientos monoclonales con mutaciones somáticas no cambiantes en el 100% de ellos (célula posfolicular). Hasta la fecha no se ha descrito ningún mieloma múltiple sin mutaciones somáticas. Además, son células que han completado el cambio de clase, por lo que se cree que su origen está en células B de la memoria. El 70% de los casos son hiperdiploides y aquellos casos hipodiploides son de especial mal pronóstico. El 50-75% de los casos según las series presenta traslocaciones en la región de *switching* de 14q323 del alelo no productivo, dando lugar a 4 tipos característicos: t(11;14), t(4;14), t(6;14) y t(14;16), siendo las 3 últimas de mal pronóstico<sup>(88)</sup>. No obstante, en la cuarta parte de los casos con traslocación en 14q32 no se encuentra la pareja afectada, siendo también de mal pronóstico. La delección del(13q), que aparece en casi la mitad de los mielomas, no se asocia a mal pronóstico si va como anomalía aislada, aunque suele ir acompañando a la t(4;14). Por último, la presencia de delecciones de *P53* supone hoy en día el principal marcador de pronóstico adverso en el mieloma múltiple.

Los estudios de *arrays* de expresión de ARN están muy desarrollados en mieloma y han permitido definir 8 tipos de mieloma: CD-1, con sobreexpresión de ciclina D1 sin sobreexpresión de CD20; CD-2 CD-1 sobreexpresión de ciclina D1 con sobreexpresión de CD20; MF, con sobreexpresión de MAF/MAFB, habitualmente asociado a t(6;14) o t(14;16); MS con sobreexpresión de MMSET/FGFR3 y asociado a t(4;14); HY, asociado a hiperdiploidía; LB, generalmente con poca lesión ósea; PR, asociado a elevada actividad proliferativa; y MY, o con firma mieloides, que aunque se creía que se definían por error metodológico (contaminación por serie mieloides) hoy se sabe que se asocia a buen pronóstico<sup>(89,90)</sup>.

Los estudios de NGS han sido decepcionantes en el mieloma, ya que apenas se han encontrado nuevas mutaciones repetitivas relevantes en estos pacientes<sup>(91-93)</sup>. Cabe, eso sí, destacar algunos genes que tienen una relativa tasa elevada de mutaciones, como se confirmó la existencia de mutaciones en *NRAS* (20%), *KRAS* (19%), *DIS3* (11%), *BRAF* (7%) y *FAM46C* (9%). Sin embargo, aún no se ha demostrado ningún valor pronóstico o terapéutico para ninguna de estas mutaciones, excepción hecha de TP53, de peor pronóstico, pero con valor ensombrecido por el peso de la delección.

### Bibliografía

- Johnsen JM, Nickerson DA, Reiner AP. Massively parallel sequencing: the new frontier of hematologic genomics. *Blood* 2013; 122 (19): 3268-75.
- Levy SE, Myers RM. Advancements in next-generation sequencing. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2016; 17: 95-115.
- Liu B, Xue Q, Tang Y, Cao J, Guengerich FP, Zhang H. Mechanisms of mutagenesis: DNA replication in the presence of DNA damage. *Mutat Res Rev Mutat Res* 2016; 768: 53-67.
- Abramowitz LK, Bartolomei MS. Genomic imprinting: recognition and marking of imprinted loci. *Curr Opin Genet Dev* 2012; 22 (2): 72-8.
- Leary A, Auguste A, Mesnage S. DNA damage response as a therapeutic target in gynaecological cancers. *Curr Opin Oncol* 2016; 28 (5): 404-11.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291 (5507): 1304-51.
- Manolio TA. Bringing genome-wide association findings into clinical use. *Nat Rev Genet* 2013; 14 (8): 549-58.
- Weischenfeldt J, Symmons O, Spitz F, Korbel JO. Phenotypic impact of genomic structural variation: insights from and for human disease. *Nat Rev Genet* 2013; 14 (2): 125-38.
- Picelli S, Bjorklund AK, Reinius B, Sagasser S, Winberg G, Sandberg R. Tn5 transposase and tagmentation procedures for massively scaled sequencing projects. *Genome Res* 2014; 24 (12): 2033-40.
- Heeney MM, Finberg KE. Iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Hematol Oncol Clin North Am* 2014; 28 (4): 637-52.
- Auer PL, Johnsen JM, Johnson AD, et al. Imputation of exome sequence variants into population-based samples and blood-cell-trait-associated loci in African Americans: NHLBI GO Exome Sequencing Project. *Am J Hum Genet* 2012; 91 (5): 794-808.
- Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 2008; 456 (7218): 53-9.
- Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* 2011; 475 (7356): 348-52.
- Harrington CT, Lin EI, Olson MT, Eshleman JR. Fundamentals of pyrosequencing. *Arch Pathol Lab Med* 2013; 137 (9): 1296-303.
- Chaisson MJ, Huddleston J, Dennis MY, et al. Resolving the complexity of the human genome using single-molecule sequencing. *Nature* 2015; 517 (7536): 608-11.
- Deamer D, Akeson M, Branton D. Three decades of nanopore sequencing. *Nat Biotechnol* 2016; 34 (5): 518-24.
- McKerrell T, Moreno T, Ponstingl H, et al. Development and validation of a comprehensive genomic diagnostic tool for myeloid malignancies. *Blood* 2016; 128 (1): e1-9.
- Simeoni I, Stephens JC, Hu F, et al. A high-throughput sequencing test for diagnosing inherited bleeding, thrombotic, and platelet disorders. *Blood* 2016; 127 (23): 2791-803.
- Bastida JM, Del Rey M, Lozano ML, et al. Design and application of a 23-gene panel by next-generation sequencing for inherited coagulation bleeding disorders. *Haemophilia* 2016; 22 (4): 590-7.
- Sankaran VG, Gallagher PG. Applications of high-throughput DNA sequencing to benign hematology. *Blood* 2013; 122 (22): 3575-82.
- Kee Y, D'Andrea AD. Molecular pathogenesis and clinical management of Fanconi anemia. *J Clin Invest* 2012; 122 (11): 3799-806.
- Schuster B, Knies K, Stoecker C, et al. Whole exome sequencing reveals uncommon mutations in the recently identified Fanconi anemia gene SLX4/FANCP. *Hum Mutat* 2013; 34 (1): 93-6.

23. Shamseldin HE, Elfaki M, Alkuraya FS. Exome sequencing reveals a novel Fanconi group defined by XRCC2 mutation. *J Med Genet* 2012; 49 (3): 184-6.
24. Dobson-Stone C, Danek A, Rampoldi L, et al. Mutational spectrum of the CHAC gene in patients with chorea-acanthocytosis. *Eur J Hum Genet* 2002; 10 (11): 773-81.
25. Cullinane AR, Vilboux T, O'Brien K, et al. Homozygosity mapping and whole-exome sequencing to detect SLC45A2 and G6PC3 mutations in a single patient with oculocutaneous albinism and neutropenia. *J Invest Dermatol* 2011; 131 (10): 2017-25.
26. Gerrard G, Valganon M, Foong HE, et al. Target enrichment and high-throughput sequencing of 80 ribosomal protein genes to identify mutations associated with Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol* 2013; 162 (4): 530-6.
27. Sankaran VG, Ghazvinian R, Do R, et al. Exome sequencing identifies GATA1 mutations resulting in Diamond-Blackfan anemia. *J Clin Invest* 2012; 122 (7): 2439-43.
28. Smedley D, Robinson PN. Phenotype-driven strategies for exome prioritization of human Mendelian disease genes. *Genome Med* 2015; 7 (1): 81.
29. Kiezun A, Garimella K, Do R, et al. Exome sequencing and the genetic basis of complex traits. *Nat Genet* 2012; 44 (6): 623-30.
30. Mannucci PM, Franchini M. The real value of thrombophilia markers in identifying patients at high risk of venous thromboembolism. *Expert Rev Hematol* 2014; 7 (6): 757-65.
31. Farrell JJ, Sherva RM, Chen ZY, et al. A 3-bp deletion in the HBS1L-MYB intergenic region on chromosome 6q23 is associated with HbF expression. *Blood* 2011; 117 (18): 4935-45.
32. Peyvandi F, Kunicki T, Lillicrap D. Genetic sequence analysis of inherited bleeding diseases. *Blood* 2013; 122 (20): 3423-31.
33. Mackie I, Cooper P, Lawrie A, et al. Guidelines on the laboratory aspects of assays used in haemostasis and thrombosis. *Int J Lab Hematol* 2013; 35 (1): 1-13.
34. Gouw SC, van den Berg HM, Oldenburg J, et al. F8 gene mutation type and inhibitor development in patients with severe hemophilia A: systematic review and meta-analysis. *Blood* 2012; 119 (12): 2922-34.
35. Bastida JM, González-Porras JR, Jiménez C, et al. Application of a molecular diagnostic algorithm for hemophilia A and B using next-generation sequencing of entire F8, F9 and VWF genes. *Thrombosis and Hemostasis* 2016. [In press].
36. Oldenburg J, Ananyeva NM, Saenko EL. Molecular basis of haemophilia A. *Haemophilia* 2004; 10 (Suppl. 4): 133-9.
37. Bardi E, Astermark J. Genetic risk factors for inhibitors in haemophilia A. *Eur J Haematol* 2015; 94 (Suppl. 77): 7-10.
38. Santagostino E, Gringeri A, Tagliavacca L, Mannucci PM. Inhibitors to factor VIII in a family with mild hemophilia: molecular characterization and response to factor VIII and desmopressin. *Thromb Haemost* 1995; 74 (2): 619-21.
39. Boylan B, Rice AS, De Staercke C, et al. Evaluation of von Willebrand factor phenotypes and genotypes in Hemophilia A patients with and without identified F8 mutations. *J Thromb Haemost* 2015; 13 (6): 1036-42.
40. Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, et al. Human von Willebrand factor gene and pseudogene: structural analysis and differentiation by polymerase chain reaction. *Biochemistry* 1991; 30 (1): 253-69.
41. Kunicki TJ, Williams SA, Nugent DJ. Genetic variants that affect platelet function. *Curr Opin Hematol* 2012; 19 (5): 371-9.
42. Genomes Project C, Abecasis GR, Auton A, et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 2012; 491 (7422): 56-65.
43. Bastida JM, del Rey M, Benito R, et al. Design and validate of next-generation sequencing panel for inherited platelet disorders. *Blood* 2014; 124 (21): 4210.
44. Dohner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2015; 373 (12): 1136-52.
45. Lindsley RC, Ebert BL. The biology and clinical impact of genetic lesions in myeloid malignancies. *Blood* 2013; 122 (23): 3741-8.
46. Welch JS, Ley TJ, Link DC, et al. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell* 2012; 150 (2): 264-78.
47. Cancer Genome Atlas Research N. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2013; 368 (22): 2059-74.
48. Dohner H, Estey EH, Amadori S, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2010; 115 (3): 453-74.
49. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2016; 374 (23): 2209-21.
50. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood* 2013; 122 (22): 3616-27; quiz 3699.
51. Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2014; 28 (2): 241-7.
52. Lindsley RC, Mar BG, Mazzola E, et al. Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. *Blood* 2015; 125 (9): 1367-76.
53. Walter MJ, Shen D, Ding L, et al. Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2012; 366 (12): 1090-8.
54. Hughes AE, Magrini V, Demeter R, et al. Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia defined by single-cell sequencing. *PLoS Genet* 2014; 10 (7): e1004462.
55. Mullighan CG. Genome sequencing of lymphoid malignancies. *Blood* 2013; 122 (24): 3899-907.
56. Hunger SP, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukemia in children. *N Engl J Med* 2015; 373 (16): 1541-52.
57. Ma X, Edmonson M, Yergeau D, et al. Rise and fall of subclones from diagnosis to relapse in pediatric B-acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Commun* 2015; 6: 6604.
58. Holmfeldt L, Wei L, Diaz-Flores E, et al. The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 2013; 45 (3): 242-52.
59. Wiemels JL, Cazzaniga G, Daniotti M, et al. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. *Lancet* 1999; 354 (9189): 1499-503.
60. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia: a Europe Against Cancer program. *Leukemia* 2003; 17 (12): 2318-57.

61. Papaemmanuil E, Hosking FJ, Vijayakrishnan J, et al. Loci on 7p12.2, 10q21.2 and 14q11.2 are associated with risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 2009; 41 (9): 1006-10.
62. Shah S, Schrader KA, Waanders E, et al. A recurrent germline PAX5 mutation confers susceptibility to pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 2013; 45 (10): 1226-31.
63. Ladetto M, Bruggemann M, Monitillo L, et al. Next-generation sequencing and real-time quantitative PCR for minimal residual disease detection in B-cell disorders. *Leukemia* 2014; 28 (6): 1299-307.
64. Mullighan CG, Su X, Zhang J, et al. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2009; 360 (5): 470-80.
65. Den Boer ML, van Slegtenhorst M, De Menezes RX, et al. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *Lancet Oncol* 2009; 10 (2): 125-34.
66. Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G, et al. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat Genet* 2011; 43 (9): 830-7.
67. Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, et al. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature* 2011; 476 (7360): 298-303.
68. Morin RD, Mungall K, Pleasance E, et al. Mutational and structural analysis of diffuse large B-cell lymphoma using whole-genome sequencing. *Blood* 2013; 122 (7): 1256-65.
69. Dubois S, Viailly PJ, Mareschal S, et al. Next-generation sequencing in diffuse large B-cell lymphoma highlights molecular divergence and therapeutic opportunities: a LYSA study. *Clin Cancer Res* 2016; 22 (12): 2919-28.
70. Vaque JP, Martinez N, Batlle-Lopez A, et al. B-cell lymphoma mutations: improving diagnostics and enabling targeted therapies. *Haematologica* 2014; 99 (2): 222-31.
71. Bea S, Valdes-Mas R, Navarro A, et al. Landscape of somatic mutations and clonal evolution in mantle cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110 (45): 18250-5.
72. Kridel R, Meissner B, Rogic S, et al. Whole transcriptome sequencing reveals recurrent NOTCH1 mutations in mantle cell lymphoma. *Blood* 2012; 119 (9): 1963-71.
73. Hussein MA, Lee EJ, Fletcher R, Schiffer CA. The effect of lymphocytotoxic antibody reactivity on the results of single antigen mismatched platelet transfusions to alloimmunized patients. *Blood* 1996; 87 (9): 3959-62.
74. Pastore A, Jurinovic V, Kridel R, et al. Integration of gene mutations in risk prognostication for patients receiving first-line immunotherapy for follicular lymphoma: a retrospective analysis of a prospective clinical trial and validation in a population-based registry. *Lancet Oncol* 2015; 16 (9): 1111-22.
75. Li H, Kaminski MS, Li Y, et al. Mutations in linker histone genes HIST1H1 B, C, D, and E; OCT2 (POU2F2); IRF8; and ARID1A underlying the pathogenesis of follicular lymphoma. *Blood* 2014; 123 (10): 1487-98.
76. Spina V, Khiabani H, Messina M, et al. The genetics of nodal marginal zone lymphoma. *Blood* 2016. [Epub ahead of print].
77. Rossi D, Trifonov V, Fangazio M, et al. The coding genome of splenic marginal zone lymphoma: activation of NOTCH2 and other pathways regulating marginal zone development. *J Exp Med* 2012; 209 (9): 1537-51.
78. Tiacci E, Trifonov V, Schiavoni G, et al. BRAF mutations in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med* 2011; 364 (24): 2305-15.
79. Martin-Jimenez P, Garcia-Sanz R, Balanzategui A, et al. Molecular characterization of heavy chain immunoglobulin gene rearrangements in Waldenström's macroglobulinemia and IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Haematologica* 2007; 92 (5): 635-42.
80. Treon SP, Xu L, Yang G, et al. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia. *N Engl J Med* 2012; 367 (9): 826-33.
81. Jimenez C, Sebastian E, Chillon MC, et al. MYD88 L265P is a marker highly characteristic of, but not restricted to, Waldenström's macroglobulinemia. *Leukemia* 2013; 27 (8): 1722-8.
82. Stilgenbauer S, Furman RR, Zent CS. Management of chronic lymphocytic leukemia. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2015: 164-75.
83. Baliakas P, Hadzidimitriou A, Sutton LA, et al. Clinical effect of stereotyped B-cell receptor immunoglobulins in chronic lymphocytic leukaemia: a retrospective multicentre study. *Lancet Haematol* 2014; 1 (2): e74-84.
84. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2011; 475 (7354): 101-5.
85. Landau DA, Carter SL, Stojanov P, et al. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* 2013; 152 (4): 714-26.
86. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature* 2015; 526 (7574): 525-30.
87. Puente XS, Bea S, Valdes-Mas R, et al. Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2015; 526 (7574): 519-24.
88. Mateos MV, Gutierrez NC, Martin-Ramos ML, et al. Outcome according to cytogenetic abnormalities and DNA ploidy in myeloma patients receiving short induction with weekly bortezomib followed by maintenance. *Blood* 2011; 118 (17): 4547-53.
89. Heuck C, van Rhee F, Mitchell A, et al. Total therapy (TT) studies for gene expression profiling (GEP)-defined high-risk multiple myeloma clinically relevant. *Blood* 2013; 122 (12 Suppl.): 126a.
90. Nair B, van Rhee F, Shaughnessy JD, Jr, et al. Superior results of Total Therapy 3 (2003-33) in gene expression profiling-defined low-risk multiple myeloma confirmed in subsequent trial 2006-66 with bortezomib, lenalidomide and dexamethasone (VRD) maintenance. *Blood* 2010; 115: 4168-73.
91. Lohr JG, Stojanov P, Carter SL, et al. Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy. *Cancer Cell* 2014; 25 (1): 91-101.
92. Bolli N, vet-Loiseau H, Wedge DC, et al. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nat Commun* 2014; 5: 2997.
93. Walker BA, Boyle EM, Wardell CP, et al. Mutational Spectrum, Copy Number Changes, and Outcome: Results of a Sequencing Study of Patients With Newly Diagnosed Myeloma. *J Clin Oncol* 2015; 33 (33): 3911-20.

---

## Linfomas cutáneos: entre la dermatología y la hematología

**RAMÓN M. PUJOL**

*Servicio de Dermatología. Hospital del Mar. Parc de Salut Mar. Barcelona*

Los linfomas cutáneos primarios (LCP) representan un grupo heterogéneo y particular de procesos linfoproliferativos de evolución y pronóstico variables en cuya aproximación diagnóstica y terapéutica deben participar y participan de forma integrada y coordinada hematólogos y dermatólogos.

Se definen como un grupo de procesos linfoproliferativos cuya manifestación inicial son lesiones cutáneas, sin que se demuestre afectación extracutánea en el momento del diagnóstico. La mayoría de los LCP corresponden a proliferaciones de linfocitos T maduros (70%) (LCP de células T –LCCT–), mientras que sobre un 30% son LCP de células B (LCCB). Dentro del grupo de los LCCT, un 75% de los casos corresponde al grupo micosis fungoide/síndrome de Sézary (MF/SS), siendo los procesos linfoproliferativos cutáneos CD30+ (papulosis linfomatoide/LCP CD30+) (15%) el segundo grupo en frecuencia. Dentro de los LCCB, los grupos más prevalentes son el LCP B de la zona marginal (MALT extranodal) y el LCP centrofolicular.

La clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2008/2016 de las neoplasias hematológicas y linfoides integra los distintos subtipos de LCP, reconociendo la idiosincrasia de los LCP, y los diferentes subtipos aparecen descritos de forma específica y pormenorizada dentro de las neoplasias linfoides de células maduras B, T y NK. Sin embargo, dicha clasificación ha experimentado cambios significativos en los últimos años, con la incorporación de nuevas entidades y la reclasificación de algunos procesos linfoproliferativos T indolentes, como consecuencia de un mejor conocimiento de las características clínicas y evolutivas de este grupo de entidades.

El diagnóstico de los procesos linfoproliferativos cutáneos puede plantear en ocasiones importantes dificultades, especialmente en lesiones incipientes con características clinicopatológicas, inmunofenotípicas y genotípicas poco concluyentes (LCCT) y en la diferenciación entre LCP verdaderos de hiperplasias linfoides reactivas tanto de células T como de células B. Ocasionalmente, las características clínicas de las lesiones plantean el diagnóstico diferencial con diversos proce-

sos inflamatorios cutáneos (linfoma T similar a paniculitis, linfoma cutáneo gamma/delta) y, en algunas situaciones, sólo una correcta correlación clinicopatológica permite establecer el diagnóstico definitivo (DD, entre MF papular y papulosis linfomatoide, o entre papulosis linfomatoide y LCP CD30+). La observación de infiltrados inflamatorios reactivos prominentes en el contexto de un LCP y la presencia de infiltrados mixtos de células B y T pueden plantear asimismo dificultades diagnósticas. Los resultados de los estudios inmunofenotípicos y genotípicos pueden ser de utilidad, aunque en la gran mayoría de LCP no se han identificado lesiones genéticas específicas –ausencia de t(14;18) en linfomas cutáneos centrofoliculares–. Asimismo, la presencia de infiltrados linfoides cutáneos atípicos debe obligar a descartar la presencia de un proceso linfoproliferativo sistémico con afectación cutánea secundaria (linfoma cutáneo secundario), que puede ser la primera manifestación de la enfermedad.

El carácter indolente de los subtipos más prevalentes de LCP, tanto LCCT (MF, procesos linfoproliferativos cutáneos CD30+) como LCCB (LCP B de la zona marginal o LCP centrofolicular), con una expresión clínica con frecuencia limitada a la piel durante largos periodos de tiempo, hace que, en muchas ocasiones, pueda recaer sobre el dermatólogo un mayor protagonismo en el diagnóstico, el tratamiento y el seguimiento de estos pacientes. En los subtipos menos frecuentes y en casos de evolución agresiva (SS, MF tumoral, LCP CD30+, linfoma difuso de células grandes de tipo piernas, etc.), una aproximación coordinada entre hematólogos y dermatólogos es fundamental, adquiriendo el hematólogo cada vez un mayor protagonismo, que puede ser prácticamente exclusivo en algunos subtipos de evolución agresiva y con afectación extracutánea (linfoma T citotóxico CD8+ epidermotropo agresivo, linfoma T gamma/delta, linfoma T/NK extranodal, de tipo nasal, etc.).

Desde un punto de vista terapéutico, en los subtipos indolentes de LCP debemos distinguir los tratamientos dirigidos exclusivamente a la piel, que suelen indicarse en fases iniciales o en pacientes con lesiones

**Tabla 1. Linfomas cutáneos primarios (adaptación). Clasificación WHO 2016**

Linfomas de células T	Linfomas de células B
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Linfoma/Leucemia linfoblástico T</li> <li>· LLTA</li> <li>· MF + variantes</li> <li>· SS</li> <li>· LACG</li> <li>· Espectro PLP CD30+ (LACG, PL)</li> <li>· LTC subcutáneo similar a paniculitis</li> <li>· LCT de tipo enteropatía</li> <li>· Linfoma células NK/T extranodal</li> <li>· LTP, no especificado</li> <li>· LCP T gamma/delta</li> <li>· LCCT CD8+ epidermotropo agresivo</li> <li>· PLP similar a Hidroa vacciniforme</li> <li>· LCP T acral CD8</li> <li>· PLP T pleomórfico CD4+ célula p/m</li> <li>· Linfoma células T foliculares</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Linfoma/Leucemia linfoblástico B</li> <li>· Linfocito cél. pequeña (LLC B)</li> <li>· Linfoma linfoplasmácico</li> <li>· Linfoma células manto</li> <li>· Linfoma células B zona marginal extranodal (¿LZM cutáneo?)</li> <li>· Linfoma folicular</li> <li>· Linfoma cutáneo centrofolicular</li> <li>· Leucemia células peludas</li> <li>· Plasmacitoma/Mieloma</li> <li>· Linfoma difuso de células grandes</li> <li>· LDCG primario cutáneo, de tipo piernas</li> <li>· Linfoma Burkitt/Leucemia</li> </ul>

LACG: linfoma anaplásico de células grandes; LCP: linfoma cutáneo primario; LCT: linfoma de células T; LDCG: linfoma difuso de células grandes; LZM: linfoma de la zona marginal; MF: micosis fungoide; PL: papulosis linfomatoide; PLP: proceso linfoproliferativo; SS: síndrome de Sézary

localizadas tanto en LCCT (PUVAterapia, mostazas nitrogenadas, radioterapia) como LCCB (tratamientos intralesionales con corticoides o rituximab, radioterapia), y los tratamientos sistémicos (monoquimioterapia, retinoides, interferón, rituximab, poli-quimioterapia), que suelen prescribirse en pacientes refractarios a tratamientos dirigidos a la piel, con lesiones no localizadas o con progresión o evolución agresiva de la enfermedad.

Sin embargo, los LCP en fases avanzadas y de evolución agresiva representan un auténtico reto terapéutico. La baja prevalencia de algunas de estas entidades explica la ausencia de pautas de tratamiento estandarizadas. Dentro del grupo MF/SS, las tasas de respuesta a las distintas pautas de tratamiento son bajas (30-50%) y con frecuencia se objetivan recurrencias postratamiento. En algunos casos se requiere una aproximación individualizada. Con los tratamientos actuales no se ha demostrado un impacto significativo en la supervivencia global de la enfermedad y sólo se ha obtenido la curación en casos aislados tras el trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos. El mejor conocimiento de los mecanismos patogénicos implicados en el desarrollo de estos procesos ha abierto la posibilidad de opciones terapéuticas adicionales en los casos de LCCT (anticuerpos monoclonales, pequeñas moléculas, inhibidores de vías de activación, inmunomoduladores, etc.). Parece evidente la necesidad de disponer de nuevos tratamientos/combinaciones terapéuticas validados a partir de ensayos clínicos. Dentro de los LCCB, las pautas terapéuticas utilizadas en el LDCG de tipo piernas suelen ser similares a las utilizadas en los equivalentes nodales.

Una aproximación multidisciplinar coordinada entre patólogos, hematólogos y dermatólogos resulta fun-

damental tanto desde un punto de vista diagnóstico como terapéutico en el manejo y el seguimiento de los procesos linfoproliferativos cutáneos.

## Conclusiones

Los LCP representan un grupo de procesos linfoproliferativos de evolución y pronóstico variables. Una aproximación multidisciplinar coordinada entre hematólogos y dermatólogos resulta fundamental en su manejo y seguimiento, tanto desde un punto de vista diagnóstico como terapéutico.

## Bibliografía

- Devata S, Wilcox RA. Cutaneous T-cell lymphoma: a review with a focus of targeted agents. *Am J Clin Dermatol* 2016; 17: 225-37.
- Jaffe ES, Lee Harris N, Stein H, Isaacson PG, et al. World Health Organisation Classification of Tumours of Haematologic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC; 2008 (4<sup>th</sup> edition).
- Lann TT, Brown NA, Hristov AC. Controversies and considerations in the diagnosis of primary cutaneous CD4+ small/medium T-cell lymphoma. *Arch Pathol Lab Med* 2014; 138: 1307-18.
- Olsen E, Vonderheid E, Pimpinelli N, Willemze R, Kim Y, Knobler R, et al.; for the ISCL and the EORTC. Revisions to the staging and classification of mycosis fungoides and Sezary syndrome: a proposal of the International Society for Cutaneous Lymphomas (ISCL) and the cutaneous lymphoma task force of the European Organization of Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Blood* 2007; 110: 1713-22.
- Pinter-Brown LC. Diagnosis and management of cutaneous B-cell lymphoma. *Dermatol Clin* 2015; 33: 835-40.

Senff NJ, Noordijk EM, Kim YH, Bagot M, Berti E, Cerroni L, et al. European Organization for Research and Treatment of Cancer and International Society for Cutaneous Lymphoma consensus recommendations for the management of cutaneous B-cell lymphomas. *Blood* 2008; 112: 1600-9.

Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016; 127: 2375-90.

Wilcox RA. Cutaneous T-cell lymphoma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol* 2016; 91: 151-65.

---

## Más allá de los genes codificantes en la fisiopatología del sistema hemostático

M.<sup>a</sup> EUGENIA DE LA MORENA-BARRIO, JAVIER CORRAL, JOSÉ RIVERA, VICENTE VICENTE  
Servicio de Hematología y Oncología Médica. Hospital General Universitario Morales Meseguer.  
Centro Regional de Hemodonación. Universidad de Murcia. IMIB-Arrixaca. Murcia

---

### Introducción

La finalización del borrador del proyecto del genoma humano en el año 2000 vino a confirmar que las diferencias en la complejidad entre diferentes organismos no se explican en función de una mayor complejidad genética. El proyecto genoma humano estableció una cifra de genes del orden de 30.000 frente a los 150.000 que habían sido estimados anteriormente<sup>(1)</sup>. Ciertos autores consideran que el barómetro de la complejidad de un organismo no se encuentra en el número de genes sino en los diferentes tipos celulares que posee, así como en el comportamiento célula-célula que depende directamente de las interacciones proteína-proteína<sup>(2)</sup>. Así, en humanos existen hasta 650.000 interacciones distintas, 3 veces más que en gusano (*Caenorhabditis elegans*) y 10 veces más que en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), cuando sus genomas son sorprendentemente muy parecidos<sup>(2)</sup>. La clave en esta complejidad se sustenta en una gran variedad de proteínas que, en organismos superiores, como el hombre, que cuenta con más de 1 millón de proteínas diferentes, debe explicarse por mecanismos diferentes al número de genes.

El dogma central de la biología molecular, que describía el proceso unidireccional por el que un gen se transcribía en un ARN mensajero que era traducido en la proteína final, se vio así obsoleto en su enunciado más simplista. La era genómica, que parecía que iba a ser la panacea de la biología molecular, no hizo más que reflejar la complejidad de los organismos y de la vida. La comunidad científica tuvo que dar un giro a su enfoque desde la genómica a la proteómica, sin haber resuelto el enigma del genoma. La investigación de una entidad única, ya fuera un gen, una proteína u otra molécula, quedó rápidamente relegada a modos de estudio más amplios como la interactómica, la metabolómica, la transcriptómica o la biología de sistemas. En definitiva, la reducción de un escenario fisiológico o patológico a un único protagonista, que puede resultar lo más sencillo de abordar, es demasiado simplista y en la mayoría de las situaciones errónea. Así es como surge, por ejemplo, el término de

enfermedad compleja frente a la enfermedad monogénica con un único gen protagonista. Por tanto, un único gen y la secuencia de nucleótidos que lo codifica no ofrecen siempre la respuesta completa a determinadas situaciones fisiológicas (como es la complejidad del proteoma o el interactoma) o patológicas (como son las enfermedades congénitas complejas).

Para entender dónde y cómo se va incrementando la complejidad biológica más allá de la simple aportación de los genes, es necesario conocer cada uno de los protagonistas que intervienen en el desarrollo de una patología o de la propia biología humana.

Se estima que existen 22.500 marcos abiertos de lectura en el ser humano<sup>(3)</sup> y, ya en el segundo escalón, nos encontramos con 100.000 transcritos distintos, producidos por promotores alternativos, procesamiento alternativo de intrones o ARNm *editing*. Sin embargo, poseemos hasta 1 millón de proteínas maduras diferentes. De nuevo, mecanismos intermedios generan este aumento exponencial de la variabilidad y multiplicidad. Las modificaciones postraduccionales (MPT) son las principales responsables de esta variabilidad. Recientemente, las MPT de las proteínas han cobrado mucha atención por parte de la investigación biológica y biomédica, y es que se conoce con claridad que la mayoría de las proteínas de especies, desde las arqueas hasta los humanos, poseen varios sitios específicos de modificaciones covalentes<sup>(3)</sup>. De hecho, se estima que hasta el 80% de todas las proteínas eucariotas presentan algún tipo de MPT<sup>(3)</sup>.

En esta revisión trataremos de profundizar sobre las MPT como elementos claves en la variabilidad y multiplicidad proteica, la diferente funcionalidad y/o actividad catalítica, y como fuente de patogenicidad, así como de estrategia terapéutica. Y todo ello lo centraremos en un sistema específico, el sistema hemostático. Se trata de un excelente ejemplo de la trascendencia fisiológica de las MPT, de su potencial patológico y de aplicaciones clásicas en el campo de la terapéutica. No es extraño que un sistema como la hemostasia, tan dependiente de las interacciones proteína-proteína, sea tan sensible a las MPT, aunque todas las conclusiones que se puedan obtener de este modelo puedan ser per-



fectamente extrapolables al conjunto de la hematología y de cualquier otro sistema.

La importancia de las MPT se conoce desde hace más de 30 años, cuando se caracterizó la actividad enzimática de las cinasas<sup>(4)</sup> y el papel de la proteólisis<sup>(5)</sup> en diferentes procesos biológicos y patológicos. Basado en datos previos y emergentes, parece evidente que las MPT están involucradas en la regulación de casi todos los eventos celulares, incluyendo la expresión génica, la transmisión de señales, las interacciones proteína-proteína, las interacciones célula-célula y la comunicación entre el espacio intra- y extracelular<sup>(6)</sup>. Por tanto, un mal funcionamiento de las MPT tendrá consecuencias deletéreas, afectando a la fisiología de la célula en todo su conjunto.

Las proteínas son biomoléculas formadas por cadenas de aminoácidos, ordenados en una secuencia precisa, que adoptan una conformación tridimensional determinada pero flexible. Estos polipéptidos se pliegan durante su propia síntesis adoptando configuraciones nativas necesarias para ejercer sus funciones biológicas. Las funciones de las proteínas son muy diversas, desde proporcionar a la célula su soporte estructural en el citoesqueleto, hasta favorecer reacciones químicas (enzimas), controlar el tráfico intracelular y el flujo de sustancias entre la célula y el exterior o regular la propia expresión de genes. Pero para estas funciones, especialmente para aspectos de regulación funcional y especificidad, no sólo la secuencia aminoacídica, ni siquiera la estructura terciaria que presentan, es suficiente. Modificaciones posteriores a la síntesis proteica, las MPT, van a jugar un papel crucial en aspectos claves de la práctica totalidad de las proteínas, además de contribuir a su variabilidad.

Existen más de 200 tipos de MPT. Este término engloba todos los cambios covalentes que experimenta una proteína tras su síntesis en el ribosoma y que afectan a las características fisicoquímicas de la proteína. Por ello, toda MPT puede afectar a la correcta función biológica de la proteína y, de hecho, en muchos casos es el mecanismo seleccionado para dar respuesta a una determinada señal. Todas las MPT son modificaciones covalentes y pueden ser resultado de mecanismos enzimáticos o no enzimáticos. En esta revisión nos centraremos en las MPT mediadas por enzimas, dejando a un lado las MPT mediadas por mecanismos no enzimáticos como la glicación no enzimática, la oxidación, la adición de lípidos electrófilos a residuos de Cys, etc., procesos fisicoquímicos que se producen extracelularmente y que suelen ser procesos de senescencia.

Las MPT mediadas por enzimas son tan relevantes para un organismo que hasta el 5% del genoma humano se encarga de codificar enzimas modificadoras implicadas en MPT<sup>(7)</sup>. De ellas, 518 son cinasas (incorporan grupos fosfato), existen más de 150 fosfatasa, más



Figura 1. Tipos de modificaciones postraduccionales.

de 600 ubiquitinligasas y más de 80 desubiquitinasa. Las MPT más importantes mediadas por actividad enzimática se reflejan en la Figura 1 y se detallan en la Tabla 1. En todos los casos, existen secuencias consenso de aminoácidos específicas implicadas en la incorporación de una determinada MPT. Por último, la localización celular donde se producen estas modificaciones es muy variada, pueden tener lugar desde el núcleo hasta la matriz extracelular, dependiendo del tipo de MPT (Tabla 1).

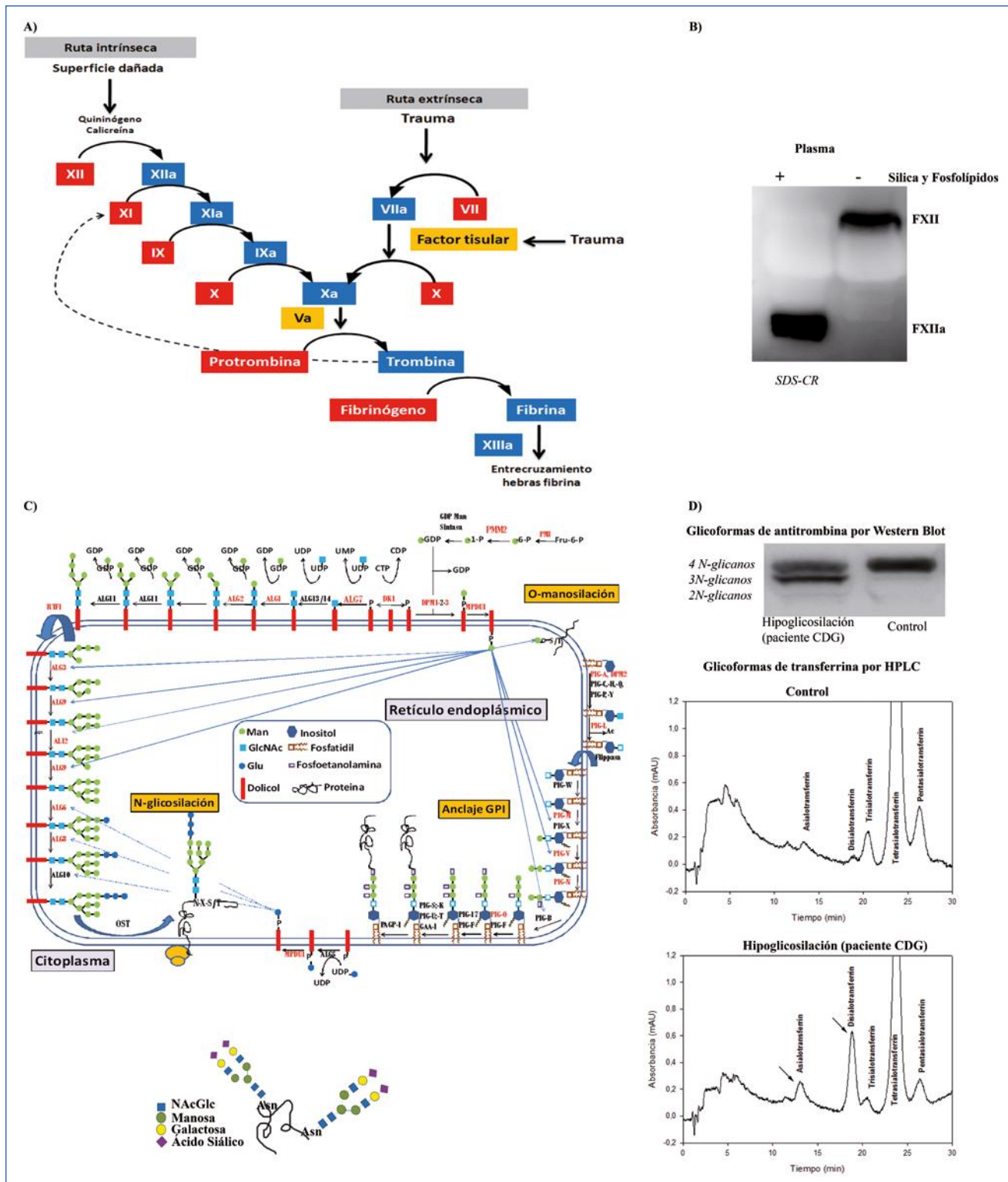
## Modificaciones postraduccionales en hemostasia

### Implicaciones fisiológicas

El papel de las MPT en hemostasia es crucial. Las MPT adquieren gran protagonismo tanto en la hemostasia primaria como en la hemostasia secundaria. Así, la cascada de coagulación tiene como fin último formar un tampón de fibrina sobre un daño endotelial de manera instantánea y localizada exclusivamente en el lugar de la lesión para evitar la hemorragia fatal. Precisamente, si esto ocurre es gracias a una serie de proteólisis en cascada de los factores de la coagulación. En la circulación, los factores de la coagulación se encuentran normalmente como zimógenos, es decir, carentes de actividad catalítica, la cual se adquiere con un cambio fisicoquímico de su estructura. Un primer estímulo derivado de la propia lesión vascular desencadena de forma casi inmediata la serie de reacciones proteolíticas seriadas que culminan con la formación de fibrina (Figura 2). Éste es un claro ejemplo de cómo las MPT son las responsables

**Tabla 1. Modificaciones postraduccionales más relevantes mediadas por enzimas modificadoras**

Modificación postraduccionales (residuos modificados)	Cambio en la masa de proteína ( $\Delta m$ , Da)	Enzima modificadora	Ejemplo de proteínas modificadas	Localización celular	Ejemplo de función biológica
<i>Fosforilación/Desfosforilación</i> (Ser, Thr, Tyr)	80	Proteincinasas vs. fosfatasa	PKA, PKC, cascadas de fosforilación	Núcleo, citoplasma, fluido extracelular, matriz extracelular	Trasmisión de señales, regulación de la actividad enzimática, interacciones proteína-proteína y proteína-ligando
<i>Glicosilación</i> N- (Asn) O- (Ser, Thr) Anclaje GPI (Gly en C-terminal)	> 800 203, > 800 > 1.000	Glicosiltransferasas	Factores de la coagulación, antitrombina, glicoproteínas plaquetarias, antígenos de los grupos sanguíneos ABO	Retículo endoplasmático y aparato de Golgi, membrana plasmática	Estabilidad proteica, solubilidad, señal de secreción, regulación de interacciones, interacciones y reconocimiento extracelular
<i>Acilación</i> Palmitoilación (Cys) Farnesilación (Cys) Mistirilación (Gly, Lys, Cys) Isoprenilación	238 204, 206 210	Palmitoil-transferasa Farnesil-transferasa Mistiril-transferasa	Proteínas G Proteína Ras	Aparato de Golgi Ribosoma	Localización proteica y actividad, interacciones proteína-proteína y proteína-membrana
<i>Sulfatación</i> (Lys, Ser, Thr)	80	Sulfotransferasa	Sulfatación de glicosaminoglicanos para activación de factores de crecimiento	Aparato de Golgi, matriz extracelular	Señalización y localización proteica, interacciones proteína-proteína
<i>Ubiquitinación</i> (Lys)	> 1.000	Enzima activadora de ubiquitina, enzima conjugadora de ubiquitina, ubiquitin-ligasa	Proteínas eucariotas	Citoplasma	Señal de degradación proteica, interacciones proteína-proteína
<i>Metilación</i> (Lys mono, di- y trimetilación, Arg mono- y dimetilación)	14, 28, 42	Metiltransferasas	Calmodulina, citocromo c, histonas, miosina	Citoplasma	Regulación de la actividad proteica, interacciones proteína-proteína, proteína-ácido nucleico, actividad de las histonas y la cromatina
<i>Acetilación</i> (Lys y Ser, residuos N-terminales)	42	Acetiltransferasas	Acetilación de histonas	Citoplasma, fluido extracelular	Estabilidad y actividad proteica, regula interacciones proteína-proteína, proteína-ligando
<i>Formación de puentes disulfuro</i> (Cys)	-2	Proteínas disulfuro isomerasa	Intermoleculares: homodímero FXI Intramoleculares: la mayoría de las proteínas	Citoplasma	Estabilidad de la estructura y actividad proteica, procesos redox
<i>Citrulinación</i> (Arg)	-1	Peptidil arginina deaminasa	Histona H3 (citrulinación desencadena NETosis)	Núcleo	Implicado en NETosis, interacciones proteína-proteína, regulación génica y respuesta inmune
<i>Hidroxilación</i> (Pro)	16	Prolihdroxilasa	Colágeno Proteína S	Matriz extracelular	Estabilidad estructural
<i>Carboxilación</i> (Glu)	44	Gamma glutamil carboxilasa	Factores de la coagulación: FII, FVII, FIX, FX, PT, PC, PZ, PS dependientes de vitamina K	Retículo endoplasmático	Regulan la actividad proteica
<i>Proteolisis</i>	-	Proteasas	Activación de zimógenos: cascada de la coagulación, factor de von Willebrand (proteolisis por ADAMTS13)	Núcleo, citoplasma, fluido extracelular, matriz extracelular	Encendido y apagado de actividad enzimática



**Figura 2.** Dos modificaciones postraduccionales (MPT) en hemostasia y su detección. A: cascada proteolítica de la coagulación; B: detección por Western blot de la forma activada por proteólisis del factor de la coagulación FXIIa (SDS-CR: gel de SDS en condiciones reductoras); C: rutas de la glicosilación. Primeros pasos de la síntesis de la cadena de azúcares que se incorporará a la N-glicoproteína naciente, ruta de la O-manosilación y ruta de la formación de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Debajo, dibujo esquemático de una proteína con 2 N-glicanos maduros. Asn: asparagina; NAcGlc: N-Acetil glucosamina; D: detección de defectos de N-glicosilación. Determinación de las glicofomas de antitrombina plasmática mediante Western blot y de transferrina plasmática mediante HPLC en un control y un paciente con deficiencia de glicosilación congénita (CDG). Se detectan los picos de asialo-, disialo-, trisialo-, tetrasialo- y pentasialo-transferrina. CDG: paciente con trastornos congénitos de la N-glicosilación, donde las glicofomas asialo- y disialo-transferrina, que se indican con una flecha, se encuentran aumentadas.

**Tabla 2. Sitios de modificaciones postraduccionales de los factores de la coagulación**

Proteína	Modificación postraducciona
<b>Factor V</b>	N-glicosilación: Asn23, Asn27, Asn211, Asn269, Asn354, Asn432, Asn440, Asn526, Asn639, Asn713, Asn724, Asn732, Asn748, Asn754, Asn793, Asn910, Asn949, Asn1046, Asn1055, Asn1075, Asn1078, Asn1175, Asn1193, Asn1229, Asn1238, Asn1265, Asn1283, Asn1310, Asn1319, Asn1347, Asn1356, Asn1451, Asn1471, Asn1531, Asn1675, Asn1982, Asn2181 Fosforilación: Ser692 Sulfatación: Tyr665, Tyr696, Tyr698, Tyr1494, Tyr1510, Tyr1515, Tyr1565
<b>Factor VIII</b>	N-glicosilación: Asn41, Asn239, Asn582, Asn757, Asn784, Asn828, Asn900, Asn943, Asn963, Asn1001, Asn1055, Asn1066, Asn1185, Asn1255, Asn1259, Asn1282, Asn1300, Asn1384, Asn1412, Asn1442, Asn1512, Asn1685, Asn1810, Asn2118 Fosforilación: Thr351, Ser1657 Sulfatación: Tyr346, Tyr718, Tyr719, Tyr723, Tyr1664, Tyr1680
<b>Factor VII</b>	$\gamma$ -carboxilación: Glu6, Glu7, Glu14, Glu16, Glu19, Glu20, Glu25, Glu26, Glu29, Glu35 $\beta$ -hidroxilación: Asp63 N-glicosilación: Asn145, Asn322 O-glicosilación (-Glc): Ser52; (-Fuc): Ser60
<b>Factor IX</b>	$\gamma$ -carboxilación: Glu7, Glu8, Glu15, Glu17, Glu20, Glu21, Glu26, Glu27, Glu30, Glu33, Glu36, Glu40 $\beta$ -hidroxilación: Asp64 N-glicosilación: Asn157, Asn167 O-glicosilación (-GalNAc): Thr159, Thr169, Thr172, Thr179; (-Glc): Ser53; (-Fuc): Ser61 Fosforilación: Ser158 Sulfatación: Tyr155
<b>Factor X</b>	$\gamma$ -carboxilación: Glu6, Glu7, Glu14, Glu16, Glu19, Glu20, Glu25, Glu26, Glu29, Glu32, Glu39 $\beta$ -hidroxilación: Asp63 N-glicosilación: Asn181, Asn191 O-glicosilación: Thr159, Thr171, Thr443
<b>Protrombina</b>	$\gamma$ -carboxilación: Glu6, Glu7, Glu14, Glu16, Glu19, Glu20, Glu25, Glu26, Glu29, Glu32 N-glicosilación: Asn78, Asn100, Asn373
<b>Proteína C</b>	$\gamma$ -carboxilación: Glu6, Glu7, Glu14, Glu16, Glu19, Glu20, Glu25, Glu26, Glu29 $\beta$ -hidroxilación: Asp71 N-glicosilación: Asn97, Asn248, Asn313, Asn329
<b>Proteína Z</b>	$\gamma$ -carboxilación: Glu7, Glu8, Glu11, Glu15, Glu17, Glu20, Glu21, Glu26, Glu27, Glu30, Glu33, Glu35, Glu40 $\beta$ -hidroxilación: Asp64 N-glicosilación: Asn59, Asn185, Asn193, Asn266, Asn292 O-glicosilación: Ser53, Thr72, Ser196, Thr275
<b>Proteína S</b>	$\gamma$ -carboxilación: Glu6, Glu7, Glu14, Glu16, Glu19, Glu20, Glu25, Glu26, Glu29, Glu32, Glu36 $\beta$ -hidroxilación: Asp95, Asn136, Asn178, Asn217 N-glicosilación: Asn458, Asn468, Asn489
<b>Antitrombina</b>	N-glicosilación: Asn96, Asn135, Asn155, Asn192
<b>Inhibidor de la proteína C</b>	N-glicosilación: Asn230, Asn243, Asn319
<b>Factor de von Willebrand</b>	N-glicosilación: Asn94, Asn384, Asn468, Asn752, Asn811, Asn1460, Asn1527, Asn1594, Asn1637, Asn1783, Asn1822, Asn2027 O-glicosilación: Thr485, Thr492, Thr493, Ser500, Thr705, Thr714, Ser723, Thr724, Thr916, Thr1535 Sulfatación de carbohidratos: Asn384, Asn468

La tabla se basa en información obtenida de las bases de datos SWISS-PROT<sup>(9)</sup>

directas del *switch on* de una función catalítica fundamental en hemostasia (Figura 2).

Siendo la proteólisis la MPT más relevante en la cascada de la coagulación, no es la única importante en este sistema.

Quizás la segunda MPT más destacable en hemostasia sea la gamma-carboxilación. Este proceso, que tiene lugar en el retículo endoplásmico y que consiste en la transformación del ácido glutámico a carboxiglutámico por acción catalítica de la gamma-glutamyl carboxilasa, permite que las proteínas afectadas puedan unirse a fosfolípidos de membrana. Esta unión es crucial para la formación de los complejos proteicos que soportan la cascada de la coagulación<sup>(9)</sup>.

Además, todas las proteínas de la coagulación, por el hecho de ser proteínas plasmáticas, poseen algún tipo de MPT y cada una desempeña un papel diferente (Tabla 2 y Figura 2)<sup>(9)</sup>. De hecho, podemos encontrar diferentes isoformas de una misma proteína por diferencias en las MPT que marquen diferentes actividades biológicas o localizaciones celulares. La antitrombina o la proteína C (PC) son excelentes ejemplos que pueden ilustrar muy bien la variabilidad de formas y funciones que proporcionan sus diferentes MPT (Tabla 2).

La antitrombina es el principal anti-coagulante endógeno del organismo. Ejerce su acción anticoagulante inhibiendo numerosas serín proteasas de la cascada de la coagulación, principalmente la trombina y el factor Xa. Su acción inhibitoria tiene lugar a través de un mecanismo rápido y eficaz de inhibición por suicidio en el que se establecen enlaces covalentes entre proteasa e inhibidor, perdiendo así sus capacidades coagulantes y anti-coagulantes, respectivamente. La antitrombina posee un sitio de unión a heparina, la cual aumenta su capacidad anticoagulante hasta 1.000 veces. La heparina genera un cambio conformacional en la molécula de antitrombina exponiendo el centro reactivo y haciéndolo más accesible a la protea-

sa diana. La antitrombina es una glicoproteína con 4 sitios de N-glicosilación (secuencia consenso: N-X-S/T) (Figura 2). Debido a que uno de ellos, el localizado en posición Asn-135, no es eficazmente glicosilado, existen 2 glicofomas de antitrombina: alfa con 4 N-glicanos y beta con 3. Aunque ambas glicofomas se secretan en proporciones similares, la forma alfa es mayoritaria en plasma (90%), ya que la glicofoma beta, al tener 1 glicano menos, presenta mayor afinidad por heparina<sup>(10)</sup>. Esta característica le confiere mayor capacidad de unión a los glicosaminoglicanos del endotelio vascular y es rápidamente eliminada de la circulación, localizándose a nivel endotelial, donde se piensa que desempeña importantes funciones anticoagulantes<sup>(10,11)</sup>.

También la PC posee 2 glicofomas que se diferencian en el contenido de N-glicanos con importantes connotaciones funcionales. La PC activada (APC) desempeña un papel anticoagulante esencial. La activación de la PC por el complejo trombina-trombomodulina, amplificada por el receptor endotelial de la PC (EPCR), conduce a la inactivación de los cofactores FVa y FVIIIa, que son esenciales para mantener la formación de trombina. Sin embargo, el sistema APC también participa en otras funciones biológicas importantes<sup>(12)</sup>, destacando su papel antiinflamatorio<sup>(13)</sup>, antiapoptótico<sup>(14)</sup>, profibrinolítico y citoprotector<sup>(15,16)</sup>. Precisamente, el estatus de glicosilación de la PC juega un papel determinante en su función. Así, la PC con 4 N-glicanos actúa principalmente como anticoagulante (Tabla 2), mientras que la glicofoma beta, caracterizada por carecer de N-glicosilación en Asn-329, es especialmente importante en la función citoprotectora del APC<sup>(17)</sup>.

También en la hemostasia primaria, identificamos MPT de gran importancia fisiológica. Las plaquetas interpretan las señales que reciben del exterior (señales *outside-in*) gracias a MPT como son la fosforilación/desfosforilación de proteínas (receptores de agonistas, proteínas G, etc.) y la oxidación/reducción (ácido araquidónico, prostaglandinas). Estas MPT guían pues la respuesta efectora oportuna, como es la liberación del contenido de los gránulos plaquetarios que desencadenan la adhesión, activación y agregación plaquetaria. Lo mismo ocurre, pero en sentido inverso, con la señalización del interior al exterior celular (*inside-out*). En esta ocasión, entran en juego enzimas como las proteincinasas (PK) A (PKA) o C (PKC), o la ciclooxigenasa (COX), las cuales modifican aminoácidos específicos de las proteínas dianas (receptor acoplado a proteína G, tromboxano...). Además, en este contexto, las interacciones proteína-ligando son cruciales para desencadenar la señal efectora desde la membrana celular y las MPT son elementos claves para que tengan lugar estas interacciones de forma correcta (Tabla 1). Asimismo, las glicoproteínas plaquetarias de membrana (glicoproteínas Ib/IX, Ia/IIa, VI, IIb/IIIa...) con alto contenido en O-glicanos

realizan su función de adhesión y agregación plaquetaria uniéndose a colágeno, factor de von Willebrand endotelial, fibrinógeno, entre otros ligandos, mediante interacciones proteína-proteína en las que el contenido glucídico es esencial.

### Implicaciones patológicas

De forma global, se estima que hasta un 5% de las enfermedades asociadas a mutaciones afecta de forma parcial (4%) o completamente (1%) a sitios de MPT<sup>(18)</sup>. Pero son menos los estudios que han considerado el carácter patológico de las alteraciones localizadas en genes que codifican enzimas implicadas directamente en MPT o proteínas moduladoras de la función de estas enzimas. Como podemos intuir, cambios en los reguladores de las MPT que afectan al sistema hemostático pueden fácilmente alterar su fino equilibrio, con consecuencias patológicas tanto trombóticas como hemorrágicas.

No sólo las alteraciones que eliminen MPT o generen nuevas MPT en proteínas del sistema hemostático pueden tener implicaciones patológicas. También alteraciones en la proporción o composición de MPT que experimentan las proteínas de la hemostasia pueden tener consecuencias patológicas.

Desde un punto de vista molecular, variaciones en las secuencias que determinan esas MPT en los genes codificantes de las proteínas hemostáticas pueden obviamente provocar cambios en las características finales de dichas proteínas. Pero también alteraciones en los genes o en la función de las enzimas implicadas en la formación de las propias MPT pueden generar diferencias en las proteínas hemostáticas. En este apartado veremos sólo algunos ejemplos de estas 2 situaciones.

### Trombocitopenia inmune

La trombocitopenia inmune es un desorden de sangrado causado principalmente por la existencia de autoanticuerpos contra GPIIb/IIIa y/o contra el complejo GIIb, lo que produce la destrucción de las plaquetas y la consiguiente caída en el recuento plaquetario. La importancia de una MPT en el mecanismo fisiopatológico por el que tienen lugar las trombocitopenias refractarias a terapias contra el fragmento FcγR se ha propuesto recientemente<sup>(19)</sup>. En este trabajo se demuestra, en un modelo murino, que el anticuerpo contra GPIIb induce la activación plaquetaria independiente de FcγR, provocando la translocación de la enzima neuraminidasa 1 al exterior de la membrana plasmática. Esta enzima desialila las glicoproteínas plaquetarias de membrana, lo que provoca el aclaramiento de las plaquetas a través de los receptores hepáticos de asialoproteínas, los receptores Ashwell-Morell<sup>(19)</sup>. Estos receptores reconocen glicoproteínas que han perdido el ácido siálico, el último

azúcar de la cadena oligosacárida, y son eliminadas de la circulación<sup>(19)</sup>. La importancia de este mecanismo fisiopatológico radica tanto en la búsqueda de biomarcadores diagnósticos como en el potencial terapéutico en el tratamiento de trombocitopenias refractarias, donde ya se está proponiendo el tratamiento con fármacos inhibidores de la neuraminidasa 1<sup>(19)</sup>.

### *Trastorno hemorrágico producido por deficiencia de VKORC1 o GGCX*

La deficiencia combinada de factores de la coagulación dependientes de vitamina K (VKCFD, por sus siglas en inglés) es un trastorno hemorrágico hereditario autosómico recesivo muy poco común provocado por una incorrecta activación de los factores de coagulación II, VII, IX y X<sup>(20)</sup>. Para que estos factores de la coagulación sean proteasas activas y participen en la cascada de la coagulación, necesitan  $\gamma$ -carboxilarse en residuos específicos de ácido glutámico a través de una reacción química en la que participa la vitamina K (Tabla 2)<sup>(21)</sup>. Se trata de una MPT en la que intervienen las enzimas  $\gamma$ -glutamyl carboxilasa (GGCX) y la vitamina K epóxido reductasa (VKOR). Estas enzimas están codificadas por los genes GGCX y VKORC1, respectivamente. Alteraciones en cualquiera de ambos genes en homocigosis o heterocigosis compuesta pueden llevar a una ineficaz  $\gamma$ -carboxilación y, en consecuencia, a un mal funcionamiento de la cascada de la coagulación, produciendo fundamentalmente trastornos hemorrágicos entre otras comorbilidades<sup>(22)</sup>. Estas deficiencias hereditarias son muy poco frecuentes. La suplementación con vitamina K puede ser suficiente para corregir estas situaciones.

Nuestro grupo ha descrito recientemente un interesante caso con VKCFD cuyo extraordinario mecanismo molecular tiene lugar por disomía uniparental del cromosoma 2. Así, el probando hereda en homocigosis una mutación que afecta al procesamiento del exón 2 del gen GGCX provocando la deficiencia combinada de los factores de la coagulación y generando un INR > 8 de forma permanente, al no haber respuesta a la suplementación con vitamina K. Sin embargo, el cuadro hemorrágico es muy moderado debido probablemente a la existencia de un mecanismo compensatorio.

### *Nuevo mecanismo trombofílico*

Desde el descubrimiento de la deficiencia de antitrombina, hace 50 años<sup>(23)</sup>, pocos son los nuevos factores o mecanismos trombofílicos identificados y todos con menor riesgo trombotico que la propia deficiencia de antitrombina<sup>(24-26)</sup>. La mayoría de las aproximaciones encaminadas a la búsqueda de nuevas trombofilias se han restringido directa o indirectamente a los genes que codifican alguno de los elementos del sistema hemostático.

Nuestro grupo, en la búsqueda de nuevos mecanismos trombofílicos, estudió el mecanismo molecular de una serie de 30 pacientes con deficiencia de antitrombina sin alteraciones en el gen que la codifica (SERPINC1), identificando trastornos de una MPT, la N-glicosilación, en el 27% de los casos estudiados. Este defecto no es exclusivo de la antitrombina, ya que observamos hipoglicosilación en todas las glicoproteínas hepáticas. Demostramos que la deficiente glicosilación se producía por distintos mecanismos que afectan la funcionalidad de diferentes enzimas implicadas en la ruta de la N-glicosilación (Figura 2). Dos mutaciones en uno de estos genes, mutaciones en diferentes genes o la combinación de una mutación funcional en un gen combinado con moderado alcoholismo, que también se conoce que interfiere en el proceso de N-glicosilación, producen una incapacidad de glicosilar todas las secuencias definidas en proteínas hepáticas. La hipoglicosilación en algunas proteínas tiene importantes efectos en los procesos de plegamiento y secreción, como en antitrombina, lo que provoca que las formas hipoglicosiladas no se secreten al plasma. Este nuevo mecanismo, que va más allá del gen codificante y que puede ser relativamente frecuente, justifica la deficiencia recesiva y congénito-transitoria de antitrombina y tiene importantes implicaciones diagnósticas y terapéuticas<sup>(27)</sup>.

### *Implicaciones terapéuticas*

Las implicaciones terapéuticas de las MPT en el campo de la hemostasia también son importantes y muy amplias. Quizá el ejemplo más claro, avalado por más de 50 años de uso masivo, son los anticoagulantes cumarínicos como el acenocumarol o la warfarina. Se trata de antagonistas de la vitamina K. La acción de estos anticoagulantes es la de inhibir la enzima VKORC1, impidiendo así la reducción de la vitamina K a hidroxi-quinona e interrumpiendo el reciclaje necesario de vitamina K<sup>(21)</sup>. Sin los residuos de  $\gamma$ -carboxiglutamato sintetizados con la ayuda de la vitamina K, los factores II, VII, IX y X no pueden unirse al calcio divalente, un catión necesario para su activación normal<sup>(21)</sup> disminuyendo la capacidad coagulante del sistema hemostático. La inhibición de una MPT, como es la  $\gamma$ -carboxilación, es en lo que se sustenta la principal terapia anticoagulante de nuestros días.

La terapia antiagregante es otro ejemplo del valor terapéutico de modular las MPT. En las plaquetas, el ácido araquidónico liberado de la membrana por la fosfolipasa A2 sufre la acción de la COX, dando lugar a la formación de tromboxano A2 (TxA2), un potente agonista plaquetario. Por el contrario, en la pared vascular se genera prostaciclina, que actúa como antiagregante plaquetario. La inhibición farmacológica de la COX altera el equilibrio entre ambos compuestos, lo que se

traduce en una acción antiagregante. Entre los fármacos que inhiben esta enzima se encuentran los antiinflamatorios no esteroideos, destacando entre ellos el ácido acetilsalicílico, la sulfinpirazona, el triflusal y el ditalzol. La acción antiplaquetaria del ácido acetilsalicílico se atribuye principalmente a la inhibición irreversible de la actividad de la COX por acetilación del grupo hidroxilo-serina de dicha enzima<sup>(28)</sup>. De esta forma, se interrumpe la transformación del ácido araquidónico en sus derivados ciclooxygenados, reduciéndose la producción de TxA2 y, subsiguientemente, los procesos fisiopatológicos en los que éstos están implicados.

En el campo de la aterotrombosis, otro ejemplo de terapia que tiene como diana las MPT es el empleo de estatinas. Las estatinas se usan para reducir los niveles de colesterol, pero también inhiben la isoprenilación de proteínas, lo cual conlleva efectos beneficiosos sobre la función cardiovascular<sup>(29)</sup>. Las estatinas, al inhibir la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa, reducen la producción de colesterol y, además, previenen la formación de compuestos isoprenoides no esteroideos, que actúan como acoplamiento lipídico para la modificación postraslacional de varias proteínas involucradas en diferentes procesos celulares. El bloqueo del proceso de isoprenilación por estatinas también tiene efectos biológicos sobre funciones celulares que van más allá de la disminución en la síntesis de colesterol: se relacionan principalmente con la función vascular, incluyendo la mejora de la hipertrofia y la insuficiencia cardíaca congestiva, tienen propiedades antiinflamatorias, inhiben la proliferación de células cancerígenas, son inmunomoduladores, mejoran la disfunción endotelial y reducen los daños de la isquemia-reperusión.

Por otro lado, la MPT de proteínas también es importante en los mecanismos de determinadas reacciones adversas a fármacos. Algunas drogas, o sus metabolitos, son especies reactivas capaces de unirse covalentemente a diversas proteínas y alterar su función, pudiendo producir toxicidad celular.

Por último, los avances técnicos en proteómica y espectrometría de masas hacen posible una caracterización cada vez más detallada del complejo panorama de las MPT de proteínas y de sus alteraciones en procesos patológicos<sup>(30)</sup>. Estos avances serán fundamentales para poder diseñar nuevos abordajes terapéuticos que persigan modular las MPT y, con ello, la función de proteínas importantes en los procesos fisiopatológicos.

## Conclusión y consideraciones finales

Las MPT son de gran relevancia en la biología y la fisiología celular. El concepto clásico de que un fenotipo es producido exclusivamente por el gen que codifica la proteína resulta demasiado simplista para entender la

complejidad fisiológica y patológica del sistema hemostático. Las MPT están detrás de la enorme multiplicidad y variabilidad de las funciones de las proteínas y de la vasta complejidad del proteoma, del interactoma y de la biología de sistemas. Tienen innegables implicaciones fisiológicas, patológicas y terapéuticas, y también cobran gran relevancia sus implicaciones diagnósticas. Ante la perspectiva de una información genómica masiva derivada del uso de la secuenciación masiva, no podemos perder de vista que las MPT también pueden ser causa de enfermedad y habrá que considerarlas en la búsqueda de genes candidatos que expliquen fenotipos clínicos.

Sin duda, identificar los mecanismos de control genotípico y fenotípico de las MPT nos ayudará a entender mejor la compleja fisiopatología humana, una perspectiva, aunque más compleja, mucho más real.

## Bibliografía

1. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860-921.
2. Stumpf MP, Thorne T, de Silva E, Stewart R, An HJ, Lappe M, et al. Estimating the size of the human interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 6959-64.
3. Jensen ON. Interpreting the protein language using proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 391-403.
4. Hunter T. Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting. *Curr Opin Cell Biol* 2009; 21: 140-6.
5. Ciechanover A. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 79-87.
6. Deribe YL, Pawson T, Dikic I. Post-translational modifications in signal integration. *Nat Struct Mol Biol* 2010; 17: 666-72.
7. Walsh CT. Posttranslational modification of proteins: expanding nature's inventory. Englewood: Roberts and Company Publishers; 2006.
8. Bandyopadhyay PK. Vitamin K-dependent gamma-glutamyl-carboxylation: an ancient posttranslational modification. *Vitam Horm* 2008; 78: 157-84.
9. Hansson K, Stenflo J. Post-translational modifications in proteins involved in blood coagulation. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 2633-48.
10. McCoy AJ, Pei XY, Skinner R, Abrahams JP, Carrell RW. Structure of beta-antithrombin and the effect of glycosylation on antithrombin's heparin affinity and activity. *J Mol Biol* 2003; 326: 823-33.
11. Frebelius S, Isaksson S, Swedenborg J. Thrombin inhibition by antithrombin III on the subendothelium is explained by the isoform AT beta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 1292-7.
12. Espana F, Medina P, Navarro S, Zorio E, Estelles A, Aznar J. The multifunctional protein C system. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* 2005; 3: 119-31.
13. Esmon CT. New mechanisms for vascular control of inflammation mediated by natural anticoagulant proteins. *J Exp Med* 2002; 196: 561-4.

14. Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, DeHoff B, Grinnell BW. Gene expression profile of antithrombotic protein C defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem* 2001; 276: 11199-203.
15. Fernandez JA, Xu X, Liu D, Zlokovic BV, Griffin JH. Recombinant murine-activated protein C is neuroprotective in a murine ischemic stroke model. *Blood Cells Mol Dis* 2003; 30: 271-6.
16. Shibata M, Kumar SR, Amar A, Fernandez JA, Hofman F, Griffin JH, et al. Anti-inflammatory, antithrombotic, and neuroprotective effects of activated protein C in a murine model of focal ischemic stroke. *Circulation* 2001; 103: 1799-1805.
17. Ni AF, O'Donnell JS, Johnson JA, Brown L, Gleeson EM, Smith OP, et al. Activated protein C N-linked glycans modulate cytoprotective signaling function on endothelial cells. *J Biol Chem* 2011; 286: 1323-30.
18. Li S, Iakoucheva LM, Mooney SD, Radivojac P. Loss of post-translational modification sites in disease. *Pac Symp Biocomput* 2010; 337-47.
19. Li J, van der Wal DE, Zhu G, Xu M, Yougbare I, Ma L, et al. Desialylation is a mechanism of Fc-independent platelet clearance and a therapeutic target in immune thrombocytopenia. *Nat Commun* 2015; 6: 7737.
20. Napolitano M, Mariani G, Lapcorella M. Hereditary combined deficiency of the vitamin K-dependent clotting factors. *Orphanet J Rare Dis* 2010; 5: 21.
21. Oldenburg J, Marinova M, Muller-Reible C, Watzka M. The vitamin K cycle. *Vitam Horm* 2008; 78: 35-62.
22. Watzka M, Geisen C, Scheer M, Wieland R, Wiegering V, Dorner T, et al. Bleeding and non-bleeding phenotypes in patients with GGCX gene mutations. *Thromb Res* 2014; 134: 856-65.
23. Egeberg O. Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh* 1965; 13: 516-30.
24. Germain M, Chasman DI, de HH, Tang W, Lindstrom S, Weng LC, et al. Meta-analysis of 65,734 individuals identifies TSPAN15 and SLC44A2 as two susceptibility loci for venous thromboembolism. *Am J Hum Genet* 2015; 96: 532-42.
25. Lotta LA, Tuana G, Yu J, Martinelli I, Wang M, Yu F, et al. Next-generation sequencing study finds an excess of rare, coding single-nucleotide variants of ADAMTS13 in patients with deep vein thrombosis. *J Thromb Haemost* 2013; 11: 1228-39.
26. Martinelli I, De Stefano V, Mannucci PM. Inherited risk factors for venous thromboembolism. *Nat Rev Cardiol* 2014; 11: 140-56.
27. De la Morena-Barrio ME, Martinez-Martinez I, de Cos C, Wypasek E, Roldan V, Undas A, et al. Hypoglycosylation is a common finding in antithrombin deficiency in the absence of a SERPINC1 gene defect. *J Thromb Haemost* 2016. [Epub ahead of print].
28. Roth GJ, Stanford N, Majerus PW. Acetylation of prostaglandin synthase by aspirin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; 72: 3073-6.
29. Rikitake Y, Liao JK. Rho GTPases, statins, and nitric oxide. *Circ Res* 2005; 97: 1232-5.
30. Walther TC, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. *J Cell Biol* 2010; 190: 491-500.

---

## Agradecimientos

*MEM-B disfruta de un contrato para la Formación Posdoctoral 2013, Ministerio de Economía y Competitividad, FPD1-2013-17273. Este trabajo se ha realizado gracias a financiación de los proyectos PI15/00079 y CB15/00055, del ISCIII & FEDER; 19873/GERM/15 Fundación Séneca; Sociedad Española de Hemostasia y Trombosis, y el premio GATRA de Grifols.*



---

## Leucemia aguda refractaria y en recaída: ¿cómo afrontarla?

**JAIME PÉREZ DE OTEYZA**

Servicio de Hematología. Hospital Universitario Madrid Sanchinarro. Centro Integral Oncológico Clara Campal (CIOCC). Universidad CEU San Pablo. Madrid

---

### Aproximación general al paciente con leucemia aguda refractaria o en recaída

El tratamiento de la leucemia mieloide aguda refractaria o en recaída (LMA-RR) continúa sin estar bien definido en la actualidad. Mientras que las combinaciones de antraciclina y citarabina son la piedra angular de los esquemas de inducción en primera línea, el manejo del paciente recidivado o refractario requiere una aproximación más compleja. En primer lugar, es necesario analizar la situación de partida en cuanto a los parámetros clínicos más habituales, tales como la edad, los tratamientos previos, la duración de la remisión si la hubo, la citogenética, las alteraciones moleculares y el antecedente o no de un trasplante hematopoyético previo. En la mayoría de los subtipos de LMA no promielocítica, el principal objetivo del tratamiento de rescate será servir de puente a un trasplante alogénico, al menos en los pacientes en edad de soportarlo y con un donante adecuado.

El camino a seguir puede incluir diversas estrategias teniendo en cuenta las herramientas disponibles, que van desde la quimioterapia convencional a los tratamientos dirigidos a dianas moleculares o epigenéticas, así como algunas opciones de terapia celular.

---

### Quimioterapia convencional

A pesar de los recientes avances en el diseño de medicamentos dirigidos a dianas específicas, la quimioterapia continúa teniendo un papel relevante en el rescate de los pacientes con LMA-RR. Sin embargo, en los casos primariamente refractarios puede resultar complejo o imposible encontrar un esquema adecuado. A este respecto se están desarrollando algunas herramientas que pueden ser de gran utilidad, como la plataforma VIVIA, en la que las células leucémicas del paciente se enfrentan *in vitro* a diversos agentes quimioterápicos solos o en combinación, lo que permite establecer un perfil personalizado de sensibilidad farmacológica. La plataforma VIVIA se está ensayando dentro del grupo

PEHEMA, con resultados interesantes que hacen pensar que este método podría incorporarse ya a la práctica clínica habitual. La trascendencia es enorme en el contexto de las LMA-RR, dado que podríamos evitar el uso de esquemas de tratamiento a los que el paciente no va a responder y elegir únicamente aquellos a los que es sensible<sup>(1)</sup>. A continuación, nos referiremos a los protocolos más comúnmente empleados.

### Combinaciones basadas en fludarabina

La fludarabina, en combinación con citarabina con o sin adición de idarrubicina, ha mostrado eficacia en el manejo de las LMA-RR. Bergua *et al.* han publicado recientemente los resultados del grupo PETHEMA con este esquema incluyendo un total de 259 pacientes, de los cuales 221 recibieron IDA-FLAG y 38 FLAGO, con adición de gemtuzumab. La tasa de remisiones completas (RC) o RC con recuperación hematológica incompleta (RCi) fue del 51%, con un 9% de muertes en inducción. Las variables asociadas a menor probabilidad de RC/RCi fueron la citogenética de alto riesgo al diagnóstico, la duración de la remisión previa menor de un año y la ausencia de un trasplante alogénico previo. En 60 pacientes se procedió a un trasplante alogénico en segunda RC. La mediana de supervivencia global de toda la cohorte fue de 0,7 años, con un 22% de supervivencia a los 5 años. Además, empleando las variables de citogenética, duplicación en tándem de FLT3, antecedente de trasplante alogénico previo y duración de la primera remisión, se pudo definir un índice pronóstico (índice SALFLAGE) que discriminaba 3 grupos de riesgo: favorable, intermedio y desfavorable, con supervivencias del 52, 26 y 7%, respectivamente<sup>(2)</sup>.

### Combinaciones basadas en mitoxantrona y Ara-C

Se han empleado distintas combinaciones de estos 2 fármacos añadiéndoles un tercero, en general etopósido u otros. Recientemente, Wei *et al.* han comunicado la utilidad del esquema MAC que incluye mitoxantrona, Ara-C y ciclofosfamida en 91 pacientes con LMA-

RR, que incluían 44 casos primariamente refractarios y 47 en recaída<sup>(3)</sup>. La tasa de remisiones completas fue del 74,7% en las refractarias y del 72,7% en las recaídas, con solamente 1 caso de mortalidad en toda la serie. La expectativa de supervivencia global fue del 36% a 5 años. Estos resultados son llamativos teniendo en cuenta que la ciclofosfamida es una droga poco utilizada en la LMA.

### Nuevas formulaciones de agentes quimioterápicos

El CPX-351 es un compuesto de daunoblastina y citarabina en formulación liposomal a una ratio molar de 5:1. Los estudios *in vitro* han mostrado que esta relación tiene la mayor sinergia y el menor antagonismo<sup>(4)</sup>. En un ensayo prospectivo en pacientes adultos con LMA-RR se comparó la eficacia del CPX-351 frente al esquema elegido por cada investigador. Aunque en el conjunto de la cohorte no hubo diferencias, en los pacientes pertenecientes al grupo de alto riesgo según el índice pronóstico europeo, la mediana de supervivencia global superó en 2,4 meses a la del grupo control<sup>(5)</sup>. Estos datos han llevado a la realización de un ensayo fase 3 cuyo reclutamiento ha concluido y está pendiente de publicación.

### Vosaroxin

Es un derivado de quinolona que inhibe la topoisomerasa II<sup>(4)</sup> sin generar radicales libres de oxígeno, que son los responsables de la cardiotoxicidad de las antraciclinas. En el estudio *VALOR*, un fase 3 aleatorio, los pacientes recibieron vosaroxin 90 mg/m<sup>2</sup> endovenoso los días 1 y 4 en el primer ciclo y 70 mg/m<sup>2</sup> en los siguientes, combinado con citarabina 1 g/m<sup>3</sup> endovenoso los días 1 a 5. El grupo control recibió citarabina y placebo. Se incluyeron un total de 711 pacientes, en una aleatorización 1:1. La tasa de remisiones completas fue significativamente mayor en el grupo de vosaroxin (30%) que en el grupo control (16%). La mortalidad precoz fue del 8 y el 7%, respectivamente. La mediana de supervivencia global fue de 7,5 meses en el grupo de vosaroxin frente a 6,1 meses en el grupo control. Aunque en el conjunto de la serie no se observaron diferencias, sí las hubo en el análisis estratificado por factores de riesgo como la edad y la fecha del trasplante alogénico ( $p = 0,024$ )<sup>(6)</sup>.

### Terapias epigenéticas

La 5-azacitidina es un inhibidor de la metiltransferasa de ADN que ha mostrado actividad clínica en LMA y en síndromes mielodisplásicos gracias a su capacidad de revertir el silenciamiento de vías proapoptóticas. Su *a priori* baja toxicidad ha extendido su empleo a pacien-

tes mayores y recaídas postrasplante. Así, el grupo europeo de trasplante EBMT ha publicado sus resultados del tratamiento con azacitidina en recaídas después de trasplante alogénico. En un total de 181 pacientes, la tasa de remisiones completas fue del 15% y, en este grupo, la supervivencia global a 2 años fue del 48%. Estos resultados indican que la azacitidina es de utilidad al menos en un grupo limitado de pacientes<sup>(7)</sup>.

El otro agente hipometilante aprobado para el tratamiento de la LMA es la decitabina. Si bien ya está indicado como primera línea en el paciente mayor, constituye también una opción en LMA-RR. A este respecto, Richie *et al.* analizaron la eficacia de decitabina en monoterapia en ciclos de 10 días en 102 pacientes con LMA-RR, con una tasa de remisiones completas del 15,7% y una mediana de supervivencia global de 177 días<sup>(8)</sup>. Estos datos confirman la eficacia, pero la proporción de pacientes que se benefician del tratamiento es todavía baja.

Dentro de los nuevos hipometilantes, la guadecitabina (SGI-110) es un dinucleótido de decitabina y desoxiguanosina que incrementa la exposición *in vivo* a la decitabina al protegerla de la desaminación. Actualmente, se está ensayando en fase 3 (NCT02348489) y será preciso esperar a los datos finales del estudio.

## Anticuerpos e inmunotoxinas

### SGN-CD33A

El antígeno CD33 se expresa en aproximadamente un 90% de las LMA, lo que lo convierte en una diana terapéutica idónea, independientemente del estado mutacional, la edad o las terapias previas. Gemtuzumab ozogamicina es una inmunotoxina de especificidad CD33 que ha sido ampliamente utilizada en las LMA-RR, si bien su comercialización se ha interrumpido en la actualidad.

Recientemente, se ha desarrollado el SGN-CD33A, que es un anticuerpo monoclonal de especificidad CD33, conjugado con 2 moléculas de una pyrrolonbenzodiazepina (PDB). Tras unirse al antígeno, SGN-CD33A se internaliza y es transportado a los lisosomas, donde el PDB se libera por escisión proteolítica, se incorpora al ADN y lleva a la muerte celular. En un ensayo fase 1 en monoterapia, Stein *et al.* incluyeron un total de 87 pacientes con LMA-RR o que habían rechazado quimioterapia en primera línea. La dosis terapéutica establecida fue de 40 µg/kg y, de los 21 casos que la recibieron, 7 (33%) alcanzaron RC o RCi, lo que sugiere que se trata de un medicamento interesante para ser utilizado en combinación con quimioterapia<sup>(9)</sup>.

## Dianas moleculares

La identificación de patrones mutacionales característicos en las LMA ha llevado al desarrollo de terapias dirigidas a dianas moleculares específicas.

### FLT-3

La duplicación interna en tándem de FLT-3 se detecta en un 30% de las LMA al diagnóstico y su presencia confiere un pronóstico adverso, por lo que se ha considerado una diana de importancia prioritaria, siendo numerosos los fármacos actualmente en ensayo.

### Midostaurin

Es la primera terapia dirigida que ha mostrado eficacia en LMA-RR no promielocítica. Los resultados iniciales han llevado a emplearlo ya en primera línea. Recientemente, en un estudio fase 3 con 717 pacientes, se ha demostrado que la adición de midostaurin a un esquema clásico de inducción con daunorubicina y Ara-C mejora significativamente la supervivencia libre de eventos y la supervivencia global<sup>(10)</sup>.

### Quizartinib

Antes conocido como AC220, el quizartinib es un inhibidor de segunda generación altamente selectivo para FLT-3. Varios ensayos fase 2 han mostrado una alta tasa de RC en pacientes con LMA-RR. Asimismo, comparando con controles históricos, Hills *et al.* han reportado que el quizartinib mejora significativamente la supervivencia global en pacientes con LMA-RR FLT-3 ITD positivos<sup>(11)</sup>.

### Crenolanib

Este inhibidor tiene actividad frente a la mutación D835 que se encuentra en el asa de activación del FLT-3 y puede soslayar la resistencia a quizartinib. En un estudio fase 2 en pacientes con LMA-RR que expresaban mutaciones de FLT-3, el crenolanib obtuvo un 23% de RCi en los casos que no habían recibido terapias anti-FLT-3 previamente y un 5% en casos previamente tratados con otros anti-FLT-3<sup>(12)</sup>.

### Gilteritinib

Previamente conocido como ASP2215, este potente inhibidor de FLT-3 ha mostrado su eficacia en un ensayo fase 1-2 que incluía un total de 215 pacientes con LMA-RR. La tasa global de respuestas fue del 60% entre completas y parciales, en los casos con FLT-3-ITD. Por este motivo, se ha iniciado ya un ensayo fase 3<sup>(13)</sup>.

## IDH2

AG-221 es un inhibidor selectivo de la enzima isocitratodeshidrogenasa-2 mutante (mIDH2), con actividad por vía oral. Considerando que IDH está mutado en una proporción de pacientes con cariotipo normal y que les confiere un pronóstico adverso, este inhibidor puede jugar un papel importante, si bien hasta la fecha solamente se han comunicado resultados preliminares de estudios fase 1<sup>(14)</sup>.

## Conclusiones

En conclusión, el tratamiento de la LMA-RR continúa suponiendo un enorme reto para el médico clínico. Si bien las nuevas terapias dirigidas están aportando algunas mejoras a la quimioterapia clásica, las tasas de respuestas y las expectativas de supervivencia de estos pacientes son todavía muy limitadas, por lo que sería recomendable incluirlos en ensayos clínicos.

## Bibliografía

1. Bennett T, Montesinos P, Moscardó F, Martínez-Cuadrón D, Martínez J, Sierra J, et al. Pharmacological profiles of acute myeloid leukemia treatments in patient samples by automated flow cytometry: a bridge to individualized medicine. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2014; 14 (4): 305-18.
2. Bergua JM, Montesinos P, Martínez-Cuadrón D, Fernández-Abellán P, Serrano J, Sayas MJ, et al. A prognostic model for survival after salvage treatment with FLAG-Ida +/- gemtuzumab-ozogamicine in adult patients with refractory/relapsed acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2016. [Epub ahead of print].
3. Wei S, Mi Y, Wei H, Lin D, Liu K, Gong B, et al. Cyclophosphamide combined with mitoxantrone and cytarabine is an effective salvage regimen for patients with acute myeloid leukemia who experienced primary induction failure or relapse. *Mol Clin Oncol* 2016; 4: 285-89.
4. Stein EM, Tallman MS. Emerging therapeutic drugs for AML. *Blood* 2016; 127 (1): 71-8.
5. Cortes JE, Goldberg SL, Feldman EJ, Rizzeri DA, Hogge DE, Larson M, et al. Phase II, multicenter, randomized trial of CPX-351 (cytarabine:daunorubicin) liposome injection versus intensive salvage therapy in adults with first relapse AML. *Cancer* 2015; 121 (2): 234-42.
6. Ravandi F, Ritchie EK, Sayar H, Lancet JE, Craig MD, Vey N, et al. Vosaroxin plus cytarabine versus placebo plus cytarabine in patients with first relapsed or refractory acute myeloid leukaemia (VALOR): a randomised, controlled, double-blind, multinational, phase 3 study. *Lancet Oncol* 2015; 16 (9): 1025-36.
7. Craddock C, Labopin M, Robin M, Finke J, Chevallier P, Yakoub-Agha I, et al. Clinical activity of azacitidine in patients who relapse after allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2016; 101 (7): 879-83.

8. Ritchie EK, Feldman EJ, Christos PJ, Rohan SD, Lagassa CB, Ippoliti C, et al. Decitabine in patients with newly diagnosed and relapsed acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2013; 54 (9): 2003-07.
9. Stein AS, Walter RB, Erba HP, Fathi AT, Advani AS, Lancet JE, et al. A phase 1 trial of SGN-CD33A as monotherapy in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia. *Blood* 2015; 126 (23): abstract 0324.
10. Stone RM, Mandrekar S, Sanford BL, Geyer S, Bloomfield CD, Dohner K, et al. The multi-kinase inhibitor midostaurin (M) prolongs survival compared with placebo (P) in combination with daunorubicin (D)/cytarabine (C) induction (ind), high-dose C consolidation (consol), and as maintenance (maint) therapy in newly diagnosed acute myeloid leukemia (AML) patients (pts) age 18-60 with FLT3 mutations (muts): an international prospective randomized (rand) P-controlled double-blind trial (CALGB 10603/RATIFY [Alliance]). Oral presentation at: 57th American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting & Exposition; December 5-8, 2015; Orlando, FL.
11. Hills RK, Gammon G, Trone D, Burnett AK. Quizartinib significantly improves overall survival in FLT3-ITD positive AML patients relapsed after stem cell transplantation or after failure of salvage chemotherapy: a comparison with historical AML database. *Blood* 2015; 126: 2557.
12. Randhawa JK, Kantarjian HM, Borthakur G, et al. Results of a phase II study of crenolanib in relapsed/refractory acute myeloid leukemia patients (Pts) with activating FLT3 mutations [abstract]. *Blood* 2014; 124 (21): abstract 389.
13. Altman JK, Perl AE, Cortes JE, Levis MJ, Smith CC, Litzow MR, et al. Antileukemic activity and tolerability of ASP2215 80 mg and greater in FLT3 mutation-positive subjects with relapsed or refractory acute myeloid leukemia: results from a phase 1-2, open-label, dose-escalation/dose-response study. *Blood* 2015; 126: 321.
14. Naeem K, Hills RK, Virgo P, Couzens S, Clark N, Gilkes A, et al. Safety and efficacy of AG-221, a potent inhibitor of mutant IDH2 that promotes differentiation of myeloid cells in patients with advanced hematologic malignancies: results of a phase 1/2 trial. *Blood* 2015; 126: 320.

---

## Inmunoterapia de las hemopatías malignas: de los monoclonales a las células CART

JAVIER BRIONES

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

El desarrollo de anticuerpos monoclonales ha tenido un impacto extraordinario en el tratamiento de pacientes con neoplasias hematológicas, que se ha traducido no sólo en un aumento de la tasa de respuestas sino también de la supervivencia. Desde el primer anticuerpo utilizado en la clínica en pacientes con linfoma no-Hodgkin (LNH), rituximab, a finales de los años noventa, se han desarrollado numerosos anticuerpos para linfoma (no-Hodgkin y Hodgkin), mieloma (MM) y leucemia aguda mieloblástica (LAM) y linfoblástica (LAL). En la mayoría de los casos, el impacto clínico de estos tratamientos ha sido relevante, con aumento de las respuestas completas (RC) y en ocasiones de la supervivencia. Si bien estos anticuerpos poseen una diana terapéutica diferente, todos ellos se caracterizan por estar dirigidos contra antígenos expresados en la célula tumoral.

Muy recientemente se ha producido un cambio de concepto en el tratamiento inmunoterápico del cáncer. Además de anticuerpos dirigidos contra células tumorales, recientemente ha cobrado enorme importancia el desarrollo de anticuerpos dirigidos frente a células del microambiente tumoral, en especial las células efectoras T y NK. El concepto clave se basa en la estimulación *in vivo* del sistema inmune para potenciar su efecto antitumoral. El efecto final antitumoral de las células T depende de una regulación compleja entre procesos de estimulación e inhibición de la función de dichas células. Es bien conocido que las células T en pacientes con cáncer muestran una disfunción en la coestimulación, así como tendencia a la inhibición o “agotamiento” como consecuencia de la expresión en dichas células de moléculas inhibitoras y de sus ligandos en las células tumorales.

---

### Inmunoterapia con anticuerpos estimuladores de células T y NK

En los últimos años se han desarrollado anticuerpos agonistas de moléculas coestimuladoras y anticuerpos antagonistas de moléculas inhibitoras de células T. Estudios en modelos preclínicos de neoplasias hema-

tológicas han mostrado que la administración de anticuerpos estimuladores o anticuerpos bloqueantes de moléculas inhibitoras produce una estimulación de la respuesta inmune capaz de eliminar las células tumorales sin necesidad de la utilización de quimioterapia. En la actualidad se están desarrollando numerosos ensayos clínicos en distintas neoplasias hematológicas con fármacos dirigidos frente a diferentes moléculas coestimuladoras e inhibitoras de células T y NK.

Entre las moléculas coestimuladoras en las células T destacan 4-1BB (CD137), OX40, CD40 y CD27, todas ellas pertenecientes a la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF). 4-1BB se expresa en células T (principalmente CD8+) y NK activadas<sup>(1)</sup>. En la actualidad se están desarrollando ensayos clínicos con anti-CD137 (urelumab) en pacientes con distintos tipos de LNH, bien en monoterapia o en combinación con rituximab, dada la sinergia en la activación de ADCC en las células NK. OX40 se expresa en linfocitos T CD4+ y CD8+ y células T reguladoras (T<sub>regs</sub>). Estudios preclínicos han demostrado que la administración de anticuerpos agonistas de OX40 potencian la inmunidad antitumoral a través de la estimulación de células T efectoras y la eliminación de células T<sub>regs</sub> inmunosupresoras y su efecto antitumoral se está ensayando en pacientes con cáncer. CD27 es una molécula coestimuladora expresada en células T, B y NK involucrada en la potenciación de la inmunidad antitumoral, tras interacción con su ligando, CD70, expresado en células presentadoras de antígenos. La administración de anti-CD27 (varlilumab) aumenta significativamente la ADCC en modelos de linfoma y su efecto antitumoral se está estudiando actualmente en pacientes con LNH de células B y T. Por otra parte, se están desarrollando anticuerpos que potencian el efecto citolítico de las células NK, a través de anticuerpos bloqueantes de receptores inhibitorios (KIR) o agonistas de receptores estimuladores (NKG2D). En concreto, se están llevando a cabo estudios con anticuerpos anti-KIR en pacientes con MM y LAM.

El conocimiento de los receptores inhibitorios en las células T (denominados en inglés *checkpoint*) y su implicación en la disfunción del sistema inmune en pacientes

con cáncer ha contribuido a uno de los avances clínicos de mayor impacto en el tratamiento de pacientes con neoplasias hematológicas. CTLA-4 y PD-1 son los 2 receptores más estudiados en la inhibición de las células T y, entre éstos, PD-1 está siendo objeto de un enorme número de estudios clínicos. PD-1 se expresa en células T una vez activadas e interacciona con los ligandos PDL1, expresado en numerosos tipos celulares (hematopoyéticos y epiteliales), y PDL2, expresado casi exclusivamente en células dendríticas. La interacción de PD1 con su ligando produce una disfunción de la células T caracterizada por la reducción de su capacidad proliferativa y función efectora (producción de citocinas y citolisis)<sup>(2)</sup>.

Si bien los primeros avances sobre el efecto de anticuerpos inhibidores de moléculas *checkpoint* se describieron en pacientes con tumores sólidos (por ejemplo, CTLA4 y melanoma), el impacto en pacientes con neoplasias hematológicas es considerable, con el desarrollo de numerosos ensayos clínicos en prácticamente todas las patologías. La interacción PD1/L1 es compleja y la expresión de ambas moléculas puede producirse tanto en células tumorales como en células del microambiente tumoral (células T y células mieloides). Además, la expresión de PDL1 en las células tumorales es dinámica y puede cambiar dependiendo de la exposición a citocinas en el ambiente (por ejemplo, interferón gamma). La expresión de PDL1 en neoplasias hematológicas es heterogénea, con una gran variabilidad entre estudios y pacientes<sup>(3)</sup>. En lo que se refiere al linfoma, la mayor expresión de PDL1 se observa en el Hodgkin clásico (alrededor de un 85% de los casos), mientras que es más heterogénea en el LNH. En el linfoma difuso de células grandes B (LDCGB), PDL1 parece expresarse sobre todo en el subtipo no centro germinal y en aquellos casos asociados al virus de Epstein-Barr. Sin embargo, no se ha detectado expresión de PDL1 en el linfoma folicular (LF) y los datos en el linfoma de células del manto son contradictorios. El linfoma T, en general, no expresa PDL1, a excepción de los originados a partir de células NK y el anaplásico de células grandes. En lo referido a otras neoplasias hematológicas, se observa expresión de PD1/L1 en las células tumorales y del microambiente en pacientes con MM, mientras que neoplasias mieloides como la mielodisplasia (SMD) y el LAM también poseen expresión de PDL1.

Hasta la fecha, los datos de eficacia más relevantes se han descrito en pacientes con Hodgkin clásico (en recidiva o refractarios), en los que el tratamiento en monoterapia con anti-PD1 (nivolumab y pembrolizumab) dio lugar a una tasa de respuestas del 87-65% con RC del 17-21%<sup>(4)</sup>. En pacientes con LDCGB y LF se han descrito respuestas del 36 y el 40%, respectivamente, si bien estos datos son muy preliminares y se requieren más estudios para conocer la eficacia real de estos agen-

tes y qué pacientes/subtipos de linfoma tienen mayor probabilidad de respuesta. Con respecto al MM, a pesar de las implicaciones biológicas de PD1/L1 en las células tumorales y del microambiente, los resultados hasta la fecha han sido decepcionantes. Se están desarrollando ensayos en pacientes con SMD y LAM, si bien los resultados no se han publicado.

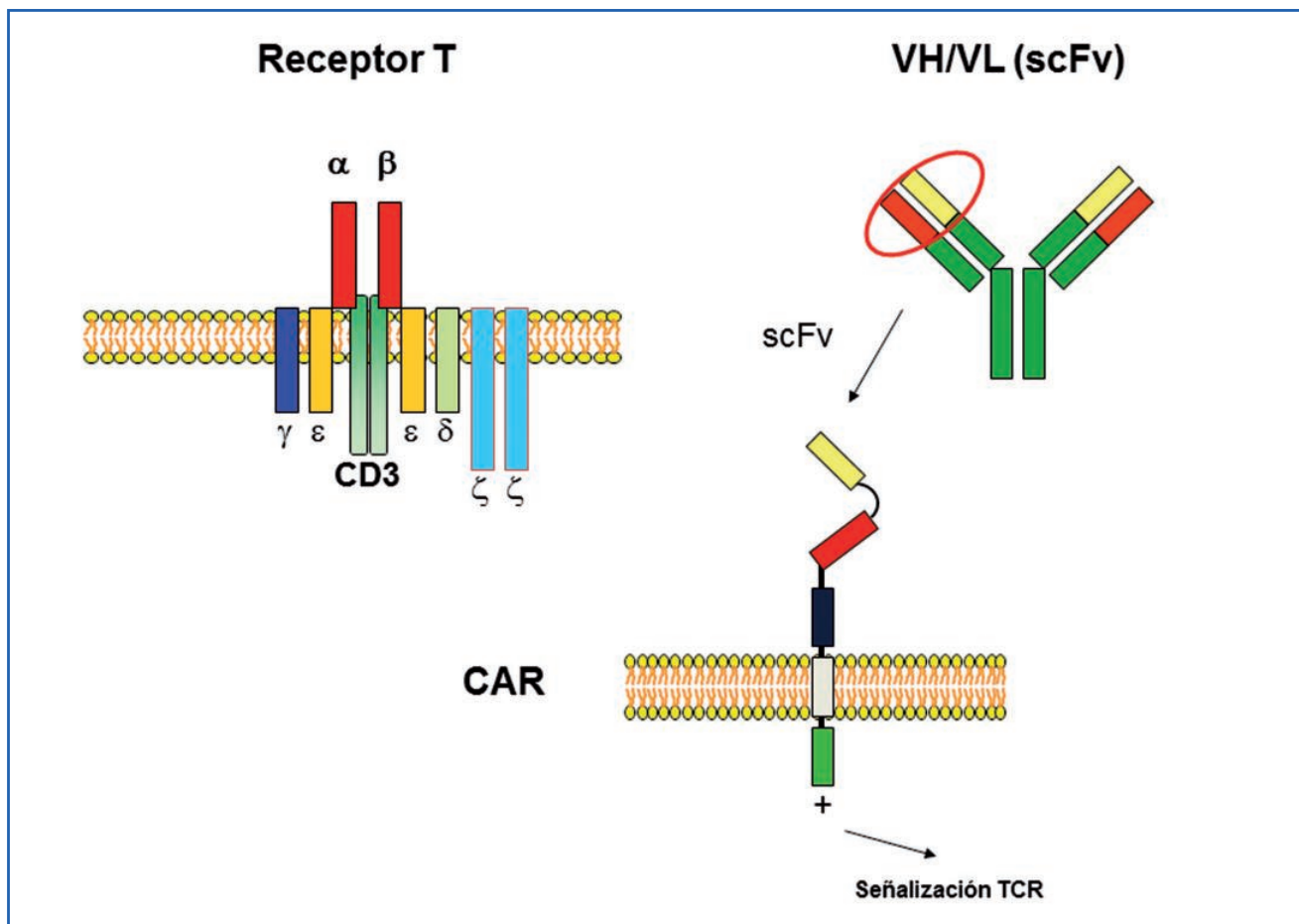
La introducción de estos agentes, aun estando en su fase inicial, está revolucionando el tratamiento de pacientes con neoplasias hematológicas. En la actualidad se han descrito al menos 6 moléculas nuevas inhibidoras de células T, para las cuales se están desarrollando anticuerpos antagonistas (por ejemplo, LAG3, TIM3, BTLA)<sup>(5)</sup>. Ello permitirá la combinación de diferentes anticuerpos inhibidores de moléculas *checkpoint*, lo que se espera se traduzca en un mayor efecto antitumoral. Por otra parte, hay varios estudios que están analizando la combinación de anticuerpos inhibidores de *checkpoint* con anticuerpos agonistas de células T y, a su vez, la posibilidad de combinarlos con agentes quimioterápicos convencionales.

Un nuevo concepto en el diseño de anticuerpos ha sido el desarrollo de anticuerpos biespecíficos, dirigidos por una parte hacia una molécula expresada en la célula tumoral y por otra hacia el receptor CD3 de la célula T. El paradigma de este tipo de fármacos –denominados BiTE–, en el contexto de neoplasias hematológicas es blinatumomab, dirigido frente a CD19<sup>(6)</sup>. La interacción simultánea con CD19, en la célula tumoral, y CD3 produce una activación de la célula T próxima a la célula tumoral que da lugar a la liberación de gránulos citotóxicos y lisis tumoral. Blinatumomab se ha ensayado en pacientes con LAL Ph– en recidiva con excelentes resultados, 42% RC (la mayoría con enfermedad mínima residual negativa), datos que dieron lugar a su aprobación por la Food and Drug Administration (FDA) en los Estados Unidos<sup>(7)</sup>. Los estudios con blinatumomab se han extendido a pacientes con diversos LNH y, en concreto, pacientes con LDCGB en recidiva han mostrado una respuesta global del 43% (19% RC) tras un solo ciclo<sup>(8)</sup>. Este concepto de anticuerpos BiTE se ha extendido a otros antígenos, como CD33 para el tratamiento de LAM.

---

## Inmunoterapia adoptiva con células T

La inmunoterapia adoptiva con células T (IAT) ha sido objeto de investigación desde hace más de 20 años. Si bien la administración de linfocitos T infiltrantes del tumor (TIL) ha tenido un éxito limitado, los recientes avances en la identificación de subtipos de células T y el desarrollo de métodos eficientes para su expansión y modificación genética han revolucionado el campo de la inmunoterapia, con implicaciones clínicas extraordina-



**Figura 1.** Diseño de la estructura básica de un CAR (1.ª generación). Un anticuerpo monoclonal, en formato de región variable de cadena única (scFv), se une a un dominio de señalización intracelular (cadena  $\zeta$ ) del complejo CD3. A este dominio se pueden unir secuencias coestimuladoras (CD28, 4-1BB) para conformar un CAR de 2.ª o 3.ª generación.

rias. La inmunoterapia con TIL consiste en el aislamiento de células T a partir de la biopsia tumoral y su expansión, *ex vivo*, mediante citocinas como IL-2, para enriquecer el producto en células antígeno-específicas y, posteriormente, su administración al paciente. Aunque este procedimiento se utiliza en el tratamiento de ciertos tumores sólidos (en especial el melanoma), la complejidad y laboriosidad del procedimiento ha impedido su aplicación de forma frecuente en la clínica. Recientemente se han utilizado linfocitos infiltrantes de la médula ósea (MIL) en pacientes con MM<sup>(9)</sup>. Si bien los resultados son prometedores (32% RC), es pronto para evaluar la eficacia real de este procedimiento, dado que en el mencionado estudio todos los pacientes habían recibido previamente un trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (TASP) acondicionado con melfalán a dosis altas.

Otra variante de la IAT consiste en la modificación genética de dichas células con receptores T antígeno-específicos. En los últimos años, se han desarrollado estrategias de terapia génica que permiten modificar las células T con receptores T antígeno-específicos. Estas

técnicas tienen claras ventajas sobre el aislamiento directo de linfocitos T específicos antitumorales. Sin embargo, la transferencia de los genes de un receptor T, con una especificidad determinada, a linfocitos T presenta serias limitaciones metodológicas que impiden su aplicación clínica a pacientes con cáncer.

Para evitar estos problemas, se ha desarrollado un procedimiento de inmunoterapia con células T mediante su modificación genética con receptores quiméricos antígeno-específicos (ampliamente conocidos con el acrónimo anglosajón CAR)<sup>(10)</sup>. Un CAR está constituido por un anticuerpo monoclonal, que reconoce un antígeno, unido al dominio de señalización intracelular de la cadena  $\zeta$  del complejo CD3 (Figura 1). Las células T transducidas con un CAR tienen ventajas muy claras sobre el uso de células T transducidas con un receptor T: 1) reconocimiento de la célula tumoral independiente del HLA del paciente; 2) se pueden generar contra cualquier molécula (proteína, glicolípido o carbohidratos) para la que haya un anticuerpo disponible, aumentando la versatilidad del sistema; y 3) la metodología de este sistema permite la

generación de células T antígeno-específicas en un periodo de tiempo muy inferior al que se necesita cuando se utilizan los procedimientos previamente descritos para generar células T antígeno-específicas, lo cual facilita su aplicabilidad clínica. Si bien el primer diseño de un CAR (1.ª generación), hace más de 15 años, se basaba exclusivamente en la señalización a través de CD3 y su eficacia clínica fue muy pobre, en los últimos años se ha mejorado la generación de CAR (2.ª generación) con la incorporación de moléculas coestimuladoras (como CD28 o 4-1BB), de forma que las células T tienen una mayor capacidad de activación, proliferación supervivencia y efecto antitumoral. En la actualidad se están diseñando CAR de 3.ª generación que incluyen 2 dominios coestimuladores o citocinas que aumentan la función efectora de las células T modificadas, así como CAR con doble especificidad antigénica o CAR duales, que incluyen dominios estimuladores e inhibidores para evitar la toxicidad secundaria al reconocimiento de la diana expresada en células no tumorales<sup>(11)</sup>.

En la clínica, el mayor impacto hasta la fecha se ha obtenido con CAR dirigidos frente a CD19. En pacientes con LAL-B (pediátricos y adultos), la administración de una sola dosis de células T-CAR19 dio lugar a un 75-90% de RC incluyendo pacientes con enfermedad mínima residual negativa; algunos de estos pacientes continúan en remisión completa sin ningún tratamiento posterior más allá de 1 año tras el tratamiento<sup>(12)</sup>. Las principales complicaciones consisten en el desarrollo de un síndrome de liberación de citocinas (en la mayoría de los pacientes que responden) y trastornos neurológicos (encefalopatía, afasia, disartria), similar a los descritos en pacientes que reciben blinatumomab. La extraordinaria experiencia obtenida en pacientes con LAL-B ha llevado a la aplicación de IAT con CAR19 en pacientes con otras neoplasias linfoides. Así, pacientes con LDCGB (incluyendo primario mediastínico) en recidiva/refractarios, tras una mediana de 3 tratamientos previos, tuvieron una RC del 50% tras la infusión de CAR19<sup>(13)</sup>. Resultados prometedores se han obtenido también en estudios preliminares en pacientes con linfoma folicular y de células del manto. En pacientes con LLC, en recidiva o refractarios a combinaciones con fludarabina e ibrutinib, se ha logrado una tasa de RC del 25%.

Estos resultados han generado enormes expectativas en el tratamiento de neoplasias hematológicas, lo que ha llevado al desarrollo de CAR dirigidos frente otros antígenos. En concreto, actualmente se están llevando a cabo ensayos en pacientes con MM con CAR dirigidos frente a CS-1, BCMA y CD138, en pacientes con LAM (CAR frente a CD33 y CD123), Hodgkin (CD30), y LNH (CD22, ROR1)<sup>(14)</sup>. Estos estudios permitirán conocer la eficacia real de este procedimiento, así como sus complicaciones y el tratamiento de las mismas.

En resumen, los avances obtenidos en los últimos 5 años en el campo de la inmunología antitumoral han permitido colocar a la inmunoterapia en primera línea en el tratamiento de neoplasias hematológicas, lo cual supone un cambio radical en el diseño de los tratamientos, dirigidos hacia las células del sistema inmune en vez de las propias células tumorales.

## Bibliografía

- Chester C, Marabelle A, Houot R, Kohrt HE. Dual antibody therapy to harness the innate anti-tumor immune response to enhance antibody targeting of tumors. *Curr Opin Immunol* 2015; 33: 1-8.
- Ostrand-Rosenberg S, Horn LA, Haile ST. The programmed death-1 immune-suppressive pathway: barrier to antitumor immunity. *J Immunol* 2014; 193: 3835-41.
- Hawkes EA, Grigg A, Chong G. Programmed cell death-1 inhibition in lymphoma. *Lancet Oncol* 2015; 16: 234-45.
- Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, Halwani A, Scott EC, Gutierrez M, et al. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 2015; 372: 311-9.
- Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell* 2015; 27: 450-61.
- Goebeler ME, Bargou R. Blinatumomab: a CD19/CD3 bispecific T cell engager (BiTE) with unique anti-tumor efficacy. *Leuk Lymphoma* 2016; 57: 1021-32.
- Topp MS, Gökbuget N, Zugmaier G, Klappers P, Stelljes M, Neumann S, et al. Phase II trial of the anti-CD19 bispecific T cell-engager blinatumomab shows hematologic and molecular remissions in patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2014; 32: 4134-4.
- Viardot A, Goebeler ME, Hess G, Neumann S, Pfreundschuh M, Adrian N, et al. Phase 2 study of the bispecific T-cell engager (BiTE) antibody blinatumomab in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2016; 127: 1410-6.
- Noonan KA, Huff CA, Davis J, Lemas MV, Fiorino S, Bitzan J, et al. Adoptive transfer of activated marrow-infiltrating lymphocytes induces measurable antitumor immunity in the bone marrow in multiple myeloma. *Sci Transl Med* 2015; 7: 288ra78.
- Brenner MK. Gene-modified cells for stem cell transplantation and cancer therapy. *Hum Gene Ther* 2014; 25: 563-9.
- Gill S, June CH. Going viral: chimeric antigen receptor T-cell therapy for hematological malignancies. *Immunol Rev* 2015; 263: 68-8.
- Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med* 2014; 371: 1507-17.
- Kochenderfer JN, Dudley ME, Kassim SH, Somerville RP, Carpenter RO, Stetler-Stevenson M, et al. Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *J Clin Oncol* 2015; 33: 540-9.
- Jackson HJ, Rafiq S, Brentjens RJ. Driving CAR T-cells forward. *Nat Rev Clin Oncol* 2016; 13 (6): 370-83.



---

## Complicaciones tardías del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos: ¿qué debemos recordar?

ILDEFONSO ESPIGADO TOCINO

Servicio de Hematología Clínica. Programa de Trasplante Hematopoyético.  
Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla

---

### Objetivos de aprendizaje

1. Reconocer las complicaciones más frecuentes a largo plazo de los supervivientes del trasplante hematopoyético.
2. Identificar los grupos de riesgo para dichas complicaciones.
3. Resumir las recomendaciones de seguimiento actuales.

---

### Introducción

El trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas (A-TPH) es una opción terapéutica establecida para diversas enfermedades hematológicas. En las últimas décadas los resultados clínicos del trasplante hematopoyético han mejorado en términos de curación y supervivencia debido fundamentalmente al perfeccionamiento de las técnicas de determinación de HLA, mejores cuidados de soporte y avances en la prevención y el tratamiento de sus complicaciones. Como consecuencia, existe un número creciente de supervivientes a largo plazo que requieren cuidados especializados y adaptados.

El 80% de los receptores de un A-TPH que sobreviven a los primeros 2 años tras el trasplante se convierten en supervivientes a largo plazo<sup>(1)</sup>. Sin embargo, tienen riesgo de desarrollar complicaciones tardías tales como compromiso cardiopulmonar, desórdenes musculoesqueléticos, endocrinopatías y neoplasias secundarias, entre otras. La magnitud del riesgo de estas complicaciones está influida fundamentalmente por las exposiciones terapéuticas previas al A-TPH, el tratamiento de acondicionamiento del trasplante y el desarrollo y manejo de la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH). En un estudio<sup>(1)</sup> de 1.479 pacientes que habían sobrevivido al menos 2 años tras el trasplante alogénico, con un seguimiento mediano de 9,5 años, la causa más frecuente de fallecimiento fue la recidiva de la enfermedad primaria (29%), que ocurrió mayoritariamente entre el segundo y quinto año postrasplante (67%). Las causas de mortalidad no relacionadas con la recaída

fueron la EICH crónica (EICH-c) (22%), la infección tardía en ausencia de EICH (11%), una enfermedad maligna secundaria (7%), complicaciones pulmonares (5%), toxicidad cardíaca (2%), otros eventos relacionados con el tratamiento (8%) y causas no relacionadas con el trasplante (3%). Las toxicidades tardías no malignas múltiples son frecuentes en los supervivientes de alotrasplantes.

El factor más importante que determina cómo ha de ser el cuidado y el seguimiento a largo plazo es el hecho de que el paciente sufra o no EICH-c. La EICH-c y su tratamiento ponen al paciente en situación de alto riesgo de complicaciones infecciosas, oculares, dermatológicas, hepáticas, gastrointestinales y pulmonares. Estas complicaciones son mucho menos frecuentes, aunque pueden ocurrir, en pacientes sin EICH-c.

La incidencia acumulada de alteraciones crónicas de salud entre los supervivientes tras un A-TPH es del 64% a 10 años y del 71% a 15 años y las complicaciones crónicas severas o amenazantes de la vida tienen una incidencia acumulada próxima al 40% a los 10 años postrasplante<sup>(1)</sup>.

Varios estudios confirman que los niños supervivientes de un alotrasplante tienen tasas similares a los adultos de complicaciones a largo plazo como pulmonares, hipertensión, alteraciones neurosensoriales y diabetes. No obstante, existen aspectos singulares de los supervivientes pediátricos que requieren atención en centros especializados, tales como el crecimiento físico y psiconeurosocial y el efecto psicológico de una enfermedad prolongada en los niños<sup>(2)</sup>.

Esta alta incidencia de morbimortalidad ha propiciado el desarrollo de guías de seguimiento estandarizado para los receptores de A-TPH de alto riesgo. Por tanto, es trascendente identificar aquellos pacientes con un riesgo aumentado para determinadas complicaciones por sus características clínicas o sus exposiciones terapéuticas y conocer e implementar las recomendaciones actuales de monitorización y seguimiento con el objetivo de la detección precoz y el manejo apropiado de las mismas. Adicionalmente, el reconocimiento de la dimensión del problema permitiría a las autoridades

**Tabla 1. Enfermedad cardiovascular**

Factores de riesgo	Complicaciones	Actuaciones
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Hipertensión arterial previa</li> <li>· Dislipemia previa</li> <li>· Diabetes previa</li> <li>· Obesidad previa</li> <li>· Consumo de tabaco previo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Muerte de origen cardiovascular</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Determinación y control de tensión arterial</li> <li>· Nutrición saludable</li> <li>· Control de la diabetes y dislipemias</li> <li>· Control de obesidad</li> <li>· Deshabitación de tabaco</li> <li>· Ejercicio físico</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Antraciclínicos</li> <li>· Ciclofosfamida</li> <li>· Radiación torácica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Enfermedad cardíaca (isquemia, miocardiopatía, insuficiencia cardíaca, arritmias)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Pruebas a pacientes con varios factores de riesgo: electrocardiograma, ecocardiograma, prueba de esfuerzo</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Enfermedad de injerto contra huésped</li> <li>· Inhibidores de calcineurina</li> <li>· Corticosteroides</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Accidente cerebrovascular</li> <li>· Diabetes</li> <li>· Dislipemia</li> <li>· Síndrome metabólico</li> <li>· Enfermedad renal</li> <li>· Hipertensión arterial</li> </ul>	

sanitarias proveer los recursos necesarios para el seguimiento a largo plazo de esta población vulnerable.

## Enfermedad cardiovascular

Los receptores de un A-TPH tienen un riesgo incrementado de complicaciones cardiovasculares, incluyendo enfermedad arterial (enfermedad cerebrovascular y enfermedad arterial coronaria) y miocardiopatía (Tabla 1). Estas complicaciones se presentan más precozmente que en la población general y, además, estos pacientes tienen doble riesgo de muerte cardiovascular que la población general<sup>(1)</sup>. Así, la edad mediana de presentación de un primer infarto miocárdico es de 53 años, mientras que en la población general es de 67 años<sup>(3)</sup>. La enfermedad arterial es debida primariamente a la arterioesclerosis acelerada atribuida a la irradiación previa, junto a la existencia de factores de riesgo cardiovascular (hipertensión, diabetes y dislipemia)<sup>(4)</sup>. En receptores de A-TPH el riesgo de que se asocien varios factores de riesgo cardiovascular se aproxima al 40% y está asociado al uso de corticoides e inhibidores de calcineurina<sup>(3)</sup>. El fallo clínico cardíaco tardío es primariamente debido a la exposición pretrasplante a antraciclínicos<sup>(5)</sup> y puede ser anticipado mediante la evaluación de la función diastólica pretrasplante<sup>(6)</sup>.

### Recomendaciones de screening, detección precoz y prevención (Tabla 1)

A los pacientes expuestos a antraciclínicos antes de alo-trasplante se les deben realizar ecocardiogramas seriados cada 1-5 años según la dosis acumulada de antraciclínicos, la edad de exposición y la radiación mediastínica concomitante. Los estilos de vida cardiosaludables deben ser recomendados para todos los supervivientes,

incluyendo un programa de ejercicio regular, recomendaciones nutricionales, *screening* y manejo agresivo de dislipemia, hipertensión y diabetes.

## Complicaciones pulmonares tardías

El síndrome de bronquiolitis obliterante, la neumonía organizativa criptogénica y el síndrome de neumonía idiopática aparecen entre los 3 meses y los 2 años post-trasplante y se relacionan estrechamente con la EICH crónica extensa<sup>(7)</sup> (Tabla 2). La incidencia acumulada global es del 10% a 2 años.

### Recomendaciones de screening, detección precoz y prevención (Tabla 2)

Es importante la evaluación precoz de síntomas como tos o disnea. Se deben realizar test de función pulmonar cada 3 meses durante el primer año post-trasplante. Esta estrategia permite identificar aquellos pacientes que puedan desarrollar un síndrome de bronquiolitis obliterante durante el periodo de disminución de la inmunosupresión, permitiendo una intervención precoz.

## Complicaciones endocrinológicas

Las complicaciones endocrinológicas se encuentran entre las más comunes tras el trasplante hematopoyético (Tabla 3).

### Tiroides

La incidencia de hipotiroidismo subclínico o compensado (TSH elevada con T4 normal) es del 25 al 30%,

**Tabla 2. Complicaciones pulmonares**

Factores de riesgo	Complicaciones	Actuaciones
<ul style="list-style-type: none"> <li>· ITC</li> <li>· Bleomicina</li> <li>· Infección</li> <li>· Neumonía inflamatoria</li> <li>· Bronquiolitis obliterante pretrasplante</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Bronquiolitis obliterante</li> <li>· Neumonía org. criptogénica</li> <li>· Sínd. de neumonía idiopática</li>   <li>· Infecciones de repetición</li> <li>· Insuficiencia respiratoria</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Deshabitación de tabaco</li> <li>· PFR (cada 3 meses post-A-TPH 1 año). Si patológico: anual</li>   <li>· Síntomas: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Radiografía/tomografía axial tórax (si patrón restrictivo)</li> <li>- Procedimientos invasivos (sospecha de infección por gérmenes oportunistas)</li> <li>- Ecocardiografía (IC/Hipertensión pulmonar)</li> </ul> </li>   <li>· Tratamientos específicos</li> <li>· Trasplante pulmonar</li> </ul>

A-TPH: trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas; ITC: irradiación total corporal; PFR: pruebas de función respiratoria; IC: insuficiencia cardíaca

**Tabla 3. Complicaciones endocrinológicas**

Factores de riesgo	Complicaciones	Actuaciones
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Corticoides crónicos</li> <li>· Inhibidores de calcineurina</li>   <li>· Acondicionamiento, más con ITC (más en sesión única)</li>   <li>· Acondicionamiento</li> <li>· ITC</li> <li>· Tratamiento de EICH</li> <li>· Mujer (también en hombre)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Diabetes mellitus de tipo 2 (30% a 2 años)</li> <li>Asociación con hipertensión e hiperlipemia: síndrome metabólico a enfermedad cardiovascular acelerada</li>   <li>· Hipotiroidismo</li>   <li>· Hipogonadismo e infertilidad</li>   <li>· Esterilidad (mieloablativo)</li> <li>· Alteraciones hormonales: pérdida de libido, disfunción eréctil, sequedad vaginal y dispareunia (asociado a EICH vulvovaginal)</li>   <li>· Alteración de función sexual (mujer &gt; hombre)</li>   <li><i>Hombre</i></li>   <li><i>Mujer</i></li> <li>· Amenorrea secundaria u oligomenorrea: insuficiencia ovárica</li>   <li>· Salud sexual y libido</li>   <li>· Hipoadrenalismo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Reconocimiento precoz</li> <li>· Glucemia -o hemoglobina glicosilada- y lípidos en ayunas (anual)</li>   <li>· TSH anual</li> <li>· T4 libre (si TSH elevada)</li> <li>Hipotiroidismo central adquirido precoz (transitorio)</li>   <li>· Preservación de fertilidad pre-TPH (criopreservación de semen)</li> <li>· Anticoncepción (hombres)</li>   <li>· Prácticas sexuales seguras</li> <li>· Hormonas sexuales (anual)</li>   <li>· Testosterona y FSH (síntomas de hipogonadismo)</li> <li>· Administración de testosterona o inhibidores de fosfodiesterasas (disfunción eréctil)</li>   <li>· FSH (y test de embarazo)</li>   <li>&lt; 40 años: estrógenos (hasta edad de menopausia natural)</li> <li>&gt; 40 años: valorar riesgo beneficio de estrógenos (cáncer de mama)</li>   <li>· Testosterona transdérmica</li>   <li>· Urgencia médica</li> <li>· Retirada lenta de esteroides</li> </ul>

EICH: enfermedad de injerto contra huésped; FSH: hormona foliculoestimulante; ITC: irradiación total corporal; T4: tiroxina; TSH: hormona tiroestimulante

con una latencia mediana de 2 años, mientras que la incidencia acumulada de hipotiroidismo clínico (TSH elevada y T4 descendida) varía del 4 al 9% y su latencia es de 2,7 años<sup>(2)</sup>. El hipotiroidismo se relaciona con la radiación de la glándula tiroides (mediastino/cuello) y la baja edad al trasplante (Tabla 3).

### Fallo gonadal

Las alteraciones puberales están causadas por alteraciones del eje pituitario-hipotalámico relacionadas con irradiación y/o daño gonadal por quimio/radioterapia (Tabla 3). La probabilidad de daño gonadal se relaciona con las dosis acumuladas de tratamiento gonadotóxico. Los supervivientes varones tienen una probabilidad considerable de recuperar la producción de esperma, incluso si han sido tratados con irradiación total corporal (ITC), si el trasplante se realizó antes de los 25 años de edad y no desarrollaron EICH-c. Los ovarios son más vulnerables a la radiación y a la quimioterapia<sup>(8)</sup>. Aunque el 50% de las niñas prepuberales expuestas a ITC fraccionada desarrolla la pubertad espontáneamente y adquiere la menarquia a la edad normal, casi todas las mujeres de más de 12 años de edad en el momento del trasplante desarrollan fallo ovárico, probablemente por una reserva disminuida de folículos primordiales. El fallo ovárico es irreversible en la mayoría de las pacientes y requiere reemplazamiento hormonal adecuado para prevenir la osteoporosis y otras complicaciones<sup>(9)</sup>.

### Infertilidad

El fallo gonadal permanente y la infertilidad son toxicidades conocidas de los regímenes de acondicionamiento para el trasplante hematopoyético<sup>(9)</sup> (Tabla 3). Son factores asociados a mayor riesgo de infertilidad la edad avanzada al trasplante, el sexo femenino y la exposición a ITC. La infertilidad puede influenciar mucho la calidad de vida (para algunos supervivientes la pérdida de fertilidad fue tan dolorosa como enfrentar el cáncer). La alta prevalencia de infertilidad hace necesario discutir con el paciente, previamente al trasplante, las opciones para preservar la fertilidad y también proporcionar un buen apoyo psicosocial a los supervivientes.

### Recomendaciones de screening, detección precoz y prevención

#### Tiroides

El *screening* de la disfunción tiroidea se hace con una buena historia clínica y examen físico, así como test de función tiroidea anuales (Tabla 3). Si se encuentran anomalías, los pacientes deben ser referidos a un endocrinólogo para reemplazamiento hormonal.

### Función gonadal

- Varones: el *screening* de hipogonadismo debe incluir la historia clínica apropiada a la edad (estadios de maduración peripuberal –estadificación de Tanner–, libido, impotencia y fertilidad). Se recomienda la determinación de los niveles de hormonas luteinizante, folículo-estimulante y testosterona a la edad de 11 años y en cualquier chico con pubertad aparentemente retrasada (Tabla 3). Si se encuentran anomalías en la función testicular, se debe consultar con un endocrinólogo.

- Mujeres: el *screening* de disfunción ovárica debe incluir la historia clínica (amenorrea primaria o secundaria, irregularidades menstruales y dificultad para el embarazo), estadificación de Tanner y niveles séricos de gonadotropina y estradiol (Tabla 3). En pacientes con ausencia de evidencia clínica de pubertad se deben obtener los niveles basales hormonales en el momento esperado de la pubertad para evaluar la necesidad de tratamiento hormonal para inducirlo.

## Complicaciones musculoesqueléticas

### Osteopenia/Osteoporosis

Los receptores de un A-TPH pueden tener una densidad ósea disminuida debido a la exposición a esteroides para el tratamiento de la EICH, deficiencia de hormona de crecimiento, hipogonadismo, inactividad física, uso de tabaco, ingesta de alcohol (riesgo de caídas y desnutrición), deficiencia de vitamina D y dieta baja en calcio (Tabla 4). La incidencia de osteoporosis se aproxima al 20% a los 2 años. La pérdida más significativa de densidad mineral ósea se produce en los 6 primeros meses postrasplante e incrementa el riesgo de fracturas.

### Osteonecrosis

La osteonecrosis es una complicación debilitante y dolorosa que se desarrolla cuando el aporte de sangre al hueso está comprometido, usualmente en áreas de circulación terminal (Tabla 4). A menudo requiere cirugía. La incidencia acumulada es del 6% tras un A-TPH de donante hermano HLA idéntico y del 15% si el donante es no emparentado. El mayor riesgo lo tienen los varones con EICH-c expuestos a inhibidores de calcineurina.

### Recomendaciones de screening, detección precoz y prevención

La historia clínica y el examen físico son la base del *screening* (Tabla 4). La detección precoz puede permitir

**Tabla 4. Complicaciones osteomusculares**

Factores de riesgo	Complicaciones	Actuaciones
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Enfermedad de injerto contra huésped crónica (EICH-c)</li> <li>· EICH-a/c (corticoides)</li> <li>· Acondicionamiento de alta intensidad</li> <li>· Hipogonadismo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Miopatía inducida por corticoides</li> <li>· Limitación movilidad articular (esclerosis cutánea y de fascias)</li> <li>· Osteopenia (principalmente en primeros 6 a 12 meses postrasplante alogénico)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Reducción de dosis de esteroides en lo posible</li> <li>· Densitometría (al año del A-TPH)</li> <li>· Determinación de vitamina D (al año del A-TPH)</li> <li>· Actividad física regular</li> <li>· Suplemento de calcio (1.200 mg/día)</li> <li>· Suplemento de vitamina D (800-1.000 UI/día)</li> <li>· Reemplazamiento estrogénico o de testosterona cuando esté indicado</li> <li>· Bifosfonatos (si osteoporosis documentada)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Corticoides prolongados</li> <li>· Varón</li> <li>· Irradiación total corporal en acondicionamiento</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Necrosis avascular de cadera y otras articulaciones mayores (4-10%): cadera (80%), rodillas (10%), muñecas y tobillos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Dolor (radiografías simples: normales al inicio)</li> <li>· Resonancia magnética precoz</li> <li>· Consulta precoz con ortopedia</li> </ul>

medidas quirúrgicas conservadoras, como la descompresión cortical, que retrasen y en algunos casos obvien el reemplazamiento articular.

### Neoplasias secundarias

Los factores asociados al desarrollo de tumores secundarios tras el A-TPH son la edad avanzada, la exposición previa a quimioterapia o radiación, la ITC como parte del acondicionamiento, la infección por virus oncogénicos (VEB, VHB, VHC) y la inmunosupresión prolongada<sup>(10)</sup>. Las neoplasias frecuentes son el linfoma de Hodgkin y el síndrome linfoproliferativo postrasplante y los tumores sólidos (cáncer de piel, cáncer de mama, cáncer de tiroides y cáncer colorrectal).

### Recomendaciones de screening detección precoz y prevención

Es importante el examen de la piel, especialmente en zonas irradiadas. Es muy importante el diagnóstico precoz del cáncer de mama, por lo que en mujeres en riesgo (dosis de radiación de 20 Gy o superior en manto, mediastínica, pulmonar o campos axilares) se recomienda autoexamen mensual y exámenes anuales empezando en la pubertad hasta la edad de 25 años y, desde entonces, cada 6 meses, y mamografía y resonancia magnética (RM) anual<sup>(11)</sup>. Para los pacientes en riesgo de cáncer colorrectal (dosis de radiación de 30 Gy o superiores en abdomen, pelvis o espinal), se recomienda colonoscopia cada 5 años desde los 35 años de edad.

### Calidad de vida y mortalidad tardía

Varios estudios anglosajones muestran que la calidad de vida es estable desde el pretrasplante hasta el postrasplante. Los aspectos psicológicos, sociales y espirituales mejoran a partir del sexto mes postrasplante (Tabla 5). La población más vulnerable es la que desarrolla EICH-c. Aproximadamente, dos tercios de los pacientes pueden volver a trabajar en el primer año y el 75% en el segundo postrasplante<sup>(12)</sup>. La gran morbilidad y el alto número de complicaciones de los receptores de un A-TPH puede resultar en mortalidad precoz. La probabilidad de supervivencia a 10-20 años de los pacientes vivos y en remisión completa 2-5 años tras el trasplante es superior al 80%<sup>(13)</sup>. Las tasas de mortalidad son de 4 a 9 veces superiores a la población normal durante al menos 30 años postrasplante, produciendo una reducción de las expectativas de vida del 30%. Aunque la recidiva de la enfermedad primaria y la EICH-c son las causas principales de muerte prematura, los receptores tienen una probabilidad de morir de una neoplasia secundaria 3,6 veces superior, de una complicación pulmonar 15,1 veces superior y por compromiso cardíaco 2,3 veces superior a la población normal<sup>(13)</sup>.

### Guías de seguimiento a largo plazo

El seguimiento adecuado del receptor de un alotrasplante requiere la coordinación por el hematólogo de múltiples especialistas y del equipo médico de atención primaria. El *Center for International Blood and Marrow Transplantation Re-*

**Tabla 5. Complicaciones psicosociales y neurológicas**

Factores de riesgo	Complicaciones	Actuaciones
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Inhibidores de calcineurina prolongados</li> <li>· ITC</li> <li>· Irradiación craneal</li> <li>· Quimioterapia intracraneal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Daño neurocognitivo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· <i>Screening</i> de daño neurocognitivo</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>· EICH</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Limitación de calidad de vida</li> <li>· Depresión</li> <li>· Falta de tolerancia al ejercicio</li> <li>· Alteraciones del gusto</li> <li>· Obesidad</li> <li>· Disminución de salud sexual</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Fisiólogos del ejercicio</li> <li>· Nutricionistas</li> <li>· Consejeros de salud sexual</li> </ul>

EICH: enfermedad de injerto contra huésped; ITC: irradiación total corporal

search (CIBMTR), el *European Group for Blood and Marrow Transplantation* (EBMT) y la *American Society for Bone Marrow Transplantation* (ASBMT) han desarrollado recomendaciones conjuntas para el *screening* y la detección precoz de las complicaciones tras el A-TPH<sup>(14)</sup>. Estas recomendaciones se centran en los riesgos a partir del sexto mes postrasplante y están organizadas por sistemas orgánicos y tiempo tras el trasplante. Incluyen efectos tardíos potenciales, factores de riesgo conocidos y recomendaciones para pruebas complementarias y medidas preventivas. El Children Oncology Group ha desarrollado para pacientes pediátricos unas guías integrales de seguimiento a largo

plazo que proporcionan recomendaciones de consenso adaptadas al riesgo<sup>(11)</sup>.

El objetivo general de estas guías es la identificación precoz de las complicaciones para la intervención temprana que permita reducir la morbimortalidad atendiendo también al control de costes. Las recomendaciones de evaluaciones periódicas están dirigidas a supervivientes asintomáticos y la intensidad del *screening* debe ser determinada por el riesgo estimado del paciente en función de su historia de exposiciones terapéuticas y/o características demográficas, con el objetivo de individualizar la toma de decisiones evitando el exceso o el defecto de intervencio-

**Tabla 6. Enfermedad hepática**

Factores de riesgo	Complicaciones	Actuaciones
<ul style="list-style-type: none"> <li>· EICH-c</li> <li>· Tratamiento inmunosupresor</li> <li>· Medicaciones</li> <li>· Sobrecarga férrica</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>· Test de función hepática (bilirrubina, transaminasas y fosfatasas alcalinas) cada 3 meses el primer año y después anual</li> <li>· Biopsia hepática (alteración enzimática sin otros signos de EICH) o causa no aclarada de afectación hepática</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Hepatitis viral previa</li> </ul>		
VHB	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Reactivación viral</li> <li>· Fallo hepático</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Test de función hepática y HbsAg (o carga viral) cada 6/12 meses</li> </ul>
VHC	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Reactivación viral</li> <li>· Fallo hepático</li> <li>· Cirrosis y/o cáncer hepático (25%)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Test de función hepática y carga viral de VHC</li> <li>· El tratamiento reduce el riesgo</li> <li>· Biopsia hepática (considerar si infección crónica más de 8-10 años)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Sobrecarga férrica (33%)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Hemocromatosis secundaria (complicaciones hepáticas, pancreáticas, gonadales, infecciosas o cardíacas a largo plazo)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Ferritina sérica</li> <li>· Biopsia hepática</li> </ul>

EICH-c: enfermedad de injerto contra huésped crónica; VHB: virus de la hepatitis B; VHC: virus de la hepatitis C

**Tabla 7. Enfermedad renal**

Factores de riesgo	Complicaciones	Actuaciones
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Enfermedad renal previa (clínica o subclínica)</li> <li>· Daño por radiación</li> <li>· Inhibidores de calcineurina (crónicos)</li> <li>· Hipertensión arterial</li> <li>· Microangiopatía</li> <li>· Enfermedad de injerto contra huésped crónica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Insuficiencia renal</li> <li>· Glomerulonefritis membranosa y otras enfermedades autoinmunes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Creatinina sérica</li> <li>· Nitrógeno ureico</li> <li>· Sedimento urinario</li> <li>· Microalbuminuria (anuales)</li> </ul>

**Tabla 8. Complicaciones dermatológicas, orales y oculares**

Complicaciones dermatológicas		
Factores de riesgo	Complicaciones	Actuaciones
<ul style="list-style-type: none"> <li>· EICH (la piel es el órgano más frecuentemente afectado)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Lesiones premalignas</li> <li>· Neoplasias malignas</li> <li>· EICH cutánea</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Examen cutáneo completo anual (pelos y uñas): signos precoces de EICH cutánea (eritema folicular, despigmentación, induración focal, contractura articular)</li> <li>· Prevenir quemadura o daño solar</li> <li>· Prevenir sequedad severa (crema hidratante)</li> </ul>
Complicaciones orales		
Factores de riesgo	Complicaciones	Actuaciones
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Irradiación de cabeza y cuello (ITC, irradiación local pre-TPH –linfomas–, EICH-c)</li> <li>· EICH-c</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Sequedad oral crónica (xerostomía): dificultad para masticar, deglutir (malnutrición) y caries aceleradas</li> <li>· Labios agrietados</li> <li>· Cánceres orales (riesgo × 7); más en anemia de Fanconi (úlceras que no cicatrizan, crecimientos de la mucosa, induración)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Enjuagues orales con salino, jugo de limón, saliva artificial</li> <li>· Evaluación orodental (cada 6 meses)</li> <li>· Lubricantes</li> <li>· Similar a EICH-c, por lo que requieren biopsia para el diagnóstico</li> </ul>
Complicaciones oculares		
Factores de riesgo	Complicaciones	Actuaciones
<ul style="list-style-type: none"> <li>· ITC (en todos los pacientes)</li> <li>· EICH-c más ITC</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Cataratas</li> <li>· Queratoconjuntivitis seca (disminución de función glandular lacrimal): 20% a 15 años post-Alo-TPH (40% si EICH-c)</li> <li>· Uveítis</li> <li>· Coroiditis</li> <li>· Retinitis infecciosas</li> <li>· Retinopatía microvascular isquémica (manchas “en lana de algodón” y edema de disco óptico)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Tratamiento específico</li> <li>· Tratamiento de la EICH más tratamiento sintomático (lágrimas artificiales, oclusión temporal)</li> <li>· Ciclosporina (desaparecen al reducir o suspenderla)</li> <li>· Evaluación ocular (oftalmólogo experto en EICH): agudeza visual y test de Schirmer (producción de lágrimas)</li> </ul>

EICH: enfermedad de injerto contra huésped; ITC: irradiación total corporal; TPH: trasplante de células progenitoras hematopoyéticas

nes. Las Tablas 6, 7, 8 y 9 presentan una síntesis de los factores de riesgo y recomendaciones de otras complicaciones frecuentes en los receptores de A-TPH no abordados en el texto por cuestión de espacio.

### Estrategias de reducción del riesgo

A menudo no es posible modificar exposiciones terapéuticas tales como el tipo de acondicionamiento o el

**Tabla 9. Complicaciones infecciosas**

Factores de riesgo	Complicaciones	Actuaciones
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Reconstitución inmune prolongada (donantes HLA-<i>mismatched</i>, injerto con depleción T, enfermedad de injerto contra huésped crónica -EICH-c-)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Infecciones por oportunistas y no oportunistas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· La prevención es crítica</li> <li>· Vacunación postrasplante (vacunas inactivas si EICH con tratamiento inmunosupresor)</li> <li>· Determinaciones: niveles de Ig, CD4, CD4/CD8 (anual)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Pérdida de inmunidad previa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Reactivación de infecciones latentes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Ig IV (si niveles muy bajos)</li> <li>· Profilaxis antiviral y antipneumocistis (si EICH-c y tratamiento inmunosupresor)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>· Asplenia anatómica o funcional</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Infecciones por bacterias encapsuladas (<i>S. pneumoniae</i>, <i>Haemophilus influenzae</i>, <i>Neisseria spp</i>, <i>Capnocytophaga canimorsus</i>) y en zonas endémicas parásitos intraeritrocitarios (<i>Babesia microti</i>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Vacunación</li> </ul>

tratamiento de la EICH. La obesidad (determinada por el índice de masa corporal) no es común en receptores de A-TPH, pero estos pacientes sí tienen un porcentaje de grasa elevado y una reducción de masa muscular<sup>(15)</sup>. Este estado de obesidad sarcopénica contribuye al desarrollo de resistencia a la insulina, hiperinsulinemia e inflamación crónica que han sido relacionados con el riesgo de cáncer asociado a obesidad y con complicaciones cardiovasculares. Por tanto, las intervenciones para mejorar la nutrición y mantener un estilo de vida físicamente activo probablemente son incluso de mayor utilidad que para la población normal para los supervivientes postrasplante, como estrategias de reducción del riesgo. La nutrición adecuada, no fumar ni beber alcohol, usar protección solar, hacer ejercicio físico y seguir las recomendaciones de vacunación estandarizadas postrasplante son medidas que deben ser enfatizadas en el seguimiento a largo plazo. Un estilo de vida saludable es probablemente la medida que pueda tener mayor impacto en la calidad de vida y la supervivencia del paciente.

### Resumen y conclusiones

El seguimiento a largo plazo de los receptores de un A-TPH requiere una actitud proactiva del médico responsable encaminada a la prevención, el diagnóstico precoz y las intervenciones terapéuticas de las complicaciones tardías. La coordinación de un equipo interdisciplinar, la educación del paciente y sus familiares, la individualización de las actuaciones y la adecuada relación con el centro de origen del paciente, en su caso, son los fundamentos del seguimiento a largo plazo. Fuentes de información y recomendaciones *on-line* como la *Transplant guide* desarrollada

por la organización *Be the Match* del *National Marrow Donor Program* (NMDP) son herramientas de gran utilidad en la clínica diaria.

### Bibliografía

1. Bhatia S, Francisco L, Carter A, et al. Late mortality after allogeneic hematopoietic cell transplantation and functional status of long-term survivors. Report from the Bone Marrow Transplant Survivor Study. *Blood* 2007; 110 (10): 3784-92.
2. Ishiguro H, Yasuda Y, Tomita Y, et al. Long-term follow-up of thyroid function in patients who received bone marrow transplantation during childhood and adolescence. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89 (12): 5981-6.
3. Armenian SH, Sun CL, Vase T, et al. Cardiovascular risk factors in hematopoietic cell transplantation survivors: role in development of subsequent cardiovascular disease. *Blood* 2012; 120 (23): 4505-12.
4. Griffith ML, Savani BN, Boord JB. Dyslipidemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: evaluation and management. *Blood* 2010; 116 (8): 1197-204.
5. Armenian S, Sun C-L, Francisco L, et al. Late congestive heart failure (CHF) following hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol* 2008; 26 (34): 5537-43.
6. Sarmiento M, Parody R, Márquez-Malaver F, et al. Pre-transplant diastolic but not systolic dysfunction has a negative prognostic impact after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2016; 51 (6): 863-5.
7. Yoshihara S, Yanik G, Cooke KR, et al. Bronchiolitis obliterans syndrome (BOS), bronchiolitis obliterans organizing pneumonia (BOOP), and other late-onset non-infectious pulmonary complications following allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007; 13 (7): 749-59.
8. Sanders JE, Buckner CD, Amos D, et al. Ovarian function following bone marrow transplantation for aplastic anemia or leukemia. *J Clin Oncol* 1988; 6 (5): 813-8.



9. Gulati SC, Van Poznak C. Pregnancy after bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 1998; 16 (5): 1978-85.
10. Rizzo JD, Curtis RE, Socie G, et al. Solid cancers after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2009; 113 (5): 1175-83.
11. Children's Oncology Group. Long-term follow-up guidelines for survivors of childhood, adolescent, and young adult cancers, version 4.0. Monrovia, CA: Children's Oncology Group; 2013. Disponible en: <http://www.survivorshipguidelines.org>.
12. Wong FL, Francisco L, Togawa K, et al. Long-term recovery after hematopoietic cell transplantation: predictors of quality of life concerns. *Blood* 2010; 115 (12): 2508-19.
13. Wingard JR, Majhail NS, Brazauskas R, et al. Long-term survival and late deaths after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol* 2011; 29 (16): 2230-9.
14. Majhail NS, Rizzo JD, Lee SJ, et al. Recommended screening and preventive practices for long-term survivors after hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2012; 47 (3): 337-41.
15. Baker KS, Ness KK, Steinberger J, et al. Diabetes, hypertension and cardiovascular events in survivors of hematopoietic cell transplantation: a report from the bone marrow transplant survivor study. *Blood* 2007; 109 (4): 1765-72.

---

## Nuevos sistemas de diagnóstico en hemostasia y trombosis

JOSÉ MARÍA BASTIDA BERMEJO, JOSÉ RAMÓN GONZÁLEZ PORRAS

Servicio de Hematología. Unidad de Trombosis y Hemostasia.

Hospital Universitario de Salamanca. Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL).

Universidad de Salamanca (USAL)

---

### Introducción

La hemostasia es el proceso fisiológico y dinámico que mantiene la integridad del sistema circulatorio y que, desde el punto de vista didáctico, se subdivide en 4 apartados interrelacionados: a) formación del tapón plaquetario (endotelio y plaquetas); b) propagación de la coagulación; c) terminación de la coagulación mediante control antitrombótico; y d) eliminación del coágulo mediante el sistema fibrinolítico. Las diátesis hemorrágica y trombótica ocurren cuando los elementos específicos de este proceso son insuficientes o están funcionalmente alterados.

A continuación, veremos la aproximación diagnóstica tanto en el paciente con diátesis hemorrágica como trombótica, centrándonos en los trastornos hereditarios.

---

### Aproximación diagnóstica al paciente con diátesis hemorrágica

La diátesis hemorrágica se define como una predisposición al sangrado debida a la existencia de un trastorno de la hemostasia que afecta a la integridad vascular, al recuento y la función plaquetarios, a los factores de la coagulación y/o a la fibrinólisis. El diagnóstico correcto se basa en la realización de la historia clínica, la exploración física y el análisis de las pruebas de laboratorio complementarias.

#### Anamnesis y exploración física

Como en cualquier patología médica, la realización de una historia clínica exhaustiva es fundamental. Es importante definir las características del sangrado: localización e intensidad, edad de comienzo, eventos asociados, historia familiar (herencia, consanguinidad), ingesta de fármacos y enfermedades sistémicas. Se deben tener en cuenta algunos signos de alarma, así como posibles malformaciones, generalmente asociadas a una diátesis hemorrágica hereditaria (DHH) (Tabla 1 y Figura 1).

El diagnóstico de este tipo de pacientes supone un reto para el clínico en su práctica diaria<sup>(1,2)</sup>. La evaluación del sangrado puede ser confusa debido a su alta prevalencia en la población sana, su variabilidad con la edad o ante la presencia de determinados eventos (cirugías y/o traumatismos). La Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (ISTH) ha desarrollado diferentes escalas de sangrado o *bleeding assessment tools* (ISTH-BAT) para establecer la cronología de los eventos hemorrágicos y disminuir la subjetividad; sin embargo, no han sido capaces de correlacionar el perfil clínico con el del laboratorio<sup>(3)</sup>. En las Tablas 2 y 3 se resumen las pruebas utilizadas para el diagnóstico de la diátesis hemorrágica y la monitorización de la terapia antiagregante<sup>(4,5)</sup>. A continuación, detallamos los nuevos avances en las técnicas de laboratorio.

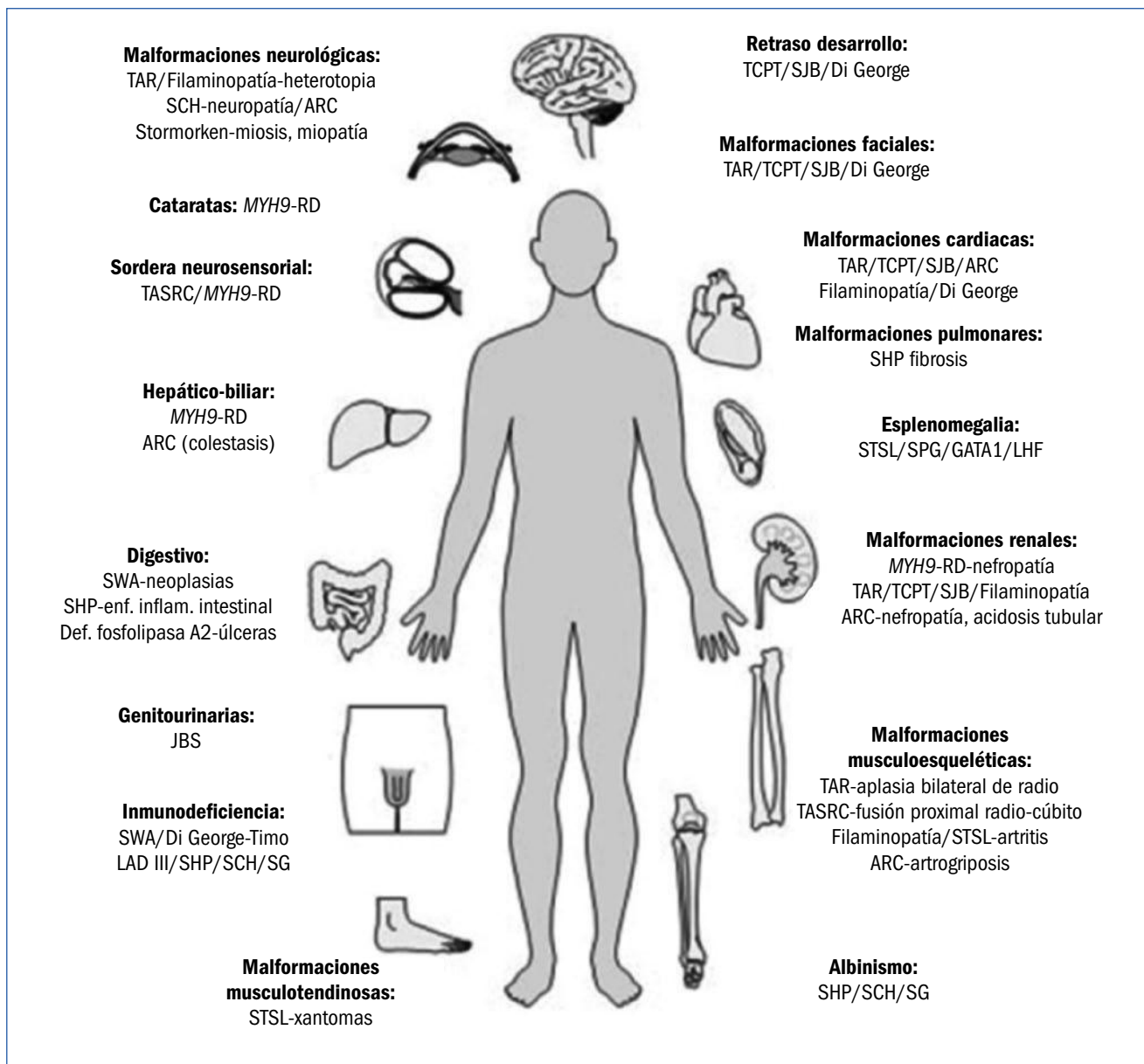
#### Tiempo de obturación (platelet function analyzer)

El PFA100® es la prueba de cribado más utilizada y sustituye al tiempo de hemorragia<sup>(4)</sup>. Debido a sus limitaciones, se ha desarrollado una prueba más específica para identificar las deficiencias moderadas/graves que afectan al receptor P2Y<sub>12</sub> (INNOVANCE® PFA P2Y)<sup>(6)</sup>. Utiliza una membrana recubierta por ADP, Ca<sup>2+</sup> y PGE1 y detecta la activación del receptor mediante la estimulación de la adenilatociclasa.

---

**Tabla 1. Síntomas y signos de alarma para sospechar un trastorno plaquetario hereditario**

- Hemorragias desproporcionadas ante traumatismos o intervenciones quirúrgicas
  - Hemorragia tras caída del cordón umbilical, en la primera infancia (circuncisión) o a partir de la adolescencia
  - Aparición de hematomas generalizados e inexplicables
  - Epistaxis prolongadas (> 30 minutos) o menometrorragia (desde la menarquía) que requiera atención hospitalaria o que produzca anemia
  - Sangrados excesivos en el parto, en la cavidad oral, tras extracción dental u otros procedimientos invasivos, que requieran la transfusión de hemoderivados o la reintervención para llevar a cabo la cauterización y hemostasia local
  - Presencia de hemartrosis
  - Falta de respuesta a tratamientos para la trombocitopenia inmune (PTI)
-



**Figura 1.** Principales manifestaciones clínicas y hallazgos patológicos en la exploración física asociados a los trastornos plaquetarios hereditarios (TPH) (modificado de Balduini et al.)<sup>(2)</sup>. ARC: síndrome de artrogriposis, disfunción renal y colestasis; JBS: síndrome de Jacobsen; LAD: deficiencia de adhesión de leucocitos; LHF: linfocitosis hemofagocítica familiar; MYH9-RD: enfermedad relacionada con MYH9; SCH: síndrome de Chediak-Higashi; SG: síndrome de Griscelli; SHP: síndrome de Hermansky-Pudlak; SPG: síndrome de plaqueta gris; STLS: sitosterolemia; SWA: síndrome de Wiskott-Aldrich; TAR: trombocitopenia con ausencia de radio; TASRC: trombocitopenia amegacariocítica congénita con sinostosis radiocubital; TCPT: síndrome de Paris-Trousseau.

### Agregometría

Es la técnica clásica y más utilizada para analizar la función plaquetaria<sup>(4)</sup>. Existen varios tipos de agregometría en función del tipo de muestra y de la técnica empleada. La impedanciometría está indicada para la monitorización de la terapia antiagregante (Tabla 2), mientras que la turbidimetría o *light transmission aggregometry* (LTA) sigue siendo el método de referencia para el diagnóstico de los trastornos plaquetarios hereditarios (TPH)<sup>(6)</sup>. Ésta

última se basa en el método de Born, que consiste en la determinación de la agregación plaquetaria mediante la transmisión de luz a través de un plasma rico en plaquetas (PRP) tras la inducción con diferentes agonistas plaquetarios. La ISTH recomienda la utilización de 5 agonistas (colágeno, ADP, ácido araquidónico, epinefrina y ristocetina), ya que algunos patrones de agregación son específicos de determinadas enfermedades, como la trombostenia de Glanzmann (TG) o el síndrome de Bernard-Soulier (SBS). En aquellos casos no concluyen-

**Tabla 2. Principales características de las pruebas de laboratorio para la valoración del fenotipo hemorrágico, la frecuencia de uso y su indicación actual**

Técnica (Frec)	Valoración	Ventajas/Inconvenientes	Indicación
<b>Hemograma (98%)</b>	Recuento líneas celulares	Recuento plaquetario, IPF y VPM Variabilidad en contadores automatizados	TPH
<b>Frotis SP (&gt; 90%)</b>	Morfología celular	Alteraciones características (cuerpos de Dhöle), VPM, agregados (pseudotrombocitopenia por EDTA). Variabilidad interobservador	TPH
<b>Test de coagulación</b>	Hemostasia secundaria	Vía intrínseca, extrínseca y común (TP, TTPa, FG) Condiciones preanalíticas	Estudio básico
<b>FVV Ag/Ac FVIII:C</b>	Despistaje de EVW <sup>(15)</sup>	Método coagulativo: estándar para trastorno cuantitativo/cualitativo. Método cromogénico más específico. Variabilidad interlaboratorio	EVW
<b>TH (28%)</b>	Global	Fisiológica. Invasiva, tiempo. Poco reproducible Escasa S y E. Factores técnicos	No
<b>PFA100® (53%)</b>	Adhesión y agregación	Sustituye al TH. Sangre total. Col-Epi/Col-ADP. Simple y rápido Útil en pediatría. Poca S y E. Condiciones preanalíticas	Screening EVW
Autoanalizadores: <b>VerifyNow®</b> , <b>Plateletworks®</b> (cirugía y cardiología) e <b>IMPACT-R®</b> <sup>(6)</sup> Sangre total, fáciles, rápidos, escasa muestra, caros			Monitor. tto
<b>LTA (60%) (PRP)</b>	Todas las fases	<i>Gold standard</i> . Dinámico. Elevada S y E. Guías de uso <sup>(10)</sup> . Caro, laborioso, complejo, grandes volúmenes. Poco reproducible	Screening y dco. TPH
<b>Multiplate® (12%) (ST)</b>	Activación Agregación	Impedanciometría. No procesamiento de la muestra. Menos sensible. Falta de estudios en TPH	Monitor. tto
<b>Lumi-LTA (21%)</b>	Agregación y secreción	LTA con secreción de ATP. PRP o ST. Gran S y rapidez. No diferencia entre liberación y secreción. Luminometría/HPLC	No validado
<b>CMF (24%)</b>	Agregación, secreción y procoagulante	Escaso volumen de muestra. Gran S y E. Múltiples aplicaciones Caro, laborioso, complejo. Variabilidad interlaboratorio.	Screening y dco. TPH
<b>R. Coágulo (10%)</b>	Agregación	ST sin anticoagulante. Apoyo diagnóstico en TG, Stormorken y SWA. Variabilidad interlaboratorio	Ayuda dco. TPH
<b>ELISA</b>	Gránulos	Gran S y E. Centros especializados No automatizadas, validadas, ni estandarizadas	Investigación
<b>HPLC</b>			
<b>ME (4%)</b>	Gránulos	<i>Gold standard</i> . Gran S y E/Caro, complejo, centros especializados	Dco. TPH
<b>Isótopos radiactivos</b>	Gránulos	5-HT y radioisótopo/Radioactividad y centros acreditados	Investigación
<b>Ensayos bioquímicos</b>	Estudios funcionales	Gran S y E/Complejos, caros y especializados Ensayos de <i>spreading</i> , metabolismo AA (TxB <sub>2</sub> ), unión ligando-receptor, proteínas intracelulares (MYH10), medición de 2.º mensajeros (Ca <sup>2+</sup> , IP <sub>3</sub> )	Investigación Dco. TPH
<b>Test globales</b>	Hemostasia global	Función dinámica, hemostasia global, trombosis (Tabla 3)	Monitor. tto
<b>Molecular</b>	Gen	Genes candidatos, mutaciones <i>Hot-Spot</i> , estudio de familiares y consejo genético/Fenotipo inespecífico, múltiples exones, heterogeneidad molecular	Dco. final de TPH

5-HT: serotonina; AA: ácido araquidónico; Ca<sup>2+</sup>: calcio iónico intracelular; Col-Epi/Col-ADP: colágeno-epinefrina-adenosin difosfato; Dco: diagnóstico; E: especificidad; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; EVW: enfermedad de von Willebrand; FG: fibrinógeno; FVIII:C: actividad factor VIII coagulativo; FVV Ag/Ac: Factor von Willebrand antigénico/actividad; GP: glicoproteína; HPLC: high-performance liquid chromatography; IP<sub>3</sub>: inositol trifosfato; IPF: índice de plaquetas inmaduras; LTA: light transmission aggregometry; Lumi-LTA.: lumiagregometría; Monitor. tto: monitorización de tratamiento antiagregante; PRP: plasma rico en plaquetas; R.: retracción; S: sensibilidad; SBS: síndrome de Bernard-Soulier; ST: sangre total; CMF: citometría de flujo; SWA: síndrome Wiskott-Aldrich; TEG: tromboelastografía; TG: trombastenia de Glanzmann; TH: tiempo de hemorragia; TP: tiempo de protrombina; TPH: trastornos plaquetarios hereditarios; TTPa: tiempo de tromboplastina parcial activada; VPM: volumen plaquetario medio

tes se recomienda el uso un panel extenso de agonistas que ayudarían a identificar un TPH más infrecuente. Aunque se han elaborado unas guías para su estandarización, sus limitaciones dificultan su uso, sobre todo en

la población pediátrica (Tabla 2). Otra limitación de la LTA es el estudio de los gránulos plaquetarios, en el que se recomienda el análisis mediante lumiagregometría (Lumi-LTA) (Tabla 2).

Se ha desarrollado un método de alto rendimiento, *optical multichannel* (Optimul®), basado en la LTA. Utiliza 7 agonistas (añade PAR-1 y U46619 a los recomendados por la ISTH) y reactivos liofilizados sobre una plataforma que permite analizar 96 muestras. El grupo inglés UK Genotyping and Phenotyping of Platelets Study Group/GAPP comprobó una gran sensibilidad, especificidad y un alto valor predictivo negativo (VPN) para el cribado de los TPH, sobre todo en los fenotipos leves. Además, reduce el volumen de muestra y el tiempo<sup>(7)</sup>.

### Citometría de flujo (CMF)

Es imprescindible para el análisis de las glicoproteínas (GP) de membrana. Además, permite el estudio de plaquetas activadas mediante la expresión de PAC-1 (frente a GPIIb/IIIa) y de los gránulos plaquetarios mediante la expresión de CD63 (gránulos densos) y de CD62P o P-selectina (gránulos  $\alpha$ )<sup>(8)</sup>. Para diferenciar si la alteración es propia del contenido o de su liberación se cuantifica la liberación de mepacrina (detección de serotonina o 5-HT). Sin embargo, se requieren otras técnicas más específicas (*high-performance liquid chromatography* o HPLC, microscopía electrónica –ME–, *enzyme-linked immunosorbent assay* o ELISA), para confirmar estos hallazgos (Tabla 2). Otras aplicaciones de la CMF son la valoración de la actividad procoagulante mediante la detección de la fosfatidilserina (tras la activación mediante un ionóforo de calcio), el estado conformacional del complejo  $\alpha$ Ib/ $\beta$ 3 (tras la activación con ADP y con PMA) y las alteraciones del receptor P2Y<sub>12</sub> (añadiendo una fosfoproteína estimulante vasodilatadora o VASP)<sup>(6)</sup>. Se han desarrollado métodos de fijación<sup>(7)</sup>:

- *AggFix*: estabiliza los agregados de plaquetas una vez añadidos los agonistas (ADP, AA, colágeno y PAR1) sobre la sangre total, durante 9 días. Se comprueba el descenso en el recuento de las plaquetas (*single platelet counting* modificado).

- *PAMFix* (grupo GAPP): estabiliza la muestra tras la adición de 5 agonistas (ADP, U46619, TRAP, AA, EPI) durante 9 días y valora principalmente los gránulos densos y  $\alpha$ , mediante la expresión de P-selectina y CD63 (*remote platelet function*). Los resultados obtenidos fueron concordantes con el análisis mediante Lumi-LTA. Podría utilizarse en el cribado previo a la realización de la LTA. No se considera útil para el diagnóstico de los TPH<sup>(7)</sup>.

### Técnicas para la valoración de los gránulos plaquetarios

Se basan en la interacción del agonista plaquetario con su receptor, la señalización intracelular, los cambios en el contenido intracelular de Ca<sup>2+</sup>, IP<sub>3</sub> y cinasas, en el remodelado del citoesqueleto y en la liberación del contenido granular<sup>(9)</sup>. Para el estudio de los gránulos

densos analizan la secreción de 5-HT y ADP-ATP, para los gránulos  $\alpha$ , la secreción de PF4 y  $\beta$ -tromboglobulina y, para la liberación del contenido de los lisosomas, LAMP-1. Existen numerosas técnicas: HPLC, ELISA, *Western blotting*, CMF, isótopos radiactivos, Lumi-LTA, medición del metabolito estable del tromboxano en suero TxB<sub>2</sub>, estudios celulares, así como el análisis mediante ME. Son técnicas muy complejas, realizadas en centros muy especializados, indicadas para el diagnóstico específico y para estudios de investigación (Tabla 2)<sup>(9)</sup>.

### Estudio de la enfermedad de von Willebrand (EVW)

El diagnóstico de la EVW se realiza según las recomendaciones de la British Committee for Standards in Haematology (BSCH) (Figura 2)<sup>(10)</sup>. Además, en los laboratorios de referencia se llevan a cabo los siguientes estudios:

- Estudio de proteólisis del FVW que mide la susceptibilidad del FVW a la metaloproteasa ADAMTS13, que regula su tamaño.

- Determinación del propéptido o FVW:Ag II que ayuda a distinguir la EVW congénita de la adquirida y a detectar moléculas de FVW con mayor velocidad de aclaramiento. Se realiza mediante técnicas de ELISA.

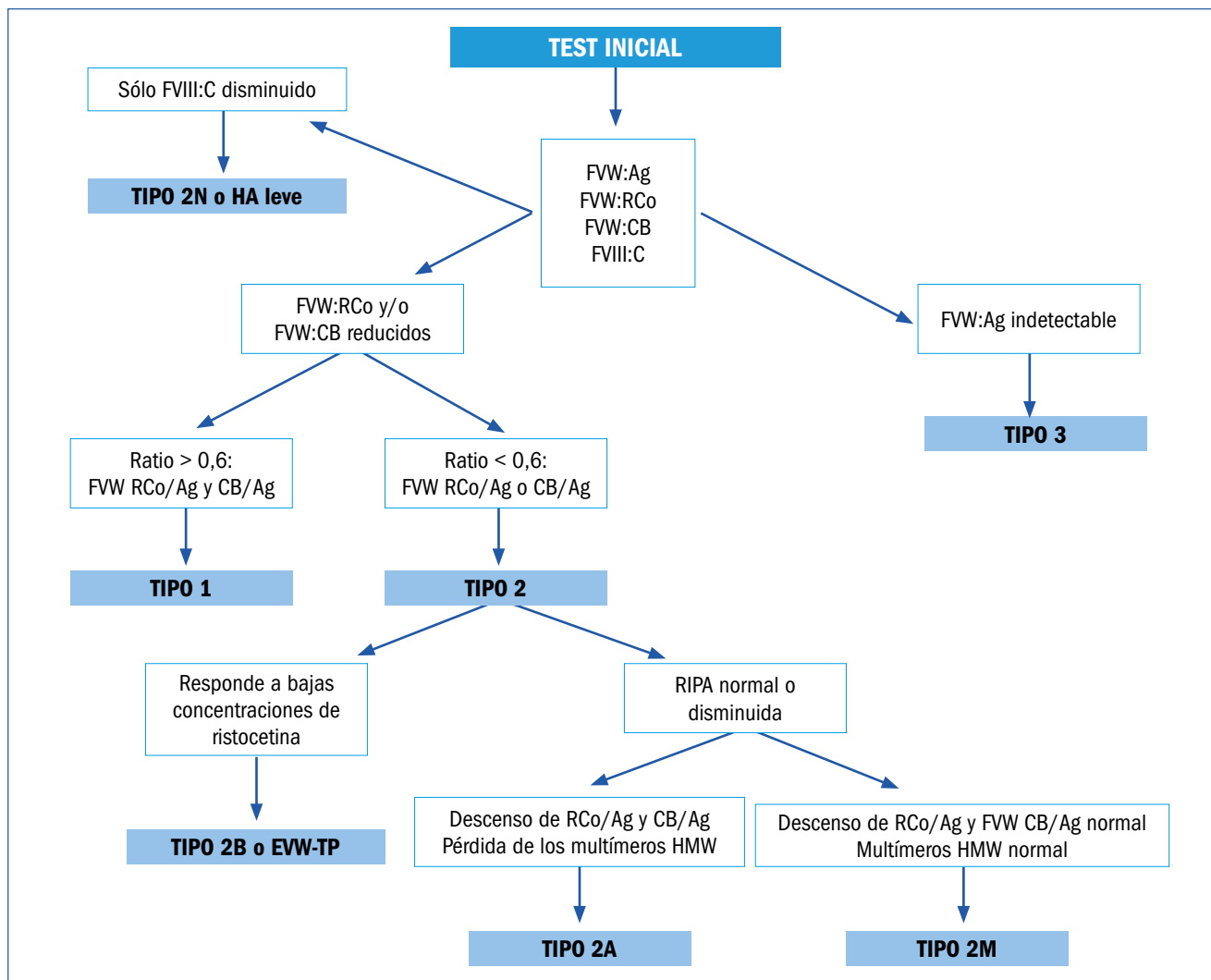
- Detección de anticuerpos contra FVW. Se detectan aloanticuerpos en algunos pacientes con EVW de tipo 3 (7-10%) y autoanticuerpos en el síndrome de von Willebrand adquirido.

### Test que evalúan la capacidad hemostática global

Proporcionan una evaluación más precisa e *in vivo* de la hemostasia, explorando la calidad de la formación del coágulo de una manera dinámica, reflejando de forma más adecuada tanto la tendencia hemorrágica como la trombótica. Simulan parcialmente las condiciones de flujo, interacción endotelial, pH y temperatura. De momento, antes de su uso clínico generalizado, es necesaria su estandarización<sup>(11)</sup>:

- Tromboelastografía (TEG)/Tromboelastometría rotacional (ROTEM): detectan cambios en la viscosidad y elasticidad durante el proceso de formación del coágulo, evalúan la funcionalidad de las plaquetas, el fibrinógeno, los factores de la coagulación y el sistema fibrinolítico. Sus principales avances se han observado en el manejo del sangrado perioperatorio y en la hemofilia (Tabla 3 y Figura 3a).

- Test de generación de trombina (TGT): permite medir la cinética global de la formación de trombina, desde la fase de inicio hasta la fase de inactivación de la trombina formada (Figura 3b). El método más utilizado es el CAT (*calibrated automated thrombin generation*), que visualiza los cambios en la generación de trombina en relación con el tiempo utilizando sustratos fluoro-



**Figura 2.** Algoritmo diagnóstico con las pruebas de laboratorio de la enfermedad de von Willebrand (EVW) (modificado de Laffan MA, et al.)<sup>(15)</sup>. Es necesaria la determinación del factor de von Willebrand (FVW) antigénico (FVW:Ag), de la actividad del FVW como cofactor de la ristocetina (FVW:RCo) con o sin la capacidad de unión del FVW al colágeno (FVW:CB) y al FVIII (FVW:FVIII) y el análisis multimérico del FVW por electroforesis. El FVW:CB no puede reemplazar al FVW:RCo porque ambos test son complementarios. Los multímeros determinados por electroforesis permiten el diagnóstico con certeza de la EVW. FVW:C: FVIII coagulante; HA: hemofilia A; PRP: plasma rico en plaquetas; RIPA: aglutinación de PRP con ristocetina; TP: tipo plaquetario.

génicos, plasma rico/pobre en plaquetas y diferentes activadores de la coagulación a diferentes concentraciones. Tiene una elevada sensibilidad pero una gran variabilidad interlaboratorio, lo que complica su estandarización.

### Estudios moleculares

Son la única prueba que permite confirmar el diagnóstico de los trastornos hereditarios y facilita el consejo genético. Además, ayuda en la identificación de los subtipos que precisen diferentes estrategias terapéuticas. Tradicionalmente, se ha realizado mediante secuenciación convencional (Sanger), mediante el análisis

de un gen candidato conocido, restringiendo el análisis a aquellos trastornos con un fenotipo específico<sup>(12)</sup>. Actualmente, es el método de elección para confirmar las variantes genéticas identificadas por la secuenciación masiva o *next-generation sequencing* (NGS)<sup>(12)</sup>. También se han empleado otras técnicas como los mapas genéticos, el análisis de ligamiento (*linkage analysis*), la utilización de marcadores microsatélites y los estudios de asociación genómica (*genome-wide association studies* o GWAS).

Las plataformas de NGS permiten la secuenciación en paralelo de múltiples fragmentos de ADN, generando una gran cantidad de datos en un tiempo más reducido y a un coste menor. Esta tecnología ofrece múltiples aplicaciones, como la secuenciación del transcriptoma

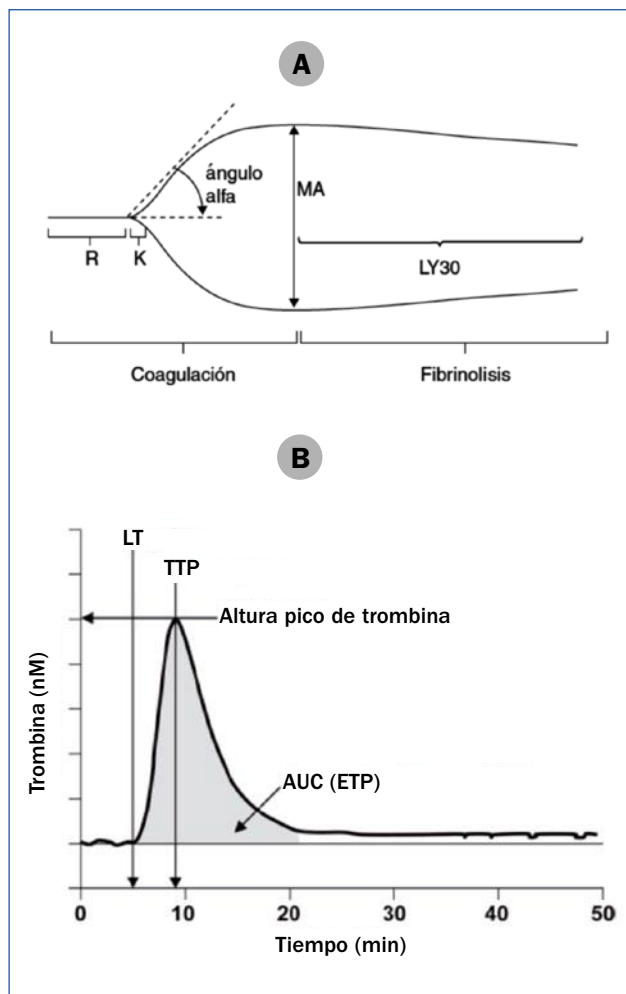
**Tabla 3. Características de los test globales de hemostasia**

Características	TEG	ROTEM
Tipo de test	Semiautomáticos	
Muestra	Sangre total	
Tubo	Citrato	
Volumen	0,36 mL	0,34 mL
Tiempo para análisis	15-120 min	
Pipeteo	Manual	Manual/Automático
Dispositivo	Cubeta a 37 °C/Pin Propios de cada dispositivo	
Mecanismo oscilación	Cubeta 4° 45´ cada 5 s; pin fijo Sensible a vibración	Pin 4° 75´ cada 6 s; cubeta fija. No sensible a vibración
Gráfica resultados	Transducción (Figura 3a)	Impedanciometría (Figura 3a)
N.º muestras analizadas	2	4
Software	Múltiples análisis Valoración función plaquetaria: <i>platelet mapping</i>	Menos análisis Valoración de fibrinolisis
Activadores de coagulación	Propios de cada dispositivo	
Aplicaciones clínicas	Disminución de las necesidades transfusionales en hemorragia masiva, cirugía cardíaca, coagulopatía secundaria a traumatismo, hemorragia posparto, en la hemorragia y el trasplante hepáticos, tratamiento con factores de la coagulación y en la hemofilia	
Limitaciones	Condiciones preanalíticas, análisis de muestras simultáneas, personal especializado, falta de estandarización, variabilidad interlaboratorio y correlación clínica	

completo (RNA-seq), la identificación de microRNA, estudios de interacción proteína-DNA (ChIP-seq) o estudios de metilación. Las aplicaciones principales son las siguientes<sup>(13)</sup>:

- Paneles de genes: en ellos se secuencian un subconjunto limitado de genes. Es un método rápido y barato respecto al Sanger y puede ser una aproximación diagnóstica en la rutina diaria. Existen plataformas europeas como ThromboGenomics (<https://thrombogenomics.org.uk>) que utilizan esta tecnología.

- Secuenciación del exoma/genoma completo (*whole-exome/genome sequencing*): consiste en secuenciar las regiones codificantes (exoma) y/o no codificantes del genoma. Es un procedimiento útil para aquellos casos con una alta sospecha de un trastorno genético, en el que no se han identificado mutaciones en los genes candidatos. Su análisis es muy complejo por la gran cantidad de datos generados (> 4.000 variantes/paciente).



Las principales limitaciones de la NGS son la dificultad para detectar inversiones, reordenamientos, grandes deleciones/inserciones y/o grandes alteraciones estructurales<sup>(13)</sup>. Además, se requiere de un análisis computacional, de algoritmos probabilísticos bioinformáticos (modelos bayesianos) y un sistema de análisis de filtrado de variantes genéticas para identificar aquellas potencialmente patogénicas. Es necesaria la confirmación funcional mediante un modelo celular para definir una determinada variante como causante de una determinada enfermedad<sup>(13)</sup>.

#### **Aplicación de la next-generation sequencing en el diagnóstico de las diátesis hemorrágicas hereditarias**

El diagnóstico molecular de los TPH se recomienda en las siguientes situaciones<sup>(6)</sup>: a) para confirmar el diagnóstico correcto; b) para identificar nuevas mutaciones que puedan correlacionarse con un fenotipo determinado; c) establecer el valor pronóstico y la correlación fenotipo-genotipo; d) por el conocimiento científico, sobre todo en los trastornos raros (enfermedad relacionada con GATA1, filaminopatías o en la EVW de tipo plaquetario) y pocos casos descritos en la literatura; y e) para detectar los genes que predisponen al desarrollo de una hemopatía mieloide maligna (RUNX1).

En este contexto, dentro del grupo de trabajo de la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia (SETH) “Caracterización funcional y molecular de pacientes con trombopatías congénitas”, hemos diseñado un panel de 71 genes relacionados con la hemostasia primaria y analizado más de 70 pacientes, con sospecha de TPH, mediante una plataforma de NGS (MiSeq® Illumina). Para dar validez a la metodología, se identificaron (mediante NGS) todas las mutaciones de 10 pacientes con el diagnóstico molecular de TPH previamente establecido por Sanger. A continuación, se analizaron 20 pacientes que presentaban un fenotipo de laboratorio específico de TPH, identificando la alteración molecular subyacente en el 80% de los casos. Finalmente, en una cohorte de 30 pacientes, en los que las pruebas de laboratorio no fueron capaces de definir un fenotipo específico de TPH, la aplicación del panel permitió identificar la alteración molecular en más del 60% de los casos. Los diagnósticos más destacables fueron: 2 casos de trombocitopenia relacionada con TUBB1, trombocitopenia relacionada con ACTN1, trombocitopenia relacionada con FLNA, enfermedad relacionada con MYH9 (MYH9-RD), síndrome de Hermansky-Pudlak (SHP) y TG, entre otros. Especialmente llamativa ha sido la identificación de los 3 primeros casos de TG-like en España, al identificar 3 mutaciones diferentes en el gen RASGRP2. Los estudios funcionales fueron concordantes con los hallazgos moleculares.

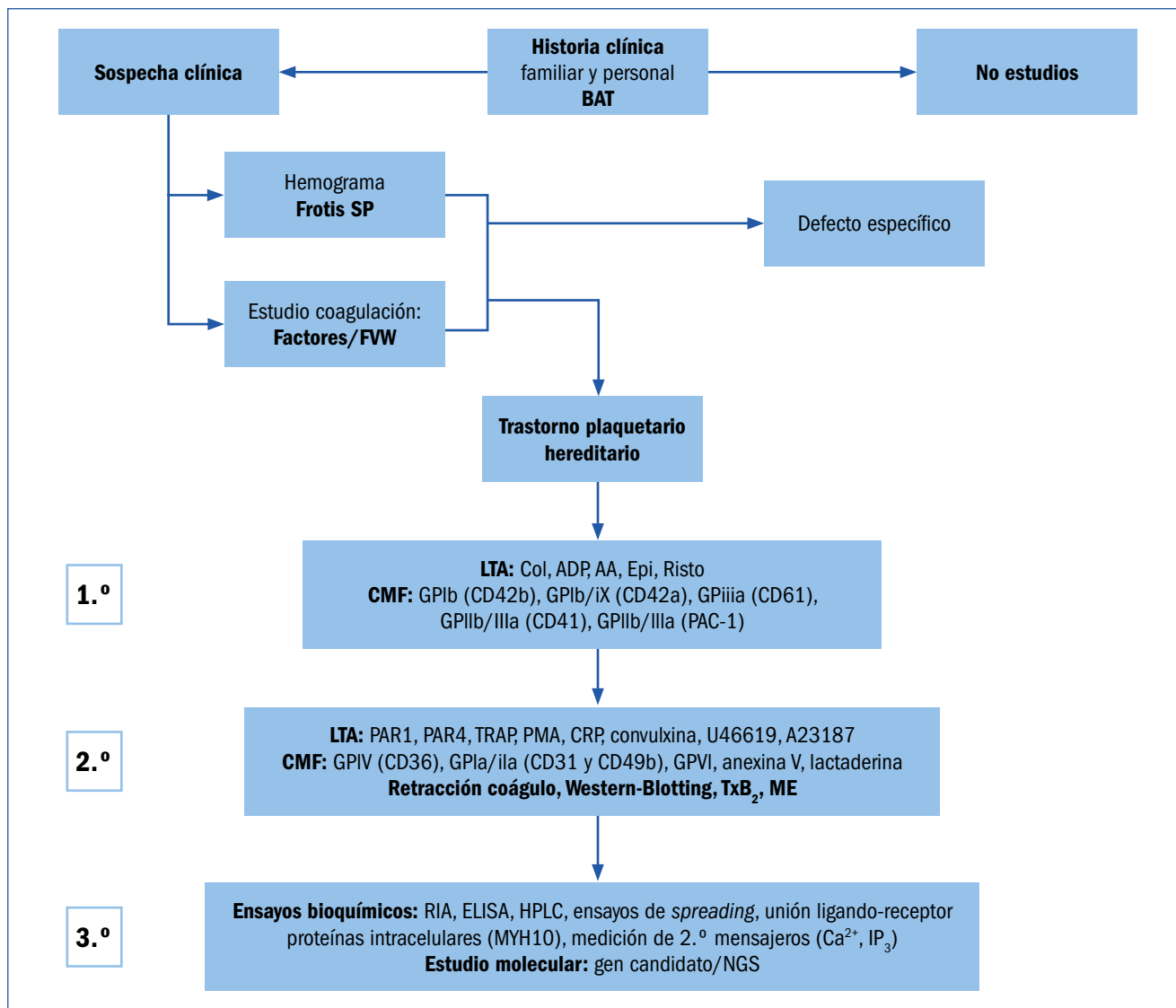
En los trastornos hemorrágicos hereditarios de la hemostasia secundaria, el diagnóstico molecular se realiza mediante secuenciación convencional del gen candidato, relacionado con la deficiencia del factor. Por ejemplo, en la hemofilia A grave se analiza la inversión del intrón 22 y del intrón 1. El resto de los fenotipos se analizan por secuenciación directa. Hasta la fecha, en el 2-5% de las hemofilias A graves y el 10% de las leves/moderadas no se encuentra ninguna alteración molecular; esto puede ser debido a la presencia de variantes genéticas intrónicas o alteraciones en el VWF<sup>(14)</sup>. En función de estas consideraciones, nuestro grupo ha incorporado al algoritmo diagnóstico la tecnología NGS para secuenciar los genes completos F8, F9 y VWF. En el análisis de 100 pacientes se ha identificado la alteración molecular subyacente en el 99% de los casos, detectando alteraciones en el *splicing*, 2 regiones intrónicas recurrentes y 8 pacientes con alteraciones en el VWF. También hemos aplicado esta tecnología en el diagnóstico de los trastornos raros de la coagulación, identificando las alteraciones causantes de la enfermedad en 20 pacientes diferentes (FXIII, FVII, FXI, FV, FX, disfibrinogenemias, deficiencia de precalicreína)<sup>(14)</sup>.

#### **Perspectivas de futuro**

El diagnóstico del fenotipo hemorrágico es complejo y las pruebas de laboratorio, en ocasiones, son laboriosas, poco reproducibles y dependen de las condiciones preanalíticas, por lo que su estandarización es difícil. Los principales avances se han conseguido en el diagnóstico de los TPH, en el que la ISTH ha establecido un algoritmo de 3 pasos (Figura 4)<sup>(6)</sup>. En primer lugar, se realizan pruebas que están disponibles en la mayoría de los laboratorios<sup>(4)</sup>: frotis de sangre periférica, estudio básico de coagulación, despistaje de la EVW y de la deficiencia de FXIII, la realización de LTA (5 agonistas), análisis de las principales GP por CMF y la evaluación de la liberación de gránulos de las plaquetas.

En segundo lugar, se aplican técnicas disponibles en laboratorios más especializados<sup>(4)</sup>: se ampliará el número de agonistas y de anticuerpos en la LTA y en la CMF, respectivamente; se llevará a cabo la retracción del coágulo, TxB<sub>2</sub>, estudio del contenido granular (HPLC, ELISA, etc.) y la ME. El último paso debe incluir los estudios bioquímicos (Tabla 2) y los estudios de genética molecular. Dado que, con este algoritmo, estos trastornos se caracterizan completamente en menos del 50% de los casos<sup>(6)</sup>, se ha incorporado la metodología de NGS. En nuestra experiencia, la aplicación de la NGS nos ha permitido mejorar el rendimiento diagnóstico de estas enfermedades tan heterogéneas.





**Figura 4.** Algoritmo diagnóstico de los trastornos plaquetarios hereditarios, según las recomendaciones de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (ISTH) (modificado de Gresele et al.)<sup>(9)</sup>. A23287: ionóforo de calcio; AA: ácido araquidónico; ADP: adenosíntrifosfato; BAT: bleeding assessment tools; CMF: citometría de flujo; Col: colágeno; CRP: péptido relacionado con el colágeno; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; Epi: epinefrina; FVW: factor de von Willebrand; GP: glicoproteína; HPLC: high-performance liquid chromatography; LTA: light transmission aggregometry; ME: microscopía electrónica; NGS: next-generation sequencing; PAR1/PAR4: agonistas del receptor de la trombina 1 y 4; PMA: acetato de forbol miristato; RIA: radioinmunoanálisis; Risto: ristocetina; SP: sangre periférica; TRAP o U46619: agonista estable del receptor del tromboxano.

### Conclusiones

- Para el estudio funcional de la hemostasia debemos prestar especial atención a la fase preanalítica (obtención y manejo, transporte y conservación y procesamiento) que influye en la fiabilidad de los resultados.
- La estandarización de los test globales de hemostasia sigue siendo esencial para garantizar un test rápido, eficaz y fisiológico que permita identificar el fenotipo hemorrágico y monitorizar la eficacia del tratamiento.

- En el contexto actual, gracias al avance en el conocimiento genético-molecular y al desarrollo de la tecnología de NGS, parece razonable el empleo de estas herramientas para el diagnóstico de las DHH, principalmente, cuando existen múltiples genes candidatos (SHP), numerosos exones (MYH9-RD) y en los casos en los que las pruebas de laboratorio no facilitan la aproximación diagnóstica.
- El análisis de las regiones intrónicas requiere de potentes programas bioinformáticos, así como estudios celulares para establecer el mecanismo etiopatogénico.

## Aproximación diagnóstica en la enfermedad tromboembólica

Es una enfermedad frecuente, grave y multifactorial, que afecta tanto al sistema venoso (enfermedad tromboembólica venosa o ETV) como arterial (enfermedad tromboembólica arterial). Ocurre cuando se rompe el equilibrio entre los factores trombogénicos (alteración de la pared vascular y del flujo sanguíneo, activación plaquetaria y de la coagulación) y los mecanismos antitrombóticos protectores (endotelio, inhibidores de la coagulación y fibrinolisis)<sup>(15)</sup>. Además, los factores ambientales y/o desencadenantes son esenciales en su etiopatogenia, así como los factores genéticos, sobre todo en la ETV. El diagnóstico sigue siendo clínico y de imagen. Por tanto, el esfuerzo va encaminado a la predicción de la recurrencia y a la modificación de la duración del tratamiento<sup>(15)</sup>.

### Pruebas de laboratorio para identificar el fenotipo/genotipo trombótico

- El **dímero D** (DD) se puede determinar mediante métodos inmuniturbidimétricos. Son los más utilizados por ser rápidos y automatizados; sin embargo, no están estandarizados. La técnica *gold standard* es el ELISA. Debido a su alto VPN, es un excelente marcador para descartar la ETV. Es muy útil para predecir el riesgo de recurrencia y modificar la duración del tratamiento anticoagulante<sup>(15)</sup>.

- Los **test de hemostasia global**: el **TGT** permite detectar el pico de generación de trombina (Figura 3b) y se ha relacionado con los estados de hipercoagulabilidad (isquemia arterial, trombofilia, anticonceptivos, cáncer y embarazo)<sup>(11,16)</sup>. No existe correlación entre el pico de trombina y el DD, pero sí con el recuento de micropartículas (MP). El proyecto GAIT-2 ha relacionado el pico máximo de trombina (mediante TGT) con el riesgo de ETV y la presencia de variantes genéticas en los genes F5, F2, FGA, F10, F12 y TFPI. En este contexto, la aplicación del TGT podría ser de utilidad para predecir el riesgo trombótico en ETV y arterial, comprobar su relación con los nuevos genes implicados en el desarrollo de ETV y la monitorización del tratamiento antitrombótico<sup>(11,16)</sup>. La aplicación del **TEG/ROTEM** ha demostrado su utilidad en el paciente con cáncer (incremento de factor tisular o FT) y en el embarazo, situaciones ya de por sí protrombóticas. Tiene escasa sensibilidad en los pacientes con trombofilia. Tanto TGT como TEG/ROTEM requieren su estandarización y más estudios para poder recomendarlos en la práctica clínica habitual. Otros test que valoran la hemostasia global son<sup>(11,16)</sup>:

a) Generación de trombina-plasmina: valora específicamente la fibrinolisis y se está desarrollando en pacientes con trombosis arteriales adquiridas y vasculopatías (diabetes, preeclampsia y enfermedad coronaria).

b) Test trombodinámico: determina la formación de trombina mediada por el FT en plasma, mediante un videomicroscopio. La formación del trombo se relaciona con la presencia de MP y los factores de coagulación. En pacientes con sepsis, se ha correlacionado con el incremento de DD. Se está evaluando en hemopatías malignas y en cardiopatías.

c) *Flow perfusion chambers*: determina la función plaquetaria (adhesión, agregación y procoagulante) y la hemostasia secundaria. Está en desarrollo.

- Las **MP** son vesículas pequeñas de tamaño heterogéneo liberadas de las membranas plasmáticas tras la activación celular, apoptosis o daño tisular. Están implicadas en situaciones proinflamatorias y procoagulantes, debido a su composición (fosfolípidos cargados negativamente en su superficie, fosfatidil serina y FT)<sup>(17)</sup>. Los niveles elevados de MP en sangre pueden estar implicados en el riesgo de ETV en pacientes con trombofilia menor. Existe una gran controversia acerca de los métodos de aislamiento, de detección y en las condiciones preanalíticas para su estudio<sup>(17)</sup>.

- **Neutrophil extracellular traps** (NET): son redes extracelulares de ADN, histonas y proteínas que son liberadas por los neutrófilos (NETosis). Se han relacionado con la ETV y la isquemia miocárdica. Un nuevo sistema de CMF (*FLOW-based*) identifica y cuantifica las NET mediante anticuerpos frente al ADN, histonas y enzimas granulares. Puede ser de utilidad como un biomarcador de riesgo trombótico<sup>(18)</sup>.

- **Estudio genético**: la trombofilia hereditaria es la predisposición genética para el desarrollo de trombosis y ocurre principalmente en la ETV<sup>(19)</sup>. Se describe hasta en un 50% de los casos idiopáticos y es producida por mutaciones y polimorfismos (*single nucleotide polymorphism* o SNP) en los genes codificantes de las proteínas de la coagulación o de los sistemas anticoagulantes naturales, aunque la historia familiar sigue considerándose el factor de riesgo más importante<sup>(19)</sup>. Los principales estudios genéticos que han permitido identificar los *loci*/SNP relacionados con la ETV son los **GWAS** (Tabla 4)<sup>(19)</sup>. Sin embargo, no pueden determinar otro tipo de variantes (inserciones, deleciones, etc.). En este contexto, la **NGS** sería el método indicado para identificar esas variantes menos frecuentes. Hasta la fecha, 2 grandes estudios han analizado 186 genes candidatos asociados a un posible incremento de la susceptibilidad trombótica<sup>(20)</sup>. El grupo francés INNOVTE (<http://www.fcrin.org/en/support-tools/innovte-thrombosis>) está analizando familias con al menos 3 miembros con ETV no provocada mediante exoma completo.

### Perspectivas

En los casos de ETV idiopática, el riesgo de recurrencia al suspender el tratamiento anticoagulante es elevado,

**Tabla 4. Marcadores hemostáticos relacionados con trombofilia y el nivel de evidencia<sup>(19)</sup>**

Consolidada	Débil	Falta de evidencia
Deficiencia de AT, Prot C y Prot S FVL y gen protrombina Grupo sanguíneo no-O Niveles elevados FVIII Disfibrinogenemia Hiperhomocisteinemia	Niveles elevados de TAFI, fibrinógeno, FIX y FXI Polimorfismos de EPCR (receptor endotelial de la proteína C)	Deficiencia de plasminógeno. Niveles elevados de PAI-1, FV, FVII y FX. Niveles bajos de TFPI. Lipoproteína A. FXIII Leu34Val. Polimorfismos de MTHFR. Trombomodulina. PZ/ZPI. ADAMTS13

incluso el 10% de los pacientes fallece por un tromboembolismo pulmonar. La identificación de los grupos de riesgo sigue siendo un reto para el clínico. Todos los esfuerzos van encaminados a identificar a aquellos pacientes que se puedan beneficiar de un cambio en el tratamiento. Estos perfiles combinan factores genéticos y ambientales. Existen varios trabajos que han establecido escalas de riesgo mediante el análisis de SNP identificados por GWAS:

- Hugoline *et al.* aplicaron un *score* de 5-SNP. Consideraron un efecto independiente de cada SNP sin valorar las interacciones gen-gen ni los factores ambientales<sup>(23)</sup>.

- Van Hylckama *et al.* compararon la aplicación de un *score* con 31-SNP frente a 5-SNP (ABO, F11, F2, F5 y FGG) sin encontrar diferencias significativas. Es decir, aplicando sólo el *score* de 5-SNP, identificaban los mismos pacientes de riesgo<sup>(22)</sup>.

- En esta misma línea, en España se ha comparado el *score* Thrombo inCode® (TiC), que aplica 12 SNP (incluye F5, F2, F12, F13, SERPINC1, SERPINA10 y A1), con los *scores* publicados previamente mejorando la capacidad para identificar a los pacientes de mayor riesgo de ETV<sup>(23)</sup>.

- Por último, el estudio prospectivo *DAMOVE* ha identificado un perfil de riesgo que combina factores genéticos (FVL y F2) con las características clínicas (DD, edad, mutación, obesidad, varices, factor VIII y sexo).

Sin embargo, la aplicación de estas escalas de riesgo debe ser analizada en ensayos clínicos aleatorizados para poder valorar un cambio en la terapia anticoagulante.

Por otra parte, se están llevando a cabo estudios para determinar cómo la interacción SNP-SNP y/o gen-gen puede incrementar el riesgo de ETV. Hasta la fecha han identificado 17 genes interrelacionados (por ejemplo, F9, PROC, PROS1, SERPINC1, THBD). Otros mecanismos epigenéticos, como la metilación en el ADN, asociado a marcadores de generación de trombina, podrían estar relacionados con el riesgo de ETV; sin embargo, no existen datos suficientes que lo avalen<sup>(21)</sup>.

### Conclusiones

- En los últimos 20 años se han estudiado biomarcadores fenotípicos y genotípicos asociados a ETV; sin embargo, su utilidad clínica sigue siendo controvertida.

- La historia clínica es fundamental para determinar la causa de ETV. El estudio genético está indicando en pacientes jóvenes con ETV idiopática o recurrente.

- La estandarización de los test fisiológicos globales que faciliten la identificación de los estados de hipercoagulabilidad y del manejo de la terapia antitrombótica es un reto para el médico.

- La identificación de pacientes de alto riesgo trombótico es necesaria para la valoración adecuada del tratamiento anticoagulante.

### Bibliografía

1. Israels SJ El-Ekiaby M, Quiroga T, Mezzano D. Inherited disorders of platelet function and challenges to diagnosis of mucocutaneous bleeding. *Haemoph* 2010; 16: 152-9.
2. Balduini CL, Pecci A, Noris P. Diagnosis and management of inherited thrombocytopenias. *Semin Thromb Hemost* 2013; 39: 161-71.
3. Rodeghiero F, Tosetto A, Abshire T, Arnold DM, Coller B, James P, et al. ISTH/SSC bleeding assessment tool: a standardized questionnaire and a proposal for a new bleeding score for inherited bleeding disorders. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 2063-5.
4. Gresele P, Harrison P, Bury L, Falcinelli E, Gachet C, Hayward C, et al. Diagnosis of suspected inherited platelet function disorders: results of a worldwide survey. *J Thromb Haemost* 2014; 12: 1562-9.
5. Lordkipanidzé M. Platelet function tests. *Semin Thromb Hemost* 2016; 42: 258-67.
6. Gresele P; Subcommittee on Platelet Physiology. Diagnosis of inherited platelet function disorders: guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2015; 13: 314-22.
7. Dovlatova N. Current status and future prospects for platelet function testing in the diagnosis of inherited bleeding disorders. *Br J Haematol* 2015; 170: 150-61.
8. Sánchez-Guiu I, Antón AI, Padilla J, Velasco F, Lucia JF, Lozano M, et al. Functional and molecular characterization of inherited platelet disorders in the Iberian Peninsula: results from a collaborative study. *Orphanet J Rare Dis* 2014; 9: 213.
9. Mumford A, Frelinger AL 3rd, Gachet C, Gresele P, Noris P, Harrison P, Mezzano D. D. A review of platelet secretion assays for the diagnosis of inherited platelet secretion disorders. *Thromb Haemost* 2015; 114: 14-25.
10. Laffan MA, Lester W, O'Donnell JS, Will A, Tait RC, Goodeve A, et al. The diagnosis and management of von Willebrand disease: a United Kingdom Haemophilia Centre Doctors Organization guide-

- line approved by the British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol* 2014; 167: 453-65.
11. Lancé MD. A general review of major global coagulation assays: thrombelastography, thrombin generation test and clot waveform analysis. *Thromb J* 2015; 13: 1.
  12. Sikkema-Raddatz B, Johansson LF, de Boer EN, Almomani R, Boven LG, van den Berg MP, et al. Targeted next-generation sequencing can replace Sanger sequencing in clinical diagnostics. *Hum Mutat* 2013; 34: 1035-42.
  13. Biesecker LG, Green RC. Diagnostic clinical genome and exome sequencing. *N Engl J Med* 2014; 370: 2418-25.
  14. Bastida JM, del Rey M, Lozano ML, Sarasquete ME, Benito R, Fontecha ME, et al. Design and application of a 23-gene panel by next-generation sequencing for inherited coagulation bleeding disorders. *Haemophilia* 2016; 1-8.
  15. Van Hylckama Vlieg A, Baglin CA, Luddington R, MacDonald S, Rosendaal FR, Baglin TP. The risk of a first and a recurrent venous thrombosis associated with an elevated D-dimer level and an elevated thrombin potential: results of the THE-VTE study. *J Thromb Haemost* 2015; 13: 1642-52.
  16. Lipets EN, Ataullakhanov FI. Global assays of hemostasis in the diagnostics of hypercoagulation and evaluation of thrombosis risk. *Thromb J* 2015; 13: 4-19.
  17. Van der Pol E, Coumans F, Varga Z, Krumrey M, Nieuwland R. Innovation in detection of microparticles and exosomes. *J Thromb Haemost* 2013; 11: 36-45.
  18. Gavillet M, Martinod K, Renella R, Harris C, Shapiro NI, Wagner DD, Williams DA. Flow cytometric assay for direct quantification of neutrophil extracellular traps in blood samples. *Am J Hematol* 2015; 90: 1155-8.
  19. Franchini M, Martinelli I, Mannucci PM. Uncertain thrombophilia markers. *Thromb Haemost* 2016; 115: 25-30.
  20. Cunha ML, Meijers JC, Middeldorp S. Introduction to the analysis of next generation sequencing data and its application to venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2015; 114: 920-32.
  21. Morange PE, Suchon P, Trégouët DA. Genetics of venous thrombosis: update in 2015. *Thromb Haemost* 2015; 114: 910-9.
  22. Van Hylckama Vlieg A, Flinterman LE, Bare LA, Cannegieter SC, Reitsma PH, Arellano AR, et al. Genetic variations associated with recurrent venous thrombosis. *Circ Cardiovasc Genet* 2014; 7: 806-13.
  23. Soria JM, Morange PE, Vila J, Souto JC, Moyano M, Trégouët DA, et al. Multilocus genetic risk scores for venous thromboembolism risk assessment. *J Am Heart Assoc* 2014; 3: e001060.

---

## Nuevos medicamentos en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares

JUAN TAMARGO

*Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid*

A lo largo del siglo XX la investigación farmacológica permitió el desarrollo de fármacos seguros y eficaces para el tratamiento de las patologías más prevalentes. Ello se ha traducido en una disminución de la morbi-mortalidad y en un aumento de las expectativas de vida de la población. Basta con pensar que la esperanza de vida de la población española que en 1900 era de 34,76 años ha pasado en 2014 a 83,3 años. Y ello, que es motivo de alegría, tiene una indudable repercusión sociosanitaria, ya que los mayores de 65 años presentan al menos una enfermedad crónica (pluripatología) y, como consecuencia, deben ser tratados con múltiples fármacos (plurifarmacia), dispositivos y productos sanitarios. En la actualidad predominan las enfermedades crónico-degenerativas (cardiopatía isquémica, insuficiencia cardiaca, fibrilación auricular, enfermedades cerebrovasculares, diabetes, hipertensión arterial, cánceres, demencias, enfermedades crónicas de las vías respiratorias, insuficiencia renal, osteoporosis) y padecimientos relacionados con los cambios de estilos de vida de la población (por ejemplo, obesidad, depresión). Es decir, que la cronicidad se ha convertido en la epidemia del siglo XXI y ya es la primera causa de discapacidad en nuestra sociedad. Y toda esta atención sanitaria es demandada por una población cada vez más activa y responsable y mejor informada, que ha pasado de ser un agente pasivo receptor de una prescripción a jugar un papel protagonista en la toma de decisiones de que afectan a su salud.

---

### El desarrollo de nuevos fármacos se complica cada vez más

El desarrollo de un nuevo fármaco es un proceso largo (10-12 años de promedio), complejo (implica la colaboración de múltiples especialistas) y costoso (al menos 1.500 millones de euros). Este proceso es una carrera contra el tiempo a fin de incrementar el que transcurre entre la comercialización del fármaco y la expiración de la patente y la aparición de competidores genéricos. Además, y a diferencia de otras actividades industriales,

el desarrollo de un fármaco está sometido a múltiples controles que evalúan su eficacia y seguridad a nivel europeo (European Medicines Agency –EMA–) y nacional (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios –AEMPS–), a lo que debemos sumar los controles que cada comunidad autónoma establece por su cuenta. Por otro lado, parece lógico que cada vez sea más difícil desarrollar nuevos fármacos en áreas como la cardiovascular (CV) en la que disponemos de un amplio arsenal terapéutico y en la que múltiples fármacos son genéricos de muy bajo coste, lo que explica por qué en los últimos años el desarrollo de algunos fármacos ha sido suspendido por motivos “estratégicos”. Por ello, en el futuro inmediato los grandes avances serán menos frecuentes y muchos desarrollos buscarán mejorar la seguridad de los fármacos disponibles.

---

### Los avances más importantes de los últimos 5 años

Los avances más importantes en el área CV se resumen en la [Tabla 1](#).

#### *Tratamiento de la hipercolesterolemia*

Existe una relación directa entre el aumento de los niveles plasmáticos de colesterol total y unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) y la aparición de complicaciones arterioscleróticas (cardiopatía isquémica, hipertensión arterial, accidentes cerebrovasculares, enfermedad vascular periférica). Por el contrario, la normalización de los niveles de LDL-C retrasa la progresión de la placa de ateroma y disminuye la morbi-mortalidad. Las estatinas han representado un importante avance, pero el 60% de los pacientes tratados no alcanza las cifras de LDL-C recomendadas en las guías terapéuticas. Recientemente se han aprobado 2 anticuerpos recombinantes humanizados (alirocumab, evolocumab) que inhiben la proteína convertasa subtilisina kexina 9 (PCSK9) que, en condiciones normales, se une a los receptores para el LDL-C y facilita

**Tabla 1. Nuevos fármacos cardiovasculares**

1. Agonistas parciales del receptor A1 de la adenosina: neladenoson dalanato
2. Antiagregantes:
  - Antagonistas del receptor P2Y<sub>12</sub> plaquetario: cangrelor, elinogrel, prasugrel, ticagrelor
  - Antagonistas del receptor TP del tromboxano A2: picotamide, ramatrobán, terutrobán
  - Antagonistas del receptor activado por proteasas PAR-1 plaquetario: atopaxar, vorapaxar
3. Antiarrítmicos: vernakalant
4. Anticoagulantes:
  - Anti-IIa: dabigatrán, bivalirudina
  - Anti-Xa: apixabán, edoxabán, rivaroxabán
  - Antídotos: idarucizumab, andexanet alfa, ciraparantag
5. Antihipertensivos:
  - Análogos de GLP-1: albiglutida, dulaglutida, exenatida, liraglutida, lixisenatida, semaglutida
  - Inhibidores de DPP-4: alogliptina, linagliptina, saxagliptina, sitagliptina, vildagliptina
  - Inhibidores del cotransportador sodio-glucosa de tipo 2: canagliflozina, dapagliflozina, empagliflozina, ertugliflozina
  - Nuevas insulinas: Abasaglar®, insulina degludec
6. Antagonista de los receptores AT1 e inhibidor de la neprilisina: Entresto® (LCZ699)
7. Antianginosos: alopurinol, ranolazina
8. Antiinflamatorios: antagonistas del receptor de IL-1b: anakinra
9. Hipertensión arterial pulmonar:
  - Estimuladores de la guanilil ciclasa soluble: riociguat, vericiguat
  - Antagonistas de los receptores de la endotelina-1: macitentan
  - Agonistas del receptor de la prostaciclina: selexipag
  - Inhibidores de la fosfodiesterasa 5: udenafil
10. Hipocolesterolemiantes:
  - Inhibidores de la proteína convertasa subtilisina kexina 9 (PCSK9): alirocumab, evolocumab
  - Inhibidores de la proteína de transferencia microsomal de triglicéridos: lomitapida
  - Oligonucleótido no codificante contra el ARNm de la apo B-100: mipomerseno
11. Hormonas: serelaxina
12. Inhibidores del sistema renina-angiotensina-aldosterona:
  - Antagonistas no esteroideos de receptor de mineralocorticoides: finerenona
  - Ligandos "sesgados" (*biased ligands*) del receptor AT1: TVR120027
13. Inotrópicos positivos: omecamtiv mecarbil, donadores de grupos nitrosilo (CXL-1427)
14. Antioxidantes: inhibidores de la xantina-oxidasa (alopurinol, febuxostat)
  15. Péptidos natriuréticos auriculares: cenditida (CD-NP), ANX-042, PL-3994, ularitida
16. Simpaticolíticos: bucindolol, mirabegón (agonista b3-adrenérgico)
17. Vasodilatadores:
  - Antagonistas del receptor de vasopresina: ribuvaptán
  - Urocortinas
18. Polipíldora

su degradación. Estos anticuerpos reducen los niveles plasmáticos de LDL-C hasta en un 60% en pacientes tratados con dosis altas de estatinas y han sido aprobados como tratamiento complementario a la dieta: a) en monoterapia o en combinación con otros hipolipemiantes en pacientes con intolerancia a las estati-

nas, o en los que éstas están contraindicadas; y b) en adultos con hipercolesterolemia primaria (familiar heterocigótica y no familiar) o dislipidemia mixta, en combinación con una estatina y/o otros hipolipemiantes en pacientes que no consiguen alcanzar la cifras recomendadas de LDL-C con la dosis máxima de estatinas. Evolocumab, asociado a otros tratamientos hipolipemiantes, también está indicado en adultos y adolescentes (> 12 años) con hipercolesterolemia familiar homocigótica (HFHo). Ambos fármacos se dispensan en jeringas precargadas para su administración cada 2 o 4 semanas, lo que simplifica el tratamiento. También se han introducido 2 nuevos fármacos para el tratamiento de la HFHo cuando las cifras de LDL-C no están controladas con otros tratamientos (fármacos y LDL-aféresis) o cuando ésta última no está disponible: 1) lomitapida, un inhibidor de la proteína de transferencia microsomal de triglicéridos (PTM); y 2) mipomerseno, un oligonucleótido no codificante contra el ARN mensajero de la apolipoproteína (apo) B-100. El reto de todos estos fármacos es demostrar que su uso reduce la mortalidad CV en el paciente hipercolesterolemico y confirmar su seguridad a largo plazo.

#### Nuevos anticoagulantes y antiagregantes

La enfermedad aterotrombótica constituye la primera causa de morbimortalidad en las sociedades desarrolladas. Los viejos anticoagulantes orales antagonistas de la vitamina K son fármacos que presentan un estrecho margen terapéutico y múltiples interacciones con otros fármacos y alimentos y precisan una monitorización periódica del paciente. Se han introducido nuevos anticoagulantes inhibidores de los factores IIa-trombina (bivalirudina, dabigatrán) y Xa (apixabán, edoxabán, rivaroxabán), que en pacientes con fibrilación auricular no valvular con 1 o más factores de riesgo han permitido reducir los ictus y/o accidentes tromboembólicos sistémicos (15%), las hemorragias intracraneales (52%) y la mortalidad (14%) con respecto a la warfarina (fármaco apenas utilizado en España). Una de las mayores críticas era la falta de un antídoto en pacientes con hemorragias no controladas o potencialmente mortales, o en intervenciones/procedimientos urgentes. En la actualidad ya disponemos de idarucizumab, anticuerpo monoclonal murino humanizado que antagoniza los efectos de dabigatrán. En desarrollo se encuentran andexanet alfa, proteína recombinante diseñada para revertir las acciones de los inhibidores directos del factor Xa, y ciraparantag, un antagonista frente a inhibidores de los factores IIa y Xa y heparinas (no fraccionada o de bajo peso molecular). También disponemos de nuevos antiagregantes que actúan como antagonistas de los receptores plaquetarios P2Y<sub>12</sub> para el ADP o PAR-1 de la trombina PAR-1.

### Tratamiento de la insuficiencia cardiaca

El principal avance de los últimos 15 años en la insuficiencia cardiaca con fracción de eyección reducida ha sido el LCZ699 (Entresto®), asociación de valsartán (antagonista de los receptores AT1 de la angiotensina II) y un inhibidor de la neprilisina (sacubitril). Como consecuencia, inhibe las acciones deletéreas de la angiotensina II mediadas a través de la estimulación del receptor AT1 y potencia las acciones beneficiosas de los péptidos natriuréticos auriculares que son degradados por la neprilisina. En un estudio comparativo, Entresto® reducía la mortalidad CV y las hospitalizaciones por insuficiencia cardiaca un 20% más que el enalapril (10 mg 2 veces al día –b.i.d.–). Sin embargo, los inhibidores del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) reducen más las hospitalizaciones que la mortalidad. La seguridad (riesgo de hipotensión, hiperpotasemia, angioedema) y eficacia de Entresto® en diversas patologías CV se está analizando en más de 20 ensayos clínicos.

Otros fármacos prometedores son los nuevos antagonistas no esteroideos de los receptores de mineralocorticoides, que presentan una alta afinidad y especificidad por dichos receptores y una distribución amplia tisular (cardiaca y renal). En estudios comparativos, finerenona produce menos hiperpotasemia y deterioro renal que espironolactona o eplerenona.

Sin embargo, ningún fármaco ha demostrado ser efectivo en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca con fracción de eyección preservada y llama la atención que en los últimos 25 años sólo se haya comercializado 1 fármaco para el tratamiento de la insuficiencia cardiaca aguda (levosimendán en Europa y nesiritida en los Estados Unidos).

En la actualidad se encuentran en desarrollo serelaxina, nuevos inotrópicos, péptidos natriuréticos auriculares, simpaticolíticos y vasodilatadores (Tabla 1).

### Fármacos antianginosos

Las últimas guías europeas han confirmado que ranolazina es capaz de reducir los niveles de HbA1c, lo que lo convierte en el antianginoso de elección en pacientes diabéticos, y han incorporado el alopurinol como fármaco de tercera elección.

### Fármacos antihipertensivos

*A priori* puede sorprender que desde hace 15 años no haya habido ninguna incorporación de nuevos fármacos antihipertensivos novedosos, lo que podría ser consecuencia de la gran cantidad de fármacos, con mecanismos de acción bien dispares, ya disponibles en el mercado. Ello contrasta con la incorporación de 3 fami-

lias de fármacos que han revolucionado el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar.

### La polipíldora

La estrategia de combinar varios fármacos de reconocida seguridad y eficacia en una misma formulación galénica (“polipíldora”) representa un importante avance en la prevención secundaria de las enfermedades CV, particularmente en la población anciana que presenta pluripatología y pobre adherencia al tratamiento (véase más adelante). Recientemente, se ha aprobado la primera polipíldora (que contiene atorvastatina, ácido acetilsalicílico y ramipril) diseñada por una empresa española para la prevención secundaria de accidentes CV, como tratamiento de sustitución en pacientes adultos controlados de forma adecuada con los monocomponentes administrados en dosis terapéuticas equivalentes. La polipíldora permite reducir el número de tomas, lo que se traduce en una mayor adherencia del paciente al tratamiento. Es de esperar que en los próximos años dispongamos de polipíldoras para el tratamiento de otras patologías (metabólicas-diabetes, respiratorias y osteoarticulares).

### Nuevos fármacos antidiabéticos

En los últimos años se han introducido: 1) nuevas insulinas: Abasaglar®, un biosimilar de insulina glargina, producido por técnicas de ADN recombinante, e insulina degludec, una insulina ultralenta que presenta una duración de 24 horas y un menor riesgo de hipoglucemias nocturnas; 2) reguladores del efecto incretina –análogos del péptido similar al glucagón de tipo 1 o GLP-1 e inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 o DPP-4); y 3) inhibidores del cotransportador sodio-glucosa de tipo 2 (SGLT-2). El estudio de la seguridad CV de los reguladores del efecto incretina y los inhibidores del SGLT-2 ha conducido a efectos contradictorios. Por una parte, alogliptina y saxagliptina aumentan el riesgo de insuficiencia cardiaca en pacientes con cardiopatías o nefropatías. Sin embargo, en pacientes con diabetes de tipo 2 y enfermedad CV establecida, empagliflozina (inhibidor de SGLT-2) reduce la mortalidad CV, las hospitalizaciones por insuficiencia cardiaca y la mortalidad por cualquier causa, y liraglutida (análogo de GLP-1) prolonga el tiempo hasta la aparición de un evento CV (mortalidad CV, infarto de miocardio no fatal o ictus no fatal). Estos hallazgos plantean una nueva redacción de las guías de atención del paciente diabético. En el momento actual más de 140.000 pacientes están incluidos en ensayos clínicos cuyos resultados nos permitirán conocer las diferencias en seguridad CV de los nuevos fármacos antidiabéticos.

## Las reacciones adversas como causa del abandono de nuevos fármacos

A *priori*, puede sorprender que casi el 50% de los fármacos no puede comercializarse por la aparición de reacciones adversas y/o múltiples interacciones medicamentosas durante los estudios de fase II y III. Ello es fácil de explicar ya que la mayoría de los modelos animales utilizados no permiten reproducir las reacciones adversas observadas en la clínica. Las células aisladas no reproducen el comportamiento de un órgano y los animales de experimentación son jóvenes y sanos y en ellos se induce de forma rápida una enfermedad que en ocasiones el animal no padece. Por el contrario, la patología CV aparece en adultos-ancianos y la enfermedad tarda años/décadas en desarrollarse. Además, los animales no presentan las comorbilidades ni reciben los complejos tratamientos (> 6 fármacos en muchos casos) que los pacientes sí reciben.

Recientemente, 2 artículos publicados por el *European Heart Journal* han reconocido: 1) que los antiinflamatorios no esteroideos (AINE), que muchas veces se utilizan sin prescripción médica, incrementan la incidencia de cardiopatía isquémica, ictus, fibrilación auricular e insuficiencia cardíaca o renal, lo que exige una prescripción racional de los AINE; 2) la aparición de la cardio-oncología en respuesta al incremento de reacciones adversas CV graves (insuficiencia cardíaca, arritmias cardíacas, tromboembolismos, etc.) observadas en pacientes cancerosos tratados con fármacos antitumorales.

## Nuevos retos

Muchas veces pensamos que la solución está en desarrollar nuevos fármacos, olvidando que podemos alcanzar importantes avances si conseguimos:

1. Que el paciente no abandone el tratamiento. En la Unión Europea la falta de adherencia al tratamiento es responsable de, al menos, un 9% de todos los eventos CV y unas 200.000 muertes anuales y conlleva un coste anual de 125 billones de euros. Por tanto, mejorar la adherencia al tratamiento es uno de nuestros mayores retos para reducir la morbimortalidad CV.

2. Reconocer que las mujeres, que sólo representan el 35% de los participantes los ensayos clínicos, presentan una forma de enfermar y pueden responder al tratamiento de forma distinta a los varones.

3. Recuperar viejos fármacos. En ocasiones descubrimos que algunos fármacos son efectivos en procesos para los que no habían sido originalmente diseñados. Así, la espironolactona (viejo diurético) es hoy un fármaco de elección en el tratamiento de la hipertensión arterial resistente y la insuficiencia cardíaca, el alopurinol (antigotoso) en el tratamiento de la angina de pecho o la ivabradina (antianginoso) en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca. El principal problema es que una vez que un fármaco se convierte en genérico, nadie está dispuesto a invertir un solo euro para estudiar sus nuevas posibles aplicaciones clínicas.

4. La formación continua del prescriptor, que debe conocer la seguridad (reacciones adversas e interacciones) y eficacia de los fármacos que recibe el paciente. Éste es un problema importante con los nuevos fármacos, cuya seguridad y eficacia ha sido analizada en condiciones bien distintas a las de la clínica diaria y es particularmente grave en la población anciana que, por lo general, es excluida de los ensayos. La formación terapéutica sería, actualizada e independiente es una obligación de administraciones y sociedades científicas, pues redundaría en un mejor tratamiento de los pacientes.

5. Identificar las causas de la gran variabilidad interindividual en la respuesta a los medicamentos, ya que es bien conocido que un 40-60% de pacientes hipertensos no responde a un determinado fármaco antihipertensivo en monoterapia y lo mismo sucede con los antidepressivos o los antipsicóticos, por poner sólo un par de ejemplos. Estos cambios en la respuesta están asociados a la presencia de variaciones en los genes que codifican las dianas terapéuticas (receptores, canales, transportadores o enzimas) o que determinan la concentración que el fármaco alcanza en su lugar de acción y que es la resultante de los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción. Conocer estas alteraciones nos permite explicar las grandes variaciones en la respuesta a clopidogrel, warfarina, estatinas, beta-bloqueantes, inhibidores del SRAA, etc. Esto implica introducir la farmacogenética (que estudia las bases genéticas de las diferencias interindividuales en la respuesta a los fármacos) y la farmacogenómica (estudio de la variabilidad en la expresión génica en respuesta a determinados fármacos) en fases tempranas de los ensayos clínicos. Ello permitirá diseñar tratamientos individualizados más seguros y eficaces, que a fin de cuentas es el objetivo final de la terapéutica médica.