

PROGRAMA EDUCACIONAL

**Coordinadores: M.A. Sanz
J. Monasterio**

Introducción

COORDINADORES: A. TORRES GÓMEZ. *Córdoba*
F. HERNÁNDEZ. *Madrid*

XLVII REUNIÓN NACIONAL AEHH
XXI CONGRESO NACIONAL SETH

El gran avance que experimentan los diferentes campos de la hematología y la velocidad con que estos se producen, hace que sea difícil establecer programas de educación continuada que cubran con solvencia todas las posibles tópicos. En este sentido, serían precisos verdaderos megaprogramas para atender en su totalidad todas estas novedades. Por otra parte, es necesario que en la investigación básica o clínica, exista una cierta sedimentación de los conocimientos para que éstos puedan encuadrarse, con ciertas garantías, entre las cuestiones establecidas. Por estos dos motivos, a la hora de elaborar este programa educacional correspondiente a la Reunión de la AEHH de Madrid 2005, ha sido necesario elegir los temas que nos han parecido más novedosos o nunca tratados y aquellos que por su continua actualidad requieren revisiones más periódicas, dentro de un marco limitado de tiempo. Naturalmente toda elección conlleva el establecimiento de unas preferencias que no siempre complacen todas las opiniones. En este sentido nos gustaría que este Programa Educacional cubriera las máximas expectativas posibles y fuera del agrado de la mayoría de congresistas. Creemos que desde nuestra óptica los tópicos elegidos cubren un amplio abanico de los diversos campos de la hematología, hemostasia —coagulación y hemoterapia que resultaran atractivos por su novedad o su actualización

Los ponentes elegidos poseen una notable experiencia en el tema que cada uno trata, y en nuestra opinión tienen la suficiente capacidad de transmisión docente como para lograr el mejor aprovechamiento de los hematólogos tanto en formación como para aquellos que buscan en el programa la puesta al día que periódicamente necesitan, así como una actualización sobre temas de su interés y que precisan en el desarrollo de su quehacer asistencial diario. También, otros temas, más distantes de la actividad cotidiana de su ejercicio profesional le servirán tal vez para mejorar o poner a punto su formación profesional, ardua e infinita tarea que siempre acompaña el devenir profesional médico.

A continuación hacemos un breve resumen-presentación de los diversos temas que se tratan y el ponente encargado de desarrollarlo.

La anemia es un trastorno prevalente en todo el mundo. Puede presentar un factor topográfico de incidencia coincidiendo con las zonas de hipoalimentación (anemias carenciales en hierro y vitaminas) o geográ-

fico (Mediterráneo en la β -talasemia o Extremo Oriente en la α -talasemia) También en el mundo desarrollado la anemia en general ocupa un nivel destacado de incidencia (sobre todo la anemia ferropénica). Sin embargo existen anemias raras o poco frecuentes, que tienen una baja incidencia poblacional, pero que representan un problema diagnóstico importante. Esto se ha incrementado con la emigración, que ha distorsionado el factor geográfico que en tiempos pasados permanecía constante por el escaso movimiento de poblaciones y constituía un factor diagnósticamente orientador. El Dr. J. L. Vives con la autoridad que le aporta su gran experiencia y el liderar el grupo ENERCA (European Network for Rare and Congenital Anemias) creada por la Dirección General de Salud Pública de la Comisión Europea, aborda con particular claridad y solvencia las pautas y algoritmos diagnósticos, así como la metodología necesaria para la detección de estos infrecuentes procesos, con el fin de iniciar un tratamiento más precoz que nos permita una máxima eficacia y un mínimo de secuelas.

En los últimos años, las células dendríticas se han convertido en un foco de enorme interés en la investigación básica y clínica. La compleja biología de estas células centinelas del sistema inmunitario está siendo intensamente diseccionada, poniendo al descubierto su capacidad única tanto para promover la estimulación linfocitaria antígeno-específica como para inducir la tolerancia a antígenos propios. Simultáneamente, se han optimizado los métodos para generar células dendríticas en cantidad suficiente que permita desarrollar vacunas para el tratamiento de neoplasias sólidas y hematológicas. Los resultados de los ensayos clínicos fase I, animan a continuar avanzando en esta modalidad de inmunoterapia que podría constituir en el futuro un sólido pilar en la curación de diversas hemopatías. El Dr. J. Sánchez hace una necesaria síntesis, aunque nos introduce con precisión en este complejo tema, poniendo unas sólidas bases sobre las que incrementar nuestros conocimientos.

La estrategia terapéutica de la leucemia mieloide crónica (LMC) es actualmente uno de los temas más movidos de la Hematología Clínica. El impacto tras la generalización del trasplante alogénico HLA genéticamente idéntico de progenitores hematopoyéticos (TPH) como tratamiento de la LMC, ya supuso una gran controversia respecto a su indicación en comparación con la terapia con interferón- α y sobre todo en

pacientes por encima de 45 años. La introducción en los últimos años de los trasplantes HLA-idénticos de donantes no emparentados y la aplicación clínica de inhibidores de la proteínasa como el Imatinib Mesylate, han complicado extraordinariamente la toma de decisiones terapéuticas. El Dr. E. Olavarría haciendo un análisis de su enorme experiencia, contesta con extraordinaria solvencia muchas de estas candentes cuestiones, clarificando hasta dónde es posible las decisiones a tomar ante un paciente con LMC.

Las células leucémicas presentan alteraciones genéticas y epigenéticas que disregulan procesos celulares esenciales conduciendo a un desorden en la proliferación y diferenciación normales. La regulación epigenética del genoma está mediada por la interacción entre la metilación del ADN, cromatina, histonas y diversos factores de transcripción. Estudios recientes han mostrado que algunos de estos elementos del sistema epigenético tienen un papel fundamental en la patogenia y pronóstico de las neoplasias humanas. El Dr. Román expondrá las bases moleculares de estos mecanismos epigenéticos asociados al cáncer y su posible implicación en la génesis y evolución de las neoplasias hematológicas.

La importancia de la alorreactividad definida como todos aquellos fenómenos biológicos que suceden al contacto de células inmunocompetentes de dos individuos genéticamente diferentes, en el trasplante de TPH es crucial para explicar los fenómenos clínico-biológicos de rechazo del injerto, enfermedad del injerto contra el huésped aguda y crónica (EICHA y EICHC), así como el quimerismo y el establecimiento de la tolerancia inmunológica. El Dr. Gallardo, hace un cuidadoso análisis de los factores genéticos que pueden ser causantes de EICHA en alo-TPH de un donante familiar HLA-A-B-DRB1 idéntico, caracterizando causas tales como: disparidad de genes HLA no habitualmente tipados, disparidad o polimorfismo de antígenos menores de histocompatibilidad, polimorfismo de genes productores de citocinas, de genes relacionados con el sistema inmunitario o el metabolismo de fármacos. En cuanto a los donantes idénticos no emparentados y los haplo-idénticos añade a estos factores el estudio de la disparidad en genes *KIR* (Killer Inhibitory Receptors) y su influencia en la recaída leucémica post-alo-TPH. También nos introduce en el concepto de los antígenos maternos no heredados (NIMA) y la influencia de su disparidad en la incidencia de EICHA grave. Finalmente describe la relación entre quimerismo post-TPH y la tolerancia inmunológica.

El tratamiento de los linfomas siempre es un tema periódicamente recurrente debido a las novedades terapéuticas que se suelen producir, bien de nuevos agentes o la estrategia en su combinación, o bien por el análisis particular de grupos de distinta histogénesis o diferente pronóstico. En este caso el Dr. E. Conde revisa la estrategia actual en el tratamiento de los linfomas de células grandes B (LCG), el más frecuente de los linfomas no hodgkinianos. Los diferentes perfiles moleculares de estos linfomas determinado por *micro-*

arrays y su importancia pronóstica, el análisis de respuestas a la luz del IPI (Índice Pronóstico Internacional), el impacto de nuevas técnicas diagnósticas (PET) en la definición de la remisión, así como el empleo de nuevos agentes en la estrategia terapéutica, son unos de los principales tópicos que con extensión y rigor se abordan en esta ponencia.

El uso terapéutico de derivados plasmáticos ha experimentado en los últimos años una serie de cambios motivados por determinadas circunstancias que hacen recomendable un replanteamiento de sus indicaciones. Éstas, han sido fundamentalmente el conocimiento de las enfermedades transmisibles por productos hemáticos, demostradas (VIH, VHC, hepatitis B, CMV, etc.) o posibles (Creutzfeldt-Jakob, fiebre del Nilo, etc.). Por otra parte, la elaboración de una larga serie de productos derivados de fracciones plasmáticas con carácter procoagulante o inhibidor, con una incuestionable eficacia y seguridad (técnicas de inactivación viral) así como el desarrollo de productos de tecnología recombinante han supuesto un alto coste económico que hace necesario un empleo racionalizado de los mismos. La Dra. Lozano en su ponencia hace una amplia revisión de las indicaciones de los derivados plasmáticos, a la luz de los conocimientos actuales, pormenorizando el uso realmente establecido de cada uno de ellos. Aspectos tales como indicaciones, dosificación y matizaciones del uso de derivados plasmáticos (albúminas, fibrinógeno, factores de coagulación, inhibidores), de productos obtenidos por técnicas recombinantes y de las inmunoglobulinas específicas e inespecíficas, se detallan sumariadas en didácticas tablas complementarias.

La púrpura trombótica trombocitopénica (PTT) es una infrecuente y misteriosa enfermedad descrita en 1924 por Moschowitz, quien la atribuyó a la acción de un potente veneno (hemolítico y aglutinante). La etiopatogenia de esta enfermedad a pesar de los notables avances registrados en los últimos años, aún permanece sin aclarar completamente. El Dr. A. Pereira, en su ponencia hace una exhaustiva revisión de los aspectos patogénicos resaltando el papel de los múltiples de factor von Willebrand (FvW) y de las metaloproteasa (ADAMTS-13) en la génesis de las trombosis de arteriolas y pequeños vasos. Trombos ricos en plaquetas y FvW, y pobres en fibrina. Destaca el autor que el déficit hereditario o adquirido de ADAMTS-13 no es suficiente para producir la PTT y necesitaría diversos factores de realización, conocidos (procesos que cursan con liberación de sustancias estimulantes del endotelio como histamina, TNF- α , o interleucinas) o desconocidos. El controvertido papel de los anticuerpos antimetaloproteasa, y su influencia en el pronóstico, así como las pautas terapéuticas actuales son también extensamente tratadas en este trabajo.

El síndrome de coagulación intravascular diseminado (SCID), concepto establecido en la década de los años 1960, es un tema que fisiopatológicamente era explicado hasta hace poco tiempo con los conceptos biológicos paralelamente coetáneos. Sin embargo, los conocimientos en cuanto a interacciones de factores de la coagulación, hemostasia primaria, inhibidores de la

coagulación y del sistema fibrinolítico han experimentado un notable incremento en los últimos años, por lo que es preciso un nuevo ensamblaje de los factores que configuran la fisiopatología del SCID. También el papel de las células circulantes (neutrófilos y monocitos) y fijas (endotelios) así como de las sustancias producidas por estas (citocinas) como mecanismo iniciador de la coagulación intravascular ha supuesto una nueva luz para comprender hechos no bien explicados hasta ahora. Todas estas cuestiones son revisadas por el Dr. Mateo, con gran claridad y soportado en una extensa y actual documentación bibliográfica.

En los últimos años, el avance en biología molecular junto al desarrollo tecnológico aplicado a la biomedicina y la bioinformática ha permitido analizar en una sola muestra de un paciente miles de parámetros biológicos, todo ello, merced a la utilización de las llamadas tecnologías "omic". Estos métodos, cuando se

aplican a cada uno de los procesos biológicos, nos proporcionan información acerca del genoma (genómica), genoma funcional o ARN (transcriptoma) y proteínas (proteómica), de un enfermo determinado. El Dr. Corral, nos introduce en el conocimiento básico de estas nuevas tecnologías aplicadas al campo de la hemostasia. Además, subraya el enorme potencial que encierra el análisis y la comparación de los distintos patrones genéticos y proteicos, los cuales nos permitirán en un futuro no muy lejano no sólo definir marcadores de utilidad para el diagnóstico/pronóstico de las distintas patologías, sino también la identificación de nuevas y más selectivas dianas terapéuticas para las patologías tanto trombóticas como hemorrágicas.

PROF. A. TORRES GÓMEZ (CÓRDOBA)
COORDINADOR DEL PROGRAMA EDUCACIONAL

Avances en la detección y diagnóstico de las anemias poco frecuentes

J.L. VIVES-CORRONS

Unidad de Patología Eritrocitaria. Hospital Clínic i Provincial. Universidad de Barcelona.

introducción

En todos los ámbitos de la geografía mundial, la anemia es un trastorno prevalente que, en la gran mayoría de casos, obedece a una carencia de factores nutritivos, muy especialmente de hierro y vitaminas¹. Hace ya mucho tiempo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reconocido la importancia de la anemia carencial como un problema de salud pública y preconizando el desarrollo de programas tanto para su diagnóstico y tratamiento como prevención, especialmente en países con graves problemas de nutrición². Junto a estas causas de anemia, existen otras mucho menos frecuentes, pero no por ello menos importantes desde el punto de vista asistencial. Algunas de estas anemias son tan poco frecuentes que se las denomina “raras” debido al escaso conocimiento que se tiene de ellas. Como consecuencia son difíciles de identificar y su diagnóstico suele pasar muchas veces inadvertido en la práctica clínica general. En muchos países de la Unión Europea (UE), estas anemias se incluyen dentro del grupo de enfermedades “huérfanas”, no sólo por el hecho de ser poco conocidas, sino también porque muchos especialistas las consideran como un problema clínico irrelevante. Obviamente, no piensan igual quienes las padecen, cuyo proceso

diagnóstico entra muchas veces un círculo vicioso difícil de romper (fig. 1). Como grupo de enfermedades con escasa prevalencia poblacional, las llamadas anemias poco frecuentes forman parte de las llamadas enfermedades raras (*rare diseases*) cuya incidencia poblacional es siempre inferior a 5 casos por cada 10.000 nacimientos^{3,4}. En el ámbito geográfico de la UE, no obstante, su prevalencia puede variar ampliamente de una región a otra, de manera que una misma enfermedad puede considerarse muy rara en algunas zonas y mucho menos, en otras. Ejemplo de ello es la talasemia, enfermedad muy conocida en poblaciones del sur de Europa y prácticamente ausente en los países nórdicos. El número de anemias *raras* es, en realidad, bastante elevado y, aunque la mayoría de ellas obedecen a defectos hereditarios del eritrocito, de la eritropoyesis o del metabolismo, algunas son también de origen adquirido (tabla 1). Entre las de mayor impacto clínico destacan la hemoglobinopatía S (HbS), causante de la *anemia falciforme*, la talasemia intermedia o mayor, la aplasia pura de serie roja (APSR), las diseritropoyesis congénitas y los defectos estructurales o metabólicos del eritrocito. Uno de los factores que más ha contribuido al progreso de los métodos para la rápida detección y diagnóstico de estas anemias ha sido el impacto que sobre muchos países de la UE está ejerciendo la inmigración. Un ejemplo de esta situación es la anemia falciforme, cuya incidencia, en España, ha aumentado notablemente a lo largo de los últimos años⁵⁻⁷. Ello explica el impulso cada vez mayor que están recibiendo los estudios encaminados a su detección precoz y consejo genético^{8,9}. Igualmente, debido al problema sanitario que crea el desconocimiento de estas enfermedades (tabla 2), la Comisión Europea, a través de su Dirección General de Salud Pública ha promovido la creación de una red (European Network for Rare and Congenital Anaemias, ENERCA) que facilite su estudio y seguimiento en todo el ámbito de la UE¹⁰. La red ENERCA, liderada por nuestro Grupo, pretende ser un medio de información para los enfermos y sus familiares y un instrumento para promover la comunicación entre los expertos de los diferentes países de Europa. Actualmente colaboran en la red ENERCA más de 50 expertos de 12 países de la UE y puede accederse fácilmente a ella a través de la web: www.enerca.org

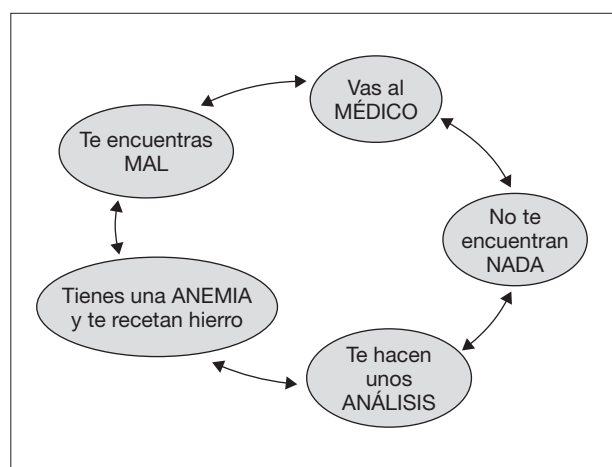


Figura 1. Círculo vicioso en el proceso diagnóstico de una anemia poco frecuente.

Tabla 1. Causas de anemia poco común o rara

1. Defectos del eritrocito
 - Talasemias (anemia mediterránea)
 - α -talasemia
 - β -talasemia
 - $\delta\beta$ -talasemia
 - Hemoglobinopatías
 - HbS, HbC, HbD y otras
 - Hemoglobinopatías inestables
 - Hemoglobinopatías funcionales
 - HbM (metahemoglobinemia congénita)
 - Membranopatías
 - Esfercitosis hereditaria
 - Eliptocitosis congénita
 - Estomatocitosis congénita
 - Hidratada (hidrocitosis)
 - Deshidratada (xerocitosis)
 - Enzimopatías
 - Déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD)
 - Déficit de piruvatoquinasa (PK)
 - Déficit de glucosa fosfato isomerasa (GPI)
 - Déficit de pirimidina 5' nucleotidasa (P5N)
 - Déficit de triosa fosfato isomerasa (TPI)
 - Déficit de fosfofructocinasa (PFK)
 - Déficit de fosfoglicercatocinasa (PGK)
 - Déficit de las enzimas de síntesis del glutatión (GSH)
 - Hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN)
2. Defectos de la eritropoyesis
 - Anemias diseritropoyéticas congénitas (ADC)
 - ADC tipo I
 - ADC tipo II
 - ADC tipo III y otras
 - Anemias sideroblásticas
 - Adquiridas (mielodisplasia)
 - Congénitas
 - Eritroblastopenia adquirida o aplasia pura de serie roja (APSR)
 - Infección viral (parvovirus B19)
 - Timoma
 - Anemia de Blackfan-Diamond (eritroblastopenia congénita)
3. Defectos del metabolismo
 - Defectos congénitos del metabolismo del hierro
 - Defectos congénitos del metabolismo de la cobalamina o folato
 - Otros defectos congénitos del metabolismo

HbS: hemoglobinopatía S.

Tabla 2. Problemas derivados de la inexistencia de una red para el estudio de las anemias

1. Desconocimiento del diagnóstico
2. Remisión del paciente a especialistas inadecuados
3. Realización de pruebas y exploraciones inapropiadas
4. Prescripción de tratamientos inútiles o contraproducentes
5. Ansiedad del paciente al no poder ver resuelto su problema
6. Malestar y preocupación de las familias afectadas
7. Dificultades para mejorar la asistencia sanitaria a estas enfermedades
8. Pérdida de oportunidades en investigación

sidera cuando se han descartado las causas adquiridas más habituales como, por ejemplo, anemia hemolítica autoinmune. El diagnóstico de la hemólisis hereditaria, dado el elevado número de causas que pueden producirla, suele ser, a veces, una tarea difícil ya que obliga a la realización de numerosas pruebas analíticas y casi siempre de estudios familiares en caso de que ello sea posible. Para su estudio las causas de hemólisis hereditaria se clasifican en tres grandes grupos: hemoglobinopatías, membranopatías y enzimopatías. No se consideran aquí las microcitosis talasémicas ya que prácticamente nunca constituyen un problema diagnóstico y los avances en el conocimiento de su mecanismo molecular ha sido ya objeto de diversas revisiones¹².

Como ya se ha mencionado anteriormente, la *hemoglobinopatía* más grave y de mayor interés clínico es la HbS, causante de la anemia falciforme o drepanocitosis. Aunque poco frecuente en nuestro país, su incidencia esta aumentando debido a la inmigración. La forma heterocigota o rasgo falciforme (HbS/A) suele ser asintomática pero la homocigota (HbSS), suele acompañarse de una elevada morbimortalidad debido a complicaciones diversas tales como tromboembolismo pulmonar, preeclampsia, infecciones de vías urinarias, insuficiencia cardíaca congestiva y accidentes vasculares agudos. Debe señalarse, no obstante, que las manifestaciones clínicas propias de la anemia falciforme pueden observarse también en portadores doble heterocigotos de HbS y otras hemoglobinopatías y talasemias que, en su conjunto, constituyen los llamados "síndromes drepanocíticos"¹³. El creciente impacto de la inmigración ha conllevado una importante actualización y mejora de los procedimientos para la detección y cribado de hemoglobinopatías, principal causa de morbilidad y mortalidad de las llamadas anemias poco comunes. Por ello en la actualidad, la clásica electroforesis sobre soportes con diferentes valores de pH se complementa con otros procedimientos más sensibles y específicos que permiten la detección de hemoglobinopatías que antes podían pasar fácilmente desapercibidas. Entre estos procedimientos destaca la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y más recientemente la espectrometría de masa¹⁴. Aunque todos estos procedimientos presentan ventajas e inconvenientes, el que parece tener una mejor relación efectividad/precio es la HPLC (tabla 3).

Métodos generales de detección y diagnóstico

Dentro de las anemias poco comunes, las que cursan con hemólisis son quizá las mejor conocidas porque, prácticamente siempre, plantean la necesidad de establecer el diagnóstico diferencial entre mecanismo adquirido y congénito. Aunque, al igual que en toda anemia, los aspectos clínicos tienen aquí un papel relevante, la imposibilidad, a veces, de demostrar la causa de la hemólisis constituye un problema clínico generalmente acuciante¹¹. Junto a la anemia, su característica más destacada es la elevada concentración de reticulocitos, lo que permite diferenciarlas inmediatamente de las debidas a defectos en la eritropoyesis. En adultos, excepto en situaciones muy evidentes, el mecanismo hereditario de la hemólisis sólo se con-

Tabla 3. Métodos diagnósticos de las hemoglobinopatías

	Electroforesis		IEE	HPLC	ESI-MS	Biología molecular
	Alcalina	Ácida				
Coste	+	+	++	++	+++	+++
Tiempo	++	++	++	+	+++	+++
Simplicidad	++	++	++	+++	+	+
Preparación de la muestra	++	++	++	+	+	++
Especificidad	+	+	++	++	+++	+++
Sensibilidad	+	+	+	+++	+++	+++
Diagnóstico en RN	+	+	+	+++	+++	+++

IEE: isoelectrofoque; ESI-MS: Electrospray Ionization Mass Spectrometry; HPLC: cromatografía líquida de alta resolución; RN: recién nacidos.

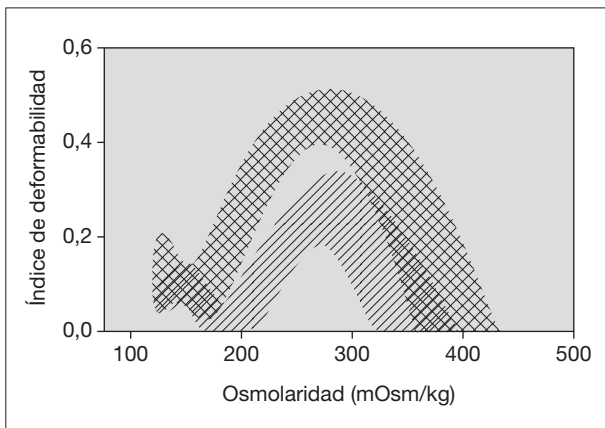


Figura 2. Gráfica que representa la medida del índice de deformabilidad (ID) eritrocitaria en función de la osmolaridad obtenida mediante ectacitometría. Sobreado de puntos: curvas correspondientes a los límites de referencia; rayas: curvas de situaciones con alteración del ID eritrocitario.

Tabla 4. Métodos para el diagnóstico diferencial de las membranopatías hereditarias

Membranopatía	Morfología	VCM	CCMH	FOE	FTE
Esfereocitosis hereditaria	Esfereocitos (1-8%)	N o ↑	↑	↑	N
Eliptocitosis congénita	Ovalocitos (> 5%) Eliptocitos	N o ↑	N o ↑	N	N
Piropoiquilocitosis	Dacriocitos Esquistocitos Microesfereocitos	↓↓↓	↑↑	↑↑	↑↑
Hidrocitosis congénita	Estomatocitos	N o ↑	↓	↑	N
Xerocitosis congénita	Codocitos Excentrocitos	N o ↑	↑↑↑	↑	↓↓↓

FOE: fragilidad osmótica eritrocitaria; FTE: fragilidad térmica eritrocitaria; N: normal; ↑: aumentada; ↓: disminuida.

Las *membranopatías hereditarias* constituyen una causa de anemia, en nuestro medio más frecuente que la debida a HbS. En general cursan con hemólisis crónica

de intensidad leve o moderada cuyo diagnóstico puede venir dificultado por la existencia de largos períodos asintomáticos con crisis de agudización desencadenadas por factores diversos entre los que destacan las infecciones, los trastornos metabólicos y el embarazo. Como contrapartida, estas anemias suelen acompañarse de alteraciones características de la morfología eritrocitaria que, la mayoría de las veces, constituyen el criterio diagnóstico fundamental (esferocitosis, eliptocitosis o estomatocitosis). A lo largo de los últimos 10 años se han sentado las bases del conocimiento molecular de la esferocitosis hereditaria (EH) y eliptocitosis congénita (EC) y se ha profundizado en la fisiopatología de la estomatocitosis congénita (EsC) como modelo de trastorno de permeabilidad iónica transmembranosa¹⁵. A pesar de estos avances, no obstante, los procedimientos diagnósticos actualmente empleados para el diagnóstico de las membranopatías continúan siendo los clásicamente conocidos de: historia clínica y exploración física (ictericia y esplenomegalia), los datos aportados por el hemograma (volumen corpuscular medio [VCM] y concentración corpuscular media de hemoglobina [CCMH]) las pruebas de fragilidad osmótica eritrocitaria (FOE) y la morfología eritrocitaria. Sólo se han implementado algunos procedimientos basados en el estudio de la deformabilidad eritrocitaria, como por ejemplo, la ectacitometría que analiza el índice de deformabilidad eritrocitaria en función de la osmolaridad (fig. 2). En la EH y xerocitosis congénita, una forma de EsC, se observa un desplazamiento característico de la curva hacia la derecha que viene dado por la característica disminución de la deformabilidad eritrocitaria¹⁶. Otro dato clínicamente útil para el diagnóstico de ambas entidades es la valoración de las magnitudes aportadas por el hemograma automatizado. En la EH, junto a una ligera disminución del VCM debida a la microsferocitosis se aprecia un aumento significativo de la CCMH (> 350 g/l), prácticamente constante incluso en presencia de intensa reticulocitosis. Los análisis hematológicos que determinan directamente la CCMH¹⁷ muestran un porcentaje elevado de eritrocitos hiper Cromos (CCMH > 400 g/l). La utilidad de la CCMH y de otras pruebas analíticas en el diagnóstico diferencial de las membranopatías se resumen en la tabla 4.

Las *eritroenzimopatías*, pueden aparecer en diferentes edades de la vida aunque lo más frecuente es que lo hagan durante la infancia o juventud. A excepción de unas pocas, por suerte muy raras, su expresividad clínica puede variar desde una crisis aguda con hemoglobinuria a una anemia hemolítica crónica de comportamiento similar al de las membranopatías, excepto en la presencia de alteraciones características de la morfología eritrocitaria. La eritroenzimopatía más frecuente, el déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), asintomático hasta que el portador entra en contacto con sustancias que generan un compromiso oxidativo incompatible con la vida del eritrocito. Entre estas sustancias destacan ciertos medicamentos oxidantes y las habas (favismo). La transmisión hereditaria del déficit de G6PD va ligada al

cromosoma X por lo que las mujeres heterocigotas carecen de expresividad clínica excepto cuando, debido al fenómeno de selección cromosómica aleatoria (Lyon), sólo se expresa el cromosoma X portador de la mutación. Le sigue en frecuencia el déficit de piruvato cinasa (PK) que cursa con hemólisis crónica. El déficit de PK puede ya expresarse en recién nacidos (hemólisis neonatal) y niños pero no es infrecuente que su primera aparición coincida con un embarazo. En este caso, la expresividad clínica del defecto persiste después del parto¹⁸. Por detrás, en frecuencia, del déficit de PK se sitúan otras enzimopatías de las que se han descrito algunos casos en nuestro país, tales como el déficit de glucosa fosfato isomerasa (GPI) y pirimidina 5' nucleotidasa (P5'N) y a mucha distancia de éstas otras en las que el síndrome hemolítico puede ir acompañado de miopatía y mioglobinuria o neuropatía con o sin retraso mental. Entre las que cursan con manifestaciones musculares destaca el déficit de fosfofructocinasa (PFK), que puede cursar con mioglobinuria y entre las que se acompañan de neuropatía destacan el déficit de triosa fosfato isomerasa (TPI) en la que esta es muy grave y causante de la muerte del paciente, el déficit de fosfogliceratocinasa y el de las enzimas relacionadas con la síntesis del glutatión (GSH) como son la glutatión sintetasa (GS) y la gammaglutamilcistein sintetasa (GGCS). La biología molecular ha revolucionado el conocimiento de los mecanismos que condicionan la pérdida de la actividad enzimática. La aplicación de procedimientos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite disponer de métodos simples y rápidos para identificar las variantes moleculares de las enzimopatías más frecuentes, tales como el déficit de G6PD y PK.

Excluida la hemólisis hereditaria como causa de anemia poco común, prácticamente todas las restantes causas tienen su origen en defectos de la eritropoyesis. Como se ha mencionado anteriormente, en este grupo de anemias, el recuento de reticulocitos constituye un criterio diagnóstico inicial de gran valor. Junto a ello, una exploración obligada es el examen morfológico de la médula ósea que puede mostrar desde la práctica ausencia de eritroblastos (eritroblastopenia) como sucede en la APSR a un exceso de ellos con eritropoyesis ineficaz (diseritropoyesis) como sucede en las anemias diseritropoyéticas congénitas (ADC) y en la anemia sideroblástica (AS). En todos estos casos el examen morfológico de la médula ósea es fundamental y para el diagnóstico de las anemias sideroblásticas es imprescindible la tinción del aspirado de médula ósea mediante la tinción de Perls¹¹.

En individuos de mediana edad puede observarse una forma de anemia rara con hemoglobinuria, signos de diseritropoyesis y trastornos tromboembólicos que se conoce con el nombre de hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) y cuya característica más destacada es la elevada sensibilidad de los eritrocitos al complemento. La HPN obedece a una mutación somática de la célula madre pluripotente por la que deja de sintetizarse el grupo glucosil fosfatidil inositol imprescindible para la unión a la membrana eritrocitaria de las proteínas encargadas de degradar el complemento

(CD55 y CD59). La HPN suele acompañarse de ferropenia pero la administración de hierro puede resultar perjudicial debido a que estimula la formación de nuevos eritrocitos con el defecto de membrana y, por tanto, intensifica la hemólisis. Con relativa frecuencia la HPN suele ir asociada a una aplasia de médula ósea¹⁹. Hasta hace pocos años el diagnóstico de la HPN se basaba en la realización de una prueba muy sencilla y consistente en la observación de aparición de hemólisis en eritrocitos del paciente cuando se acidificaba el medio en que se hallaban suspendidos (prueba de la hemólisis en medio ácido). Actualmente el diagnóstico consiste en la demostración del déficit de CD55 y CD59 en eritrocitos u otras células de la sangre²⁰.

La APSR afecta a personas de cualquier edad y en su forma primaria suele tener un comportamiento crónico. A veces cursa con recuperación muy rápida como sucede en la infección por parvovirus B19, pero cuando constituye la manifestación de una enfermedad inmune subyacente en proceso suele de más larga duración. En estos casos suele hallarse un inhibidor plasmático (IgG) de la eritropoyesis con o sin actividad citotóxica. Otras veces el proceso es mediado por linfocitos T y con propiedades citotóxicas (linfocitos grandes granulares) o un timoma. El diagnóstico de estos trastornos es complejo ya que puede implicar diferentes trastornos de la inmunidad con afectación de linfocitos B y T. La forma hereditaria de APSR se conoce con el nombre de anemia de Blackfan-Diamond (ABD) que se manifiesta ya durante el primer año de vida y un 10 % de los niños ya nace con anemia. La mayoría son casos esporádicos pero en algunas familias se puede encontrar un patrón de herencia autosómica dominante. La ABD obedece a una mutación de un gen situado en el cromosoma 19 (19q.13.3) que codifica la proteína ribosomal RPS 19²¹. Aunque su etiopatogenia no es aún bien conocida, se atribuye a un posible defecto en el proceso de diferenciación durante la fase BFU-E de la eritropoyesis. En la ABD es frecuente el aumento de actividad de la enzima adenosina desaminasa (ADA) eritrocitaria, por lo que su determinación puede resultar de utilidad diagnóstica²².

Finalmente las anemia diseritropoyética puede obedecer también a un mecanismo adquirido. En este caso, mucho más frecuente que las formas hereditarias, la anemia suele ir asociada a un síndrome mielodisplásico (SMD) caracterizado por afectación de todas las líneas celulares hematopoyéticas y a veces difícil de distinguir de otras causas de anemia, especialmente en individuos de edad avanzada. En la anemia diseritropoyética congénita (ADC), el defecto de la eritropoyesis se manifiesta desde los primeros años de la vida y se transmite con carácter autosómico recesivo. En general, cursan con signos biológicos de hemólisis debidos a la eritropoyesis ineficaz (hemólisis intramedular) y carácter crónico, aunque bien tolerado, porque la intensidad de la anemia es generalmente moderada. Según las alteraciones morfológicas presentes en la médula ósea se han descrito tres variantes de ADC y recientemente, cuatro subtipos más²³. La forma de ADC más frecuente es el tipo II o HEMPAS (siglas en

inglés de *hereditary erythroblastic multinuclearity positive acidified serum*) con prueba de Ham-Dacie positiva y presencia de alteraciones ultraestructurales características de la médula ósea. Desde no hace mucho se conoce el gen responsable del defecto de membrana: CDAN2 situado en el cromosoma 20 (20q11.2). También se sabe que los genes responsables de las CDA tipos I y III se hallan en el cromosoma 15 (15q15.1-q15.3) para la CDA tipo I y (15q21) para la CDA tipo III).

Métodos de prevención y diagnóstico precoz

Es un hecho bien conocido que a través de diferentes medios de comunicación, se viene insistiendo en la necesidad de acercar la red sanitaria de utilización pública a las prioridades de salud y medicina preventiva a los colectivos de inmigrantes. Los recurrentes flujos migratorios han conducido a la emergencia de muchas anemias antes prácticamente desconocidas en nuestro entorno. Un ejemplo de esta situación es la anemia de células falciformes o drepanocitosis y otras hemoglobinopatías hereditarias causantes de hemólisis. En este sentido, recientes estudios realizados en inmigración y salud destacan que en relación con la utilización y acceso a los servicios hospitalarios y a las consultas de atención primaria, hay que dedicar una especial atención a las enfermedades transmisibles (tuberculosis, parasitosis, malaria, etc.) pero también a las de origen no infeccioso como los dolores musculoesqueléticos y ciertas alteraciones hematológicas del tipo de la anemia²⁴. En este sentido, son diversos los estudios que demuestran los beneficios derivados del diagnóstico precoz de hemoglobinopatías durante el período neonatal²⁵.

En España, todos los estudios realizados hasta la actualidad ponen de manifiesto, en poblaciones inmigradas, una elevada incidencia de portadores heterocigotos del gen *HbS* cuyo estado homocigoto es la causa de la conocida anemia falciforme^{5,26}. Igualmente, en un estudio piloto realizado en la población de riesgo de Cataluña²⁷ nuestro grupo ha puesto de manifiesto una elevada prevalencia de portadores del gen *HbS* (30,16%), lo que significa una incidencia de anemia falciforme de 1 caso por cada 810 individuos. Este valor, sensiblemente superior al observado para ciertas enfermedades metabólicas con elevado impacto sanitario y social (hipotiroidismo, fibrosis quística y fenilcetonuria, entre otras), sugiere la necesidad de hacer extensivo el cribado neonatal (CN) de hemoglobinopatías a los programas oficiales de CN ya existentes para las enfermedades citadas. Con ello se conseguirá realizar su diagnóstico precoz y prevenir un aumento de la morbilidad y eventualmente mortalidad de la anemia falciforme en nuestro país. Creemos finalmente que la Red ENERCA puede también contribuir decisivamente a difundir esta necesidad tanto en España como en otros países de la UE, promover la implantación de programas de CN para hemoglobinopatías y obtener información de elevado interés epidemiológico.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado en parte gracias a la ayuda del Ministerio de Educación y Ciencia (MEC). Ref. SAF 2001/1205.

Bibliografía

1. Vives Corrons. Fundamentos de la patología eritrocitaria. En Hematología. En: García-Conde Bru J, San Miguel JE, Sierra Gil J, Vicente García V, Urbano Ispizua A, Vives Corrons JL, editores. Madrid: Arán; 2003.
2. World Health Organization. Document, Iron deficiency anaemia: assessment, prevention and control. A guide for programme managers. Genève: World Health Organization, 2001 (Document WHO/NHD/01.3).
3. EURORDIS. European Organization for Rare Disorders and Orphan Medical Products. Disponible en: <http://www.eurordis.org>
4. ORPHANET. Maladies Rares et Medicaments Orphelins. INSERM SC11. Disponible en: <http://orphanet.infobiogen.fr>
5. Dulín Iñiguez E, Cantalejo López MA, Cela de Julián ME, Galarón García P. Detección precoz neonatal de anemia falciforme y otras hemoglobinopatías en la comunidad autónoma de Madrid. Estudio piloto. An Pediatr. 2003;58:146-55.
6. Programa de salud pública de la Junta de Extremadura. Subunidad de errores congénitos del metabolismo. Formato electrónico (consultado 30-12-2004). Disponible en: www.sanidaddigital.org
7. Martín Núñez G. Campaña de detección de hemoglobinopatías y talasemias en la población escolar del Norte de Extremadura. Sangre (Barc). 1995;40:459-64.
8. Carballo M, Divino JL, Zeric D. Migration and health in the European Union. Trop. Med Int Health. 1998;3:936-44.
9. Jansá JM. Inmigración extranjera en el estado español. Consideraciones desde la Salud Pública. Rev Esp Salud Pública. 1998;72:165-8.
10. Vives Corrons JL, Hurst S, Abril M. ENERCA. Primera Red Europea para el estudio de las Anemias. XVII Reunion de la Asociación Española de Hematología y Hemoterapia. Santiago de Compostela, 23-25 de octubre de 2003.
11. Vives Corrons JL. El laboratorio en el diagnóstico de las anemias. En: Análisis Clínicos. Módulo I. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Madrid: Acción Médica; 2004. p. 217-40.
12. Villegas A, Roper P. Los síndromes talasémicos. En: García Conde J, San Miguel J, Sierra Gil J, Vicente García V, Vives Corrons JL, Urbano Ispizúa A, editores. Hematología. Madrid: Arán; 2003.
13. Vives Corrons JL Anemias hemolíticas. Aspectos generales. Anemias hemolíticas congénitas En: Sans Sabrafén J, Besses Raebbel C, Vives Corrons JL, editores. Hematología Clínica. 4ª ed. Madrid: Harcourt; 2001. p. 151-82.
14. Cech N, Enke C. Practical implication of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. Mass Spectrometry Reviews. 2001;20:362-87.
15. Ribeiro L, Tamagnini G. Trastornos congénitos de la membrana eritrocitaria. En: García Conde J, San Miguel J, Sierra Gil J, Vicente García V, Vives Corrons JL, Urbano Ispizúa A, editores. Hematología; Madrid: Arán; 2003. p. 277-89.
16. Grootenboer S, Schischmanoff PO, Cynober T, Rodríguez JC, Delaunay J, Tchernia G, et al. A genetic syndrome associating dehydrated hereditary stomatocytosis, pseudohyperkalaemia and perinatal oedema. Br J Haematol. 1998;103:383-6.
17. Mohandas N, Kim YR, Tycho DH. Accurate and independent measurement of volume and hemoglobin concentration of individual red cells by laser light scattering. Blood. 1986;68:506-13.
18. Vives Corrons Anemias hemolíticas. Aspectos generales. Anemias hemolíticas congénitas En: Sans Sabrafén J, Besses Raebbel C, Vives Corrons JL, editores. Hematología Clínica. 4ª ed. Madrid: Harcourt; 2001. p. 151-82.

19. Luzzatto L. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematology*. 2000;18:82-7.
20. Villamor N, Marín P, Aymerich M, Arriols R, Rovira M, Bosch F, et al. Diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with cytofluorometric of molecules bound to the membrane by glycosylphosphatidylinositol groups. *Med Clin*. 1994;102:481-4.
21. Gazda H, Lipton JM, Willig TN, Ball S, Niemeyer CM, Tchernia G, et al. Evidence for linkage of familial Diamond-Blackfan anemia to chromosome 8p23.3-p22 and for non-19q non-8p disease. *Blood*. 2001;97:2145-50.
22. Glader BE, Backer K, Diamond LK. Elevated erythrocyte adenosine deaminase activity in congenital hypoplastic anemia. *N Engl J Med*. 1983;309:1486-90.
23. Iolascon A, Perrotta S. Anemias diseritropoyéticas congénitas. En: García-Conde Bru J, San Miguel JF, Sierra Gil J, Vicente García V, Urbano Ispizua A, Vives Corrons JL, editores. *Hematología*. Madrid: Arán; 2003.
24. Berra S, Serra-Sutton V, Bartomeu N, Elorza-Ricard JM, Hausman S, Rajmil L. Necessitats en salut de la població immigrant: revisió d'estudis de l'àmbit espanyol i d'experiències internacionals de recerca i intervenció. *Annals de Medicina*. 2004;87: 168-71.
25. Guide to clinical Preventive Services. 2nd ed. Screening for hemoglobinopathies; 1996.
26. Cabot Dalmau M, Casado Toda J, Barberán Pérez M, Roqueta Sureda Q, Martorell Aymerich A, et al. Screening neonatal de drepanocitosis en el Consorci Sanitari de Mataró. Justificación y primeros resultados. *Medicina Fetal y Neonatología*. 1998; 49(2).
27. Mañú MM, Maya A, Cararach V, Sabria J, Boixadera J, Quintó L, et al. Cribado neonatal de hemoglobinopatías y déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) en Cataluña. I Estudio piloto en población anónima no relacionada. *Barcelona: Med Clin*; 2005. En prensa.

Células dendríticas: biología, fisiopatología y posibles aplicaciones clínicas

J. SÁNCHEZ¹, C. HERRERA¹, O. DE LA ROSA² Y A. TORRES¹

¹Servicios de Hematología, Hemoterapia e ²Inmunología. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba.

Introducción

Las células dendríticas (DC) constituyen una población leucocitaria heterogénea, descrita inicialmente en los órganos linfoides del ratón por R. Steinman en la Universidad de Rockefeller¹ durante los años 1970. Su localización, en sitios de gran importancia inmunológica, se debe a su capacidad única de capturar y presentar antígenos de forma óptima a linfocitos T

virgenes, generando respuestas inmunitarias específicas. Posteriormente, se ha demostrado que su papel en el control de la respuesta inmunológica es mucho más amplio y versátil, siendo capaces de activar linfocitos B, inmunidad natural (células NK [*natural killer*], macrófagos, células NK-T, eosinófilos) y por el contrario, generar tolerancia inmunológica². A partir de los años 1990, el desarrollo de sistemas de identificación y selección de DC ha permitido el auge actual en la investigación de la compleja biología de estas células y de su amplio potencial terapéutico en el campo de la inmunoterapia antitumor o antiinfecciones así como para promover tolerancia postrasplante o en enfermedades autoinmunes.

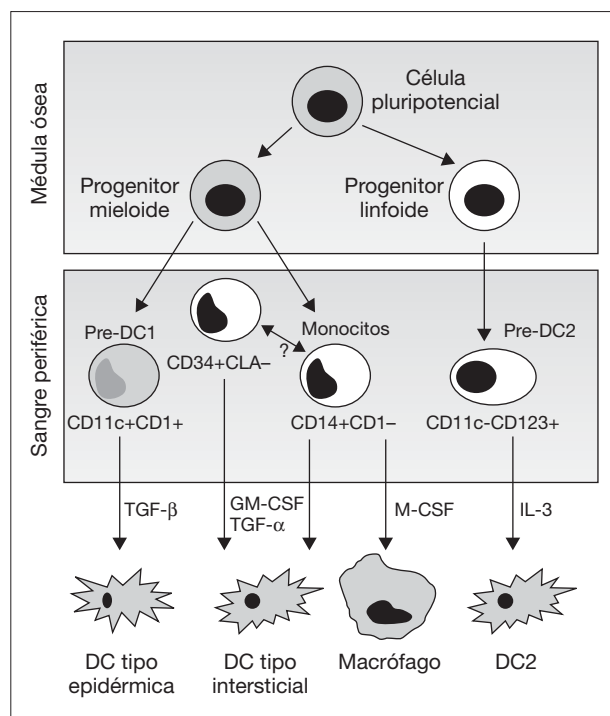


Figura 1. Origen y vías de diferenciación de las células dendríticas. Las vías de diferenciación se deducen de los distintos estudios de cultivo *ex vivo* de células CD34 de cordón umbilical o médula ósea. Los monocitos y los precursores mieloides CD34+ CLA- son muy semejantes ya que presentan capacidad bipotencial para transformarse en macrófagos o en células dendríticas intersticiales. Los precursores mieloides CD14-CD11c generan células dendríticas tipo epidérmicas (Langerhans like) con gránulos de Birbeck y expresión de langerina. Sin embargo el sistema moncito-macrófago-dendrítica podría exhibir *in vivo* una gran plasticidad. CLA: antígeno asociado a linfocitos cutáneos; TGF-β: factor de crecimiento tumoral β; GM-CSF: factor estimulante de colonias granulomonocíticas; TNF-α: factor de necrosis tumoral α; M-CSF: factor estimulante de colonias monocitarias; IL-3: interleucina 3.

Biología

Las DC se originan a partir de progenitores hemato-poyéticos de médula ósea CD34+, que generan *precursores dendríticos* (mieloides y linfoides) que pasan al torrente circulatorio. Estos precursores migran a tejidos periféricos donde se diferencian en *DC inmaduras* con gran capacidad de procesamiento antigénico. Posteriormente viajan por los vasos linfáticos aferentes hasta los ganglios adquiriendo características de *DC maduras* con gran capacidad de presentación antigénica y estimulación linfocitaria. Una vez iniciada la respuesta inmunitaria T específica sufren un proceso de muerte celular programada².

Origen de las células dendríticas

Con excepción de las DC ganglionares foliculares cuyo origen es mesenquimal³ (y cuya función difiere también de la clásica DC), las DC se generan a partir de progenitores medulares CD34+. Aunque en el ratón se ha caracterizado un precursor puramente dendrítico tanto de DC linfoides (CD8^{α+}) como de mieloideas (CD11c⁺)^{4,5}, en el hombre, los progenitores dendríticos se cree que se entroncan inicialmente con progenitores de serie mieloide y linfoide⁶ aunque las vías de diferenciación no han sido aún dilucidadas⁷ (fig. 1).

Los precursores dendríticos mieloides (pre-DC1) se pueden generar a partir de células progenitoras CD34+ de médula ósea o cordón umbilical, mediante cultivo *ex vivo* durante 12 días, con factor estimulante de colonias granulomonocíticas (GM-CSF), interleucina 4 (IL-4) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)⁸. A partir del quinto día es posible diferenciar dos poblaciones: una CD14+ CLA-, que genera DC tipo dérmica intersticial y macrófagos y una población CD1a+ CLA+, que genera células de Langerhans típicas cuando se adiciona factor de crecimiento tumoral β (TGF- β).

Asimismo, es posible generar precursores dendríticos linfoides (pre-DC2) mediante cultivo de células progenitoras de médula ósea CD34+ CD45RA+ CD10+ con combinación de citocinas incluyendo FLT3-ligando^{9,10}. Además, los progenitores hematopoyéticos CD34+ CD38- presentes en el timo humano poseen potencial para generar linfocitos T, células NK y DC que permanecerán en el ambiente tímico¹¹.

Precursos dendríticos en sangre periférica

La sangre periférica humana contiene principalmente DC en forma de precursores inmaduros. Los monocitos CD14+ son células precursoras capaces de diferenciarse a macrófagos pero también a DC (Mo-DC) mediante cultivo *ex vivo* durante 7-12 días con GM-CSF, IL-4 y maduración final con TNF o lipopolisacárido (LPS), constituyendo la población generalmente usada en los protocolos de inmunoterapia¹².

Sin embargo los considerados precursores dendríticos, se identifican como células que expresan HLA-DR pero son negativas para marcadores de línea B, T, NK y granulocitaria-monocitaria¹³. Dentro de estas células Linea^{neg}DR^{pos} se identifican dos poblaciones principales (fig. 2): los precursores mieloides (pre-DC1) que expresan CD11c y los precursores linfoides (pre-DC2) que expresan CD123 (receptor α para la interleucina 3, IL-3 α R)¹³⁻¹⁵. Existen también otras poblaciones periféricas Linea^{neg}DR^{pos}, que expresan los antígenos BDCA3, CD16+ y CD34 pero con funciones menos conocidas^{13,16}.

La población precursora circulante mieloides pre-DC1 CD11c+, presenta una morfología monocitoide, expresa marcadores CD33, CD13, BDCA1 y supone en sujetos sanos un total de $14,2 \pm 3,9/\mu\text{l}$. Generará DC inmaduras tisulares, aunque también puede derivar a macrófagos². Típicamente producirá respuestas linfocitarias citotóxicas Th1 (interferón e IL-12).

La población circulante precursora linfoides pre-DC2 CD123+ presenta una morfología plasmocitoide y ha sido identificada como una célula de gran importancia en la inmunidad natural al ser productora de grandes cantidades de interferón tipo I (INF- α/β) en respuesta a infecciones víricas. Poseen marcadores linfoides (como CD4, BDCA2, BDCA4, ARN para IgK germinal, receptor α pre-T) y suponen en sangre periférica de sujetos sanos un total de $8,9 \pm 1,7/\mu\text{l}$. Pueden ser derivadas a DC maduras linfoides mediante IL-3 o CpG bacteriano¹⁷. Producirán preferentemente res-

puestas linfocitarias Th2 (con secreción de interleucina-2 [IL-2] e interleucina-4 [IL-4]) o generaran poblaciones linfocitarias T con funciones reguladoras¹⁸. Recientemente se ha identificado que las neoplasias CD4+ CD56+ (definidas por la clasificación WHO como leucemias NK blastoides) son la contrapartida tumoral de esta población pre-DC2^{19,20}.

La administración de factor estimulante de colonias granulocitarias (G-CSF) o Flt-3 ligando, aumenta considerablemente la cantidad de precursores circulantes especialmente los DC2²¹⁻²³ lo cual supone otra fuente alternativa a las Mo-DC, para generar DC en número suficiente para protocolos terapéuticos.

Células dendríticas inmaduras tisulares: captura y procesamiento antigénico

Los precursores dendríticos de sangre periférica migran a tejidos específicos guiados por los llamados receptores de quimiocinas^{2,24}. Se distinguen los grupos CCR (CC *motif chemokine receptor*) y CXCR (CX *motif chemokine receptor*) (tabla 1). Las DC inmaduras expresan CCR1 y CCR3 cuyos ligandos (proteína inflamatoria de macrófago, MIP-1 $\alpha\beta$) se expresan en los endotelios activados y en células inflamatorias, promoviendo la migración hacia piel (fig. 3), bazo (zona marginal), hígado, pulmón, corazón, riñón y mucosas constituyendo una red de DC intersticiales en todos los órganos excepto en sistema nervioso central (SNC) y testículo²⁵. Estas DC inmaduras tisulares son células profesionales en la captura y vigilancia antigénica, debido a su gran capacidad para internar bacterias, virus, células muertas o fragmentos celulares por fenómenos de fagocitosis, endocitosis y pinocitosis. En su superficie están dotadas de un amplio repertorio de receptores (tabla 2) como: receptores Lectina-tipo C (DC-SIGN para virus, receptor de manosa, langerina, BDCA2), receptores para inmunocomplejos (CD32 para Fc γ -RI y CD64 para Fc γ RIII) e integrinas para cuerpos apoptóticos y opsonizados^{2,25}.

Una vez en el interior de las DC, las proteínas exógenas se degradan en endosomas-lisosomas y los péptidos se unen a complejos mayores de histocompatibilidad (HLA) clase II, pero también en moléculas clase I (presentación cruzada) permitiendo la activación tanto de linfocitos CD4 como de CD8²⁶. Los antígenos de síntesis endógena son procesados mediante una vía citosólica que incluye su ubiquitinación, degradación por proteasomas y transportados de forma específica al retículo endoplásmico y cargados en HLA clase I. Los complejos antígeno-HLA son posteriormente transportados a la superficie celular. Las DC son las células presentadoras de antígeno más potentes debido en parte a la gran densidad antigénica de moléculas HLA de superficie (10-100 veces más que los monocitos) y a su capacidad para procesar varios antígenos simultáneamente. Además, las glucoproteínas CD1 (a-d) funcionan como un sistema de presentación antigénica no-HLA, con afinidad por antígenos lipídicos y glucolípidos, activando linfocitos T (mediante CD1b-c) y células NKT (mediante CD1d).

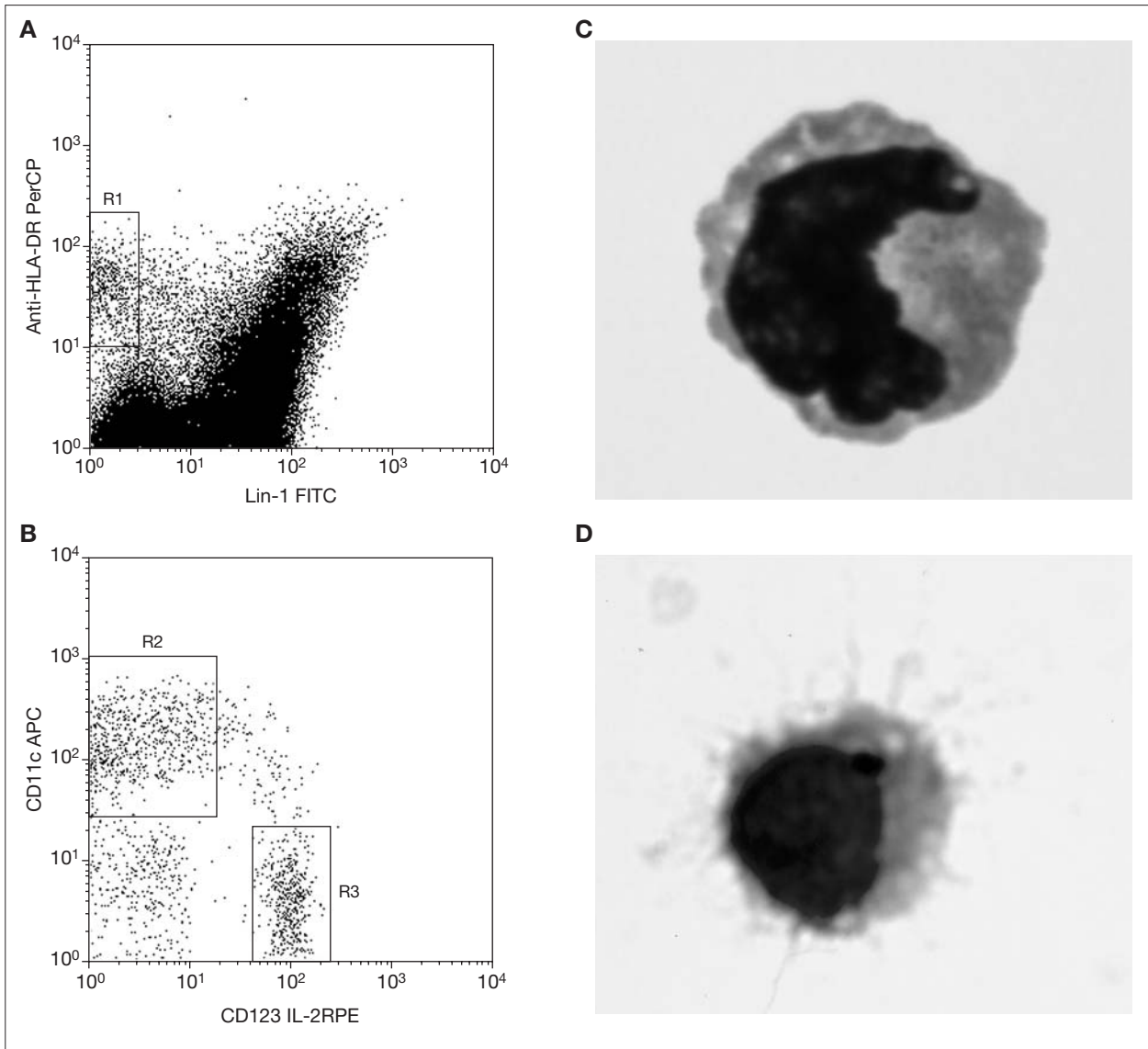


Figura 2. Análisis citométrico multiparamétrico y morfológico de precursores dendríticos en sangre periférica. Los precursores dendríticos circulantes en sangre periférica se pueden identificar mediante citometría multiparamétrica. Constituyen una población sin marcadores de línea (Lin-FITC) y con expresión de HLA-DR (HLA-DR PercP) (A). Esta población presenta unas características de tamaño y complejidad intermedias entre linfocitos y monocitos. La expresión de CD11c (APC) o la expresión de CD123 (Receptor α de la interleucina 3, PE) identifica los precursores mieloides (pre-DC1) y los precursores linfoides (Pre-DC2) respectivamente (B). Los pre-DC1 purificados mediante sistema inmunomagnético (BDCA-1) presentan rasgos monocitoides (C). Tras cultivo con lisado de blastos y con factor de necrosis tumoral α presentan morfología característica de células dendríticas (D).

Células dendríticas maduras: migración a órganos linfoides secundarios y generación de respuestas linfocitarias específicas

Además de la captura de antígenos, las DC deben recibir las llamadas *señales de peligro*, para sufrir un proceso madurativo que les permitirá desplazarse a los órganos linfoides secundarios y estimular de forma óptima los linfocitos vírgenes. Estas señales se producen por citocinas inflamatorias (factor de necrosis tumoral [TNF], interferón [INF], interleucina 1 [IL-1]) y por productos bacterianos que son agonistas de los llamados receptores *toll-like*²⁷ (TLR). Estos receptores activan MAP cinasas y NF- κ B, produciendo en las DC

en una capacidad incrementada de presentar complejos antígeno-HLA, expresión de moléculas coestimuladoras de linfocitos T, secreción de citocinas para atraer linfocitos, cambios estructurales con aparición de vellosidades citoplásmicas, y expresión del receptor quimiocina CCR7 cuyo ligando (MIP-3 β y SLC) se encuentra en las paredes de los ganglios linfáticos y zona paracortical ganglionar.

Una vez en las áreas paracorticales ricas en linfocitos T de los ganglios linfáticos (DC interdigitantes, fig. 4), bazo o tejido linfoide asociado a mucosas, las DC maduras atraen a los linfocitos T vírgenes mediante la producción de MIP-3 β . La interacción inicial DC-linfocito T se realiza mediante las moléculas de

adhesión ICAM-3, DC-SIGN y semaforinas. La primera señal de activación se realiza mediante la interacción del complejo antígeno-HLA y el receptor TCR específico en el linfocito T. La segunda señal de activación de los linfocitos T se realiza a través de las moléculas coestimuladoras presentes en las DC maduras: La familia B7 (CD80, CD86) para los receptores linfocitarios CD28, y la familia TNF (OX40-L, 4-1BB) para los receptores linfocitarios R-TNF²⁸. La expresión de CD40-L en los linfocitos T activados produce una señalización bidireccional con mayor activación de las DC. Si las DC activadas secretan IL-12, polarizarán los linfocitos-T a un perfil citotóxico Th1 con secreción de INF- γ . Sin embargo, la ausencia de IL-12 produce la polarización de los CD4 a un perfil Th2 con secreción de IL-4,IL-5 y respuestas humorales.

Además, las DC activadas interdigitantes ganglionares interaccionan con los linfocitos B previamente activados vía CD40, induciendo su proliferación, cambio isotípico y diferenciación a células plasmáticas. Las DC foliculares, de origen mesenquimal (fig. 4), tienen una función particular, ya que presentan inmunocomplejos mediante sus receptores CD21 y CD35 a linfocitos B centrogerminales hipermutados, evitando su apoptosis. A partir de las DC foliculares se desarrollan sarcomas que pueden afectar a órganos no linfoides³.

Tolerancia inmunológica mediada por células dendríticas:

Las DC promueven la generación de tolerancia inmunológica antígeno específica como control homeostático de los fenómenos autoinmunes. Las DC tímicas promueven la eliminación de los linfocitos T autorreactivos, y las DC periféricas producen tolerancia inmunológica principalmente en su estado inmaduro o semimaduro. En este estado, la presentación antigénica sin las moléculas coestimuladoras o en ausencia de producción de IL-12, inducirá la aparición de linfo-

Tabla 1. Receptores de quimiocinas expresados en las células dendríticas

Receptores de quimiocinas	Ligando	Tipo de DC
CCR1	MIP-1 α , RANTES, MIP-5	Inmadura
CCR2	MCP	Inmadura
CCR4	MDC	Inmadura
CCR5	MIP-1 α , MIP-1 β	Inmadura
CCR6	MIP-3 α	Inmadura
CXCR1	IL-8	Inmadura
CXCR4	SDF-1	Madura-inmadura
CCR7	MIP-3 β	Madura

CCR: CC motif quimioquina receptor; CXCR: CXC motif quimioquina receptor; MIP: proteína inflamatoria macrofágica; MCP: proteína monocitaria quimioattractante; MDC: quimiocina derivada de macrófago; IL-8: interleucina 8; SDF-1: factor derivado de estroma.

Tabla 2. Receptores para captura antigénica de las células dendríticas

Clases de receptor	Receptor	Ligando
Lectina tipo C	DC-SIGN	VIH, micobacterias
	DEC-205	
	BDCA2	ζ
	Langerina	
Integrinas	Receptor de manosa	Glucanos bacterianos
	CD11b	Agentes
	CD11c	opsonizados-apoptóticos
Receptores Fc	V β 5	
	CD32	Inmunocomplejos
	CD64	

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

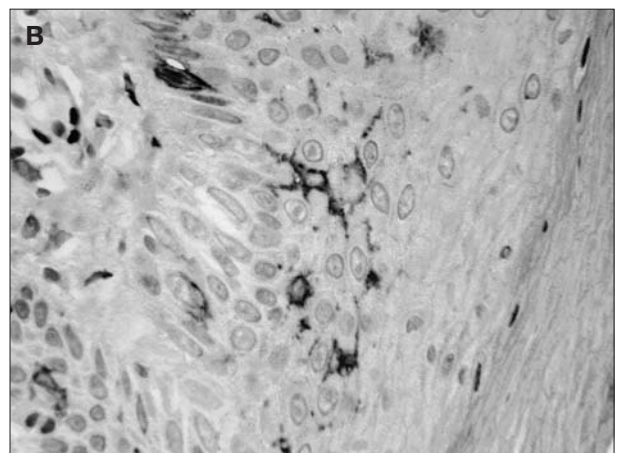
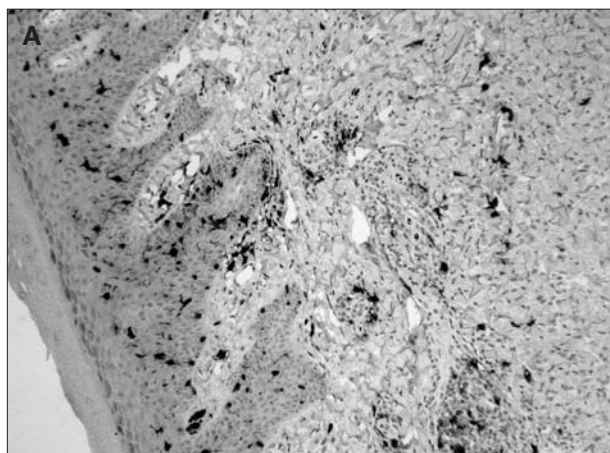


Figura 3. Células dendríticas dérmicas. Las DC residen en prácticamente todos los tejidos en un estado inmaduro con gran capacidad de captura antigénica. En la piel se distinguen, las células intersticiales (A) localizadas en la dermis (positividad para tinción con inmunohistoquímica para S-100) y las células epidérmicas de Langerhans (positividad para CD1a) (B).

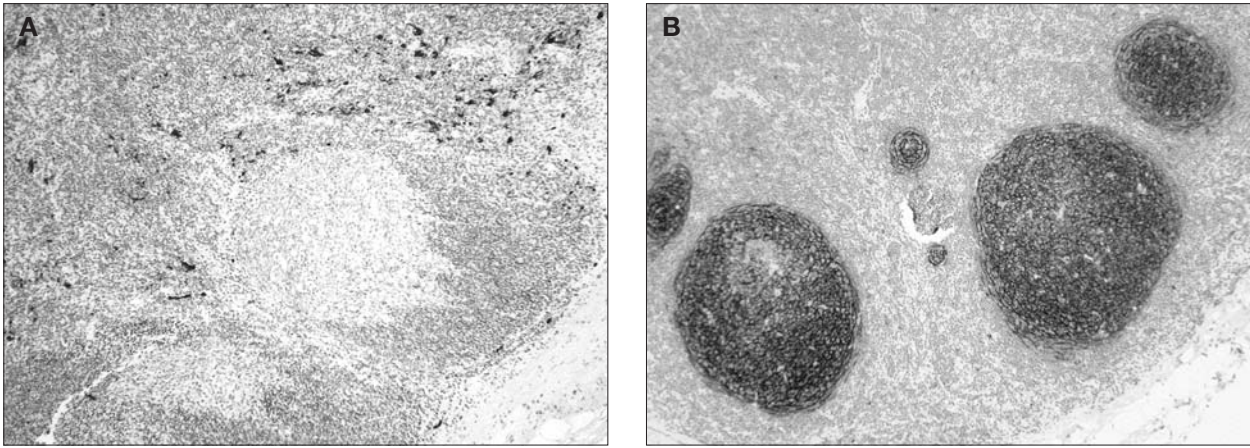


Figura 4. Células dendríticas en órganos linfoides secundarios. Una vez capturado el antígeno e iniciado el proceso madurativo mediante citocinas o activación de los receptores *Toll like*, las DC migran a los órganos linfoides secundarios donde se localizan en las áreas paracorticales T para estimular a los linfocitos vírgenes (A con tinción inmunohistoquímica S-100). Además existen DC foliculares (B con tinción inmunohistoquímica para CD21) que se encargan de la selección clonal de los centroblastos con mutación somática.

cidos CD4 y CD8 reguladores que suprimen la respuesta inmunitaria mediante la secreción de IL-10 y TGF- β (poblaciones linfocitarias Th3 y Tr, respectivamente). Las DC sufren proceso de parada madurativa y adquieren características “tolerogénicas” mediante sustancias como esteroides, vitamina D₃, IL-10, TGF- β ^{29,30} o CTLA-4 producido por la población reguladora no-antígeno específica CD4+ CD25+²⁸. Asimismo las DC linfoplasmocitoides generadas a partir de precursores CD123+ mediante CD40-L inducen estimulación T pero también Tr CD8 productoras de IL-10³¹. Las DC tolerogénicas o semimaduras expresan indolamina 2,3-dioxigenasa que depleciona el triptófano con producción de metabolitos que inhiben la proliferación de los linfocitos T³².

Existen actualmente estudios preclínicos en modelos murinos del empleo de DC tolerogénicas para la prevención de la enfermedad de injerto contra-huésped postrasplante alogénico de precursores hematopoyéticos³³, para la prevención del rechazo en el trasplante de órganos sólidos³⁴ y para el tratamiento de enfermedades autoinmunes³⁵.

Aplicaciones clínicas: inmunoterapia con células dendríticas en neoplasias hematológicas

El sistema inmunitario humano es capaz de producir respuestas humorales y citotóxicas frente a antígenos específicos tumorales³⁶, lo cual ha llevado a desarrollar protocolos de inmunoterapia para vacunaciones con proteínas, péptidos y recientemente con DC. A diferencia de las vacunas contra agentes infecciosos externos, la inmunoterapia antitumoral debe generar respuestas contra antígenos propios a los que el huésped ha estado expuesto. Aun más, las células neoplásicas se han desarrollado consiguiendo escapar a la vigilancia de los mecanismos inmunológicos. Los sistemas de escape conocidos³⁷ incluyen la pérdida de molé-

las HLA clase I, mutaciones o pérdida de los antígenos tumorales con potencial inmunógeno, alteraciones en las vías de muerte celular con resistencia a la lisis, y síntesis de citocinas como IL-10, TGF- β 1 y factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF) que bloquean la maduración de las DC convirtiéndolas en tolerogénicas con aparición de linfocitos T reguladores CD4+ CD25+, Th3 o Tr. Por tanto, los protocolos de inmunoterapia con DC deben en primer lugar purificar precursores dendríticos con gran capacidad de captura antigénica, posteriormente *pulsarlos* con antígenos específicos tumorales y por último proceder a su completa maduración *ex vivo* fuera del ambiente tumoral que inhibe su función. Una vez administradas, las DC deberán alcanzar órganos linfoides secundarios y estimular linfocitos T vírgenes para generar respuesta inmunitaria específicas detectables mediante ELISOPOT o tetrámeros HLA³⁸.

Obtención de precursores dendríticos

La purificación de DC a gran escala para protocolos de inmunoterapia se realizaba inicialmente mediante centrifugación en gradiente de densidad para concentrar los precursores DC presentes en sangre periférica pero en muy baja frecuencia. Sin embargo, en los últimos años, es posible obtener un número entre 1×10^6 y 1×10^8 de DC mediante técnicas de cultivo *ex vivo* libres de suero pero que requieren condiciones Good Manufacturing Practice (GMP) con el uso de citocinas exógenas y el riesgo de contaminación bacteriana^{30,38-40}.

1. *Diferenciación de monocitos de sangre periférica*¹². Los monocitos se purifican principalmente de productos de aféresis de sangre periférica mediante inmunoselección, elutriación o adherencia. Posteriormente se diferencian a Mo-DC con GM-CSF y IL-4 (o IL-13) y maduración final con TNF o IL-1 β , Prostaglandina E₂ (PGE₂) e IL-6, todo lo cual requiere cultivo *ex vivo* durante 6-10 días.

2. *Diferenciación de células CD34 positivas.* Las células se purifican también de productos de aféresis, médula ósea o cordón umbilical mediante inmunoselección y se cultivan *ex vivo* con GM-CSF y TNF- α durante 6-10 días. Se genera una población mixta de células DC intersticiales y de Langerhans.
3. *Diferenciación de células leucémicas*⁴¹⁻⁴³. Las células blásticas de leucemia aguda mieloblástica (LAM), leucemia mieloide crónica (LMC) (blastos o monocitos), síndromes mielodisplásicos (SMD), leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) y excepcionalmente leucemia aguda linfoblástica (LAL), pueden diferenciarse también a células con características morfológicas y fenotípicas de DC, capaces de generar respuestas inmunitarias T. Generalmente se emplean GM-CSF, IL-4 y TNF durante 7-14 días. Poseen la ventaja de estar dotadas intrínsecamente de todos los antígenos tumorales, pero pueden presentar defectos en maduración y función⁴⁴, y para su uso clínico supondrían la reinfusión al paciente de células tumorales.
4. *Precusores dendríticos de sangre periférica.* El empleo de citocinas como G-CSF o Flt3L, aumenta considerablemente el número de precusores dendríticos en sangre periférica y por tanto en pacientes afectados de neoplasias hematológicas candidatos a procedimientos de terapia intensiva con rescate autólogo, los productos de aféresis pueden teóricamente constituir una fuente atractiva, no sólo de monocitos, sino de precusores dendríticos que son fácilmente purificables mediante inmunoselección. Esta estrategia acorta considerablemente el tiempo de cultivo *ex vivo* ya que maduran rápidamente en 24-48 h. En nuestra experiencia es posible obtener aproximadamente un $1-2 \times 10^6$ /kg de pre-DC1 y pre-DC2²³ en pacientes con neoplasias hematológicas. Los pacientes afectados de LAM, movilizados con quimioterapia y G-CSF presentan un número incrementado de precusores DC1 (hasta 20×10^6 /kg) que no pertenecen al clon tumoral ya que poseen características policlonales estudiadas mediante gen HUMARA o citogenética²³.

Apenas existen estudios comparativos de la capacidad estimuladora de respuesta antitumoral específica según la fuente inicial de células DC (monocitos, CD34 o precusores dendríticos). En la generación de respuestas a agentes externos como toxina tetánica, las DC derivadas de precusores mieloides pre-DC1 ejercen mayor capacidad estimuladora de linfocitos T que las Mo-DC⁴⁵.

Carga con antígenos tumorales y vías de administración

Las DC inmaduras obtenidas directamente de precusores DC o diferenciadas desde monocitos o CD34 poseen gran capacidad de captura antigénica por lo que deben ser dotadas con los antígenos tumorales antes de someterlas al proceso final de maduración *ex vivo*. La exposición al antígeno se realiza en forma de

proteínas purificadas, complejos HLA-péptidos, o transfectando las DC con ARN que codifica el antígeno deseado permitiendo la presentación en HLA clase I. Para el desarrollo de protocolos de inmunoterapia en las neoplasias hematológicas existen las siguientes posibilidades^{30,36}:

1. Proteínas de fusión específicas tumorales con capacidad antigénica: bcr-abl (p210 b3a2 y p190 e1a2 en LMC y LAL-LAM, respectivamente), Pml-RAR α (leucemia promielocítica), Dek-can (LAM con t[6;9]), TEL-AML (leucemias agudas con t[12;21] y CBF β (LAM con Inv16).
2. Proteínas sobre-expresadas por alteraciones genéticas: p53, N-Ras, survivina, WT1, proteinasa 3, MUC1.
3. Idiotipos de inmunoglobulinas: reordenamiento clonal de los genes *VDJ* en neoplasias linfoides B.
4. Cuando se desconoce el antígeno tumoral expresado, las DC pueden exponerse a lisados de células blásticas, fusionarse con los blastos para crear híbridos, o transfectarse con todo el ARN tumoral⁴⁶.

Existen pocos estudios comparando la capacidad inmunógena de las DC según la modalidad de carga de antígeno. La carga de DC mediante lisados tumorales tiene la ventaja de la sencillez del protocolo, la presentación vía HLA-II y HLA-I por presentación cruzada, la exposición a todos antígenos con potencial inmunógeno, y la liberación de proteínas del shock por calor (hsp70) que inducen maduración de las DC³⁰. Estudios en modelos de LAM, demuestran que las estrategias de carga tumoral total en forma de híbridos de fusión son las más estimuladoras de respuestas específicas⁴⁷. En nuestro centro, hemos desarrollado clones T citotóxicos específicos antileucemia empleando DC mieloides policlonales obtenidas de los productos de aféresis y cargadas mediante lisados tumorales en pacientes afectados de LAM.

La capacidad inmunógena de las DC puede aumentarse mediante el uso de adyuvantes como KLH y la transfección de ARN para la síntesis de citocinas, principalmente IL-12, o moléculas coestimuladoras. En modelos murinos se infunden aproximadamente $1-5 \times 10^5$ DC pero el número óptimo de DC a infundir en humanos no ha sido claramente establecido, empleándose generalmente $1 \times 10^{6-8}$ DC e infusiones repetidas a las 3-4 semanas. La administración intravenosa tiene como principal inconveniente el rápido secuestro pulmonar y hepático de las DC infundidas. La administración subcutánea es la más empleada, consiguiendo alcanzar los ganglios linfáticos locales aproximadamente un 2-5 % de las DC. Las DC pueden también inyectarse directamente en los ganglios linfáticos locales o intratumoral para el desarrollo de respuesta *in situ*.

Resultados clínicos en neoplasias hematológicas

La generación a gran escala de DC y su procesamiento *ex vivo* ha permitido su uso en protocolos clínicos,

principalmente fase I, para el tratamiento inmunotérapico de neoplasias hematológicas^{40,48}. En términos generales, el perfil de tolerancia es muy bueno con escasas reacciones locales durante la infusión. No se han producido fenómenos de autoinmunidad que habrían sido comunicados en modelos murinos.

Linfoma no Hodgkin B

En 1996, Hsu et al publicaron el primer ensayo clínico con vacuna basada en DC pulsadas con la proteína idiotípica generada en hibridoma, en 4 pacientes afectados de linfoma folicular⁴⁹ y posteriormente su experiencia global en 35 pacientes⁵⁰. En total 10 pacientes fueron tratados en recaída o persistencia de enfermedad tumoral. De ellos tres alcanzaron remisión completa (RC) pero sólo 1 paciente se mantiene 79 meses posvacunación. Un paciente consiguió respuesta parcial y 6 pacientes presentaron enfermedad progresiva. De los 25 pacientes tratados en primera RC tras quimioterapia, fueron evaluables 22 y de ellos: 8 presentaron remisión completa 24-56 meses posvacunación, 7 pacientes enfermedad estable 23-51 meses y siete presentaron progresión de la enfermedad 16-51 meses posvacunación. Debido a la biología de la enfermedad y la ausencia de grupo control en el estudio, se puede concluir que las vacunas con DC pulsadas con idiotipo de inmunoglobulinas en linfoma folicular, pueden inducir respuestas celulares e inmunes específicas pero el impacto real sobre la evolución de la enfermedad aún no está establecido.

Mieloma múltiple

En 1998, Wen et al publicaron el primer paciente afectado de mieloma múltiple (MM) sometido a inmunoterapia con DC pulsadas con la paraproteína específica purificada por cromatografía⁵¹. Se desarrollaron respuestas celulares y humorales específicas antiparaproteína pero con poco impacto sobre la evolución clínica. Desde entonces, se han publicado varios ensayos clínicos incluyendo un total de más de 100 pacientes. A pesar de detectarse respuestas inmunitarias específicas, la respuesta clínica suele ser pobre con disminución de los niveles de paraproteína en aproximadamente un 20 % de los casos y disminución de infiltración plasmática sólo excepcionalmente^{48,52}. La presencia de paraproteína sérica secretada por las células plasmáticas puede causar neutralización de los linfocitos T citotóxicos específicos y de los anticuerpos antiidiotipos. Además las DC de los pacientes afectados de MM, debido a la regulación anómala de citocinas como IL-6, IL-10 y TGF- β , presentan defectos madurativos y poca capacidad inmunogénica⁵³.

Leucemia mieloide crónica

En 1997, Choudhury et al⁴³, describieron la posibilidad de generar DC Phi+ de monocitos o blastos de pacien-

tes afectados de LMC y que poseían capacidad intrínseca para generar respuestas citotóxicas específicas. Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que pueden presentar alteraciones en su maduración y disminución en su capacidad inmunoestimuladora. Se han publicado 3 series clínicas de pacientes que recibieron vacunas con DC Phi+ evidenciándose la presencia de respuestas T citotóxicas específicas pero sin repercusión clínica⁵⁴⁻⁵⁶.

Posibles aplicaciones en otras neoplasias hematológicas

Se podrían emplear DC pulsadas con la proteína LMP2A del virus de Epstein-Barr (VEB) en el tratamiento de pacientes con enfermedad de Hodgkin ya que han sido descritas respuestas a linfocitos citotóxicos anti-VEB. En leucemia linfática crónica, se ha documentado la presencia de alteraciones cuantitativas y cualitativas de las poblaciones dendríticas circulantes. Se ha descrito el uso de DC pulsadas con lisados tumorales en pacientes afectados de linfoma cutáneos T con respuestas clínicas de corta duración⁴⁸. Recientemente Lee et al⁵⁷ han descrito el uso de DC derivadas de monocitos y pulsadas con lisado de blastos leucémicos en 2 pacientes afectados de LMA en recaída postrasplante autólogo, sin respuesta clínica.

Conclusiones

Los conocimientos adquiridos en la última década sobre la compleja biología de las DC y sus capacidades únicas estimuladoras y reguladoras del sistema inmunológico, abren un apasionante campo de investigación clínica en enfermedades tumorales, infecciosas o autoinmunitarias. La posibilidad de generar DC a escala clínica, ha permitido diseñar protocolos de inmunoterapia antitumoral, cuya tolerancia y seguridad ya han sido testadas en ensayos clínicos fase I. Sin embargo, a diferencia de los resultados en neoplasias sólidas, principalmente en melanoma con respuestas clínicas superiores a los protocolos de vacunación peptídica⁵⁸, la respuesta inmunitaria generada posvacunación en las neoplasias hematológicas parece ser actualmente insuficiente para erradicar la enfermedad. Las estrategias futuras que hay que desarrollar para mejorar estos resultados incluyen la optimización de los protocolos de pulsado con antígenos tumorales específicos sin fenómenos de escape, protocolos de captura antigénica mediante DEC-205, maduración de las DC mediante TLR específicos, empleo de DC2 con gran capacidad de síntesis de INF- γ y amplificación de la repuesta inmunitaria mediante administración posterior de péptidos, IL-12 o linfocitos T específicos. Asimismo, el empleo de vacunas con DC en pacientes en situación clínica de remisión pero con altas posibilidades de recaída, permitirá a la respuesta inmunitaria generada destruir con mayor probabilidad las células tumorales residuales.

Bibliografía

- Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I: Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med.* 1973;137:1142-62.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu Y, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:767-811.
- Van Nierop K, De Groot C. Human follicular dendritic cells: function, origin and development. *Semin Immunol.* 2002;14:251-7.
- Del Hoyo GM, Martín P, Vargas HH, Ruiz S, Arias CF, Ardavin C. Characterization of a common precursor population for dendritic cells. *Nature.* 2002;415:1043-7.
- Manz MG, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood.* 2001;97:3333-41.
- Shortman K, Caux C. Dendritic development: multiple pathways to nature's adjuvants. *Stem Cells.* 1997;15:409-19.
- Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:151-61.
- Caux C, Vanbervliet C, Massacrier C, Dezutter-Dambuyant B, De Saint-Vis B, Jacquet C, et al. CD34+ hematopoietic progenitors form human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF + TNF α . *J Exp Med.* 1996;184:695-706.
- Galy A, Travis M, Cen D, Chen B, Human TB. Natural killer and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity.* 1995;3:459-73.
- Blom B, Ho S, Antonenko S, Liu YJ. Generation of interferon alpha-producing dendritic cell (pre-DC2) from human CD34+ hematopoietic stem cells. *J Exp Med.* 2000;192:1785-96.
- Res P, Martínez-Cáceres E, Jaleco AC, Staal F, Noteboom E, Weijer K, et al. CD34+ CD38- cells in the human thymus can differentiate into T, natural killer, and dendritic cells but are distinct from pluripotent stem cells. *Blood.* 1996;87:5196-206.
- Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin-4 and downregulated by tumour necrosis-factor- α . *J Exp Med.* 1994;179:1109-18.
- MacDonald KPA, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J, Hart DNJ. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood.* 2002;100:4512-20.
- Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, et al. BDCA-2, BDCA-3 and BDCA-4: Three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol.* 2000;165:6037-46.
- Szabolcs P, Park KD, Reese M, Marti L, Broadwater G, Kurtzberg J. Absolute values of dendritic cell subsets in bone marrow, cord blood, and peripheral blood enumerated by a novel method. *Stem Cells.* 2003;21:296-303.
- Almeida J, Bueno C, Alguero MC, Sánchez ML, De Santiago M, Escribano L, et al. Comparative analysis of the morphological, cytochemical, immunophenotypical, and functional characteristics of normal human peripheral blood lineage(-)/CD16(+)/HLA-DR(+)/CD14(-/lo) cells, CD14(+) monocytes, and CD16(-) dendritic cells. *Clin Immunol.* 2000;10:325-38.
- Blom B, Lighthart SJW, Schotte R, Spits H. Developmental origin of pre-DC2. *Human Immunol.* 2002;63:1072-80.
- Gilliet M, Liu YJ. Human plasmacytoid-derived dendritic cells and the induction of T-regulatory cells. *Human Immunol.* 2002;63:1149-55.
- Béné MC, Feuillard J, Jacob MC. Plasmacytoid dendritic cells: form the plasmacytoid T-cell to type 2 dendritic cells CD4+ CD56+ malignancies. *Semin Hematol.* 2003;40:257-66.
- Bueno C, Almeida J, Lucio P, Marco J, Garcia R, De Pablos JM, et al. Incidence and characteristics of CD4(+)/HLA DRhi dendritic cell malignancies. *Haematologica.* 2004;89:58-69.
- Arpinati M, Green CL, Heimfeld S, Heuser JE, Anasetti C. Granulocyte-colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells. *Blood.* 2000;95:2484-90.
- Pulendran B, Banchereau J, Burkeholder S, Kraus E, Guinet E, Chalouni C, et al. Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. *J Immunol.* 2000;165:566-72.
- Sánchez J, Herrera C, Torres A, Román-Gómez J, Álvarez MA. Chemotherapy plus G-CSF mobilized peripheral blood stem cell harvests from acute myeloid leukaemia patients contain large amounts of polyclonal myeloid Lin^{neg}CD11c^{pos} dendritic precursor cells. *Br J Haematol.* 2004;124:636-44.
- McCull SR. Chemokines and dendritic cells: a crucial alliance. *Immunol Cell Biol.* 2002;80:489-96.
- Hart DNJ. Dendritic cells: Unique leukocyte population which control the primary immune response. *Blood.* 1997;90:3245-87.
- Ackerman AL, Cresswell P. Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat Immunol.* 2004;5:678-84.
- Takeda K, Kaisho T, Akira A. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:335-76.
- Sánchez J, Casañó J, Álvarez MA, Román-Gómez J, Martín C, Martínez F, et al. Kinetic of regulatory CD25^{high} and activated CD134+ (OX40) T lymphocytes during acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Haematol.* 2004;126:697-703.
- Rutella S, Lemoli RM. Regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells: from basic biology to clinical applications. *Immunol Lett.* 2004;94:11-26.
- O'Neill DW, Adams S, Bhardwaj N. Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer. *Blood.* 2004;104:2235-46.
- Gilliet M, Liu YJ. Human plasmacytoid-derived dendritic cells and the induction of T-regulatory cells. *Human Immunol.* 2002;63:1149-55.
- Temess P, Bauer TM, Rose L, Duffer C, Watzlik A, Simon H, et al. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med.* 2002;196:447-57.
- Fresnay S, Garnache-Ottou F, Plumas J, Seilles E, Tiberghien P, Saas P. Can tolerogenic dendritic cell help to modulate allo-immune responses in the setting of hematopoietic cell transplantation? *Transplant Immunol.* 2003;11:259-66.
- Ichim TE, Zhong R, Min WP. Prevention of allograft rejection by in vitro generated tolerogenic dendritic cells. *Transplant Immunol.* 2003;11:295-306.
- Thompson AG, Thomas R. Induction of immune tolerance by dendritic cells: implications for preventive and therapeutic immunotherapy of autoimmune disease. *Immunol Cell Biol.* 2002;80:509-19.
- Renkvist N, Castelli C, Robbins PF, Parmiani G. A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2001;50:3.
- Ahmad M, Rees RC, Ali SA. Escape for immunotherapy: possible mechanisms that influence tumor regression/progression. *Cancer Immunol Immunother.* 2004;53:844-54.
- Fong L, Engleman EG. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:245-73.
- Whiteside TL, Odoux C. Dendritic cell biology and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2004;53:240-8.
- Cranmer LD, Trevor KT, Hersh EM. Clinical applications of dendritic cell vaccination in the treatment of cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2004;53:275-306.
- Santiago-Schwarz F, Coppock DL, Hindenburg AA, Kern J. Identification of a malignant counterpart of the monocyte-dendritic cell progenitor in acute myeloid leukemia. *Blood.* 1994;84:3054.
- Choudhury A, Liang JC, Thomas EK, Flores-Romo L, Xie QS, Agusala K, et al. Dendritic cell derived *in vitro* from acute myelogenous leukemia cells stimulate autologous antileukemic T-cell responses. *Blood.* 1999;93:780-6.
- Choudhury A, Gajewski JL, Liang JC, Popat U, Claxton DF, Kliche KO, et al. Use of leukemic dendritic cells for the generation of anti-leukemic cellular cytotoxicity against Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *Blood.* 1997;89:1133-42.

44. Mohty M, Jarrossay D, Lafage-Pochitaloff M, Zandotti C, Brière F, De Lamballeri XN, et al. Circulating blood dendritic cells from myeloid leukemia patients display quantitative and cytogenetic abnormalities as well as functional impairment. *Blood*. 2001;98:3750-6.
45. Osugi Y, Vuckovic S, Hart DNJ. Myeloid blood DC11c + dendritic cells and monocytes-derived dendritic cells differ in their ability to stimulate T lymphocytes. *Blood*. 2002;100:2858-66.
46. Vari F, Hart DN. Loading DCs with Ag. *Cytotherapy*. 2004;6:110-21.
47. Galea-Lauri J, Darling D, Mufti G, Harrison P, Farzaneh F. Eliciting cytotoxic T lymphocytes against acute myeloid leukemia-derived antigens: evaluation of dendritic cell-leukemia cell hybrids and other antigen-loading strategies for dendritic cell-based vaccination. *Cancer Immunol Immunother*. 2002;51:299-310.
48. Büchler T, Michalek J, Kovarova L, Musilova R, Hajek R. Dendritic cell-based immunotherapy for the treatment of hematological malignancies. *Hematology*, 2003;8:97-104.
49. Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, et al. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med*. 1996;2:52-8.
50. Timmerman JM, Czerwinski DK, Davis TA, Hsu FJ, Benike C, Hao ZM, et al. Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. *Blood*. 2002;99:1517-26.
51. Wen YJ, Ling M, Bailey-Wood R, Lim SH. Idiotypic protein-pulsed adherent peripheral blood mononuclear cell-derived dendritic cells prime immune system in multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 1998;4:957-62.
52. Reichardt VL, Brossart P. Dendritic cells in clinical trials for multiple myeloma. *Methods Mol Med*. 2005;109:127-36.
53. Ratta M, Fagnoni F, Curti A, Vescovini R, Sansoni P, Oliviero B, et al. Dendritic cells are functionally defective in multiple myeloma: the role of interleukin-6. *Blood*. 2002;100:230-7.
54. Claxton DF, McMannis J, Champlin R, Choudhury A. Therapeutic potential of leukemia-derived dendritic cells: preclinical and clinical progress. *Crit Rev Immunol*. 2001;21:147-55.
55. Takahashi T, Tanaka Y, Nieda M, Azuma T, Chiba S, Juji T, et al. Dendritic cell vaccination for patients with chronic myelogenous leukemia. *Leuk Res*. 2003;27:795-802.
56. Westermann J, Kopp J, Korner I, Richter G, Qin Z, Blankenshtein T, et al. Bcr/abl + autologous dendritic cells for vaccination in chronic myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant*. 2000;25 Suppl 2:46-9.
57. Lee JJ, Hook H, Park MS, Nam JH, Choi BH, Song WH, et al. Immunotherapy using autologous monocyte-derived dendritic cells pulsed with leukemic cell lysates for acute myeloid leukemia relapse after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *J Clin Apheresis*. 2004;19:66-70.
58. Cerundolo V, Hermans IF, Salio M. Dendritic cells: a journey from laboratory to clinic. *Nat Immunol*. 2004;5:7-10.

Leucemia mieloide crónica: controversias terapéuticas actuales

E. OLAVARRIA

Hammersmith Hospital. Londres. Reino Unido.

Introduction

Chronic myeloid leukaemia (CML) is a haematopoietic disorder characterised by the malignant expansion of bone marrow stem cells. Its cytogenetic hallmark is a reciprocal t(9;22)(q34;q11) chromosomal translocation that creates a derivative 9q+ and a small 22q-, known as the Philadelphia (Ph) chromosome. The latter harbors the *BCR-ABL* fusion gene encoding a chimeric BCR-ABL protein with a deregulated tyrosine kinase activity, the expression of which has been shown to be necessary and sufficient for the transformed phenotype of CML cells. There has never been a more difficult time to advise an individual newly diagnosed with chronic myeloid leukaemia. Until recently the options comprised non-curative but relatively non-toxic chemotherapy or potentially curative allogeneic stem cell transplantation (SCT) with its attendant substantial toxicity¹. The management of CML has changed dramatically over recent years with the introduction of specific tyrosine kinase inhibitors, the first example of which is Imatinib (Glivec). Imatinib acts by inhibiting the kinase activity of the BCR-ABL oncoprotein, thereby blocking the signal transduction pathways that underlie the leukaemia; this in turn leads to death of affected cells². Imatinib occupies the ATP-binding site of the ABL tyrosine kinase component of the BCR-ABL oncoprotein and maintains it in an inactive conformation. Although *in vitro* studies have demonstrated selective killing of CML haematopoietic cells, presumably resulting from BCR-ABL kinase inhibition, its precise mechanism of action *in vivo* is still unclear. Imatinib was first administered to patients with CML in June 1998 in the USA and further clinical trials recruited patients rapidly³. As a consequence there is experience now with the treatment of more than 20,000 patients worldwide. The drug is administered orally, is well tolerated, and has a manageable side-effect profile⁴. Results from phase II/III trials demonstrate that complete cytogenetic remissions (CCR) could be obtained in many patients in all phases of CML^{3,5-8}. One thousand one hundred and six patients were randomised in the Novartis STI571-0106 study (IRIS study)⁹. Newly diagnosed patients were allocated to treatment with Imatinib alone at a dose of 400 mg daily or interferon-alpha (target dose 5 MIU/m²/day)

plus cytosine arabinoside (Ara-C) (20 mg/m²/day for 10 days per month). At 18 months the rates of major and complete cytogenetic responses were 92 % and 74 % for Imatinib alone versus 10 % and 2 % for interferon- α plus Ara-C ($p < 0.001$). In addition patients treated with Imatinib had a significantly reduced risk of progressing to accelerated phase. More recently, Hughes et al (10) have reported that patients treated with Imatinib are more likely to achieve a major molecular remission (> 3 log reduction in BCR-ABL transcripts from baseline levels). These data need to mature and, although promising, will need confirmation. The problem for physicians is that we must advise the newly diagnosed patients with chronic phase CML according to the facts that we know now and not the facts that we hope we will know in the future. It is highly likely that any treatment algorithm will require revision on more than one occasion over the next few years.

Controversies

It is highly unusual that the introduction of novel, effective, and safe therapies for any malignancy results in controversy regarding the optimal management of the disease. However, this seems to be the current situation for CML. The long-term outcome for patients with CML treated with Imatinib alone is unknown—hence the dilemma. In advocating Imatinib as the treatment of choice for all patients with CML we may deny individual patients the chance of cure by a long-standing and universally accepted therapy, namely allo-SCT. As new information becomes available from patients treated with Imatinib from diagnosis, we must try to develop a wide range of prognostic indicators to help distinguish patients for whom the apparently safe option is not necessarily the correct option, from those destined to have prolonged survival with targeted drug therapy. In addition, the introduction of Imatinib into clinical practice has raised a number of other questions, including the optimal use of this drug in terms of dose, dosing schedules, duration of treatment, definitions of response and conversely failure, and the continuing management of patients who fail to achieve molecular responses.

To transplant or not to transplant

At the present time there are broadly 2 approaches to the management of the newly diagnosed patient. The first is to offer all patients a trial of Imatinib and offer transplant only to those patients who fail treatment according to a pre-established set of guidelines for lack or loss of response. The second is to continue to discuss up-front allogeneic transplant with selected groups of individuals for whom more aggressive therapy is deemed appropriate.

The advantages of recommending Imatinib as first-line therapy for all newly diagnosed patients are clear. The results of the IRIS study of Imatinib alone versus IFN- α plus Ara-C showed that the chance of remaining progression free at 18 months was 97 % for patients receiving Imatinib alone versus 93 % for those given IFN- α plus Ara-C. This was associated with a considerable increase in the proportion of patients achieving MCR and CCR at 87 % and 76 % for Imatinib alone versus 34 % and 15 % for IFN- α plus Ara-C ($P < 0.001$). By giving all newly diagnosed patients Imatinib, the immediate morbidity and mortality of allo-SCT will be avoided, perhaps indefinitely, for some patients.

The disadvantages are also apparent. Despite the encouraging results of the IRIS study, 20-30 % of newly diagnosed patients fail to achieve such a good response. Furthermore, a number of questions concerning Imatinib remain outstanding, not least of which is whether the occurrence of MCR and CCR will translate into a survival advantage. As mentioned earlier, although the majority of patients achieve haematological and cytogenetic remission, a very small proportion achieves RT-PCR negativity for *BCR-ABL*^{11,12}. This is in contrast to RT-PCR results in long-term survivors of allo-SCT, and raises the possibility that the effects of Imatinib may not be durable. Furthermore, an appreciable minority of those patients who respond initially to Imatinib subsequently lose their response in association with emergence of an Imatinib resistant clone¹³. The various mechanisms underlying this resistance are probably heterogeneous but one that is reasonably well defined is the "acquisition" of mutations in the *BCR-ABL* kinase domain that impair Imatinib binding¹⁴⁻¹⁶. Some studies suggest that identification of such mutations, especially those present in the phosphate-binding loop (P-loop) of the kinase domain, is associated with a high probability of disease progression and relatively short survival¹⁵.

Definitions of success and failure to imatinib

In pursuing a strategy of offering a trial of Imatinib to all patients it is important to have clear definitions of both "response to" and "failure of" treatment, and a plan for managing both of these situations. There are some patterns of patient response (or lack of response) that can be considered failure of treatment without controversy. Any patient who has achieved a

degree of response, haematological, cytogenetic, or molecular, and then loses this response while still on treatment, should be considered at risk of disease progression. An individual who fails to achieve haematological control is also unlikely to do well in the long term. However, patients who have partial and/or gradual changes in their cytogenetic responses are more difficult to classify. Previously, we arbitrarily decided that those patients, who had not achieved an MCR at 12 months, were Imatinib "failures". More recently we have altered our definition of treatment failure to a lack of CCR after 12 months treatment at (at least) 400 mg/day. This change has been prompted by the relatively small increase in the proportion of patients achieving CCR at 18 months (76 %) compared to 12 months (69 %) in the IRIS study and by the knowledge that the best outcome of allo-SCT is found in patients transplanted within 1 year of diagnosis. It would, therefore, be preferable to reduce the duration of an Imatinib trial to less than 12 months. Furthermore, there are data to suggest that the rapidity of response may in itself be a prognostic indicator of the likelihood of achievement of MCR and therefore possibly of progression-free survival.

Predicting survival with transplantation strategies

With respect to up-front transplantation, a logical approach would be to restrict this to those patients likely to do extremely well with allo-SCT (and for whom it might be misguided to offer them an alternative therapy) and those who are likely to do (or have done) poorly with Imatinib. The question remains as to whether these 2 groups can be accurately identified.

The factors influencing the outcome of allo-SCT are well recognized. Age, disease status, disease duration, recipient-donor gender combinations, and the source of the transplant product have all been identified as significantly influencing long-term survival. In recipients of unrelated transplant, CMV serostatus is also influential. On the other hand, the applicability of the Sokal and Hasford scores to the outcome of transplantation has remained unclear. Very recently the International Blood and Marrow Transplant Registry (IBMTR) has analysed the impact of the two scores on transplant outcome and found that they were entirely non-predictive for survival. Gratwohl et al¹⁷ for the EBMT have developed a risk assessment score for the outcome of transplant, which involves five prognostic features (age at transplant, disease stage at transplant, donor type, donor-recipient gender combination and the interval from diagnosis to transplant). Using 3142 patients transplanted for CML from 1984-1999, the score was validated for transplant-related mortality, survival and disease-free survival. More recently the IBMTR has confirmed the value of the Gratwohl data using an additional data set com-

prising 3211 patients. Attempts were made to improve upon the original risk assessment by adding additional factors such as Karnofsky performance score, CMV antibody status of patient and donor, donor age and donor/recipient ABO blood group compatibility. Although the addition of the Karnofsky score improved the discriminatory power of the model in the learning set, it did not add sufficient information to the validation set to warrant its inclusion in the original Gratwohl risk assessment score¹⁸.

Allo-SCT should be discussed with all young patients with CML in chronic phase within the first year of diagnosis that have HLA-identical donors. The area of debate must be the definition of "young." For recipients of sibling transplant, this might be up to 45 years of age, and up to 35 years for patients with unrelated donors. If the Sokal or Hasford scores at diagnosis suggest a good prognosis, then the ages might be reduced. In contrast, for unrelated transplant if both donor and recipient are CMV negative and HLA-matched by high resolution typing, the definition of "young" might be more liberal.

Predicting survival with imatinib

The early identification of patients likely to do badly with Imatinib is more problematic and probably impossible at this time. The Sokal score has been found to correlate with outcome of treatment with Imatinib, and can be used to distinguish groups of patients at diagnosis. With the advent of gene expression profiling it might be possible to identify a pattern associated with early disease progression on Imatinib. However, if this were related to the presence of very small numbers of resistant cells with point mutations in the kinase domain of *BCR-ABL*, the nature of the micro-array assays would preclude their detection.

We have defined a response to Imatinib as the achievement of a CCR within 12 months of the onset of therapy. Patients who fail to respond or who lose their response, even though they remain in chronic phase, should be offered an allogeneic transplant (conventional or RIC-SCT) as soon as possible if they are of a suitable age and performance status and have an available donor. However, allo-SCT will be unsuitable for some of these patients and other therapies should be investigated. Various possibilities include:

1. Continuing Imatinib at 400 mg/day.
2. Increasing the dose of Imatinib to 600 or 800 mg/day.
3. Adding another agent such as IFN- α , Ara-C, hydroxyurea, decitabine, or homoharringtonine.
4. Changing treatment to one or more of these agents.
5. Considering an autologous transplant.
6. Entering the patient in a trial of one of the newly available tyrosine kinase inhibitors, currently BMS 354825 (Dasatinab) (Bristol Myers Squibb) or AMN107 (Novartis).

Biological features at diagnosis

The clinical features at diagnosis must, at least in part, reflect the inherent biology of the individual disease. A number of recent studies have attempted to identify factors underlying the molecular heterogeneity of CML. Telomere length decreases with each division in somatic cells and can be used as an indicator of the proliferative history of any cell type. It seems that telomere length is shorter in leukaemic cells than in their normal counterparts, and in one study a shortened telomere length has been associated with a reduction in the duration of phase¹⁹. Approximately 70 % of patients express a reciprocal ABL-BCR protein derived from the derivative chromosome. The presence or absence of the protein does not seem to affect the clinical outcome to conventional therapy. However, more recently the presence of deletions in the region of the ABL-BCR gene was reported in some 20 % of patients and appears to identify a subgroup of patients with a particularly poor prognosis²⁰. To date the presence of such deletions does not appear to correlate with the expression of the ABL-BCR fusion gene. The presence of additional chromosome abnormalities in a patient who otherwise appears to be in stable chronic phase is a criterion for accelerated phase in several disease stage classifications²¹. However the nature of the additional abnormality may be more important than simply the presence of additional derangements. An additional Philadelphia chromosome at diagnosis may be perfectly compatible with chronic phase whereas trisomy 8 and isochromosome 17 are likely to be more ominous. Since the introduction of Imatinib there have been anecdotal reports of additional abnormalities in Ph negative cells, a phenomenon previously observed only rarely in patients rendered Ph negative in interferon²². The significance of these changes is, as yet, unclear. However, these molecular abnormalities may reflect important information concerning the stability of the disease and its underlying propensity for transformation. Unpublished data from the Hammersmith Hospital showed that patients with additional cytogenetic abnormalities do not respond to Imatinib and, perhaps, in these cases treatment with Imatinib has been detrimental. These and other factors may be built into scoring systems in the future, further improving individual treatment planning.

Imatinib mesylate in conjunction with stem cell transplantation

Relatively few patients have received SCT after prior Imatinib therapy. Those that have done so have predominantly been treated by both strategies for advanced phase disease. Although the great majority of patients have engrafted there are insufficient data relating to transplant related mortality, late graft failure and disease relapse to assess the advisability of pre-treatment with Imatinib before any planned trans-

plant procedure. It should be born in mind that an initial trial of Imatinib might affect the outcome after allografting similarly to the impact of prolonged therapy with interferon alpha.

A more interesting possibility is the use of Imatinib after SCT. There are some data suggesting that Imatinib is well tolerated after autologous and allogeneic SCT. Donor lymphocyte infusions (DLI) have become the treatment of choice for patients who relapse after allogeneic SCT and durable molecular remissions are achieved in the majority of patients relapsing into chronic phase. GVHD and marrow aplasia remain the two most important complications of DLI but when an escalating dose schedule is used these problems are greatly reduced²³⁻²⁵. In a recent EBMT study, survival after relapse was related to 5 factors: time from diagnosis to transplant, disease phase at transplant and at relapse, time from transplant to relapse and donor type²⁵. The effects of individual adverse risk factors were cumulative so that, patients with 2 or more adverse features had a significantly reduced survival (35 % vs 65 % at 5 years). Furthermore, DLI was less effective in patients who developed GVHD after SCT. The use of Imatinib after allogeneic SCT could potentially offer many advantages. It could achieve remission without GVHD and could be effective when DLI has failed. It could also be used in combination with lower doses of DLI to prevent GVHD.

A number of groups have now used Imatinib in the management of patients relapsing after allogeneic transplantation^{26,27}. Most of these patients were treated for relapse into advanced phase disease, as DLI are of limited value in this situation. Other patients were treated for cytogenetic relapse or haematological relapse into chronic phase, often in the presence of on-going immunosuppression for GVHD and/or after failure of DLI. Some haematological, cytogenetic and molecular remissions have been achieved although the durability of these responses is as yet unknown. Some of these patients received Imatinib relatively shortly after DLI and responses could have been as a result of lymphocyte infusions. Several pilot studies are currently exploring the efficacy of Imatinib given prophylactically after conventional or RIC-SCT.

New tyrosin kinase inhibitors

BMS-354825 is a dual abl and src inhibitor that demonstrates significant efficacy in advanced Imatinib-resistant and intolerant CML patients. It is 300-1000 times more potent than Imatinib in a range of biochemical and cellular assays. In Phase I studies for patients with Imatinib-resistant and Imatinib-intolerant CML the agent appeared to be safe and well tolerated. In addition it resulted in haematological and cytogenetic responses. Of 36 patients treated in chronic phase, 86 % (31 patients) achieved a complete haematological response. 29 were evaluable for a cytogenetic response and 13 (45 %) developed CCyR and a further 8 (28 %) a major cytogenetic response.

Most BCR-ABL point mutations including P-loop mutations responded to BMS-354825. However the T315I mutation appears resistant to BMS-354825.

AMN107 is a more potent and more selective inhibitor than Imatinib of BCR-ABL autophosphorylation in BCR-ABL transfected haematopoietic and leukaemic cells. It was found to increase survival in murine BCR-ABLMPD models including Imatinib-resistant mutants and it inhibits all tested Imatinib-resistant point mutants of BCR-ABL (32 of 33) with the exception of T315I mutants. AMN107 also actively inhibits PDGFRA and B as well as KIT, and may have a role in the management of patients with systemic mastocytosis. 66 patients with CML in various phases of the disease have been treated in a Phase I trial and were reported at the 2004 ASH meeting. Haematological responses were observed in 91 %, 77 % and 55 % of patients in the chronic, accelerated and blastic phases respectively. Major or complete cytogenetic responses were also seen but follow-up was rather too short to assess the incidence or durability of such effects. Results in Ph-positive acute lymphoblastic leukaemia were more disappointing.

Long-term term follow-up

The management of patients who achieve CCR but who continue to have molecular evidence of disease is highly controversial. In this context, managing a clear "failure" might be considerably easier than managing a partial success. These patients are not "cured" of their disease and are therefore at risk of disease progression. The simplest approach is to continue treatment with regular molecular monitoring by quantitative RT-PCR. If levels of residual disease show a sustained increase, the patients can be offered transplant if possible. Alternatively they, like patients with cytogenetic responses other than complete, might be suitable candidates for alternative strategies within carefully conducted Phase II/III studies. Such strategies include those listed above for Imatinib non-responders with the additional choices of conventional or reduced intensity allo-SCT where possible and adoptive immunotherapy.

Unanswered questions

Do we need to redefine the criteria for a MCR? Clearly, if the vast majority of patients in chronic phase at diagnosis achieve a complete cytogenetic remission, then the continuous presence of even a small amount of Ph+ metaphases may represent clear biologic resistance rather than a partial response and may require transplantation or an alternative non-transplant therapy.

Recently, emerging data from microarray studies may allow for stratification and prediction of response to Imatinib therapy. In such experiments, CD34 selected

peripheral blood stem cells from patients in chronic phase and blast crisis show clear differences in gene expression patterns. With further validation, these data at diagnosis would be invaluable, and would necessitate inclusion into current prognostic models. Experience with Imatinib has also highlighted a subset of patients with accelerated disease defined by clonal evolution only. These patients have rates of haematological remission and MCR similar to chronic phase patients and better than accelerated phase patients with other clinical features of advanced disease.

Many groups have recently reported the identification of additional cytogenetic abnormalities in cells which are negative for the Philadelphia chromosome, most commonly trisomy 8, monosomy 7, t(3,10) and others. This highlights the importance of performing routine cytogenetic analysis (even in the presence of a low and stable PCR value) in patients who have achieved a complete cytogenetic remission. The true significance of these findings remains unclear but with myelodysplasia as a potential complication now described during Imatinib therapy, the role of allogeneic SCT may be revisited.

Summary

Our personal view is that the future management of CML will continue to depend on a combination of approaches utilising both allografting and targeted drug therapy. There is little doubt that the next decade will witness the introduction of a number of agents capable of inhibiting signal transduction pathways at a variety of levels. Combinations of these agents may be highly effective in long-term control of malignant cells. Until that time however we are obliged to treat our patients (especially young ones) with the most effective therapy currently available. The future of CML management must lie in devising individual patient-specific strategies. At the present time, the long-term outcome of treatment with Imatinib remains uncertain. Patients must be evaluated for adverse features at the time of diagnosis and repeatedly throughout the course of their disease. Those who are responding sub-optimally to their current therapy should be offered alternative approaches in the context of well-designed and well-recorded clinical studies. The possibilities for management are numerous and exciting. However, our enthusiasm must be tempered with an objective approach to the problem that CML is a heterogeneous disease and, therefore, the various subpopulations of patients differ from each other in the nature of their response to individual therapeutic regimens.

References and recommended reading

1. Goldman J. Implications of Imatinib for hematopoietic stem cell transplantation. *Semin Hematol.* 2001;38(3 Suppl 8): 28-34.
2. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of BCR-ABL-positive cells. *Nat Med.* 1996;2:561-6.
3. Druker B. Signal transduction inhibition: results from phase I clinical trials in chronic myeloid leukemia. *Semin Hematol.* 2001;38(3 Suppl 8):9-14.
4. Garcia-Manero G, Talpaz M, Kantarjian HM. Current therapy of chronic myelogenous leukemia. *Intern Med.* 2002;41:254-64.
5. Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, Guilhot F, Schiffer C, Gambacorti-Passerini C, et al. Hematologic and cytogenetic responses to Imatinib in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med.* 2002;346:645-52.
6. Sawyers CL, Hochhaus A, Feldman E, Goldman JM, Miller CB, Ottmann OG, et al. Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood.* 2002;99:3530-9.
7. Talpaz M, Silver RT, Druker BJ, Goldman JM, Gambacorti-Passerini C, Guilhot F, et al. Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. *Blood.* 2002;99:1928-37.
8. Ottmann OG, Druker BJ, Sawyers CL, Goldman JM, Reiffers J, Silver RT, et al. A phase 2 study of Imatinib in patients with relapsed or refractory Philadelphia chromosome-positive acute lymphoid leukemias. *Blood.* 2002;100:1965-71.
9. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, et al. Imatinib Compared with Interferon and Low-Dose Cytarabine for Newly Diagnosed Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukaemia. *N Engl J Med.* 2003;348:994-1004.
10. Hughes TP, Kaeda J, Branford S, Rudzki Z, Hochhaus A, et al. *N Engl J Med.* 2003;349:1423-32.
11. Barbany G, Hoglund M, Simonsson B. Complete molecular remission in chronic myelogenous leukemia after Imatinib therapy. *N Engl J Med.* 2002;347:539-40.
12. Wang L, Pearson K, Pillitteri L, Ferguson JE, Clark RE. Serial monitoring of BCR-ABL by peripheral blood real-time polymerase chain reaction predicts the marrow cytogenetic response to Imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2002;118:771-7.
13. Hochhaus A, Kreil S, Corbin A, La Rosee P, Lahaye T, Berger U, et al. Roots of clinical resistance to STI-571 cancer therapy. *Science.* 2001;293:2163.
14. Shah N, Nicoll J, Nagar B, Gorre M, Paquette R, Kuriyan J, et al. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor Imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell.* 2002;2:117.
15. Branford S, Rudzki Z, Walsh S, Grigg A, Arthur C, Taylor K, et al. High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop Imatinib (STI571) resistance. *Blood.* 2002;99:3472-5.
16. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science.* 2001;293:876-80.
17. Gratwohl A, Hermans J, Goldman JM, Arcese W, Carreras E, Devergie A, et al. Risk assessment for patients with chronic myeloid leukaemia before allogeneic blood or marrow transplantation. Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Lancet.* 1998; 352:1087-92.
18. Passweg JR, Walker I, Sobocinski KA, Klein JP, Horowitz MH, et al. Validation and extension of the EBMT Risk Score for patients with chronic myeloid leukaemia (CML) receiving allogeneic haematopoiesis stem cell transplants. *British Journal of Haematology.* 2004;125:613-20.
19. Boulwood J, Peniket A, Watkins F, Shepherd P, McGale P, Richards S, et al. Telomere length shortening in chronic myelogenous leukemia is associated with reduced time to accelerated phase. *Blood.* 2000;96:358-61.

20. Huntly BJ, Guilhot F, Reid AG, Vassiliou G, Henning E, et al. Imatinib improves but may not fully reverse the poor prognosis of patients with CML with derivative chromosome 9 deletions. *Blood*. 2003;102:2205-12.
21. O'Dwyer ME, Mauro MJ, Kurilik G, Mori M, Balleisen S, Olson S, et al. The impact of clonal evolution on response to Imatinib (STI571) in accelerated phase CML. *Blood*. 2002;100:1628-33.
22. Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J, Kjeldsen L, Dufva IH, Brondum-Nielsen K. Clonal Ph-negative hematopoiesis in CML after therapy with Imatinib is frequently characterized by trisomy 8. *Leukemia*. 2002;16:1390-3.
23. Guglielmi C, Arcese W, Dazzi F, Brand R, Bunjes D, Verdonck LF, et al. Donor lymphocyte infusion for relapsed chronic myelogenous leukemia: prognostic relevance of the initial cell dose. *Blood*. 2002;100:397-405.
24. Dazzi F, Szydlo RM, Cross NC, Craddock C, Kaeda J, Kanfer E, et al. Durability of responses following donor lymphocyte infusions for patients who relapse after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000;96:2712-6.
25. Guglielmi C, Arcese W, Hermans J, Bacigalupo A, Bandini G, Bunjes D, et al. Risk assessment in patients with Ph+ chronic myelogenous leukemia at first relapse after allogeneic stem cell transplant: an EBMT retrospective analysis. The Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood*. 2000;95:3328-34.
26. Olavarria E, Craddock C, Dazzi F, Marin D, Markt S, Apperley JF, et al. Imatinib (STI571) in the treatment of relapse of chronic myeloid leukemia after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2002;99:3861-2.
27. Kantarjian HM, O'Brien S, Cortés JE, Giralt SA, Ríos MB, Shan J, et al. Imatinib therapy for relapse after allogeneic stem cell transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 2002;100:1590-5.

Metilación del ADN en oncohematología

J. ROMÁN-GÓMEZ¹, A. JIMÉNEZ-VELASCO², X. AGIRRE³, M. BARRIOS², J.A. CASTILLEJO¹, F. PROSPER³, A. HEINIGER² Y A. TORRES¹

¹Servicio de Hematología. Hospital Reina Sofía. Córdoba. ²Servicio de Hematología. Hospital Carlos Haya. Málaga. ³Servicio de Hematología. Área de Terapia Celular. Clínica Universitaria de Navarra. Pamplona.

Introducción

La metilación del nucleótido citosina es la única modificación conocida que ocurre de forma endógena en el ADN de los mamíferos y es debida a la adición enzimática de un grupo metilo al carbono en posición 5 de la citosina¹ (fig. 1). La mayoría de las 5-metilcitosinas (5 mC) en el ADN humano están presentes en los dinucleótidos 5'-CpG-3' (citosina-fosfato-guana, CpG), los cuales no se encuentran uniformemente distribuidos en el genoma ya que han sido deplecionados progresivamente de éste a lo largo de la evolución². En el 98 % del genoma, los dinucleótidos CpG aparecen una vez cada 100 dinucleótidos y se encuentran fuertemente metilados con objeto de estructurar la cromatina nuclear en un estado represivo que impida la transcripción de regiones poco útiles y potencialmente peligrosas del ADN, tales como las secuencias repetitivas *Alu* o transposones³. Por contra, pequeñas regiones del ADN que van desde 200 pb hasta varias kilobases, denominadas "islas CpG", contienen la frecuencia esperada de dinucleótidos CpG (1 por cada 10 dinucleótidos)⁴⁻⁵. Estas áreas están protegidas de la metilación y se encuentran localizadas en las regiones promotoras proximales de cerca del 50-60 % de todos los genes⁶, siendo esta ausencia de metilación un requisito básico para la transcripción activa y normal funcionamiento de los mismos.

Hasta hace pocos años, se pensaba que sólo una única metiltransferasa del ADN, la DNMT1, era la responsable del mantenimiento de los patrones de metilación del genoma de las células adultas⁷. En la

actualidad, se han identificado otras dos DNMT biológicamente activas, las DNMT3a y DNMT3b. La supresión o alteración de los genes de las DNMT en el ratón, de forma aislada o en combinación, causa letalidad embrionaria y ha conducido a la descripción de un modelo en el cual DNMT3a y DNMT3b son las responsables de la metilación establecida *de novo*, la cual es mantenida en el tiempo y transmitida a la progenie celular (la llamada herencia epigenética) por la acción de la DNMT1⁸.

Funciones fisiológicas de la metilación

La metilación de las citosinas tiene una serie de funciones fisiológicas, algunas de las cuales están suficientemente probadas, mientras que otras son aún activamente debatidas. En general, la metilación de un gen ejerce una función represora de la actividad del mismo (fig. 2).

Durante el desarrollo, la inactivación de uno de los dos cromosomas X de las células femeninas ocurre gracias a un proceso dependiente de la metilación⁹. Las islas CpG contenidas en la mayoría de los genes del cromosoma X inactivo, incluyendo genes habituales como *HPRT*, *G6PD* y *PGK1*, se encuentran metiladas y en silencio transcripcional (sin función), presumiblemente para asegurar unos niveles equivalentes de expresión tanto en hombres como en mujeres¹⁰.

La metilación es crítica, también, para la expresión de los llamados genes "impresos". Mientras que la mayor parte de los genes son expresados tanto por su alelo materno como paterno, un número pequeño de genes "impresos" son expresados únicamente por el alelo procedente de la madre o del padre, pero no por ambos¹¹. Este proceso supone la adquisición de un estado de cromatina cerrado e hipermetilación del ADN en uno de los alelos del gen de forma precoz en las células germinales del padre o madre, lo que conduce a la expresión monoalélica del mismo¹².

Por otra parte, aunque la metilación del ADN no es un sistema ampliamente usado por el ser humano para regular la expresión normal de los genes, de hecho disponemos de redes moleculares más complejas y especializadas para esto, algunas veces la metilación consigue de forma fisiológica este propósito. Es el caso, por ejemplo, de aquellos genes cuya expresión está restringida a las células germinales del hombre o

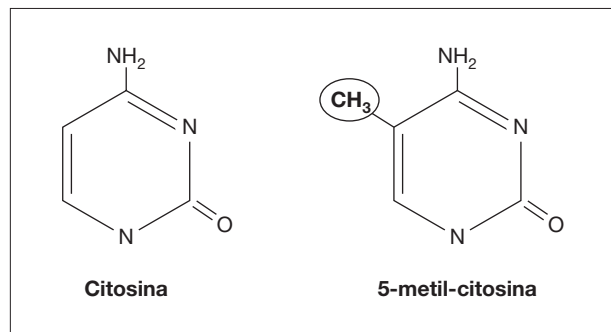


Figura 1. La metilación del ADN ocurre por la adición enzimática de un grupo metilo en el carbono 5 del nucleótido citosina.

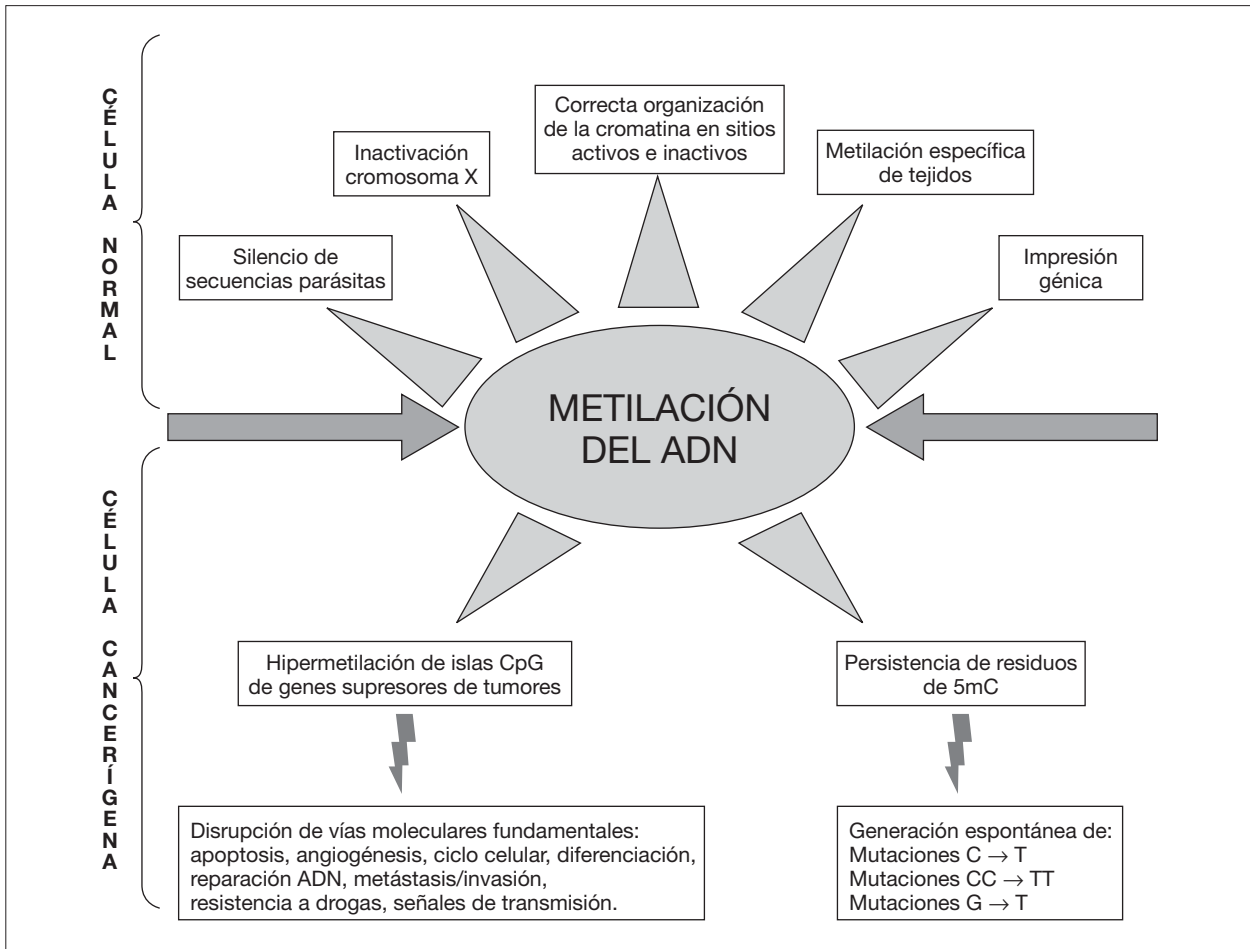


Figura 2. Papel central de la metilación del ADN en la conducta normal y tumoral de las células.

la mujer y que no son expresados con posterioridad en ningún tejido adulto, tales como las familias génicas *MAGE* y *LAGE*¹³. Mucho más debatido es el caso de los genes específicos de tejidos, algunos de los cuales contienen islas CpG, mientras que otros sólo presentan escasos dinucleótidos CpG parcheados por sus regiones promotoras. La metilación se ha postulado como uno de los mecanismos silenciadores de estos genes específicos de tejidos en aquellos tipos celulares donde no deberían ser expresados. Un ejemplo bien caracterizado de este tipo de regulación es el proporcionado por la *adenosiltransferasa de metionina 1A* y *2A* en los roedores¹⁴.

Finalmente, una de las más atractivas funciones fisiológicas de la metilación podría ser su papel en la represión de secuencias parásitas del ADN¹⁵. Nuestro genoma está plagado con transposones y retrovirus endógenos adquiridos a lo largo de la evolución de los homínidos. Nosotros podemos controlar estas secuencias importadas mediante la represión transcripcional directa mediada por varias proteínas del huésped, pero nuestra principal línea de defensa contra este inmenso número de secuencias extrañas (más del 35 % del total del genoma humano) puede ser la metilación del ADN. La metilación de los promotores de nuestros parásitos intragenómicos inactiva estas se-

cuencias y posteriormente las 5mC son mutadas a timinas que acabarán destruyendo las mismas.

Hipermetilación en el cáncer humano

La metilación de las regiones promotoras de los genes es, en la actualidad, el evento epigenético (alteración de la expresión de un gen sin que exista cambio en la secuencia normal de los nucleótidos que lo componen) mejor caracterizado de las células tumorales; se encuentra virtualmente en todos los tipos de neoplasias humanas y se asocia con el inapropiado silencio transcripcional y pérdida de función de estos genes¹⁶⁻¹⁷. Sorprendentemente, esta hipermetilación es, al menos, tan frecuente como las mutaciones o deleciones que se presentan en los genes supresores de tumores clásicos y su importancia en la carcinogénesis puede ser apreciada por los siguientes hechos:

1. Durante los últimos años se ha constatado que la metilación anómala de los promotores se asocia a una pérdida de la función del gen, la cual proporciona una ventaja selectiva a las células neoplásicas de la misma forma que lo hacen las mutaciones.

Por ejemplo, los genes del *síndrome de Von Hippel-Lindau (VHL)*¹⁸, del *cáncer de mama de comienzo temprano 1 (BCRA1)*¹⁹ y de la *cinasa serina/treonina 11 (STK11)*²⁰, cuyas mutaciones en la línea germinal causan formas familiares de cáncer renal, de mama y de colon, respectivamente, son inactivadas epigenéticamente en las formas esporádicas de los mismos.

2. El significado funcional de la hipermetilación de los promotores de los genes supresores de tumores puede ser también apreciada examinando las consecuencias de la inactivación de copias individuales de tales genes. El modelo en “dos golpes” de Knudson (*two hits model*) establece que las consecuencias fenotípicas de la pérdida de función de un gen supresor de tumores no pueden ser observadas a menos que ambos alelos del gen se encuentren inactivados en las células tumorales. Numerosos estudios demuestran que los tumores pueden mantener mutaciones de forma estable en uno de los alelos del gen, mientras que el otro alelo se encuentra hipermetilado, conduciendo a la inactivación funcional del mismo²¹⁻²². De hecho, cuando uno de los dos alelos está mutado en un paciente con una forma familiar de cáncer, la hipermetilación es frecuentemente observada como el segundo cambio inactivador.
3. La metilación en el ADN predispone a la aparición de mutaciones durante la progresión tumoral. Esto se observó inicialmente en el gen reparador del ADN, *MLH1*²³, el cual se encuentra frecuentemente hipermetilado en los tumores esporádicos que presentan inestabilidad de microsatélites (inestabilidad en el genoma ocasionada por un alto índice de mutaciones localizadas en pequeñas regiones repetitivas del ADN). La O⁶-metilguanina-ADN metiltransferasa (*MGMT*) es otro gen reparador del ADN que es silenciado por metilación en los tumores de colon, pulmón y linfomas²⁴⁻²⁶. La proteína *MGMT* elimina las O⁶-metilguaninas inducidas por agentes cancerígenos ya que éstas originan mutaciones de G a A si no son reparadas. Los tumores que presentan inactivación del gen *MGMT* están predispuestos a la mutación de genes supresores de tumores, tales como *p53* o *K-RAS*.
4. Otra importante observación respecto a los genes supresores de tumores que son alterados por mecanismos genéticos o epigenéticos es que se encuentran, a menudo, en regiones genómicas caracterizadas por su frecuente delección. Estas delecciones cromosómicas causan pérdida de heterocigocidad (LOH), la cual se emplea en el laboratorio para la búsqueda de genes supresores. Es interesante destacar que existen regiones LOH en las cuales los eventos epigenéticos, más que las alteraciones genéticas, parecen definir los genes importantes, tal y como ocurre con los genes *RASSF1A* o *HIC1* en los cánceres de pulmón, próstata y mama²⁷.

Además del efecto silenciador génico asociado a la metilación, es importante reconocer que la metilación de las citosinas puede influenciar la tumorigéne-

sis por otros mecanismos. Esto ocurre porque las 5mC son por sí mismas mutagénicas ya que sufren desaminación hidrolítica espontánea, causando transiciones C-T²⁸. De este modo, hasta el 50 % de las mutaciones puntuales que ocurren en la región codificante del gen supresor *p53* acaecen en las 5mC²⁹. La presencia de un grupo metilo en los dinucleótidos CpG de este gen incrementa de forma sustancial la tasa de mutaciones inducidas por las radiaciones ultravioletas durante el desarrollo del cáncer cutáneo³⁰. Los dinucleótidos CpG metilados son, también, las dianas preferidas para las mutaciones de G a T, las cuales son inducidas en las células de los mamíferos por los benzopirenos del tabaco³¹.

Genes hipermetilados en el cáncer

La metilación de genes relacionados con el cáncer aparece en la mayoría de las vías moleculares que caracterizan la actividad tumoral. Genes implicados en la regulación del ciclo celular, reparación del ADN, resistencia a drogas, diferenciación, apoptosis, angiogénesis, metástasis e invasión se encuentran patológicamente silenciados por metilación. Eventos similares pueden ser inducidos química o genéticamente en modelos murinos, que junto con estudios dinámicos y funcionales muestran evidencias suficientes de que la metilación de las islas CpG contribuye directamente a la aparición de las neoplasias³²⁻³⁴. Esta metilación aberrante puede influenciar, también, la expresión de genes “impresos” en las células cancerígenas. La expresión regulada por metilación de una serie de genes “impresos” es crítica para el desarrollo embrionario, pero en el microambiente de una célula tumoral, la disregulación de estos genes puede tener consecuencias oncogénicas³⁵.

La metilación de los promotores génicos se ha observado en células que no son abiertamente malignas. Por ejemplo, una extensa metilación de islas CpG está presente en el tejido no displásico de pacientes con esófago de Barrett y adenocarcinoma asociado³⁶. En pacientes con cáncer gástrico, los promotores de los genes *p16* y *E-cadherina* se encuentran metilados tanto en células tumorales como en mucosa gástrica normal³⁶. Metilación de *p16*, *p14*, *MGMT* y *APC* ocurre en adenomas colorrectales³⁷ y de *hMLH1* en hiperplasias endometriales y colitis ulcerosa, ambas, lesiones precursoras de cánceres uterinos y colorrectales^{38,39}. Por tanto, la metilación de las islas CpG no puede considerarse una consecuencia del propio tumor y su detección en tejidos de apariencia normal antes de la conversión maligna ofrece la oportunidad de usarla como marcador de lesiones precancerosas. Un aspecto de extraordinaria importancia es el hecho de que no todos los genes se encuentran metilados en cada tipo de tumor, sino que el patrón de genes metilados difiere en cada tipo de entidad maligna, determinando un patrón de metilación específico de tumor⁴⁰. Entre el 70-90 % de las neoplasias humanas presentan, al menos, un gen metilado. Algunos genes, como el inhibidor del ciclo celular *p16*, se en-

Tabla 1. Genes frecuentemente metilados en las neoplasias hematológicas

Tipo de tumor	Genes
Linfoma no Hodgkin	DAPK, P57, P16, MGMT, GST, RARB2, CRBP1.
Mieloma múltiple	P16, SOCS-1, CDH1, P73, DAPK.
Leucemia mieloide crónica	ABL, BCR, CDH13.
Leucemia mieloblástica aguda	P15, CDH1, SOCS-1, P73, DAPK, HIC1, RARB2, CRBP1

Tabla 2. Genes metilados en la leucemia linfoblástica aguda

Gen	Localización	Función
ADAMTS1	21q21.2	Metaloproteasa
ADAMTS5	21q21.3	Metaloproteasa
APAF-1	12q23	Regulación de la apoptosis
ASPP-1	6p22.1	Coestimulador de p53. Regulación de la apoptosis
CDH1	16q22	Adhesión celular
CDH13	16q24	Adhesión celular
DAPK	9q34	Regulación de la apoptosis
DIABLO	12q24.31	Regulación de la apoptosis
DKK-3	11p15	Antagonista de la vía de señales WNT
LATS-1	6q23-25	Control ciclo celular en G2-M
LATS-2	13q11-12	Control ciclo celular en G2-M/G1-S
NES-1	19q13	Control del crecimiento y diferenciación
P14	9p21	Control ciclo celular. Regulación de la apoptosis
P15	9p21	Control ciclo celular en G1-S
P16	9p21	Control ciclo celular en G1-S
P57	11p15	Control ciclo celular en G1-S
P73	1p36	Control ciclo celular en G1-S
PARK-2	6q25-27	Ubiquitinación
PTEN	10q23	Adhesión celular/motilidad. Apoptosis. Angiogenesis. Control ciclo celular. Transducción de señales
sFRP-1	8p12-11.1	Antagonista vía de señales Wnt
sFRP-2	4q31.3	Antagonista vía de señales Wnt
sFRP-4	7p14.1	Antagonista vía de señales Wnt
sFRP-5	10q24.1	Antagonista vía de señales Wnt
SHP-1	12p13	Inhibidor de la vía Jak/STAT
SYK	9q22	Transducción de señales
TMS-1	16p11-12	Regulación de la apoptosis
WIF-1	12q14.3	Antagonista vía de señales Wnt

cuentran metilados en una gran variedad de tumores que incluyen los colorrectales, pulmonares, de mama, vejiga, gliomas y melanomas, reflejando la extensa contribución de la disrupción de la vía de control celular ciclina *D-retinoblastoma* en el cáncer humano. Otros cambios, tales como la metilación del gen reparador *MGMT* o del gen proapoptótico *DAPK*, también tienen una amplia distribución, mientras que la metilación de *p14* o *APC* son más prevalente en los tumores gastrointestinales, la de *GSTP1* en neoplasias relacionadas con esteroides y la metilación de *p73*, *p15* o *p21* son casi exclusivas de las hemopatías⁴¹⁻⁴⁵.

Metilación en las neoplasias hematológicas

Esta metilación específica de tumor también es evidente en las neoplasias hematológicas (tabla 1), siendo en la leucemia linfoblástica aguda (LLA) donde mejor se encuentra caracterizada (tabla 2). En los últimos años, nuestro grupo ha mostrado que la metilación de múltiples genes es un fenómeno común en las células LLA humanas y constituye el mecanismo más importante para inactivar genes relacionados con el cáncer en esta enfermedad⁴⁴⁻⁵². La metilación en la LLA participa en la inactivación de tres vías moleculares esenciales: eventos que disregulan la proliferación celular alterando: a) el punto de control tardío en la transición G1-S del ciclo celular, bien directamente (inactivando *p21*, *p15*, *p16* y *p57*) o indirectamente (inactivando *p73*, *PTEN*, *NES-1* y *LATS-2*); b) alterando también la transición G2-M (inactivando *LATS-1* y *LATS-2*), y c) inhibiendo los antagonistas de la vía de señales WNT/ β -catenina (*DKK-3*); el programa apoptótico (a través de la inactivación de *DAPK*, *p14*, *TMS1*, *APAF-1*, *DIABLO* y *ASPP-1*) y la adhesión celular (inactivando *H-cadherina*, *E-cadherina*, *ADAMTS1* y *ADAMTS5*). Todas estas anomalías no deben sorprendernos ya que, subyacente a la complejidad de cada tumor, todos ellos presentan un cierto número de “misiones críticas” que conducen a la célula tumoral y a su progenie hacia la expansión incontrolada. Una de estas es la disregulación de la proliferación celular, que junto a la obligada supresión de la apoptosis, crean una plataforma mínima necesaria para el desarrollo neoplásico⁵³. Nuestros datos demuestran que en la LLA, esta plataforma común se obtiene a través de un mecanismo epigenético de metilación. Más aún, aunque las anomalías del gen supresor *p53* son las más frecuentes observadas en los tumores sólidos⁵⁴, estas lesiones son raras en la LLA⁵⁵. Una hipótesis que nace a la luz de nuestros resultados es que la metilación de los promotores en la LLA inactiva las respuestas apoptóticas y de control de la proliferación, bien por encima (*p14*, *DAPK*, *ASPP-1*) o por debajo (*p21*, *APAF-1*) de *p53*. Esto implica que en la LLA, también existe una fuerte selección celular para perder la funcionalidad de *p53*, pero en este caso, mediante una vía epigenética alternativa.

La metilación no sólo interviene en la génesis de las hemopatías, sino que está claramente involucrada en la progresión a la fase aguda de la leucemia mieloide crónica (LMC) donde aparecen metilados los genes de la *calcitonina*, *ABL* y *BCR*⁵⁶⁻⁵⁸ y en las agudizaciones de los síndromes mielodisplásicos, caracterizados por la hipermetilación de *p15*⁵⁹.

Mecanismos por los que la metilación génica causa silencio transcripcional

Aunque la importancia funcional de la metilación en la pérdida de función génica está claramente establecida, los mecanismos moleculares implicados en este proceso no están totalmente dilucidados. Recientemente, se ha demostrado la implicación funcional de

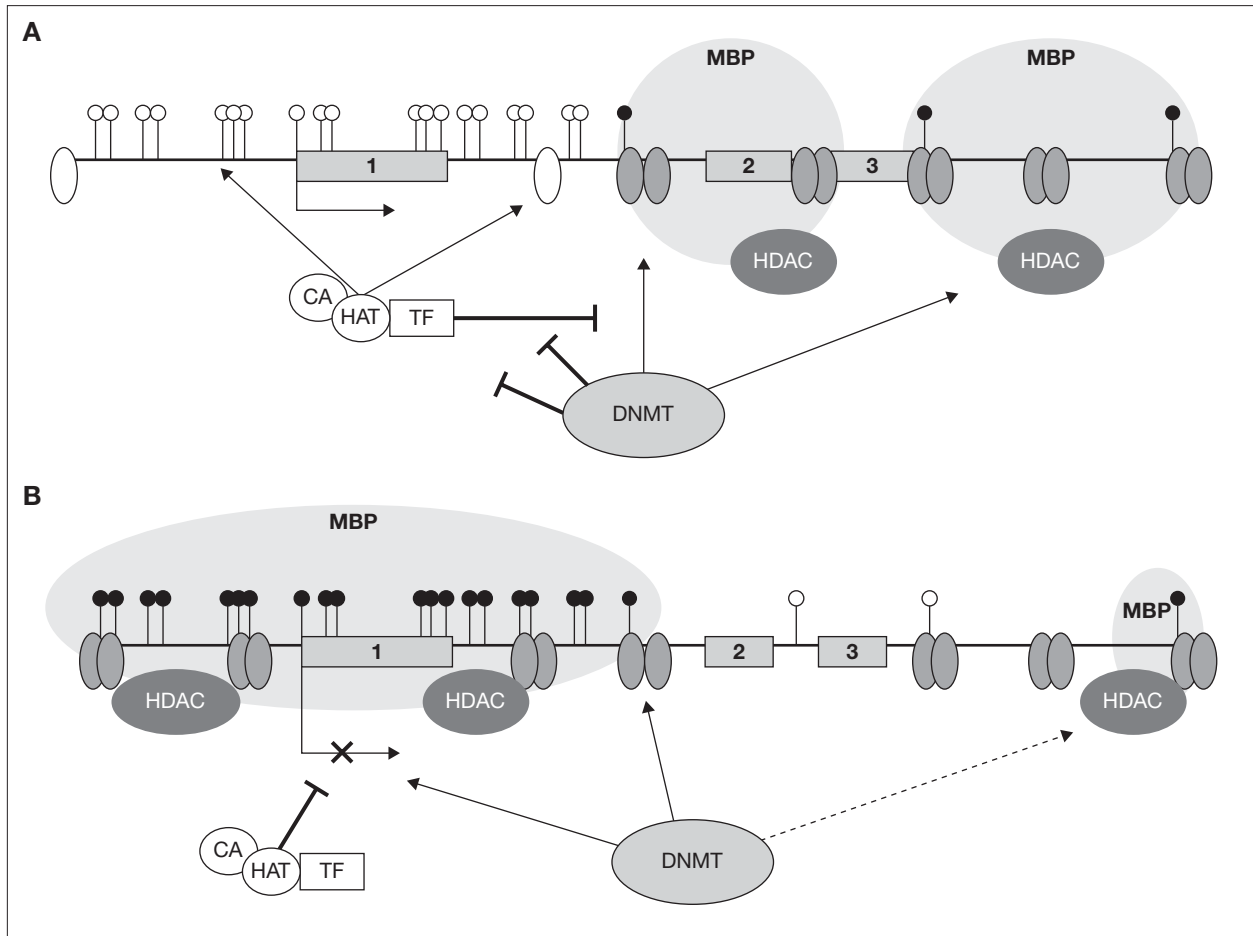


Figura 3. A) Célula normal. Configuración típica de una transcripción activa (flechas al comienzo del exón 1), tres exones (rectángulos números 1, 2 y 3) con una región promotora no metilada en las islas CpG (círculos blancos). Las islas están constituidas por una región rica en CpG que está protegida de la metilación, mientras que las áreas inmediatas debajo de la cadena, tanto dentro del cuerpo del gen y en dirección 3', muestran depleción de CpG y fuerte metilación (círculos negros) típica de la mayor parte del genoma. La constitución de la cromatina en las islas es favorable a la transcripción y se caracteriza por estar ampliamente distendida y presentar nucleosomas no compactos con histonas acetiladas (óvalos claros sobre el ADN). A diferencia de esto, las regiones sin islas CpG tienen cromatina escasamente distendida y nucleosomas compactos con histonas desacetiladas (óvalos oscuros). Las islas son accesibles a los complejos habituales de transcripción constituidos por una acetilasa de histonas (HAT), un coactivador (CA) y factores de transcripción (TF), pero no interactúan con las metiltransferasas del ADN (DNMT). Por el contrario, el complejo de transcripción no interactúa con las regiones metiladas que sin embargo son plenamente accesibles a las DNMT y presentan complejos proteicos constituidos por proteínas que se unen a las citosinas metiladas (MBP; halo oscuro) y desacetilasas de histonas (HDAC). **B) Célula cancerígena.** El gen muestra metilación aberrante y silencio transcripcional (X). La isla CpG está ahora fuertemente metilada (círculo negro), plenamente accesible a las DNMT y los nucleosomas contienen histonas desacetiladas y están aún más compactos con cromatina menos distendida (óvalos oscuros). Las islas CpG metiladas interactúan ahora con los complejos MBP-HDAC y el complejo de transcripción está excluido de la región. El área por debajo de la isla muestra la hipometilación típica del genoma de la célula tumoral, con débil interacción con DNMT, con un descenso del número de nucleosomas y pocos complejos MBP-HDAC.

la asociación entre metilación y una cromatina nuclear inactiva desde el punto de vista transcripcional. Esta misión esencial se realiza a través de proteínas que se fijan de forma preferente a las 5mC y que participan en complejos que contienen desacetilasas de las histonas⁶⁰⁻⁶³ (fig. 3). Se han descrito al menos, dos o tres complejos independientes. Uno constituido por la proteína de unión a CpG metiladas, denominada MECP2 y otros constituidos por las proteínas MBD2 y MBD3. Estos complejos contienen, a su vez, las desacetilasas de histonas HDAC1 y/o HDAC2 y también, algunos represores de la transcripción. MECP2 y MBD2 son, además, capaces de reprimir la transcripción por sí mismas y adicionalmente, MBD3 puede residir en un complejo con Mi2/CHD que es una

proteína remodeladora de la cromatina nuclear. La demostración de estos complejos implica que la metilación del ADN actúa sobre los genes a través de diversas vías: mediante el remodelaje de la cromatina hacia un estado represivo y convirtiendo las histonas y otras proteínas a un estado de no acetilación.

Todo esto sugiere que la metilación trabaja en coordinación con las proteínas con capacidad de unión a las 5mC y con las desacetilasas de las histonas para producir el silencio transcripcional de los genes hipermetilados en el cáncer. Esto se realiza de la siguiente forma dinámica (fig. 4): Normalmente, los promotores de la mayoría de genes que se transcriben activamente están ocupados simultáneamente por complejos activadores y represores (fig. 4A)⁶⁴. Los niveles de ex-

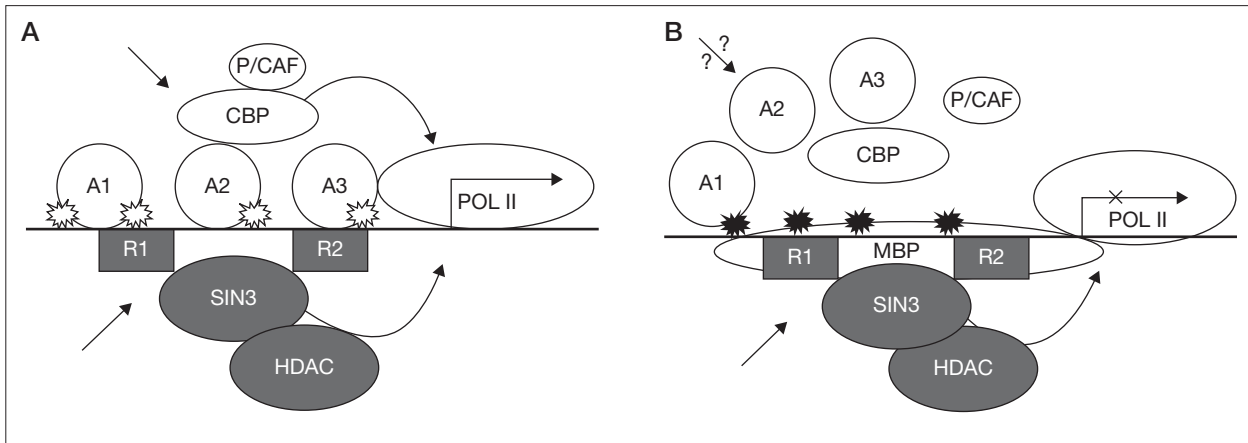


Figura 4. A) Promotor no metilado. Se muestran las interacciones entre los complejos transcripcionales de activación y represión para una isla CpG promotora normal no metilada (las islas CpG están representadas como estrellas blancas sobre el ADN) asociadas con "transcription-ready gene" [flecha negra dentro del círculo de la polimerasa II (POL II)]. Como se discute en el texto, tanto los factores activadores de la transcripción [(los activadores directos, A1, A2 y A3; coactivadores con actividad acetilasa de histonas y de otras proteínas, CBP (proteína que se une al AMP cíclico) y P/CAF (factor asociado a p300/CBP)] como los factores activadores de la represión (represores directos, R1 y R2; correpresores, Sin3; histonas desacetilasa, HDAC) son representados cuando se unen a la región promotora en una situación lista para la transcripción. El nivel relativo de transcripción es determinado por las señales celulares (flechas negras) que influyen en la cantidad de los complejos y en el estado postranslacional, especialmente el estado de acetilación de histonas y otras proteínas. **B) Promotor en un estado aberrante de hipermetilación en una célula cancerígena** (las estrellas negras representan las islas CpG metiladas). Los signos de interrogación indican la posibilidad de que señales celulares para transcribir un gen dado afecten la vulnerabilidad del promotor CpG a la metilación aberrante. En este escenario, el complejo de activación de la transcripción se representa como disperso y no tiene acceso al ADN, y un nuevo complejo represor es atado fuertemente al ADN por la presencia de una proteína que se une a la citosina metilada (MBP representada por un halo claro alrededor de las CpG hipermetiladas). El exceso de HDAC en el complejo represor más la metilación previenen el acceso de acetilasas, resultando en un incremento de la cromatina desacetilada, el cual origina un silenciamiento del estado adecuado para la transcripción (X sobre la Pol II en lugar de comienzo de la transcripción) del gen. En este modelo, la inhibición de la actividad desacetilasa de histonas por drogas como el tricostatín (TSA) no incrementarán la expresión del gen a no ser que un grado de desmetilación tal permita el re acceso de los complejos de activación con actividad acetilasa.

presión del gen son determinados por señales intracelulares que influyen, no sólo la cantidad de estos complejos, sino de manera más importante, las modificaciones postranscripcionales tales como el estado de acetilación de las histonas. En este modelo, los promotores metilados en las células malignas sufre una desviación hacia el silencio transcripcional mediante 2 eventos (fig. 4B). Primero, la metilación puede excluir a los complejos activadores que presentan actividad acetilasa y segundo, las proteínas con capacidad de unión a las 5mC pueden fijar complejos que contienen represores de la transcripción y desacetilasas de las histonas.

Causas que originan la metilación de las islas CpG

Una cuestión fundamental es saber si la hipermetilación de las islas CpG aparece como un efecto estocástico o si existen eventos predisponentes, tal y como sugieren observaciones recientes. Los genes con mayor densidad de metilación en el cáncer de colon parecen predisuestos a este cambio como consecuencia del envejecimiento⁶⁵. Los promotores de estos genes están mínimamente metilados en la mucosa colónica normal de los individuos jóvenes incrementándose con la edad y siendo máxima cuando aparece la neoplasia. Incluso los genes supresores de tumores clásicos, tales como *p16* cuya metilación no es dependiente de la edad, pueden estar predisuestos a la metilación. Tanto en la leucemia aguda mieloblástica

como linfoblástica^{48,66-68} aparece una metilación coordinada de varios genes, sugiriendo que la metilación de islas CpG está relacionada con defectos específicos de la metilación en un subgrupo de pacientes, más que la metilación de cada CpG individual represente un evento al azar seguido por la selección de la célula afectada⁴⁸.

Dos modelos se han propuesto para explicar la metilación de las islas CpG:

1. El primero implica la pérdida de factores que normalmente protegen a las islas CpG de la metilación. Estos factores protectores podrían competir de manera exitosa con las DNMT por las regiones CpG. En estudios realizados en el promotor del gen de la adenina fosforribosil transferasa (APRT), los sitios de unión para el factor de transcripción Sp1 parecen ser críticos para la protección frente a la metilación⁶⁹⁻⁷⁰. Sin embargo, en el ratón *knock-out* para Sp1, las islas CpG se encuentran no metiladas, sugiriendo que esta proteína por sí misma no es capaz de ejercer una total protección⁷¹. Otros factores candidatos incluyen coactivadores de la transcripción y los modificadores de la cromatina. Entre los primeros se encuentran la proteína CBP/p300 y el pCAF⁷² y entre los segundos, la familia proteica SWI/SNF⁷³.
2. Un segundo modelo considera que la metilación de las islas CpG es un proceso activo causado por la acción coordinada de las diferentes DNMT, como queda demostrado por dos eventos genéti-

cos de las células tumorales, uno que ocurre de forma natural y otro inducido experimentalmente:

- La translocación que produce la proteína PML-RAR α en las células de la leucemia promielocítica aguda induce represión en la transcripción y anormal metilación del receptor β del ácido retinoico (RAR β). Esta metilación ocurre de forma concomitante con la aparición de complejos que contienen cada una de las tres DNMT en el promotor RAR β ⁷⁴.
- La inactivación somática del gen *DNMT1* en las células del cáncer de colon tiene poco efecto sobre la metilación del ADN celular⁷⁵. Además, la metilación y silencio de genes tales como *p16* persiste en estas células. Del mismo modo, cuando DNMT3b es inactivada en las células del cáncer de colon, los promotores génicos continúan metilados⁷⁶. Sin embargo, cuando ambas, DNMT1 y DNMT3b son delecionadas simultáneamente, las células pierden prácticamente su actividad DNMT y la metilación desaparece.

Uso práctico de la metilación

La metilación de las islas CpG puede ser usada como un marcador biológico de la transformación maligna. El desarrollo de la técnica de PCR específica de metilación (MSP)⁷⁷ ha popularizado estos estudios, ofreciendo una forma rápida, sencilla y sensible de detectar la metilación génica (fig. 5). Esta estrategia es interesante por tres aspectos: la señal de la PCR es una señal positiva que no es enmascarada por las células normales; la metilación de los promotores aparece de forma temprana en la evolución tumoral, permitiendo un diagnóstico precoz y además, todos los tumores parecen tener uno o más *loci* hipermetilados cuando un panel de genes son estudiados de forma conjunta. La metilación aberrante de las islas CpG se ha empleado como instrumento para la detección de células neoplásicas en los lavados bronquioalveolares⁷⁸, ganglios linfáticos⁷⁹, esputo⁸⁰ y suero⁸¹.

La metilación de los promotores de ciertos genes puede emplearse para definir el pronóstico, la respuesta al tratamiento y establecer de forma más precisa el grupo de riesgo en el que incluir al paciente. Por ejemplo, la metilación del gen *p15* y *p16* constituyen datos de mal pronóstico en la LAM y en el mieloma múltiple, respectivamente⁸²⁻⁸³. Recientemente, nuestro grupo ha analizado el estado de metilación de 15 genes en 251 pacientes afectados de LLA^{44-52,84-85}. En este estudio, la metilación simultánea de un elevado número de genes se asoció a una significativa reducción de la supervivencia libre de enfermedad y supervivencia general, tanto en niños como en adultos. En adición, en grupos seleccionados de riesgo estratificados por alteraciones genéticas, la metilación fue capaz de redefinir el pronóstico de los mismos. De este modo la metilación génica empeora el pronóstico de los pacientes *TEL-AML1* positivos, mientras que la ausencia de metilación mejora el pronóstico de la LLA *BCR-ABL* positiva⁴⁸. Esto sugiere que el patrón de metilación es un

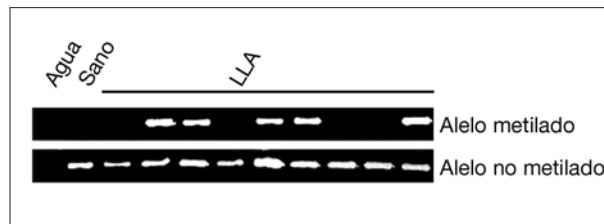


Figura 5. Ejemplo representativo de MSP del gen de la cadherina-E (CDH1) en muestras de pacientes con leucemia aguda linfobástica. El ADN es tratado con bisulfito que tiene la propiedad de cambiar las citosinas no metiladas a timinas, mientras que las citosinas metiladas permanecen invariables. La amplificación se realiza sobre este ADN modificado empleando cebadores específicos para las secuencias metiladas y no metiladas.

nuevo marcador de riesgo en la LLA y que puede complementar los análisis inmunofenotípicos, citogenéticos y moleculares habituales. En la LMC, la metilación de la *cadherina-13*, un gen que controla la adhesión célula a célula se correlaciona significativamente con una ausencia de respuesta citogenética al interferón⁸⁶. Una aplicación directa de la metilación en la toma de decisiones terapéuticas proviene del silencio epigenético del gen reparador del ADN *MGMT* en pacientes con linfoma difuso de células grandes⁸⁷. La metilación de este gen en pacientes con linfoma que recibían regímenes que contenían ciclofosfamida se asoció a un incremento significativo en la supervivencia general y en la supervivencia libre de progresión. De este modo, el silencio del gen *MGMT* contribuye a una mayor sensibilidad de las células linfomatosas a los agentes alquilantes ya que las lesiones inducidas en el ADN por la quimioterapia no pueden ser reparadas adecuadamente llevando finalmente a las células defectuosas a morir por apoptosis.

Finalmente, a diferencia de los cambios genéticos que ocurren en el cáncer, los cambios epigenéticos son potencialmente reversibles y por tanto, existe la posibilidad de reactivar los genes silenciados por metilación con objeto de obtener un beneficio terapéutico. Los agentes desmetilantes como la azacitidina o la 5-aza-2-desoxicitidina (decitabina), son capaces de inducir la expresión de genes silenciados por metilación en cultivos de líneas celulares malignas. Estos compuestos deben incorporarse al ADN como un análogo de las citosinas y por tanto, pueden inducir efectos tóxicos inespecíficos cuando se utilizan a altas dosis probablemente por la inducción de daño en el ADN. Sin embargo, su principal mecanismo de acción es por una inhibición irreversible de las DNMT⁸⁸. En síndromes mielodisplásicos (SMD) el empleo de 5-azacitidina subcutánea consigue una tasa de respuestas del 60 % y una significativa prolongación del tiempo medio hasta la transformación⁸⁹. En el mismo sentido, la administración prolongada de bajas dosis de decitabina en infusión continua se asocia a una tasa de respuesta en SMD del 65 %⁹⁰. En LMC, el empleo de decitabina consigue respuestas objetivas en el 28 % de los pacientes en crisis blástica, en el 55 % de las fases aceleradas y en el 63 % de los pacientes en fase cónica⁹¹. Por otra parte, el empleo secuencial de agentes

desmetilantes seguidos de inhibidores de las desacetilasas de las histonas (fenilbutirato) esta siendo investigado en la actualidad. Resultados preliminares indican que dicha asociación es capaz de inducir mejoría en el 50 % de los pacientes con SMD o leucemia secundaria a SMD⁹².

Hipometilación del ADN en el cáncer

La hipometilación del ADN asociada al cáncer humano es tan prevalente como la hipermetilación, pero estos dos tipos de anomalías epigenéticas afectan secuencias genómicas diferentes. La metilación se observa con mayor frecuencia en las islas CpG de los promotores de los genes, mientras que la hipometilación afecta a las regiones repetitivas del ADN, especialmente a transposones y retrovirus endógenos (los cuales constituyen la mayor parte de todas nuestras secuencias genómicas).

El significado biológico de la hipometilación en el cáncer es menos conocido que el de la hipermetilación, sin embargo, estudios realizados en ratones demuestran que la hipometilación inducida es capaz de producir tumores en éstos⁹³. En humanos, la alta frecuencia de hipometilación ligada al cáncer, la naturaleza de las secuencias afectadas y la ausencia de una asociación clara con la hipermetilación hablan a favor de un papel importante e independiente de la hipometilación en la génesis y progresión tumoral⁹⁴. La hipometilación del ADN podría favorecer la oncogénesis a través de un aumento de la inestabilidad genómica o mediante la activación de oncogenes por una acción *cis* o *trans*.

Aunque existen pocos trabajos que valoren el estado de hipometilación en neoplasias hematológicas, nuestro grupo ha demostrado recientemente que la hipometilación del retrotransposón humano LINE-1 se asocia a la transformación de la LMC a crisis blástica y además, constituye un factor de alto riesgo durante la fase crónica asociándose a una falta de respuesta al interferón e imatinib y a un acortamiento del tiempo medio hasta la progresión⁹⁵.

En conclusión, la disrupción de la maquinaria metiladora y sus consecuencias constituye un marcador esencial del cáncer humano situado al mismo nivel de importancia que los eventos genéticos o ambientales. Muchos aspectos son todavía desconocidos pero el escenario presentado es prometedor para el mejor conocimiento biológico y manejo de las neoplasias.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado en parte por las siguientes becas y Fundaciones: Fondo de Investigación Sanitaria 03/0141, 01/0013-01, 01/F018, 02/1299; Gobierno de Navarra (31/2002); RETIC C03/10; Junta de Andalucía 03/143, 03/144; IMABIS; UTE proyecto CIMA; Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña Automovilista y Asociación Medicina e Investigación (AMI).

Bibliografía

- Doerfler W. DNA methylation and gene activity. *Annu Rev Biochem.* 1983;52:93-124.
- Ng HH, Bird A. DNA methylation and chromatin modification. *Curr Opin Genet Dev.* 1999;9:158-63.
- Bestor TH, Tycko B. Creation of genomic methylation patterns. *Nat Genet.* 1996;12:363-7.
- Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol.* 1987;196:261-82.
- Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature.* 1986;321:209-13.
- Antequera F, Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:11995-9.
- Bestor T, Laudano A, Mattaliano R, Ingram V. Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. *J Mol Biol.* 1988;203:971-83.
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3b and Dnmt3a are essential for the *de novo* methylation and mammalian development. *Cell.* 1999;99:247-57.
- Goto T, Monk M. Regulation of X-chromosome inactivation in development in mice and humans. *Micobiol Mol Biol Rev.* 1998;62:362-78.
- Kass SU, Landsberger N, Wolffe AP. DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation. *Curr Biol.* 1997;7:157-65.
- Tycko B. DNA methylation in genomic imprinting. *Mutat Res.* 1997;386:131-40.
- Reik W, Murrell A. Genomic imprinting. Silence across the border. *Nature.* 2000;405:408-9.
- De Smet C, Lurquin C, Lethe B, et al. DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. *Mol Cell Biol.* 1999;19:7327-35.
- Torre L, López-Rodas G, Latasa MU, et al. DNA methylation and histone acetylation of rat methionine adenosyltransferase 1A and 2A genes is tissue-specific. *Int J Biochem Cell Biol.* 2000;32:397-404.
- Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.* 1997;13:335-40.
- Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med.* 2003;349:2042-54.
- Das PM, Singal R. DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol.* 2004;22:4632-42.
- Herman JG, Latif F, Weng Y, et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:9700-4.
- Esteller M, Silva JM, Domínguez G, et al. Promoter hypermethylation and BCRA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92:564-9.
- Esteller M, Avizienyte E, Corn PG, et al. Epigenetic inactivation of LKB1 in primary tumors associated with the Peutz-Jeghers syndrome. *Oncogene.* 2000;19:164-8.
- Myohanen SK, Baylin SB, Herman JG. Hypermethylation can selectively silence individual p16^{ink4A} alleles in neoplasia. *Cancer Res.* 1998;58:591-3.
- Grady WM, Willis J, Guilford PJ, et al. Methylation of the CDH1 promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer. *Nature Genet.* 2000;26:16-7.
- Herman JG, Umar A, Polyak K, et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:6870-5.
- Esteller M, Toyota M, Sánchez-Céspedes M, et al. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* 2000;60:2368-71.
- Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA

- methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res.* 1999;59:793-7.
26. Esteller M, Risques RA, Toyota M, et al. Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with the presence of G:C to A:T transition mutations in p53 in human colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* 2001;61:4689-92.
 27. Wales MM, Biel MA, El Deiry W, et al. P53 activates expression of HCI-1, a new candidate tumor suppressor gene on 17p13.3. *Nature Med.* 1995;1:570-7.
 28. Coulondre C, Miller JH, Farabaugh PJ, Gilbert W. Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia coli*. *Nature.* 1978;274:775-80.
 29. Ridecut WM, Coetzee GA, Olumi AF, Jones PA. 5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. *Science.* 1990;249:1288-90.
 30. Pfeifer GP, Tiang M, Denissenko MF. Mutation hotspots and DNA methylation. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2000;249:1-19.
 31. Yoon JH, Smith LE, Feng Z, et al. Methylated CpG dinucleotides are the preferential targets to G-to-T transversion mutations induced by benzo(a)pyrene diol epoxide in mammalian cells: similarities with the p53 mutation spectrum in smoking-associated lung cancers. *Cancer Res.* 2001;61:7110-7.
 32. Belinsky SA. Role of the cytosine DNA-methyltransferase and p16INKa genes in the development of mouse lung tumors. *Exp Lung Res.* 1998;24:463-79.
 33. Akamo TO, Okazaki Y, Ito M, et al. Restriction landmark genomic scanning (RLGS-M)-based genome-wide scanning of mouse liver tumors for alterations in DNA methylation status. *Cancer Res.* 1997;57:3294-9.
 34. Robertson KD, Wolffe AP. DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet.* 2000;1:11-9.
 35. Jirtle RL. Genomic imprinting and cancer. *Exp Cell Res.* 1999;248:18-24.
 36. Eads CA, Lord RV, Kurumboor SK, et al. Fields of aberrant CpG island hypermethylation in Barrett's esophagus and associated adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2000;60:5021-6.
 37. Esteller M, Sparks A, Toyota M, et al. Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human neoplasia. *Cancer Res.* 2000;60:4366-71.
 38. Esteller M, Catusus L, Matías-Guío X, et al. HMLH1 promoter hypermethylation is an early event in human endometrial tumorigenesis. *Am J Pathol.* 1999;155:1767-72.
 39. Fleisher AS, Esteller M, Harpaz N, et al. Microsatellite instability in inflammatory bowel disease-associated neoplastic lesions is associated with hypermethylation and diminished expression of the DNA mismatch repair gene, hMLH1. *Cancer Res.* 2000;60:4864-8.
 40. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* 2001;61:3225-329.
 41. Corn PG, Kuerbitz SJ, Van Noesel M, et al. Transcriptional silencing of the p73 gene in acute lymphoblastic leukemia and Burkitt's lymphoma is associated with 5' CpG island methylation. *Cancer Res.* 1999;59:3352-6.
 42. Kawano S, Miller CW, Gombart AF, et al. Loss of p73 gene expression in leukemias/lymphomas due to hypermethylation. *Blood.* 1999;94:1113-20.
 43. Batova A, Diccianni MB, Yu JC, et al. Frequent and selective methylation of p15 and deletion of p15 and p16 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.* 1997;57:832-6.
 44. Román-Gómez J, Castillejo JA, Jiménez A, et al. 5' CpG island hypermethylation is associated with transcriptional silencing of the p21 (CIP1/WAF1/SDI1) gene and confers poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2002;99:2291-6.
 45. Román-Gómez J, Castillejo JA, Jiménez A, et al. Hypermethylation of p21 gene in acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2002;100:3433-4.
 46. Román-Gómez J, Jiménez-Velasco A, Agirre X, et al. The normal epithelial cell-specific 1 (NES-1) gene, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 19q13.3-4, is downregulated by hypermethylation in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2004;18:362-5.
 47. Román-Gómez J, Jiménez-Velasco A, Agirre X, et al. Transcriptional silencing of the Dickkopf-3 (DKK-3) gene by CpG hypermethylation in acute lymphoblastic leukemia. *Br J Cancer.* 2004;91:707-13.
 48. Román-Gómez J, Jiménez-Velasco A, Agirre X, et al. Promoter hypermethylation of cancer-related genes: a strong independent prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2004;104:2492-8.
 49. Román-Gómez J, Jiménez-Velasco A, Agirre X, Prosper F, Heiniger A, Torres A. Lack of CpG island methylator phenotype defines a clinical subtype of T-cell acute lymphoblastic leukemia associated with good prognosis. *J Clin Oncol.* 2005 (In press).
 50. Agirre X, Vizmanos JL, Calasanz MJ, García-Delgado M, Larrazoz MJ, Novo FJ. Methylation of CpG dinucleotides and/or CCWGG motifs at the promoter of TP53 correlates with decreased gene expression in a subset of acute lymphoblastic leukemia patients. *Oncogene.* 2003;22:1070-2.
 51. Agirre X, Román-Gómez J, Vázquez I, et al. Abnormal methylation of the common *PARK2* and *PACRG* promoter is associated with downregulation of gene expression in Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) and Chronic Myeloid Leukemia (CML). *Int J Cancer* 2005 (In press).
 52. Jiménez-Velasco A, Román-Gómez J, Agirre X, et al. downregulation of the large tumor suppressor 2 (*LATS2* / *KPM*) gene confers poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2005 (In press).
 53. Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature.* 2001;411:342-8.
 54. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. P53 mutations in human cancers. *Science.* 1991;253:49-53.
 55. Wada M, Bartram CR, Nakamura H, et al. Analysis of p53 mutations in a large series of lymphoid hematologic malignancies of childhood. *Blood.* 1993;82:3163-9.
 56. Nelkin BD, Przepiorka D, Burke PJ, Thomas ED, Baylin SB. Abnormal methylation of the calcitonin gene marks progression of chronic myelogenous leukemia. *Blood.* 1991;77:2431-4.
 57. Asimakopoulus FA, Shteper PJ, Krichevsky S, et al. ABL1 methylation is a distinct molecular event associated with clonal evolution of chronic myeloid leukemia. *Blood.* 1999;94:2452-60.
 58. Litz CE, Vos JA, Copenhaver CM. Aberrant methylation of the major breakpoint cluster region in chronic myeloid leukemia. *Blood* 1996;88:2241-9.
 59. Tien HF, Tang JH, Tsay W, et al. Methylation of the p15 gene in myelodysplastic syndrome: it can be detected early at diagnosis or during disease progression and is highly associated with leukemic transformation. *Br J Haematol.* 2001;112:148-54.
 60. Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet.* 1998;393:386-9.
 61. Nan X, Ng HH, Johnson CA, et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature.* 1998;393:386-9.
 62. Wade PA, Geggion A, Jones PL, Ballestar E, Aubry F, Wolffe AP. Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet.* 1999;23:62-6.
 63. Ng HH, Zhang Y, Hendrich B, et al. MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet.* 1999;23:62-6.
 64. Mannervik M, Nibu Y, Zhang H, et al. Transcriptional coregulators in development. *Science.* 1999;284:606-9.
 65. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:8681-6.
 66. Melki JR, Vincent PC, Clark SJ. Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia. *Cancer Res.* 1999;59:3730-40.
 67. Toyota M, Kopecky KJ, Toyota MO, Jair KW, Willman CL, Issa JP. Methylation profiling in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2001;97:2823-9.

68. García-Manero G, Daniel J, Smith TL, et al. DNA methylation of multiple promoter-associated CpG islands in adult acute lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res.* 2002;8:2217-24.
69. Brandeis M, Frank D, Keshet I, et al. Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature.* 1994;371: 435-8.
70. Mummaneni P, Yates P, Simpson J, Rose J, Turker MS. The primary function of a redundant Sp1 binding site in the mouse aprt gene promoter is to block epigenetic gene inactivation. *Nucleic Acids Res.* 1998;26:5163-9.
71. Marin M, Karis A, Visser P, Grosveld F, Philipsen S. Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell.* 1997;89:619-28.
72. Struhl K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev.* 1998;12:599-606.
73. Pollard KJ, Peterson CL. Chromatin remodeling: a marriage between two families? *BioEssays.* 1998;20:771-80.
74. Di Croce L, Raker VA, Corsaro M, et al. Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science* 2002;295: 1079-82.
75. Rhee I, Jair KW, Yen RW, et al. CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1. *Nature.* 2000;404: 1003-7.
76. Rhee I, Bachman KE, Park B, et al. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature.* 2002;416:552-6.
77. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:9821-6.
78. Ahrendt SA, Chow JT, Xu LH, et al. Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91:332-9.
79. Sánchez-Céspedes M, Esteller M, Hibi K, et al. Molecular detection of neoplastic cells in lymph nodes of metastatic colorectal cancer patients predicts recurrence. *Clin Cancer Res.* 1999; 5:2450-4.
80. Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G, et al. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Res.* 2000;60:5954-8.
81. Esteller M, Sánchez-Céspedes M, Rosell R, et al. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res.* 1999;59:67-70.
82. Chim CS, Liang R, Tam CY, et al. Methylation of p15 and p16 genes in acute promyelocytic leukemia: potential diagnostic and prognostic significance. *J Clin Oncol.* 2001;16: 1844-51.
83. Mateos MV, García-Sanz R, López-Pérez R, et al. Methylation is an inactivating mechanism of the p16 gene in multiple myeloma associated with high plasma cell proliferation and short survival. *Br J Haematol.* 2002;118:1034-40.
84. Román-Gómez J, Castillejo JA, Jiménez A, et al. Hypermethylation of the calcitonin gene in acute lymphoblastic leukaemia is associated with unfavourable clinical outcome. *Br J Haematol.* 2001;113:329-38.
85. Román-Gómez J, Castillejo JA, Jiménez A, Barrios M, Heiniger A, Torres A. The role of DNA hypermethylation in the pathogenesis and prognosis of acute lymphoblastic leucemia. *Leuk Lymphoma.* 2003;44:1855-64.
86. Román-Gómez J, Castillejo JA, Jiménez A, et al. Cadherin-13, a mediator of calcium-dependent cell-cell adhesion, is silenced by methylation in chronic myeloid leukemia and correlates with pretreatment risk profile and cytogenetic response to interferon-alpha. *J Clin Oncol.* 2003;21:1472-9.
87. Esteller M, Gadiano G, Goodman SN, et al. Hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine DNA methyltransferase and survival of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94:26-32.
88. Lubbert M. DNA methylation inhibitors in the treatment of leukemias, myelodysplastic, syndromes and hemoglobinopathies: clinical results and possible mechanisms of action. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2000;249:135-64.
89. Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leucemia group B. *J Clin Oncol.* 2002;20:2429-40.
90. Issa JP, García-Manero G, Giles FJ, et al. Phase I study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies. *Blood.* 2004;103:1635-40.
91. Kantarjian HM, O'Brien S, Cortes J, et al. Results of decitabine therapy in 130 patients with chronic myelogenous leucemia. *Cancer.* 2003;98:522-8.
92. Millar CB, Herman JG, Baylin SB, Galm O, Yerian JA, Gore SD. A phase I dose deescalation trial of combined DNA methyltransferase/histone deacetylase inhibition in myeloid malignancies. *Blood.* 2001;98:622a.
93. Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, et al. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science.* 2003;300:489-92.
94. Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene.* 2002;21:5400-13.
95. Román-Gómez J, Jiménez-Velasco A, Agirre X, et al. Promoter hypomethylation of the LINE-1 retrotransposable elements activates sense/antisense transcription and marks the progression of chronic myeloid leukemia. *Oncogene* 2005 (In press).

Alorreactividad en el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos

D. GALLARDO

Servicio de Hematología Clínica. Institut Català d'Oncologia. Hospital Durán i Reynals. IDIBELL.

Introducción

El concepto de alorreactividad debe incluir a todas aquellos fenómenos biológicos y clínicos que tienen lugar como consecuencia de la interacción entre células inmunocompetentes procedentes de dos individuos genéticamente distintos. Por tanto, si bien el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH) constituye el marco ideal para dichos fenómenos, también se van a producir en trasplantes de órganos sólidos y en el intercambio feto-materno.

Los fenómenos alorreactivos que tienen especial trascendencia en el alo-TPH son: el reconocimiento inmune que va a dar lugar a la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) o al rechazo del injerto, y el establecimiento de quimerismo y de tolerancia post-trasplante. Esto se asocia tanto a factores genéticos como clínicos.

Factores genéticos responsables de la EICH en el alo-TPH a partir de un donante familiar HLA-A-B-DRB1 idéntico

Disparidades en genes HLA no tipificados rutinariamente

Es raro entre hermanos HLA-A-B-DRB1 idénticos. La disparidad en HLA-C es prácticamente inexistente, dado que la herencia en forma de haplotipo del brazo corto del cromosoma 6 hace que sea difícil una doble recombinación entre los genes de HLA-A y HLA-B. La disparidad en HLA-DQB1 es rara (< 1 %), debido al estrecho desequilibrio de ligamiento entre HLA-DRB1 y HLA-DQB1. Sin embargo, la posibilidad de una recombinación entre los genes del complejo HLA-DR-DQ y el gen de HLA-DPB1 es más posible, debido a la distancia entre dichos genes y a la presencia de un punto de alta tasa de recombinación. Cuando analizamos la frecuencia de disparidad HLA-DPB1 entre hermanos HLA-A-B-DRB1 idénticos, esta fue del 6 % aproximadamente¹. Al analizar la relevancia clínica de esta disparidad, encontramos una mayor incidencia acumulada de EICH aguda estadios II-IV en aquellos pa-

cientes que tenían disparidad (66,7 % frente a 35,7 %), pero no se observó efecto sobre la supervivencia global².

Antígenos menores de histocompatibilidad

Se trata de péptidos procedentes de la degradación natural de proteínas endógenas en el proteasoma. Para actuar como antígenos menores de histocompatibilidad, estos péptidos deben ser polimórficos y ser capaces de generar respuestas inmunitarias en caso de disparidad³. Suelen tener dos alelos, uno de los cuales será capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria cuando es presentado a los linfocitos del donante de forma restringida por una molécula de HLA (siempre y cuando el donante no tenga ese alelo en su dotación genética). La tabla 1 muestra los antígenos menores de histocompatibilidad conocidos en la actualidad. El mecanismo por el cual uno de los alelos es capaz de resultar inmunogénico es variable: en el caso de HA-1 se debe a una mayor afinidad por la molécula de HLA-A*0201, mientras que en el caso de HA-8 se debe a una incapacidad del transporte del péptido no inmunogénico por el sistema TAP, lo cual se traduce

Tabla 1. Antígenos menores de histocompatibilidad humanos identificados

Antígeno menor	Péptido	Elemento de restricción	Localización
HA-1	VLHDDLLEA	HLA-A*0201	Tejido hematopoyético
HA-2	YIGEVLSV	HLA-A*0201	Tejido hematopoyético
HA-3	VTEPGTAQY	HLA-A*0101	Todas las células
HA-8	RTLDKVLEV	HLA-A*0201	Todas las células
H-Y (SMCY)	FIDSYICQV	HLA-A*0201	Todas las células
H-Y (SMCY)	SPSVDKARAEI	HLA-B*0702	Todas las células
H-Y (UTY)	LPHNHTDL	HLA-B*0801	Todas las células
H-Y (UTY)	RESEESVSL	HLA-B*4001	Todas las células
H-Y (DBY)	HIENFSDIDMGE	HLA-DQB1*05	Todas las células
H-Y (DFFRY)	IVDCLTEMY	HLA-A*0101	Todas las células
HB-1	EERKGLSHVW	HLA-B*44	Linfocitos B
ACC1 (BCL2A1)	DYLQYVLQI	HLA-A*2402	Tejido hematopoyético
UGT2B17	AELLNIPFLY	HLA-A*2902	APC, hígado, intestino

Trabajo realizado dentro del proyecto financiado con la beca FIS PI020148.

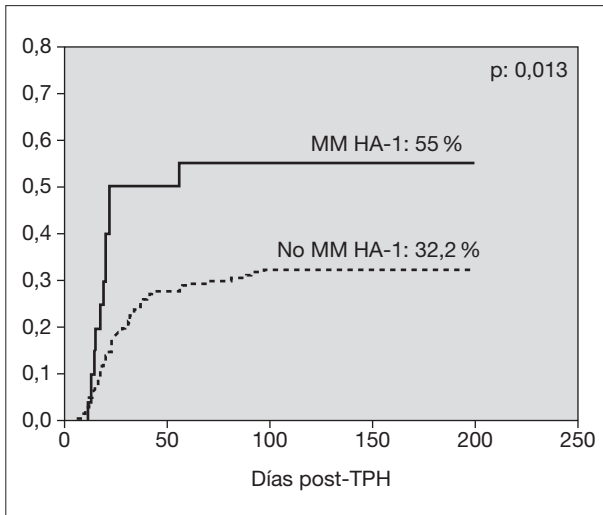


Figura 1. Impacto de la presencia de un *mismatch* HA-1 sobre la incidencia de EICH aguda estadios II-IV tras trasplante alogénico a partir de hermano HLA idéntico sin depleción T. Análisis basado en 225 trasplantes realizados a pacientes adultos entre 1995 y 2002 con acondicionamiento mieloablativo de la serie del Grupo Español de TPH (GETH).

Tabla 2. Implicación de distintos polimorfismos en genes productores de citocinas en el desarrollo de EICH

Polimorfismo	Efecto	Referencia
IL1 Ra VNTR	Aumenta la EICH crónica	Cullup 2003
IL2 (-330 G/T)	Aumenta la EICH aguda y crónica	MacMillan 2003
IL6 (-174)	Aumenta la EICH crónica	Cavet 1999 Socié 2001
IFN γ Intrón 1	Aumenta la EICH aguda	Cavet 2001
TNF δ 3	Aumenta la EICH aguda	Middleton 1998 Cavet 1999
TNFR1 196R	Aumenta la EICH crónica	Stark 2003
IL10-1064	Aumenta la EICH aguda y crónica	Lin 2003 Rocha 2002
TGF- β	Aumenta la EICH aguda	Hattori 2002

EICH: enfermedad injerto contra el huésped; TGF- β ; factor transformador del crecimiento.

en una ausencia de este péptido a nivel de la superficie celular. En el caso de los péptidos codificados por el cromosoma Y, el mecanismo de inmunogenicidad se debe, obviamente, a su ausencia en células femeninas. Conocemos el impacto clínico de algunos de los antígenos menores de histocompatibilidad conocidos. Así, sabemos que una disparidad en el antígeno menor HA-1 se asocia a una mayor incidencia de EICH aguda estadios II-IV tras un alo-TPH emparentado sin manipulación del inóculo (fig. 1). Sin embargo, no se ha podido demostrar una mayor incidencia de estadios severos de EICH aguda ni un impacto sobre la supervivencia^{4,5}.

También es conocido el efecto negativo sobre la supervivencia postrasplante de una disparidad de sexo entre donante y receptor (cuando el receptor es varón

y su donante es mujer). Este efecto negativo viene mediado por la presentación de los péptidos derivados del cromosoma Y por las células presentadoras de antígeno del receptor.

Otro de los antígenos menores que ha sido estudiado en relación a la aparición de EICH aguda es HA-8. El grupo de Seattle describió un aumento en la incidencia de EICH estadios II-IV en presencia de una disparidad HA-8⁶. Recientemente, nuestro grupo ha hecho un estudio retrospectivo en pacientes adultos, demostrando un aumento de la incidencia de estadios severos (III-IV) de EICH aguda y una peor supervivencia postrasplante en aquellos casos en que se detectó esta disparidad.

Polimorfismos en genes productores de citocinas

Una vez se ha producido el fenómeno de alorreconocimiento, la reacción que da lugar a la EICH aguda está mediada por la secreción de citocinas proinflamatorias, tales como la IL-1, IL-2, TNF- α o IFN- γ . Es por ello que la presencia de polimorfismos en los genes que codifican estas citocinas pueden dar lugar a un aumento o descenso en la secreción de las mismas, influyendo en el desarrollo de la EICH⁷⁻¹⁰. Estos polimorfismos pueden estar presentes tanto en el donante como en el receptor.

La tabla 2 muestra los polimorfismos en genes productores de citocinas que se han asociado a EICH tras trasplante de progenitores hematopoyéticos.

Polimorfismos en genes relacionados con el sistema inmunitario o con el metabolismo de fármacos

Se han descrito polimorfismos en los genes del receptor de estrógenos y del receptor de la vitamina D. Estos receptores tienen importantes efectos en el desarrollo del sistema inmunitario. Así, el polimorfismo del intrón 8 del gen del receptor de la vitamina D¹¹ y el polimorfismo del intrón 1 del gen del receptor de estrógenos¹² se han asociado a una mayor incidencia de EICH aguda y a una peor supervivencia tras alo-TPH. Otros genes implicados con los mecanismos de defensa ante microorganismos, como el gen de la mieloperoxidasa, el gen *MBL* (*mannose binding lectin*) o los genes de los receptores para Fc γ (Fc γ IIa, IIIa y IIIb) se han asociado con la tasa de infecciones tras alo-TPH. Recientemente se ha descrito la relación entre polimorfismos del complejo NOD2/CARD15 en el receptor o en el donante con el desarrollo de EICH aguda¹⁵. Este gen codifica un sensor intracitoplasmático para muramil-dipéptido, lo cual supone un mecanismo de defensa antibacteriana en el epitelio intestinal. Polimorfismos de este gen se asocian a un descenso de la actividad de respuesta antibacteriana del factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), facilitando el desarrollo de EICH.

Los polimorfismos en genes implicados en el metabolismo de fármacos usados como profilaxis de la EICH, tales como el metotrexato, pueden aumentar la incidencia de EICH aguda al aumentar la capacidad de

metabolización de determinadas enzimas (como la metilén-tetrahidrofolato reductasa, MTHFR). Otros polimorfismos en genes de la familia del citocromo P450 (CYP2B6) se asocian a aumento de riesgo de mucositis o de enfermedad venooclusiva hepática¹⁴.

Factores genéticos relacionados con EICH en el alo-TPH a partir de un donante no emparentado o familiar haploidéntico

Disparidades en genes HLA no tipificados rutinariamente

Clásicamente, la tipificación HLA previa a trasplante alogénico no emparentado se ha basado en técnicas de baja resolución para HLA de clase I (serología) y de alta resolución para HLA-DRB1. Posteriormente, estudios retrospectivos han demostrado una elevada incidencia de disparidades ocultas a nivel de HLA de clase I por alta resolución y una elevada tasa de disparidades en genes HLA de clase II no tipificados rutinariamente (HLA-DQB1 y -DPB1). Todos los estudios además mostraron un aumento de incidencia de EICH aguda y de mortalidad asociada con el procedimiento cuando se hacía un trasplante con disparidades HLA ocultas¹⁵⁻¹⁷.

Actualmente se hace una tipificación HLA de alta resolución para los *loci* HLA-A, -B, -C, -DRB1 y -DQB1, lo cual hace que sea más difícil encontrar donantes "idénticos", pero probablemente favorezca la supervivencia de los pacientes sometidos a este tipo de trasplantes. Por otra parte, se están dedicando muchos esfuerzos en la detección de "mismatches permisibles", ya que sabemos que hay casos en que una única disparidad HLA no se ha asociado a EICH.

Disparidades en genes KIR

Los genes del complejo KIR (*killer inhibitory receptors*) pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas y codifican glucoproteínas de membrana que se expresan en células NK. Su función es la de reconocer alelos concretos de HLA de clase I (básicamente HLA-C y HLA-B), que actúan como ligandos de los receptores KIR, dando lugar a una señal inhibitoria en la célula NK. De esta manera, cuando una célula presenta un alelo HLA propio a la célula NK, ésta no se activará. En cambio, cuando el alelo de HLA que se presenta no pertenece al mismo grupo, o bien si no se expresa HLA en superficie (lo cual es un mecanismo de escape tumoral), la célula NK se activará, ante la ausencia de interacción entre el receptor KIR y su ligando.

Cuando se hace un trasplante con disparidad HLA, básicamente en HLA-C, puede conllevar una falta de reconocimiento de las células del receptor por las células NK del donante, lo que podría dar lugar a su destrucción por activación NK. Por otra parte, dicha incompatibilidad favorecería la eliminación de enfermedad mínima residual. De hecho, se ha comunica-

do una menor tasa de recidiva leucémica en pacientes trasplantados a partir de un donante no emparentado con incompatibilidad KIR¹⁸.

NIMA

El concepto de NIMA (*non-inherited maternal antigens*) se define como aquellos alelos HLA maternos que no han sido heredados, pero ante los cuales puede haber un cierto grado de tolerancia desencadenado por la coexistencia de los sistemas inmunitarios de la madre y del feto *in utero*. Basado en este concepto, se hipotetiza que un *mismatch* HLA que involucre a estos alelos podría ser mejor tolerado que una disparidad de otro tipo, y todo ello se correlaciona también con la posible existencia de microquimerismo hematopoyético a largo plazo por intercambio feto-materno bidireccional. Recientemente, un grupo japonés ha publicado su experiencia en trasplante alogénico haploidéntico, comunicando una menor tasa de EICH aguda grave para aquellos pacientes que fueron trasplantados a partir de un donante dispar para los NIMA¹⁹.

Quimerismo y tolerancia postrasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos

Para que se inicie una reacción del injerto contra el huésped aguda es necesaria la existencia de dos condiciones desde el punto de vista del quimerismo: primero, que exista quimerismo completo del donante en linfocitos T, y segundo, que hayan células presentadoras de antígeno del receptor.

El hecho de que pacientes con quimerismo mixto desarrollen raramente EICH supone que la coexistencia de dos sistemas inmunitarios (el del receptor y el del donante) da lugar a tolerancia, si bien puede asociarse a un aumento de riesgo de recidiva de enfermedad neoplásica.

En esta misma línea, se ha sugerido que el desarrollo de microquimerismo hematopoyético después de un trasplante de órgano sólido se asocia a una menor tasa de rechazo del órgano trasplantado²⁰.

Por el contrario, se ha descrito una mayor frecuencia de microquimerismo hematopoyético de origen feto-materno en pacientes afectados de enfermedades autoinmunitarias. Se ha hipotetizado que este microquimerismo linfocitario sería el responsable del cuadro clínico. En este sentido, la similitud clínica entre estas enfermedades (esclerodermia, síndrome de Sjögren) y la EICH crónica apoyaría esta teoría.

Consideraciones finales

Los fenómenos de alorreactividad son un pilar fundamental del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos, tanto en su vertiente "positiva" (el efecto del injerto contra la leucemia) como "negativa"

(la EICH aguda). Hay factores genéticos asociados a donante y receptor que no son modificables, excepto cuando existen varios donantes HLA idénticos que permitan escoger el mejor donante. Sin embargo, el mejor conocimiento de estos factores puede ser útil para predecir el riesgo de EICH aguda de forma individualizada, adaptando el régimen de inmunosupresión o la manipulación del inóculo a cada paciente en concreto.

El mejor conocimiento de los antígenos menores de histocompatibilidad también favorecerá el desarrollo de estrategias de inmunoterapia dirigida contra antígenos restringidos a tejido hematopoyético o contra antígenos tumorales como tratamiento de recidivas postrasplante alogénico.

Bibliografía

- Büchler T, Gallardo D, Rodríguez-Luaces M, Pujal JM, Graña A. Frequency of HLA-DPB1 disparities detected by Reference Strand-mediated Conformation Analysis in HLA-A, -B and -DRB1 matched siblings. *Hum Immunol.* 2002;63:139-42.
- Gallardo D, Brunet S, Torres A, Alonso-Nieto M, Vallejo C, Jimenez A, et al. HLA-DPB1 mismatch in HLA-A-B-DRB1 identical sibling donor stem cell transplantation and acute graft-versus-host disease. *Transplantation.* 2004;77:1107-10.
- Chao NJ. Minors come of age: Minor histocompatibility antigens and graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2004;10:215-23.
- Tseng LH, Lin MT, Hansen JA, Gooley T, Pei J, Smith AG, et al. Correlation between disparity for the minor histocompatibility antigen HA-1 and the development of acute graft-versus-host disease after allogeneic marrow transplantation. *Blood.* 1999;94:2911-4.
- Gallardo D, Arostegui JI, Balas A, Torres A, Caballero D, Carreras E, et al. Disparity for the minor histocompatibility antigen HA-1 is associated with an increased risk of acute graft-versus-host disease (GvHD) but it does not affect chronic GvHD incidence, disease-free survival or overall survival after allogeneic human leucocyte antigen-identical sibling donor transplantation. *Br J Haematol.* 2001;114:931-6.
- Akatsuka Y, Warren EH, Gooley TA, Brickner AG, Lin MT, Hansen JA, et al. Disparity for a newly identified minor histocompatibility antigen, HA-8, correlates with acute graft-versus-host disease after haematopoietic stem cell transplantation from an HLA-identical sibling. *Br J Haematol.* 2003;123:671-5.
- Dickinson AM, Middleton PG, Rocha V, Gluckman E, Holler E. Genetic polymorphisms predicting the outcome of bone marrow transplants. *Br J Haematol.* 2004;127:479-90.
- Lin MT, Storer B, Martin PJ, Tseng LH, Gooley T, Chen PJ, et al. Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host disease and survival after hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med.* 2003;349:2201-10.
- Cavet J, Dickinson AM, Norden J, Taylor PR, Jackson GH, Middleton PG. Interferon-gamma and interleukin-6 gene polymorphisms associate with graft-versus-host disease in HLA-matched sibling bone marrow transplantation. *Blood.* 2001;98:1594-600.
- Cavet J, Middleton PG, Segall M, Noreen H, Davies SM, Dickinson AM. Recipient tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphisms associate with early mortality and acute graft-versus-host disease severity in HLA-matched sibling bone marrow transplants. *Blood.* 1999;94:3941-6.
- Middleton PG, Cullup H, Dickinson AM, Norden J, Jackson GH, Taylor PR, et al. Vitamin D receptor gene polymorphism associates with graft-versus-host disease and survival in HLA-matched sibling allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2002;30:223-8.
- Middleton PG, Norden J, Cullup H, Cavet J, Jackson GH, Taylor PR, et al. Oestrogen receptor alpha gene polymorphism associates with occurrence of graft-versus-host disease and reduced survival in HLA-matched sib-allo BMT. *Bone Marrow Transplant.* 2003;32:41-7.
- Holler E, Rogler G, Herfarth H, Brenmoehl J, Wild PJ, Hahn J, et al. Both donor and recipient NOD2/CARD15 mutations associate with transplant-related mortality and GvHD following allogeneic stem cell transplantation. *Blood.* 2004;104:889-94.
- Rocha V, Porcher R, Filion A, Bittencourt H, Zanette D, Vilela G, et al. Association of drug metabolism gene polymorphisms with toxicities, graft-versus-host disease and survival after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood.* 2003;102:24a (abstract 848).
- Sasazuki T, Juji T, Morishima Y, Kinukawa N, Kashiwabara H, Inoko H, et al. Effect of matching of class I HLA alleles on clinical outcome after transplantation of hematopoietic stem cells from an unrelated donor. *Japan Marrow Donor Program.* *N Engl J Med.* 1998;339:1177-85.
- Petersdorf EW, Anasetti C, Martin PJ, Gooley T, Radich J, Malkki M, et al. Limits of HLA mismatching in unrelated hematopoietic cell transplantation. *Blood.* 2004;104:2976-80.
- Petersdorf EW, Kollman C, Hurley CK, Dupont B, Nademanee A, Begovich AB, et al. Effect of HLA class II gene disparity on clinical outcome in unrelated donor hematopoietic cell transplantation for chronic myeloid leukemia: the US National Marrow Donor Program Experience. *Blood.* 2001;98:2922-9.
- Giebel S, Locatelli F, Lamparelli T, Velardi A, Davies S, Frumento G, et al. Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood.* 2003;102:814-9.
- Ichinohe T, Uchiyama T, Shimazaki C, Matsuo K, Tamaki S, Hino M, et al. Feasibility of HLA-haploidentical hematopoietic stem cell transplantation between noninherited maternal antigen (NIMA)-mismatched family members linked with long-term fetomaternal microchimerism. *Blood.* 2004;104:3821-8.
- Pujal JM, Grinyó JM, Manito N, Gil-Vernet S, Hueso M, Caldes A, et al. Influence of hematopoietic microchimerism in organ tolerance after kidney or heart transplantation. *Transplant Proc.* 2003;35:1775-7.

Tratamiento del linfoma de células grandes B

E. CONDE, L. YÁÑEZ, A. BERMÚDEZ, A. INSUNZA Y M.A. CUADRADO
Servicio de Hematología. Hospital Valdecilla. Santander.

Introducción

El linfoma difuso de células grandes (LCG) es el linfoma no hodgkiniano (LNH) más frecuente. Se origina en los linfocitos B y es muy heterogéneo en sus características biológicas y clínicas. Esta diversidad ha sido reconocida gracias a los avances moleculares, derivados de los estudios de *microarrays* de expresión, lo que nos ha permitido conocer, con más detalle, los mecanismos oncogénicos responsables que ponen en marcha el desarrollo del linfoma. En base a las características moleculares, se han identificado dos subgrupos de LCG, uno originado en linfocitos B del centro germinal (GCB) y otro en linfocitos B activados (ACB). Cada subtipo tiene una expresión de genes diferentes, lo que explica la diversidad desde el punto de vista pronóstico y clínico. Se ha reconocido un tercer tipo de linfoma, que no expresa ni los genes del tipo GCB, ni los del tipo ACB. El pronóstico y la clínica difieren notablemente de unos casos a otros. En 1993, se publicó el Índice Pronóstico Internacional (IPI), basado exclusivamente en variables clínicas, que nos permitió identificar cuatro diferentes grupos pronósticos, lo que ha tenido una gran repercusión en los nuevos protocolos terapéuticos. Por otra parte, la incorporación de las nuevas técnicas radiológicas, nos ha ayudado a conocer, con más detalle, la extensión de la enfermedad y, sobre todo, la respuesta terapéutica precoz, lo que tiene un gran interés pronóstico. Así, el estudio de la tomografía de emisión por positrones (PET), realizado después del tercer ciclo de quimioterapia tiene un gran valor predictivo pronóstico, que, en la práctica clínica, nos sirve para modificar precozmente el tratamiento de los pacientes con una PET-positiva.

Los factores de crecimiento granulomonocíticos (G-CSF y GM-CSF) han sido fundamentales para que podamos aumentar la dosis de los quimioterápicos. De esta forma, podemos aumentar la intensidad de dosis de los antineoplásicos, ya sea escalando la dosis en un período de tiempo dado, o acortando el tiempo entre los ciclos, lo que nos permite “concentrar” la dosis estándar de los fármacos. La escalada de dosis puede llegar, en ocasiones, a niveles mieloablativos, que requieren el rescate con células progenitoras hematopoyéticas.

La revolución más destacada en los últimos años en el tratamiento de los LCG, ha sido debida a los anticuerpos monoclonales (AcMo), especialmente los

anti-CD20. El empleo de los AcMo en la clínica ha cambiado las estrategias terapéuticas empleadas y, ahora, es obligado contar con dichos agentes en el tratamiento de muchos linfomas.

Tratamiento

Principios generales

El primer objetivo del tratamiento del linfoma de células grandes B es alcanzar una remisión completa (RC) tan rápidamente como sea posible, ya que sólo los pacientes que alcanzan la RC tienen posibilidades de curación con la quimioterapia inicial. Para ello, debe utilizarse el tratamiento de primera línea más apropiado a la dosis máxima tolerada, porque una reducción de dosis se acompaña de una respuesta significativamente más baja.

Antes de iniciar el tratamiento debemos tener en cuenta la edad del paciente, la situación clínica y el grupo pronóstico al que pertenece. La supervivencia de los LCG depende de diversos factores pronósticos relacionados con las características del enfermo, con la masa tumoral y con la respuesta terapéutica. El IPI, basado en criterios clínicos, es una herramienta eficaz para definir diferentes grupos pronósticos de pacientes con LCG, por lo que se ha mostrado útil para evaluar y comparar los diversos tratamientos.

La incorporación de nuevas variables pronósticas, como la β_2 -microglobulina y las alteraciones moleculares, nos ayudará a definir mejor los grupos de riesgo así como el tratamiento más apropiado para cada grupo pronóstico. Un aspecto muy importante que debe considerarse siempre en el tratamiento de los pacientes con un LCG, es la respuesta precoz evaluada al tercer ciclo de quimioterapia mediante una PET. La importancia pronóstica de este estudio es grande porque tiene un alto poder predictivo negativo.

Tratamiento de primera línea

Enfermedad localizada

Se considera que un paciente tiene un linfoma localizado cuando después de la valoración de extensión de

la enfermedad, la masa tumoral es pequeña (< 10 cm), no presenta síntomas sistémicos y el estadio es I o IIE. También se considera que la enfermedad está localizada en los estadios II o IIE cuando las dos áreas ganglionares afectas son contiguas. Este grupo de pacientes representa el 20 % de los LCG.

Los pacientes con enfermedad localizada tienen más posibilidades de curación que los pacientes con enfermedad diseminada. El tratamiento estándar hasta 1980 era la radioterapia local, pero la supervivencia libre de enfermedad a los 5 años era sólo del 50 %. Posteriormente se demostró que la quimioterapia era, también eficaz, pero los mejores resultados se han obtenido cuando se combina la quimioterapia con la radioterapia de los campos afectados. El tratamiento con 3 ciclos de CHOP seguido de radioterapia local a la dosis de 45-50 Gy proporciona una supervivencia superior al 80 %. Los resultados pueden mejorarse sólo con quimioterapia. En un estudio aleatorizado del grupo GELA demostraron que tanto la supervivencia global (SG) como la supervivencia libre de enfermedad (SLE) eran significativamente mejores en el grupo que recibía quimioterapia basado en el esquema ACVBD, comparado con la quimioterapia tipo CHOP \times 3 y radioterapia local.

Los pacientes con enfermedad localizada extranodal deben estadiarse de forma muy precisa para estar seguros de que realmente la enfermedad está localizada. Los pacientes con linfoma gástrico o intestinal pueden tener enfermedad oculta en otros lugares del tracto digestivo o en el anillo de Waldeyer. En estos pacientes la cirugía cumple una función importante en el diagnóstico y puede ser útil en el tratamiento. Sin embargo, no existe un modelo habitual de recidiva, por lo que la quimioterapia se utiliza como forma primaria de tratamiento.

Enfermedad avanzada

Un paciente tiene un LCG en estadios avanzados cuando después de la valoración de extensión presenta un estadio II con áreas ganglionares afectadas no contiguas, un estadio III o IV. El tratamiento de elección de estos pacientes se basa en las combinaciones quimioterápicas que incorporan una antraciclina, habitualmente la adriamicina. El régimen más utilizado es el CHOP con el que se han descrito RC en el 50-70 % de los pacientes tratados y supervivencias prolongadas en el 30-40 % de los casos.

Para mejorar los resultados del CHOP, intentando evitar la resistencia a los fármacos, se han descrito nuevos esquemas quimioterápicos que incorporan fármacos nuevos y dosis más elevadas. De esta forma se desarrollaron los regímenes quimioterápicos de segunda y tercera generación. El CHOP ha sido comparado en una prueba intergrupos, aleatorizada y prospectiva con el m-BACOD, MACOP-B y ProMA-CE-CytaBOM. Los resultados mostraron una respuesta terapéutica y supervivencia global similares con una toxicidad mayor de los regímenes multifármacos, lo que sugiere que la adicción de otros fárma-

cos a los componentes del CHOP no mejoró los resultados. Esto podría explicarse en parte por una reducción en la intensidad de dosis de los dos fármacos más activos, la ciclofosfamida y la doxorubicina, en los esquemas terapéuticos de segunda y tercera generación para intentar evitar una toxicidad inaceptable relacionada con el uso de muchos fármacos.

Actualmente el tratamiento de los LCG con enfermedad avanzada se realiza de acuerdo con el grupo pronóstico del IPI al que pertenecen. Los pacientes que pertenecen a los grupos pronósticos favorables deberán tratarse con los esquemas quimioterápicos convencionales, con los que se consigue una RC en el 67-87 % de los casos y una posibilidad de curación del 51-73 % para el grupo total, independientemente de la edad, y del 69-83 % para los pacientes menores de 60 años. Por el contrario, los pacientes de mal pronóstico alcanzan la RC en el 44-55 % y la probabilidad de supervivencia a los 5 años es del 26-43 % para todas las edades y del 32-46 % para los pacientes con menos de 60 años. Estos resultados son malos por lo que se considera que los pacientes de mal pronóstico son buenos candidatos para investigar en ellos nuevos tratamientos.

Progresos en el tratamiento en la era pre-rituximab

La forma de mejorar los resultados del CHOP ha sido aumentar la dosis total de los fármacos administrando o escalando la dosis en un intervalo de tiempo específico (intensidad de dosis) o reduciendo el intervalo de tiempo entre los ciclos (densidad de dosis). De Vita ha destacado la importancia de la intensidad de dosis en los linfomas de células grandes, especialmente cuando la enfermedad es sensible a los fármacos. En su estudio comparó los resultados del CHOP a dosis plenas con CHOP a mitad de dosis demostrando que los pacientes que reciben menos dosis tienen una supervivencia significativamente más corta. En esta misma línea, el grupo francés GELA ha demostrado que cuando un paciente recibe menos del 70 % de la dosis programada, la evolución es significativamente peor. Por el contrario, el incremento de la dosis de adriamicina en los regímenes CHOP, m-BACOD y MACOP-B tiene implicaciones pronósticas favorables, según el grupo de Stanford.

Grados más altos de escalada de dosis han sido explorados en pacientes con LCG de mal pronóstico, en unos casos con dosis elevadas, pero no mieloablativas, y en otros casos con dosis mieloablativas con soporte de CPH. Un primer intento de la escalada de dosis de los alquilantes y/o de las antraciclinas hasta niveles no mieloablativos, sin soporte de células progenitoras hematopoyéticas ha sido posible gracias a la utilización de factores de crecimiento granulocítico (G-CSF) o granulomonocítico (GM-CSF) en pacientes con LCG de mal pronóstico con una toxicidad aceptable. Esta estrategia ha sido eficaz en los pacientes jóvenes de mal pronóstico.

Una segunda posibilidad de intensificar la dosis es administrar la dosis total en menos tiempo (densidad

de dosis). Esto ha sido posible, también, gracias a la utilización de los factores de crecimiento, que favorecen la recuperación granulocitaria. El grupo alemán ha demostrado que esta estrategia es posible administrando el CHOP convencional cada 14 días, en vez de cada 21 días. Los resultados de sus trabajos demuestran la ventaja del CHOP-14 en los pacientes con LCG de más de 60 años y en los jóvenes de buen pronóstico.

Otra opción para aumentar la intensidad de dosis consiste en administrar quimioterapia hasta niveles mioablativos seguida del rescate con CPH. El TCPH nos permite administrar la máxima intensidad de dosis tolerada de los agentes quimioterápicos. De esta forma, en ocasiones se puede vencer la resistencia a los fármacos y conseguir algún tipo de respuesta en pacientes refractarios. Los resultados del TCPH son mejores que los de la quimioterapia y dependen de la quimiosensibilidad o resistencia de las células linfomatosas. La tasa de respuesta completa es del 20 % para los trasplantados con enfermedad resistente y del 80 % para los que se trasplantan con enfermedad quimiosensible. La supervivencia global (SG) en los pacientes trasplantados con enfermedad resistente es del 4 %, la probabilidad de recaída es del 65 % y la mortalidad relacionada con el trasplante es del 25 %. Los resultados son significativamente mejores cuando la enfermedad es sensible a la quimioterapia, la SG es del 45 %, la tasa de recidiva del 40 % y la mortalidad tóxica del 8 %. Estos resultados han sido confirmados por un estudio prospectivo internacional realizado por el grupo de Parma en pacientes con enfermedad quimiosensible. La tasa de respuesta fue significativamente más elevada en el grupo de pacientes trasplantados que en los que recibieron quimioterapia con el régimen DHAP 84 % frente a 44 %, respectivamente. La SLE y la SG a los 5 años también fueron significativamente mejores en el grupo trasplantado que en el de quimioterapia 46 % frente a 12 % ($p = 0,001$) y 53 % frente a 32 % ($p = 0,03$), respectivamente.

Una cuestión controvertida es la utilización del trasplante como consolidación en pacientes que están en RC o formando parte del tratamiento inicial en pacientes de mal pronóstico. En diversos estudios retrospectivos se han descrito largas SLE en torno al 50 % en los pacientes trasplantados en 20 RC y por encima del 70 % en los trasplantados en 10 RC. El grupo francés GELA ha publicado sus resultados comparando una quimioterapia secuencial con el trasplante en 541 pacientes que alcanzaron la RC. La SLE fue similar en las dos ramas, pero había diferencias significativas a favor del trasplante cuando el análisis se realizaba sólo en los pacientes con IPI de mal pronóstico. Gianni et al han demostrado que una quimioterapia secuencial seguida de TCPH es superior al MACOP-B en 98 pacientes con LCG de mal pronóstico. Sin embargo, otros autores no han encontrado diferencias entre la quimioterapia y el TCPH. En consecuencia, el papel del TCPH como consolidación sigue siendo una cuestión abierta aunque parece ser que es más eficaz en aquellos pacientes con un IPI de mal pronóstico.

Importancia de los anticuerpos monoclonales

El rituximab es un anticuerpo monoclonal (AcMo) quimérico, anti-CD20, aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) en 1997. Es eficaz cuando se utiliza como tratamiento único en pacientes con linfomas de células B refractarios a la quimioterapia o en recaída.

La asociación del rituximab con CHOP o con regímenes similares al CHOP se ha realizado en varios estudios en pacientes con menos y con más de 60 años. El grupo francés GELA ha realizado un estudio aleatorizado en pacientes con más de 60 años comparando 8 ciclos de CHOP cada 3 semanas con y sin rituximab, administrado el día 1 de cada ciclo. La tasa de RC fue significativamente más alta en el grupo de pacientes que recibió el AcMo (76 % frente a 63 %; $p = 0,005$). La supervivencia libre de evento (SLE) y la supervivencia global (SG), con una mediana de seguimiento de 2 años, fue, también, significativamente mejor en el grupo que recibió rituximab, $p < 0,001$ y $p = 0,007$, respectivamente. Además, en el grupo de pacientes que recibió el AcMo, se redujo el riesgo de fallos del tratamiento y de muertes. La actualización de los resultados, con una mediana de 5 años de seguimiento, sirvió para confirmar el beneficio del rituximab en la SG (58 % frente a 45 %; $p = 0,007$). Igualmente, han demostrado que el CHOP-R es más efectivo que el CHOP sólo en los pacientes bcl-2 positivos, pero no en los bcl-2 negativos.

En otro estudio intergrupos (MINT), se evaluó la eficacia del rituximab en pacientes jóvenes (entre 18 y 60 años). Se incluyeron en el estudio a pacientes con LCG-B, IPI 0-1, estadio II-IV y estadio I con masa "bulky". Los pacientes fueron aleatorizados para recibir 6 ciclos de CHOP u otros similares a este régimen con o sin rituximab a las dosis habituales. Se incluyeron a 823 pacientes, 413 en la rama del CHOP + R y 410 en la del CHOP. La tasa de RC (81 % frente a 67 %; $p < 0,0001$), la progresión de la enfermedad durante el tratamiento (4 % frente a 15 %; $p < 0,00001$), el tiempo hasta el fallo del tratamiento (76 % frente a 60 %; $p < 0,00001$) y la supervivencia global a los 2 años (94 % frente a 87 %; $p < 0,001$) fueron significativamente mejores en el grupo de pacientes que recibió rituximab. El problema fundamental de este estudio es que no se incluyeron pacientes de IPI desfavorable.

En un estudio intergrupos americano, se incluyeron a 632 pacientes en dos ramas que recibieron 6-8 ciclos de CHOP-R (318) o CHOP (314). Se administraron 5 dosis de rituximab (375 mg/m^2) los días 7 y 3 anteriores al primer ciclo y 2 días después de los ciclos 3, 5 y 7. Los pacientes que respondieron (415), fueron aleatorizados para recibir rituximab de mantenimiento (207) (4 dosis semanales de 375 mg/m^2 cada 6 meses durante 2 años) o nada (208). El estudio es complicado y está comunicado provisionalmente en forma de *abstract*. Los resultados más destacados son que el rituximab mejora la supervivencia libre de progresión cuando se administra en la inducción con el

CHOP o cuando se utiliza como tratamiento de mantenimiento, pero no existía ningún beneficio del mantenimiento en los pacientes que ya habían recibido el rituximab en la inducción. En un segundo análisis, intentado eliminar la influencia del rituximab del mantenimiento, la SG a los 3 años era mejor en los pacientes que recibieron el AcMo en la inducción (67 % frente a 58 %; $p = 0,05$)

Los investigadores de la British Columbia realizaron un estudio retrospectivo comparando 140 pacientes de la era pre-rituximab con 152 del período post-rituximab. La SG a los 2 años era significativamente más larga en la era post-rituximab para todos los pacientes (78 % frente a 52 %; $p < 0,001$) y se mantenía las diferencias en los menores de 60 años (85 % frente a 67 %; $p = 0,02$) y en los mayores de 60 años (73 % frente a 42 %; $p = 0,0003$).

En resumen, el rituximab ha mejorado las tasas de respuesta y la supervivencia en los pacientes con LCG, cuando se utiliza como tratamiento inicial en combinación con la quimioterapia de primera línea. Sin embargo, en el momento actual no se conoce el impacto que pueda tener en la supervivencia de los enfermos cuando se utiliza como tratamiento de mantenimiento.

Tratamiento de los pacientes en recaída o refractarios

La evolución de los pacientes que fallan al tratamiento de primera línea o que recaen después de una remisión inicial, es muy mala. El pronóstico de estos pacientes, que representan más del 50 % de los LCG, depende de la sensibilidad de las células neoplásicas a la quimioterapia. Los pacientes que tienen una enfermedad quimiosensible suelen responder bien a los tratamientos de segunda línea, sin embargo, cuando la enfermedad es refractaria, la respuesta es muy mala y son muy pocas las opciones de curación de estos enfermos.

Los regímenes de rescate utilizados en estos pacientes se basan en la incorporación de fármacos no incluidos en los regímenes de primera línea tales como el DHAP (dexametasona, citarabina y cisplatino), ES-HAP (etopósido, cisplatino, metilprednisolona y citarabina) y el ICE (ifosfamida, carboplatino y etopósido). En general, la tasa de respuesta oscila entre el 30-40 %, son de corta duración y la supervivencia es inferior al 10 %. En la actualidad, estos esquemas se utilizan como parte inicial del tratamiento que acabará con la utilización de altas dosis y rescate con células progenitoras. En los pacientes quimiosensibles, el tratamiento estándar ha sido el trasplante autólogo de células progenitoras hematopoyéticas (TACPH). En un estudio aleatorizado prospectivo, estudio de Parma, los pacientes fueron tratados con dos ciclos de DHAP y los que respondían, respuesta completa o buena respuesta parcial, se aleatorizaban para recibir 4 ciclos más de DHAP o un TACPH con BEAM. La SG a los 5 años fue significativamente favorable al trasplante 53 % frente a 32 % ($p = 0,03$).

Los AcMo anti-CD20, ha mejorado notablemente la tasa de respuesta, incluso en los pacientes refractarios a la quimioterapia. La incorporación de estos AcMo a los esquemas quimioterápicos, mejora las opciones de respuesta de estos pacientes. Los radioinmunoconjugados, AcMo unidos a isótopos radiactivos, es una nueva opción de tratamiento, muy atractiva, para estos pacientes.

Bibliografía recomendada

- Abramson JS, Shipp MA. Advances in the Biology and Therapy of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. Moving Towards a Molecularly Targeted Approach. Blood First Edition Paper, prepublished online April 26, 2005; DOI 10.1182/blood-2005-02-0687.
- Coeffier B, Lepage E, Brière J, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2002;346:235-42.
- Fisher RI, Gaynor ER, Dahlberg S, et al. Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 1993;328:1002-6.
- Gianni AM, Bregni M, Siena S, et al. High-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation compared with MA-COP-B in aggressive B-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 1997;336:1290-7.
- Gisselbrecht C, Mounier N. Improving Second-Line Therapy in Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. *Semin Oncol.* 2004;31 Suppl 2:12-16.
- Gisselbrecht C, Lepage E, Molina T, et al. Shortened first-line high-dose chemotherapy for patients with poor-prognosis aggressive lymphoma. *J Clin Oncol.* 2002;20:2472-9.
- Haioun C, Lepage E, Gisselbrecht C, et al. Survival benefit of high-dose therapy in poor-risk aggressive non-Hodgkin's lymphoma: final analysis of the prospective LNH87-2 protocol — a groupe d'Étude des lymphomes de l'Adulte study. *J Clin Oncol.* 2000;18:3025-30.
- Kouroukis CT, Brownman GP, Esmail R, Meyer RM. Chemotherapy for Older Patients with Newly Diagnosed, Advanced-Stage, Aggressive-Histology Non-Hodgkin Lymphoma: A Systematic Review. *Ann Intern Med.* 2002;136:144-52.
- Miller TP, Dahlberg S, Cassady JR, et al. Chemotherapy alone compared with chemotherapy plus radiotherapy for localized intermediate- and high-grade non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 1998;339:21-6.
- Milpied N, Deconinck E, Gaillard F, Delwail V, et al, for the Groupe Ouest-Est des Leucémies et des Autres Maladies du Sang. Initial Treatment of Aggressive Lymphoma with High-Dose Chemotherapy and Autologous Stem-Cell Support. *N Engl J Med.* 2004;350:1287-95.
- Monti S, Savage KJ, Kutok JL, et al. Molecular profiling of diffuse large B-cell lymphoma identifies robust subtypes including one characterized by host inflammatory response. *Blood.* 2005;105:1851-61.
- Pfreundschuh M, Trümper L, Kloess M, et al. for the German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group (DSHNHL). Two-weekly or 3-weekly CHOP chemotherapy with or without etoposide for the treatment of young patients with good-prognosis (normal LDH) aggressive lymphomas: results of the NHL-B1 trial of the DSHNHL. *Blood.* 2004;104:626-33.
- Pfreundschuh M, Trümper L, Kloess M, et al. for the German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group (DSHNHL). Two-weekly or 3-weekly CHOP chemotherapy with or without etoposide for the treatment of elderly patients with aggressive lymphomas: results of the NHL-B2 trial of the DSHNHL. *Blood.* 2004;104:634-41.

- Reyes F, Lepage E, Ganem G, et al. for the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). ACVBP versus CHOP plus Radiotherapy for Localized Aggressive Lymphoma. *N Engl J Med.* 2005;352:1197-205.
- Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2002;346:1937-47.
- The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 1993;329:987-94.
- Thierry P, Guglielmi C, Hagenbeek A, et al. Autologous bone marrow transplantation as compared with salvage chemotherapy in relapses of chemotherapy-sensitive non-hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 1995;333:1540-5.

Uso terapéutico de los derivados plasmáticos

M.L. LOZANO ALMELA

Profesor Titular Universidad de Murcia. Centro Regional de Hemodonación. Murcia.

Introducción

En el siglo XIX la “fracción acuosa” de la sangre comenzó a considerarse de gran interés terapéutico, al ser fuente de una serie de nuevos compuestos que no podían ser sintetizados mediante los métodos químicos clásicos, debido a su complejidad estructural. Desde que en 1888, el científico alemán Hofmeister publicara artículos que trataban sobre el comportamiento y solubilidad de las proteínas plasmáticas usando sulfato de amonio, continúa aplicándose el principio de esta técnica de precipitación-separación para la purificación de los componentes plasmáticos. Fue a partir de la Segunda Guerra Mundial cuando más se han desarrollado los métodos de separación y concentración que permiten el aprovechamiento de la sangre humana para la preparación de valiosos compuestos biofarmacéuticos. Éstos incluyen, entre otros, las inmunoglobulinas para la inmunización pasiva; concen-

trados de factores de coagulación para el tratamiento de pacientes con hemofilia y enfermedades relacionadas; albúmina, para la restauración de volumen; antitrombina para el manejo de deficiencias adquiridas y congénitas; α_1 -antitripsina para el tratamiento de pacientes –enfisematosos y potencialmente aquellos con fibrosis quística– con deficiencias en esta antiproteasa; y sistema adhesivo de fibrinógeno para aplicaciones vasculares y quirúrgicas (tabla 1).

El potencial terapéutico del plasma, no obstante, se ha oscurecido por dos hechos durante la década de los años 1980. En primer lugar, la aparición del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y su transmisión a partir de hemoderivados, hizo que se priorizaran esfuerzos en garantizar la seguridad de estos compuestos, en lugar de continuar la investigación y desarrollo de nuevos productos. En segundo lugar, el progreso de la tecnología de recombinación genética ha abierto la perspectiva de que la extracción de derivados

Tabla 1. Principales indicaciones de los derivados plasmáticos

Producto	Indicación
Plasma fresco congelado Crioprecipitado	Revertir anticoagulación; déficit de factores coagulación; recambio plasmático en PTT Hipofibrinogenemia, déficit de factor XIII
Albúmina	Paracentesis, síndrome hepatorenal, recambio plasmático
Inmunoglobulina sérica inmune, IM Inmunoglobulina IV Inmunoglobulina hiperinmune	Profilaxis VHA o de otros agentes Inmunodeficiencias, PTI, TPH alogénico, enfermedades de Kawasaki y de Guillain-Barré Ver tabla 2
Fibrinógeno	Hipofibrinogenemia; disfibrinogenemia congénita
Factor VII	Déficit congénito
Factor VIII	Tratamiento de hemofilia A
Factor IX	Tratamiento de hemofilia B
Concentrado de complejo protrombinasa	Deficiencia de FII, FVII, FIX o FX, sobredosis anticoagulantes
Concentrado de complejo protrombinasa activado	Inhibidores de FVIII
Factor von Willebrand	Enfermedad de von Willebrand
Factor XIII	Déficit de FXIII
Sistema de sellado de fibrina	Promover hemostasia local en trastornos congénitos y adquiridos de la coagulación
Concentrado de proteína C	Deficiencia congénita de proteína C
Antitrombina	Deficiencia de antitrombina
Inhibidor de α_1 -antitripsina	Deficiencia de antitripsina
Inhibidor de C1-esterasa	Angioedema hereditario

PTT: púrpura trombótica trombocitopénica; VHA: virus de la hepatitis A; PTI: púrpura trombocitopénica autoinmune; TPH: trasplante de progenitores hematopoyéticos.

plasmáticos pueda pronto quedar obsoleta, ante la posibilidad de tener acceso a cantidades ilimitadas de equivalentes proteicos libres de virus, a un bajo coste. Sin embargo, a pesar del optimismo inicial, existen productos como las inmunoglobulinas que difícilmente podrán ser desplazados por alternativas recombinantes. Además, la disponibilidad de los productos recombinantes puede estar limitada por el bajo número de productores (en ocasiones un único para un determinado producto), mientras que la sangre humana permite la producción de varias proteínas a partir de una única fuente. Adicionalmente, el desarrollo continuado de técnicas de eliminación viral, ha posibilitado que los derivados plasmáticos actualmente disponibles cumplan con estándares muy exigentes de seguridad. Así la situación actual justifica que se revise el futuro de los hemoderivados plasmáticos.

Fuentes

Los hemoderivados plasmáticos, bien procedentes de donaciones de sangre total o de plasmaféresis, pueden ser divididos en dos grupos:

1. Productos derivados de donaciones individuales o de pequeñas mezclas del material original. Estos derivados, por ejemplo los concentrados celulares y los crioprecipitados, se fraccionan y distribuyen en los centros de transfusión, y su calidad y seguridad dependen casi exclusivamente de ellos.
2. Derivados plasmáticos producidos a escala industrial de "pooles" del material inicial, a través de varios procedimientos de separación, y cuya calidad y seguridad incluyen procesos que inactivan o eliminan contaminantes microbianos.

Proceso de fraccionamiento

El proceso de fraccionamiento comienza cuando la sangre total se separa entre concentrados de hematíes y plasma. El componente plasmático se congela y posteriormente descongela. Los factores de coagulación se separan entonces del plasma en una serie de pasos que incluyen la centrifugación y el plasma residual se fracciona en albúmina, inmunoglobulinas inespecíficas e hiperinmunes, y otros factores, como α_1 -antitripsina y antitrombina. De 1 l de *pool* de plasma se obtendrán 2 U (50 ml) de albúmina al 25 %, 180-200 U de factor VIII, 250-450 U de factor IX, y o bien 2,5 g de inmunoglobulinas o globulinas hiperinmunes (p. ej., tétanos, hepatitis, o RhD).

Nivel de autosuficiencia de plasma en España

Las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud y del Consejo de Europa en el campo de la

sangre y hemoderivados en aras de una mayor seguridad en su utilización, han promovido desde hace años la consecución del autoabastecimiento en cada país, y un mayor control y seguridad de la sangre y plasma procedentes de donantes altruistas. Actualmente, con la creación de los Centros de Transfusión Comunitarios, se ha alcanzado la autosuficiencia en hemoderivados primarios (concentrados de hematíes, de plaquetas, y plasma fresco congelado), aunque no en el caso de los hemoderivados procedentes de plasma. Así, un país se considera autosuficiente en derivados sanguíneos cuando supera el índice de 43 a 45 donaciones por mil habitantes (sólo alcanzado en el año 2003 en Navarra, Euskadi, Galicia y Cantabria), presentando España, una media de 38 donaciones por mil habitantes. Aproximadamente el 71 % del plasma disponible en nuestro país se deriva a la industria, calculándose que cada año se importan entre 200.000 y 300.000 l. Los hemoderivados que condicionan preferentemente el que no se cubran todas las necesidades terapéuticas son el factor VIII de origen plasmático (porcentaje de cobertura con plasma de origen español del 20 %), albúmina (porcentaje de cobertura del 53 %), e inmunoglobulinas intravenosas (porcentaje de cobertura del 65 %).

Hemoderivados

Plasma fresco congelado y crioprecipitado

El plasma fresco congelado (PFC) es la fuente primaria de factores de coagulación en pacientes con déficit de éstos. Es el plasma que se obtiene de donaciones individuales de sangre y procesado en las primeras 6 h de recolección. Este plasma se mantiene congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una vez descongelado tiene una vida útil de 24 h. Contiene aproximadamente 400 mg de fibrinógeno y otros factores de coagulación (V, VII, IX, XI, antitrombina, proteína C o S). Cuando se lleva a cabo la descongelación lenta del plasma a temperatura discretamente por encima de la de congelación se produce un depósito o crioprecipitado. Cada unidad de crioprecipitado es un concentrado de factor VIII (80-120 U), fibrinógeno (150-250 mg/dl), factor de von Willebrand (FvW) (125-200 U), fibronectina, y factor XIII.

El PFC es el componente sanguíneo que más frecuentemente se emplea de forma inadecuada en la práctica clínica, lo que dificulta la autosuficiencia y encarece el coste de los derivados de este producto. El resultado de diversas auditorías llevadas a cabo en diversos países muestra un empleo inadecuado de este hemoderivado que oscila entre el 32 % en 15 centros escoceses¹, el 45 % en 2 hospitales canadienses², el 60 % en un hospital indio³, hasta el 96 % en un hospital mexicano⁴. La guía recientemente publicada por el Comité Británico de Estandarización en Hematología⁵ refleja la inadecuada indicación del uso de PFC en el contexto de la coagulación intravascular diseminada (CID) sin sangrado, en revertir la anticoagulación en ausen-

Tabla 2. Principales indicaciones de las inmunoglobulinas inespecíficas

Diagnóstico	Dosis
<i>Inmunodeficiencias</i>	
Deficiencias inmunes congénitas o adquiridas (p. ej., LLC, mieloma)	100-400 mg/kg mensual, durante 3 meses. Después ajustar dosis según niveles de IgG
VIH avanzado e infecciones graves que no responden a antivirales	
<i>Enfermedades hematológicas</i>	
Trombocitopenia inmune idiopática (PTI) o asociada a VIH con plaquetas < 20 × 10 ⁹ /l, o < 50 × 10 ⁹ /l con sangrado	1 g/kg
PTI en embarazo con plaquetas < 10 × 10 ⁹ /l, o de 10-30 × 10 ⁹ /l y sangrado	
Trasplante hematopoyético alogénico, para mitigar infecciones, neumonía intersticial y EICH	
<i>Enfermedades neurológicas</i>	
Síndrome de Guillain-Barré	2 g/kg durante 2-5 días
Polirradiculopatía desmielinizadora crónica inflamatoria	
Neuropatía motora multifocal	
Miastenia gravis (en circunstancias seleccionadas)	
<i>Enfermedades reumatológicas</i>	
Dermatomiositis	2 g/kg durante 2 días
Síndrome de Kawasaki	

LLC: leucemia linfática crónica; VIH: virus de inmunodeficiencia humana; EICH: enfermedad injerto contra el huésped.

cia de hemorragia, y una utilidad limitada en la profilaxis de la biopsia hepática. La indicaciones para el empleo del PFC son revertir con urgencia el tratamiento con anticoagulantes si existe hemorragia grave, corregir deficiencias únicas de factores de coagulación (fundamentalmente factor V) para los cuales no haya disponibilidad del factor específico y déficit de varios factores de coagulación asociados o no a CID en presencia de sangrado; y para reemplazo en intercambio plasmático exclusivamente de pacientes con púrpura trombótica trombocitopénica (para la cual también se puede emplear el criosobrenadante). El crioprecipitado se emplea para incrementar los niveles de fibrinógeno en disfibrinogenemias e hipofibrinogenemias congénitas, y en las presentes debidas a transfusión masiva o a CID. Si se emplean para el sangrado quirúrgico o traumático, las dosis de PFC y de crioprecipitado deben ajustarse de acuerdo con los niveles de coagulación.

Albúmina

La albúmina es la molécula presente en mayores concentraciones en el plasma. Puesto que no puede salir de los capilares en las personas sanas, tiene un papel

importante en el mantenimiento de la presión oncótica vascular. Cada 500 ml de albúmina al 5 % inyectada incrementará en 750 ml el volumen intravascular. En España, el consumo de albúmina en el año 2002 fue de 217 g/1.000 personas (41,5 millones de euros), superando al de países como Canadá o Reino Unido. En julio de 1998 se publicó un metaanálisis de ensayos clínicos en enfermos críticos tratados con albúmina, que mostró un incremento de la mortalidad del 7 % comparado con pacientes que no habían sido tratados, o que recibieron cristaloides⁶. En la actualidad no existe evidencia de que la albúmina sea superior a los cristaloides en los subgrupos de pacientes con hipovolemia, hipoalbuminemia, ni en pacientes con sangrados graves⁷, y no se dispone de datos suficientes que indiquen una superioridad de este tratamiento en el contexto de la hipotensión durante la diálisis o en cirugía cardíaca. Teniendo en cuenta el coste de la albúmina (117 € por 500 ml), comparado con el de otros expansores de volumen que no son derivados sanguíneos, como el hidroxialmidón (56 €), o el suero salino (2 €), habría que limitar el uso de la albúmina a aquellas situaciones en los que existe evidencia científica del beneficio de su uso. Esto es, en el contexto de paracentesis evacuadoras de más de 5 l, síndrome hepatorenal, y en intercambio plasmático, a excepción de la púrpura trombótica trombocitopénica.

Inmunoglobulinas

El uso de las inmunoglobulinas inespecíficas (preparación al 90 %) ha experimentado un incremento significativo en los últimos años. Las inmunoglobulinas humanas para uso intravenoso tienen como principales indicaciones clínicas la terapia sustitutiva en déficit congénitos o adquiridos y la terapia inmunomoduladora en una gran variedad de patologías autoinmunes (tabla 2). Una de las principales limitaciones del uso de las inmunoglobulinas es su coste, que se sitúa en torno a los 75 €/g. Así, un curso único de tratamiento de un paciente de 70 kg con la dosis habitualmente prescrita de 1 g/kg/día durante 2 días cuesta 10.000 €, lo que supuso en España en el año 2002 un gasto de 112,5 millones de euros. Otro de los aspectos que hay que valorar con el empleo de inmunoglobulinas intravenosas es la posibilidad de reacciones adversas, que van desde ansiedad, inestabilidad hemodinámica, náuseas, eventos tromboembólicos, fallo renal, meningitis aséptica o anafilaxia.

Las globulinas inmunes séricas (preparación al 16 %), de empleo intramuscular, contienen títulos elevados de anticuerpos contra numerosos agentes infecciosos. Este producto continúa siendo el principal tratamiento en la prevención de los brotes de hepatitis A, en militares, y para aquellas personas que viajan a regiones endémicas de hepatitis A.

Existen también preparaciones de inmunoglobulinas específicas, que son productos plasmáticos que consisten fundamentalmente en anticuerpos contra un material extraño ajeno. Para preparar estos productos se precisa de plasma, generalmente mediante selec-

Tabla 3. Inmunoglobulinas específicas

Inmunoglobulina específica	Vía	Indicación	Dosificación
Antitetánica	IM	Profilaxis Tratamiento	250-500 U 3.000-6.000 U
Antihepatitis B	IM	Profilaxis postexposición en asociación a vacuna hepatitis B	0,06 ml/kg, y repetir la dosis a los 28-30 días de la exposición
Antirrábica	IM	Profilaxis postexposición, en asociación a vacuna antirrábica	Adultos y niños: 20 U/kg
Anti-Rh(D)	IM SC ^a IV ^b	Profilaxis pre y postexposición	200-300 µg (1.000-1.500 U)
Anti-CMV	IV	Profilaxis en trasplantes	Dosis inicial 150 mg/Kg
Anti-VRS	IV	Profilaxis infección por VRS en lactantes y niños de alto riesgo	750 mg/kg/mes
Antivaricela-zóster	IM	Profilaxis preexposición en pacientes de riesgo	10 U/kg

^aVía subcutánea en pacientes con trombocitopenia o alteraciones graves de la coagulación.

^bPúrpura trombocitopénica idiopática.

CMV: citomegalovirus; VRS: virus respiratorio sincitial.

ción de donantes que son hiperinmunes a determinados microorganismos o al antígeno RhD. Tras la administración de la gammaglobulina específica (tabla 3), se consigue así la inmunización pasiva del sujeto.

Factores de coagulación

En los países desarrollados, el tratamiento de elección para la hemofilia A y B son los concentrados de factores de coagulación recombinantes. No obstante, independientemente de consideraciones de coste y disponibilidad de estos, todavía se requiere la terapia de reemplazo derivada del plasma para pacientes con inhibidores, con enfermedad de von Willebrand, en la inducción de la tolerancia inmunitaria, y para el tratamiento de deficiencias poco frecuentes de proteínas procoagulantes o anticoagulantes (tabla 4⁸).

Puesto que el tratamiento con concentrados de factores de la coagulación derivados del plasma ha causado la transmisión de enfermedades virales, como la hepatitis y el VIH, es importante asegurar que los productos que se emplean sean seguros y libres de carga vírica. Desde la década de los años 1980, las agencias reguladoras y los productores de derivados plasmáticos para uso clínico se han hecho eco de esta preocupación, y han desarrollado una serie de medidas, para reducir –si no eliminar– este riesgo. Básicamente, estas se basan en:

1. Seleccionar adecuadamente la sangre y los donantes.
2. Realizar un cribado riguroso del plasma.
3. Eliminación de los virus contaminantes durante el proceso de producción.

Fibrinógeno

Los concentrados de fibrinógeno se obtienen de la primera fracción precipitada del proceso de Cohn. Se emplea para el control de las hemorragias en las defi-

ciencias congénitas de fibrinógeno. Teniendo en cuenta la larga semivida del fibrinógeno (2-4 días), se puede llevar a cabo una profilaxis regular con infusiones semanales del concentrado. Esto se recomienda en pacientes que sangran frecuentemente y en órganos críticos, como músculos, articulaciones, tracto gastrointestinal y sistema nervioso central. En España, no existe ningún concentrado de fibrinógeno comercializado, debiéndose obtener como medicamento extranjero.

Concentrados de complejo protrombinasa (CCP) y concentrados de complejo protrombinasa activados (CCPa)

Los concentrados del complejo de la protrombinasa (CCP) consisten en un producto que contiene los factores II, IX, y X. El factor VII también puede estar presente según el método de producción. Su indicación es en el tratamiento del sangrado o en la profilaxis perioperatoria de pacientes con: a) deficiencias congénitas de factores de la coagulación dependientes de la vitamina K, cuando el producto de factor de coagulación específico purificado no está disponible, o b) deficiencias adquiridas de factores de la coagulación dependientes de la vitamina K (p. ej., en tratamientos anticoagulantes, cuando se requiere una reversión rápida del efecto). Los concentrados de complejo protrombinasa activados se emplean para tratar hemofílicos con inhibidores. Este producto es efectivo en controlar el sangrado de articulaciones y tejidos blandos en el 80 % de estos pacientes⁹.

La terapia con CCP o CCPa resulta cara, genera respuestas hemostáticas poco predecibles, carece de métodos para la monitorización de la eficacia clínica, y conlleva riesgo de complicaciones importantes, como trombosis incluyendo infarto de miocardio. Como guía general, la dosis efectiva de CCPa se sitúa en rangos entre 75-100 U/kg, con administración cada 12 h, puesto que dosis más frecuentes pueden incrementar el riesgo trombótico.

Tabla 4. Tratamiento de sustitución de deficiencias de proteínas de coagulación

Deficiencia	Cirugía mayor	Cirugía menor	Sangrado espontáneo	Comentarios
Fibrinógeno	Concentrado (20-30 mg/kg) PFC (15-20 ml/kg) Crioprecipitado (1/10 kg) Nivel: > 50 mg/dl hasta cicatrización	PFC (15-20 ml/kg) Nivel: > 50 mg/dl, 2-3 días	PFC (15-20 ml/Kg) Nivel: > 50 mg/dl hasta cese hemorragia	Profilaxis con concentrado semanal (20-30 mg/kg) si el sangrado espontáneo es frecuente y severo
Protrombina	CCP (20-30 U/kg) PFC (15-20 ml/kg) Nivel: > 30 % hasta cese hemorragia Nivel: > 30 % hasta cicatrización	PFC (15-20 ml/kg) Nivel: > 30 %, 2-3 días	PFC (15-20 ml/kg)	Tras CCP, FVII, FIX, y FX no deberían exceder el 150 %
V	PFC (15-20 ml/kg) Nivel: > 20 % hasta cicatrización	Como en cirugía mayor Nivel: > 20 %, 2-3 días	Como en cirugía mayor	No hay concentrados disponibles Nivel: > 20 % hasta cese hemorragia
VII	FVIIar (15-30 µg/kg) a intervalos de 12 h) Concentrado (30-40 U/kg a intervalos de 12 h) Nivel: > 20 % hasta cicatrización	Como en cirugía mayor Nivel: > 20 %, 2-3 días	Como en cirugía mayor Nivel: > 20 % hasta cese hemorragia	Monitorizar con ensayos de actividad FVII
VIII	Leve: DDAVP (0,3 µg/kg) Grave: concentrado (40-50 U/kg) Nivel: Inicial del 60-100 %, seguido del 50 %	Leve: DDAVP (0,3 µg/kg) Severa: concentrado (25 U/kg) Nivel: inicial del 50 %, 2-3 días	Como en cirugía mayor Nivel: 40-100 % dependiendo de localización de hemorragia	En pacientes con inhibidores, administrar FVIIar (90 µg/kg), CCP (30-50 U/kg/12 h), CCPa (75-100 U/kg)
IX	Concentrado (60-80 U/kg) Nivel: inicial del 60-80 %, seguido del 30 %	Concentrado (40 U/kg) Nivel: inicial del 40 %, 2-3 días	Como en cirugía mayor Nivel: 30-80 % dependiendo de localización de hemorragia	En pacientes con inhibidores, administrar FVIIar (90 µg/kg), CCP (30-50 U/kg/12 h), CCPa (75-100 U/kg)
X	CCP (20-30 U/kg) PFC (15-20 ml/kg) Nivel: > 20 % hasta cicatrización	PFC (15-20 ml/kg) Nivel: > 30 %, 2-3 días	Como en cirugía mayor Nivel: > 20 % hasta cese hemorragia	Tras CCP, FVII, FIX, y FX no deberían exceder el 150 %
XI	PFC (15-20 ml/kg) Nivel: > 20 % hasta cicatrización	Como en cirugía mayor Nivel: > 20 %, 2-3 días	Como en cirugía mayor Nivel: > 20 % hasta cese hemorragia	Los niveles de FXI generalmente pueden conseguirse con infusiones a días alternos
XIII	Concentrado(10-20 U/kg) PFC (15-20 ml/kg) Crioprecipitado (1/10 kg) Nivel: > 5 % hasta cicatrización	Como en cirugía mayor Nivel: > 5 %, 2-3 días	Como en cirugía mayor Nivel: > 5 % hasta cese hemorragia	Profilaxis en todos los pacientes. La reposición se puede llevar a cabo cada 20-30 días
FvW	Tipo 1: DDAVP (0,3 µg/kg) Tipos 2 y 3: concentrados de FVIII/FvW (50 U/kg) Nivel: FVIII > 50 % hasta cicatrización	Tipo 1: DDAVP (0,3 µg/kg) Tipos 2 y 3: concentrados de FVIII/FvW (40 U/kg) Nivel: FVIII > 30 %, 2-3 días	Tipo 1: DDAVP (0,3 µg/kg) Tipos 2 y 3: concentrados de FVIII/FvW 25U/kg Nivel: FVIII > 30 % hasta cese de hemorragia	En pacientes con inhibidores, FVIII recombinante o FVIIar
PC	Concentrados (40 U/kg/12 h) hasta reinicio de anticoagulación oral	—	—	Administrar también concentrados al inicio del tratamiento con cumarínicos
Antitrombina	Concentrados (60 U/kg/24 h) Niveles > 80-100 %	—	—	

PFC: plasma fresco congelado; CCP: concentrado de complejo protrombinasa; CCPa: concentrado de complejo protrombinasa activado; FVIIar: FVII activo recombinante; DDAVP: desmopresina.

Modificada de Mannucci et al⁸.

FVIII y FIX

Durante los últimos 30 años se han producido avances significativos en el desarrollo y producción de estos factores de la coagulación, para el tratamiento de las hemofilias A y B. La metodología de los sistemas de purificación ha experimentado un notable desarrollo, con la producción de concentrados de pureza “intermedia” o “alta”. Se ha establecido un con-

senso bastante generalizado para el uso prioritario en los enfermos con hemofilia A o B severa de concentrados plasmáticos de “alta pureza”. Los concentrados de FVIII de “pureza intermedia”, junto con algunos de “alta pureza” que mantienen un alto contenido cuantitativo y cualitativo de FvW, pueden indicarse en aquellos casos de enfermedad de von Willebrand (EvW) donde el tratamiento con desmopresina (DDAVP) es ineficaz.

La elección entre el empleo de FVIII y FIX derivados de plasma o recombinante, tiene que tener en cuenta que los primeros cada vez son más seguros, y que los segundos son un 20-50 % más caros y además, su producción es limitada. En EE.UU., aproximadamente el 60-70 % de los hemofílicos graves usan factores recombinantes, mientras que en Europa este porcentaje es menor. Así, en España, en el año 2002, este supuso el 40 % del total consumido. Debido a la necesidad de priorizar las indicaciones de FVIII recombinante, en los países desarrollados, se prefiere el empleo de este factor en pacientes de reciente diagnóstico. No obstante, a nivel mundial, los factores derivados del plasma posiblemente seguirán siendo la única opción terapéutica en el 80 % de los hemofílicos que en el momento actual tienen acceso nulo o muy limitado a cualquier terapia de reemplazo¹⁰. Actualmente, el concepto general es a aceptar que la incidencia de inhibidores es similar en pacientes con hemofilia que reciben tratamiento con factores recombinantes o derivados del plasma, tanto en lo que se refiere a FIX¹¹, como a FVIII¹². No obstante, también existen datos que apoyan que el uso de concentrados que contengan FvW resulta en una menor incidencia de inhibidores, y en una mejor respuesta en pacientes en los que se lleva a cabo una tolerancia inmunitaria^{13,14}.

Factor von Willebrand

La mayoría de pacientes con EvW tipo 1 expresan sólo un sangrado moderado y requieren tratamiento en caso de traumatismos o de cirugía, siendo el DDAVP es el tratamiento de elección, al igual que en pacientes con hemofilia A leve. Los pacientes que no responden al DDAVP, los que exhiben efectos adversos importantes, y aquellos en los que el DDAVP está contraindicado, son candidatos para una terapia de reemplazo con productos que contengan FvW (20-30 % de pacientes con EvW). Los derivados plasmáticos de FVIII/FvW purificados y sometidos a inactivación viral, son los más frecuentemente empleados en este contexto. Además, ha sido desarrollado un FvW derivado del plasma, purificado, casi totalmente deplecionado de FVIII. Hay que tener en cuenta que la hemostasia no puede llevarse a cabo hasta que la actividad del FVIII coagulante ha alcanzado el 40 %, y que la infusión de FvW sólo no aumenta los niveles de este durante al menos 6-12 h, por lo que en situaciones de emergencia hay que administrar FVIII junto a la primera infusión de FvW. En la actualidad se está desarrollando una preparación de FvW de origen recombinante, que aunque todavía no está disponible para su empleo en humanos, contiene un amplio espectro de multímeros y niveles adecuados de antígeno y funcionales.

Factor VII

La indicación clínica de este producto es para el tratamiento o profilaxis de sangrado en situaciones de riesgo, de pacientes con deficiencias congénitas de factor VII y niveles de FVII:C por debajo del 25 %. No obs-

tante, el empleo de forma satisfactoria del rFVIIa en este contexto¹⁵ lleva a considerar como adecuado el empleo de este producto en este tipo de pacientes. El factor VII derivado de plasma, a diferencia del rFVIIa no contiene FVII activo, por lo que no debe ser administrado en pacientes con hemofilia A y B e inhibidores.

Factor XIII

Los concentrados de factor XIII se utilizan como tratamiento sustitutivo para el sangrado de pacientes con déficit congénito de factor XIII, favoreciendo también la cicatrización de heridas en estos enfermos. Debido a la larga vida media del FXIII infundido (11-14 días), estos concentrados pueden ser infundidos a intervalos largos de tiempo (20-30 días). Se han llevado ya estudios de fase 1 de una preparación de FXIII recombinante en personas sanas¹⁶.

Concentrados de proteína C

Desde el año 2001 la Agencia Europea del Medicamento ha aprobado el uso de concentrados de proteína C como terapia de sustitución en pacientes con problemas severos de coagulación ligados a una deficiencia congénita de proteína C. No se debe confundir este hemoderivado, con los concentrados de proteína C activada de origen recombinante, cuya indicación es la reducción de la mortalidad por sepsis grave asociada a fallo orgánico en adultos con riesgo elevado de muerte (índice APACHE II \geq 25).

Sistema adhesivo de fibrina

El término sistema hemostático de fibrina se refiere a un producto que contiene factores de coagulación a ser administrados de forma local para producir un coágulo de fibrina. De forma típica, el sistema adhesivo de fibrina consiste en al menos dos componentes, uno de ellos fibrinógeno con/sin FXIII y/o aprotinina, y el otro trombina, que se mantienen separados hasta que su mezcla, en presencia de calcio, induce la formación de fibrina. El sistema adhesivo de fibrina se ha venido empleando en los últimos 30 años, y cada vez su uso se expande, al haberse demostrado una reducción significativa de pérdida sanguínea en el período perioperatorio, en la exposición a sangre alogénica, y en la cantidad de sangre transfundida¹⁷. Sin embargo, al no haberse observado beneficios en otros eventos clínicamente importantes, como en mortalidad, reintervención, tiempo de hospitalización, infecciones de la herida o eventos adversos, este producto no debe ser empleado como un sustituto a las medidas quirúrgicas hemostáticas. En concreto, este producto está indicado en situaciones donde: *a*) existe un deficiente sistema coagulativo en el paciente; *b*) no es posible la aplicación de presión mecánica; *c*) tejidos difíciles de suturar (p. ej., el pulmón o el hígado), y *d*) es crítico una adecuada hemostasia (p. ej., cerebro) (www.emea.eu.int).

Inhibidores de proteasas

El plasma humano contiene una gran variedad de inhibidores de proteasas designadas para inhibir, o modular, la activación de la coagulación, la fibrinólisis, la activación del complemento, y otras funciones. Se dispone comercialmente de tres inhibidores de proteasas aislados del plasma que tienen importantes aplicaciones clínicas. Estos incluyen la antitrombina, el inhibidor de C1-esterasa, y el α_1 -antitripsina.

Antitrombina

El concentrado de antitrombina es un derivado del plasma humano sometido a inactivación viral, habiéndose también desarrollado una nueva preparación de antitrombina obtenida por tecnología recombinante²⁰. Los concentrados de antitrombina se administran en pacientes con deficiencias congénitas de antitrombina y situaciones como en trombosis establecida, en el período periparto, o en cirugías. En deficiencias adquiridas de antitrombina su empleo es más controvertido, existiendo pocos estudios clínicos realizados en este contexto. Así, existen dos ensayos clínicos controlados en pacientes con shock séptico, en los que o bien se muestra un beneficio de este tratamiento en la reducción de la mortalidad¹⁹, o se objetiva un incremento en el riesgo de hemorragia si este se administra junto a heparina²⁰.

Inhibidor C1-esterasa

El inhibidor de C1-esterasa limita la actividad de la esterasa C1 en la activación del complemento; una deficiencia de este factor se asocia con angioedema hereditario. La transfusión del inhibidor de C1-esterasa (o de plasma fresco congelado) es eficaz para el tratamiento de emergencia del edema de glotis.

α_1 -antitripsina

La α_1 -antitripsina preparada del plasma humano ha sido empleada para tratar el defecto autosómico caracterizado por enfisema panacinar y enfermedad hepática. La escasa disponibilidad de este derivado plasmático ha llevado al desarrollo de este agente antiinflamatorio por tecnología recombinante y a su aplicación en otras enfermedades, bien de forma tópica en la psoriasis o en la dermatitis atópica, o en forma de aerosol en enfermedades respiratorias como el enfisema o el asma.

Conclusiones

Los nuevos métodos de producción de los derivados plasmáticos han proporcionado productos de mayor pureza, a la vez de que la tecnología de inactivación vírica ha resultado en compuestos más seguros. A pesar de que las tendencias terapéuticas actuales se dirigen al empleo de agentes obtenidos mediante tec-

nología de recombinación genética, por una parte existen productos que difícilmente podrán ser desplazados por alternativas recombinantes, y por otra parte, la capacidad de producción de éstos limita la capacidad de satisfacer las demandas existentes. Por ello, continua siendo imprescindible el fraccionamiento de todos los productos derivados del plasma. Adicionalmente, en su empleo deben considerarse razones como coste, disponibilidad, aspectos relacionados con la seguridad y la existencia de evidencia que establezca la eficacia de estos derivados en situaciones clínicas específicas.

Bibliografía

1. Soutar RL, Jobanputra S, Tait RC. A two-phase audit of fresh frozen plasma: a regional approach. *Transfus Med.* 2004;14:75-6.
2. Luk C, Eckert KM, Barr RM, Chin-Yee IH. Prospective audit of the use of fresh-frozen plasma, based on Canadian Medical Association transfusion guidelines. *Can Med Assoc J.* 2002;166:1539-40.
3. Kakkar N, Kaur R, Dhanoa J. Improvement in fresh frozen plasma transfusion practice: results of an outcome audit. *Transfus Med.* 2004;14:231-5.
4. Pita-Ramírez L, Cabrera CBE, Ortega ZC. Motivos de transfusión de plasma fresco congelado en un hospital general. *Rev Med Hosp Gen Mex.* 1999;51:89-92.
5. O'Shaughnessy DE, Atterbury C, Bolton Maggs P, Murphy M, Thomas D, Yates S, et al. Guidelines for the use of fresh-frozen plasma, cryoprecipitate and cryosupernatant. *Br J Haematol.* 2004;126:11-28.
6. Cochrane Injuries Group Albumin Reviewers. Human albumin administration in critically ill patients: systematic review of randomised controlled trials. *BMJ.* 1998;317:235-40.
7. Wilkes MM, Navickis RJ. Patient survival after human albumin administration: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Ann Intern Med.* 2001;135:149-64.
8. Mannucci M, Duga S, Peyvandi F. Recessively inherited coagulation disorders. *Blood.* 2004;104:1243-52.
9. Wilde JT. Evidence for the use of activated prothrombin complex concentrates (aPCCs) in the treatment of patients with haemophilia and inhibitors. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2002;32 Suppl 1:9-12.
10. Mannucci PM. Hemophilia: treatment options in the twenty-first century. *J Tromb Haemost.* 2003;1:1349-55.
11. Poon MC, Lillicrap D, Hensman C, et al. Recombinant factor IX recovery and inhibitor safety: a Canadian post-licensure surveillance study. *Thromb Haemost.* 2002;87:431-5.
12. Mauser-Bunschoten EP, Van der Born JG, Bongers M, et al. Purity of factor VIII product and incidence of inhibitors in previously untreated patients with haemophilia A. *Haemophilia.* 2001;7:364-8.
13. Behrmann M, Pasi J, Saint-Remy JM, Kotitschke R, Kloft M. Von Willebrand factor modulates factor VIII immunogenicity: comparative study of different factor VIII concentrates in a haemophilia A mouse model. *Thromb Haemost.* 2002;88:221-9.
14. Auerswald G, Spranger T, Brackmann HH. The role of plasma-derived factor VIII/von Willebrand factor concentrates in the treatment of hemophilia A patients. *Haematologica.* 2003;88 Suppl 9:21-5.
15. Mariani G, Testa MG, Di Paolantonio T, Molskov Bech R, Hedner U. Use of recombinant, activated factor VII in the treatment of congenital factor VII deficiencies. *Vox Sang.* 1999;77:131-6.

16. Lovejoy AE, Reynolds TC, Butine MD, Visich JE, Ishak LM, Belvedere MA, et al. Safety and pharmacokinetics of recombinant factor XIII in patients with congenital factor XIII deficiency. [abstract]. *Blood*. 2003;102:307a.
17. Carless PA, Anthony DM, Henry DA. Systematic review of the use of fibrin sealant to minimize perioperative allogeneic blood transfusion. *Br J Surg*. 2002;89:695-703.
18. Edmunds T, Van Patten SM, Pollock J, Hanson E, Bernasconi R, Higgins E, et al. Transgenically produced human antithrombin: structural and functional comparison to human plasma-derived antithrombin. *Blood*. 1998;91:4561-71.
19. Fourrier F, Jourdain M, Tournays A. Clinical trial results with antithrombin III in sepsis. *Crit Care Med*. 2000;28 Suppl: 38-43.
20. Warren BL, Eid A, Singer P, Pillay SS, Carl P, Novak I, et al. High-dose antithrombin III in severe sepsis: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2001;286:1869-78.

Patogenia, diagnóstico y tratamiento de la púrpura trombótica trombocitopénica

A. PEREIRA SAAVEDRA

Servicio de Hemoterapia y Hemostasia. Hospital Clínico. Barcelona.

Introducción

La púrpura trombótica trombocitopénica (PTT) es un síndrome hematológico caracterizado por trombocitopenia y anemia microangiopática, con formación de trombos de predominio plaquetario en la microcirculación que pueden dar lugar a manifestaciones isquémicas en diversos órganos y tejidos, siendo típicas las del sistema nervioso central. El diagnóstico es clínico-hematológico y debe sospecharse ante la combinación de trombocitopenia y anemia con esquistocitos en la extensión de sangre que no se expliquen por otras causas. El tratamiento de elección es el recambio plasmático masivo con infusión de plasma fresco.

La PTT puede ser idiopática, que es lo más común, o secundaria a otros procesos. En este último caso las asociaciones más frecuentes se dan con la ingesta de ciertos fármacos (ciclosporina, tacrolimus, citostáticos, quinina, ticlopidina, clopidogrel, etc.), la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el trasplante alogénico de médula ósea y el embarazo o el parto. Existe una forma familiar que es poco frecuente y que suele manifestarse en la infancia y adoptar un curso crónico recidivante. El síndrome urémico hemolítico (SUH) es una entidad próxima a la PTT en la que el fenómeno trombótico se circunscribe a la microcirculación renal. En comparación con la PTT, en el SUH predomina la insuficiencia renal, los síntomas neurológicos son menos frecuentes, la trombocitopenia no es tan intensa y la respues-

ta al recambio plasmático es más incierta. En esta clase del curso educacional se revisarán las características más destacadas de la PTT idiopática y se presentarán los últimos avances que se han producido en el conocimiento de la patogenia y en el tratamiento de esta rara entidad.

Etiopatogenia y fisiopatología

Los hallazgos anatomopatológicos característicos de la PTT consisten en un engrosamiento del endotelio de las arteriolas terminales y de los capilares, con formación de trombos hialinos intraluminales, sin que se observe el infiltrado celular perivascular que es típico de las vasculitis. La inmunohistoquímica muestra que los trombos son ricos en plaquetas y factor von Willebrand (FvW) y pobres en fibrina¹.

Se han postulado diferentes mecanismos patogénicos para explicar la trombosis de predominio plaquetario típica de la PTT (tabla 1). La mayoría de estos mecanismos se basan en hallazgos de laboratorio o en experimentos *in vitro* con plasma de pacientes y resulta difícil distinguir si lo observado posee una relación causal con la enfermedad o es simplemente un epifenómeno. No obstante, el conjunto de estas observaciones apunta a una secuencia patogénica en la que existiría una lesión o sobrestimulación del endotelio de los pequeños vasos que, en presencia de algún factor o factores favorecedores, daría lugar a la trombosis de predominio plaquetario. Los esquistocitos se forman por fragmentación de los hematíes en las zonas de flujo turbulento adyacentes a los trombos plaquetarios. Estos últimos pueden dar lugar a síntomas y signos neurológicos de origen isquémico, que típicamente son fluctuantes, o a manifestaciones en cualquier otro órgano, como el intestino, el páncreas o el riñón. De hecho, los estudios necrópsicos muestran que la trombosis microvascular afecta a múltiples órganos y tejidos, incluso aunque los síntomas hayan sido exclusivamente neurológicos. La trombocitopenia se debe al consumo acelerado de plaquetas en esta microtrombosis difusa. Por su parte, la lactato deshidrogenasa (LDH) sérica está muy elevada como consecuencia tanto de la hemólisis como de su liberación desde las zonas isquémicas.

Tabla 1. Mecanismos patogénicos postulados para la PTT

Déficit de prostaciclina
Autoanticuerpos contra la glucoproteína IV plaquetaria (CD 36)
Defectos de la fibrinólisis
Factor plasmático agregante plaquetario (p37)
Factor plasmático que induce apoptosis de la célula endotelial
Factor plasmático que induce activación de granulocitos y monocitos
Autoanticuerpos anticélula endotelial
Toxinas activadoras del endotelio
ULvWFM y déficit de ADAMTS-13

PTT: púrpura trombótica trombocitopénica.

ADAMTS-13, factor de von Willebrand y PTT

En 1982 Joel Moake comunicó 4 casos de PTT recidivante que, en las fases tempranas de los episodios, presentaban en el plasma multímeros del FvW de peso molecular extraordinariamente alto (ULvWFM o *Ultra-Large von Willebrand Factor Multimers*), similares a los que se encuentran en los depósitos intraendoteliales de este factor². Estos multímeros de gran peso molecular confieren al FvW una mayor afinidad por la subunidad I α del complejo glucoproteico Ib-IX de las plaquetas, lo que los convierte en proagregantes plaquetarios en condiciones de flujo con alto coeficiente de cizallamiento como las que se dan en las arteriolas terminales³. Moake postuló que la presencia de ULvWFM se debería a un déficit en el procesamiento enzimático del FvW recién secretado y que podrían desempeñar un papel patogénico en la PTT. Quince años después, Furlan et al en Berna^{4,5} y Tsai y Lian⁶ en Nueva York describieron algunos pacientes con PTT que presentaban un déficit de la metaloproteasa encargada de degradar los ULvWFM. La actividad metaloproteasa se normalizaba cuando la enfermedad entraba en remisión. En algunos casos, el déficit se debía a la aparición transitoria de autoanticuerpos inhibidores de clase IgG. La metaloproteasa del FvW fue posteriormente caracterizada como la número 13 de una familia de enzimas que poseen en común una actividad proteasa dependiente de cationes metálicas y una estructura con 8 dominios similares a la trombospodina, por lo que recibió el nombre de ADAMTS-13 (*a disintegrin and metalloprotease with eight thrombospondin-1-like domains*). Estos estudios y otros muchos que les han seguido han permitido construir una de las hipótesis más robustas sobre la patogenia de la PTT⁷⁻¹⁰. En condiciones normales, el FvW es secretado desde los cuerpos de Weibel-Palade hacia la matriz subendotelial donde desempeña su función hemostática fisiológica. Parte de él, al parecer unido a la P-selectina, pasa a la región luminal del vaso sanguíneo donde se adhiere a la membrana de la célula endotelial. Aquí, la ADAMTS-13 degrada los ULvWFM mediante la hidrólisis específica del enlace peptídico 842Tyr-843Met de algunas subunidades monoméricas del FvW. Cuando existe un déficit grave de ADAMTS-13 esta hidrólisis no tiene lugar y los ULvWFM permanecen sobre la superficie del endotelio, expuestos al flujo sanguíneo, donde capturan las plaquetas circulantes a través del complejo glucoproteico Ib-IX. La unión de nuevas plaquetas a este tapón inicial da lugar a un trombo plaquetario que puede llegar a ocluir el vaso o romperse y embolizar distalmente. Desde 1998 se han publicado más de 150 artículos sobre el significado de la ADAMTS-13 en la patogenia y la evolución de la PTT (revisado por Sadler⁹, Fontana¹¹ y George¹²). Los hallazgos más significativos pueden resumirse en las siguientes conclusiones:

1. Una mayoría de pacientes con PTT idiopática "típica" presentan un déficit grave (actividad < 5 %) de ADAMTS-13 en el plasma. En cambio, en el SUH o en la PTT postrasplante de médula ósea la

actividad ADAMTS-13 es normal o está sólo discretamente disminuida.

2. Los pacientes con PTT idiopática y déficit grave de ADAMTS-13 responden al recambio plasmático con más facilidad que aquellos en quienes los niveles de ADAMTS-13 son normales o están sólo discretamente disminuidos.
3. En la PTT familiar existe un déficit grave de ADAMTS-13 como consecuencia de mutaciones homocigotas o heterocigotas dobles en los alelos del cromosoma 9q34 que codifican la ADAMTS-13.
4. Los pacientes con PTT y déficit de ADAMTS-13 secundario a autoanticuerpos inhibidores de alta titulación responden peor al recambio plasmático y presentan una mayor probabilidad de recidiva que aquellos que carecen de inhibidor o en los que éste es de baja titulación.

No obstante lo anterior, la asociación entre el déficit de ADAMTS-13, con o sin presencia de anticuerpos inhibidores, y el curso clínico de la PTT dista de ser lo suficientemente sólida como para basar el pronóstico y las decisiones terapéuticas en este marcador biológico. Por una parte, muchas de las comunicaciones corresponden a observaciones aisladas o de pequeñas series de pacientes, y es posible que hayan existido sesgos de selección y publicación a favor de los resultados que concordaban con las expectativas previas. Además, la determinación de la ADAMTS-13 no está aún estandarizada y pueden darse diferencias entre laboratorios, aunque parece existir un grado de concordancia bastante alto. Por otra parte, en algunas series amplias de pacientes con PTT se ha visto que la presencia de déficit grave de ADAMTS-13 no se asocia con diferencias en la presentación clínica de la enfermedad, que este dato biológico no permite predecir la respuesta al recambio plasmático, y que no todos los pacientes con inhibidores de alta titulación presentan recidivas^{13,14}. Por último, el estudio de los pedigrís de pacientes con PTT familiar ha demostrado que existen individuos con déficit grave de ADAMTS-13 que han vivido muchos años, o incluso toda su vida, sin haber presentado la enfermedad⁹.

Es evidente, pues, que el déficit grave de ADAMTS-13 no es condición necesaria ni suficiente para que aparezca el síndrome clínico de la PTT. Los datos de que disponemos hasta ahora sugieren que el déficit de ADAMTS-13 constituiría un factor predisponente para la PTT, seguramente no el único, y que sería necesaria la concurrencia de otros factores para que se desencadenase la enfermedad. Así, procesos que cursan con la liberación de sustancias estimulantes del endotelio, como histamina, factor de necrosis tisular α (TNF- α), diversas interleucinas, etc., y que habitualmente no desencadenan la enfermedad, serían capaces de producir la PTT cuando existiera un déficit permanente o transitorio de ADAMTS-13 que impidiese el procesamiento normal de los ULvWFM liberados en exceso por la estimulación del endotelio. Es muy posible, pues, que la etiopatogenia de PTT remede la de la trombosis vascular, donde existen factores biológicos predisponentes (déficit de antitrombina III, mu-

tación Leiden del factor V, mutación G20210A del gen de la protrombina, etc.) que requieren de un desencadenante (estasis, cirugía, embarazo, anticuerpos antifosfolípido, etc.) para que aparezca la enfermedad clínica.

Diagnóstico

Cómo se ha comentado, el diagnóstico de la PTT es clínico-hematológico y debe sospecharse ante cualquier paciente que se presente con trombocitopenia y anemia microangiopática (con esquistocitos en la extensión de sangre periférica) que no se expliquen por otras causas. La mitad de los pacientes no presentan manifestaciones neurológicas inicialmente, los signos de afección renal son infrecuentes y la fiebre es rara. El test de Coombs es negativo y el resultado de las pruebas de coagulación plasmática suele ser normal. La marcada elevación de la LDH sérica, muy superior a la que suele verse en la hemólisis autoinmune, debe alertar sobre la posibilidad de una PTT. Puesto que no existe una prueba diagnóstica patognomónica, es obligado hacer un diagnóstico diferencial cuidadoso con otras entidades que puedan confundirse con la PTT, sobre todo con aquellas que posean un tratamiento específico (tabla 2).

Tratamiento

El tratamiento estándar de la PTT es el recambio plasmático masivo con infusión de plasma fresco como fluido de reposición (revisado recientemente por Fontana¹¹, George¹⁵ y Rock¹⁶). El volumen de plasma infundido en cada proceso ha de ser elevado (≥ 40 ml/kg) y los procesos han de realizarse a diario, sin interrupción, hasta conseguir una remisión estable. Algunos autores recomiendan que la retirada de los recambios sea paulatina con el fin de disminuir el riesgo de recidivas tempranas. No es raro que la interrupción del tratamiento antes de que se haya alcanzado una remisión estable se siga inmediatamente de una recurren-

cia de la PTT. Es muy frecuente que se añadan corticoides a dosis de 1-2 mg/kg, que se retirarán de modo escalonado tras haberse alcanzado la remisión. No está claro si la adición de vincristina al tratamiento inicial ofrece alguna ventaja, aunque una revisión reciente parece apuntar una mayor tasa de remisiones sostenidas¹⁷. El tratamiento con recambio plasmático debe instaurarse lo más pronto posible, pues el retraso en el inicio de esta terapéutica influye negativamente sobre el pronóstico¹⁸. La progresión a estupor o a coma constituye un signo ominoso que augura un desenlace fatal¹⁸. Cuando no sea posible iniciar los recambios de inmediato estará indicada la infusión de plasma fresco a las dosis más altas que pueda tolerar el paciente (p. ej., 15-20 ml/kg/día).

Con este esquema terapéutico se consigue una remisión sostenida en el 75-80 % de los pacientes. Típicamente, la cifra de plaquetas empieza a subir entre el tercer y el séptimo recambio plasmático, se alcanza la remisión entre el sexto y el onceavo y puede suspenderse el tratamiento o iniciar su retirada progresiva tras varios recambios adicionales. El retraso en el inicio de la respuesta o la aparición de recurrencias auguran que el recambio plasmático solo no va a ser suficiente para producir la remisión, por lo que deberá añadirse algún tratamiento coadyuvante^{18,19}. Entre éstos, el más extendido es la infusión de vincristina a dosis de 1,4 mg/m² (máximo 2 mg), que se repite al cabo de unos días. No está claro cuál es la mejor actitud terapéutica ante los pacientes que no responden a este esquema, si bien existe un cierto consenso sobre la eficacia de la esplenectomía, seguida a veces de una nueva serie de recambios plasmáticos, para rescatar a algunos de estos pacientes.

El plasma sobrenadante de crioprecipitado es igual de eficaz que el plasma fresco congelado para el tratamiento de la PTT²⁰. Algunos estudios con series cortas de pacientes parecen indicar que el plasma inactivado para virus con solvente-detergente es tan efectivo como el plasma fresco. En cuanto al plasma inactivado con azul de metileno, dos estudios realizados en nuestro país encontraron que este producto es menos eficaz que el plasma fresco^{21,22}. Cuando se compararon con series históricas de pacientes tratados con plasma fresco congelado, los que habían recibido plasma inactivado con azul de metileno alcanzaron la remisión más tarde, presentaron más recurrencias, los ingresos hospitalarios fueron más prolongados, la probabilidad de remisión disminuyó y la mortalidad debida a PTT resistente fue más elevada.

El recambio plasmático masivo es un tratamiento agresivo que no está exento de morbilidad y mortalidad. En la serie del registro de Oklahoma, que incluye 149 pacientes tratados entre 1996 y 2002, 54 (28 %) presentaron complicaciones importantes y tres (2 %) fallecieron como consecuencia directa del tratamiento (la mayoría por problemas relacionados con la inserción de catéteres centrales)¹¹. En la experiencia del autor de esta revisión, que ha participado directamente en el tratamiento de más de 40 casos de PTT-SUH, el único fallecimiento atribuible al recambio plasmático ocurrió como consecuencia de un hematoma rápi-

Tabla 2. Diagnóstico diferencial de la PTT

Enfermedades hipertensivas del embarazo
Síndrome antifosfolípido
Válvulas cardíacas disfuncionantes
Prótesis intravasculares
Hipertensión maligna
Crisis renal de la esclerodermia
Carcinomatosis diseminada
Aspergilosis diseminada (en TMO)
Coagulación intravascular diseminada

PTT: púrpura trombótica trombocitopénica; TMO: trasplante de médula ósea.

damente disecante tras la colocación de un catéter central por vía yugular. Desde entonces, cuando se requiere un acceso venoso central para el recambio plasmático, se coloca bajo control angiorradiológico y profilaxis con transfusión de plaquetas. Nunca hemos observado un agravamiento brusco de la PTT atribuible a la transfusión de plaquetas.

La mayoría de los pacientes que alcanzan la remisión pueden considerarse curados. Algunos presentan una o dos recaídas, típicamente en los meses siguientes al primer episodio, aunque pueden ser más tardías, y que habitualmente responden al mismo esquema terapéutico que se empleó en el episodio inicial. En una minoría de pacientes, la PTT adopta un curso recidivante, con repetidas recaídas tras el primer episodio. Esta forma evolutiva parece asociarse a la persistencia tras las remisiones de ULvWFM, déficit de ADAMTS-13 y anticuerpos inhibidores de esta metaloproteasa, si bien la asociación no es tan fuerte como para que estos parámetros biológicos sirvan, de momento, para indicar alguna terapéutica de mantenimiento. La esplenectomía es la única medida que ha demostrado ser eficaz en la PTT recidivante. Antes de recurrir a este tratamiento quirúrgico conviene descartar la existencia de factores precipitantes de las recaídas, como infecciones o exposición repetida a compuestos quinados (p. ej., bebidas tónicas).

En los dos últimos años se han comunicado algunos casos de PTT refractaria o recidivante en los que se ensayó con éxito el rituximab. La mayoría de estas comunicaciones corresponden a casos aislados o series cortas de pacientes que habían recibido otros tratamientos además del rituximab, por lo que es difícil extraer alguna conclusión firme. En la mayoría de los casos comunicados se había demostrado la existencia de anticuerpos inhibidores contra la ADAMTS-13 y el rituximab fue efectivo después de varias tandas semanales.

Bibliografía

1. Kwaan HC. Clinicopathological features in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol.* 1987;24:101-9.
2. Moake JL, Rudy CK, Troll JH, Weinstein MJ, Colannine NM, Azocar J, et al. Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med.* 1982;307:1432-5.
3. Moake JL, Turner NA, Stathopoulos NA, Nolasco LH, Hellums JD. Involvement of large plasma von Willebrand factor (vWF) multimers and unusually large vWF forms derived from endothelial cells in shear stress-induced platelet aggregation. *J Clin Invest.* 1986;78:1456-61.
4. Furlan M, Robles R, Solenthaler M, Wassmer N, Sandoz P, Lämmle B. Deficient activity of von Willebrand factor-cleaving protease in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 1997;89:3097-103.
5. Furlan M, Robles R, Galbusera M, Remuzzi G, Kyrle PA, Brenner B, et al. Von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med.* 1998;339:1578-84.
6. Tsai HM, Lian ECY. Antibodies of von Willebrand factor cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med.* 1998;339:1585-94.
7. Lopez JA, Dang JF. Cleavage of von Willebrand factor by ADAMTS-13 on endothelial cells. *Semin Hematol.* 2004;41:15-23.
8. Moake JL. Von Willebrand factor, ADAMTS-13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol.* 2004;41:4-14.
9. Sadler JE, Moake JL, Miyata T, George JN. Recent advances in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hematology.* 2004. p. 407-23.
10. Tsai HM. Molecular mechanisms in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Semin Thromb Hemost.* 2004;30:549-57.
11. Fontana S, Hovinga JAK, Studt J-D, Alverio L, Lämmle B, Telegani BM, et al. Plasma therapy in thrombotic thrombocytopenic purpura: review of the literatura and the Bern experience in a subgroup of patients with severe acquired ADAMTS-13 deficiency. *Semin Hematol.* 2004;41:48-59.
12. George JN, Vaseley SK, Terrell DR. The Oklahoma thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome (TTP-HUS): a community perspective of patients clinically diagnosed of TTP-HUS. *Semin Hematol.* 2004;41:60-7.
13. Peyvandli F, Ferrari S, Lavoretano S, Canciani MT, Mannucci PM. Von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13) and ADAMTS-13 neutralizing autoantibodies in 100 patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol.* 2004;127:433-9.
14. Vesely SK, George JN, Lämmle B, Studt JD, Alberio L, El-Harake MA, et al. ADAMTS13 activity in thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome: relation to presenting findings and clinical outcomes in a prospective cohort of 142 patients. *Blood.* 2003;102:60-8.
15. George JN. How I treat patients with thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. *Blood.* 2000;96:1223-9.
16. Rock G, Porta C, Bobbio-Pallavicini E. Thrombotic thrombocytopenic purpura treatment in year 2000. *Hematologica.* 2000;85:410-9.
17. Ziman A, Mitri M, Klapper E, Pepkowits SH, Goldfinger D. Combination vincristine and plasma exchange as initial therapy in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura: one institution's experience and review of the literature. *Transfusion.* 2005;45:41-9.
18. Pereira A, Mazzara R, Monteagudo J, Sanz C, Puig L, Martínez A, et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura/hemolytic uremic syndrome: a multivariate analysis of factors predicting the response to plasma exchange. *Ann Hematol.* 1995;70:319-23.
19. Henon P. Traitement du purpura thrombotique thrombopénique: résultats d'une étude clinique randomisée. *Presse Med.* 1991;20:1761-7.
20. Rock G, Anderson D, Clark W, Leblond P, Palmer D, Sternbach M, et al. Does cryosupernatant plasma improve outcome in thrombotic thrombocytopenic purpura? No answer yet. *Br J Haematol.* 2005;129:79-86.
21. de la Rubia J, Arriaga F, Linares D, Larrea L, Carpio N, Marty ML, et al. Role of methylene blue-treated or fresh-frozen plasma in the response to plasma exchange in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol.* 2001;114:721-3.
22. Álvarez-Larrán A, Del Río J, Ramírez C, Albó C, Pena F, Campos A, et al. Methylene blue-photoinactivated plasma versus fresh-frozen plasma as replacement fluid for plasma exchange in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Vox Sang.* 2004;86:246-51.

Coagulación intravascular diseminada. Un viejo concepto para un hecho clínico complejo

J. MATEO ARRANZ Y J. FONTCUBERTA BOJ

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

Introducción

La coagulación intravascular diseminada (CID) se caracteriza por la activación global de la coagulación que resulta en la formación de fibrina y en la oclusión

Tabla 1. Enfermedades que pueden asociarse a coagulación intravascular diseminada

<i>Infecciones (potencialmente todas)</i>
Gramnegativos (<i>Neisseria meningitidis</i> , enterobacterias, <i>Salmonella</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Pseudomona</i>)
Grampositivos (<i>Staphylococcus pneumoniae</i> , estafilococos)
Anaerobios (<i>Clostridia</i>)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , rickettsias
Hongos (<i>Aspergillus</i> , histoplasma, <i>Candida</i>)
Virus (varicela, citomegalovirus, hepatitis, rubéola)
Protozoos (<i>Plasmodium falciparum</i>)
<i>Neoplasias malignas</i>
Tumores sólidos (adenocarcinomas, linfomas)
Leucemias (cualquier tipo, pero especialmente promielocítica)
<i>Complicaciones obstétricas</i>
Embolia de líquido amniótico, <i>abrutio placentae</i> , rotura uterina, eclampsia, feto muerto retenido, óbito fetal, aborto séptico
<i>Insuficiencia hepática</i>
Hepatitis aguda fulminante, <i>shunt</i> de LeVeen, <i>HELLP syndrome</i> , hígado graso del embarazo, cirrosis, síndrome de Reye
<i>Daño tisular</i>
Traumatismos (craneoencefálicos, aplastamientos)
Grandes quemados
Hipertermia, hipotermia, asfixia, rabdomiólisis, electrocución, etc.
<i>Reacciones inmunitarias intravasculares</i>
Anafilaxia, reacciones hemolíticas transfusionales, rechazo trasplante renal, reacciones a fármacos, etc.
<i>Enfermedades vasculares</i>
Hemangiomas gigantes, tumores vasculares, aneurismas aórticos, cirugía vascular, tumores y trombos intracardíacos, hipertensión maligna, vasculitis, etc.
<i>Dispositivos artificiales</i>
Cirugía con <i>bypass</i> cardiopulmonar, asistencia ventricular, balón de contrapulsación aórtico
<i>Fármacos</i>
Concentrados de factor IX y de complejo protrombínico, anticoagulantes orales (en caso de déficit de proteína C o S)
<i>Miscelánea</i>
Déficit congénito homocigoto de proteína C o S, pancreatitis, síndrome de distrés respiratorio, etc.
<i>Venenos y toxinas</i>

trombótica de vasos de mediano y pequeño calibre¹. La coagulación intravascular compromete el aporte de sangre a los tejidos que, junto a la alteración hemodinámica y metabólica, contribuye a la insuficiencia de múltiples órganos. Simultáneamente, el consumo de factores de la coagulación y plaquetas causan manifestaciones hemorrágicas. La CID sucede en aproximadamente 1 de cada 1.000 pacientes hospitalizados. Se presenta como complicación en situaciones clínicas muy concretas e implica que pacientes con entidades tratables, sufran complicaciones críticas o mortales como consecuencia de la disfunción de múltiples órganos (fallo multiorgánico [FMO]). La lesión tisular es el resultado de una activación incontrolada del sistema hemostático y de los procesos inflamatorios. La terminología empleada puede ser confusa: los términos CID, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) y FMO cubren un número de entidades estrechamente relacionadas y con frecuencia se emplean de manera indiscriminada. La CID y el SRIS, sin embargo, son conceptos fisiopatológicos mientras que el FMO describe el resultado de los procesos².

Factores etiológicos

La CID se asocia a entidades clínicas bien definidas y es una respuesta del organismo frente al agente causal. Puede existir una acción directa sobre el sistema hemostático (toxinas y venenos de animales, superficies artificiales, etc.). Dependiendo de la magnitud y la velocidad de la activación del sistema coagulativo, puede ser aguda y muy grave, o cursar de forma crónica, con manifestaciones trombóticas o hemorragias leves o ausentes³. La CID se puede asociar a la sepsis, a neoplasias malignas, complicaciones obstétricas, hepatopatías y politraumatismos (tabla 1). En estas situaciones la CID es más pronunciada si existen, además, hipotensión, acidosis, hipoxemia o *shock*.

Fisiopatología

En la CID, la formación sistémica de fibrina se produce porque existe un exceso de generación de trom-

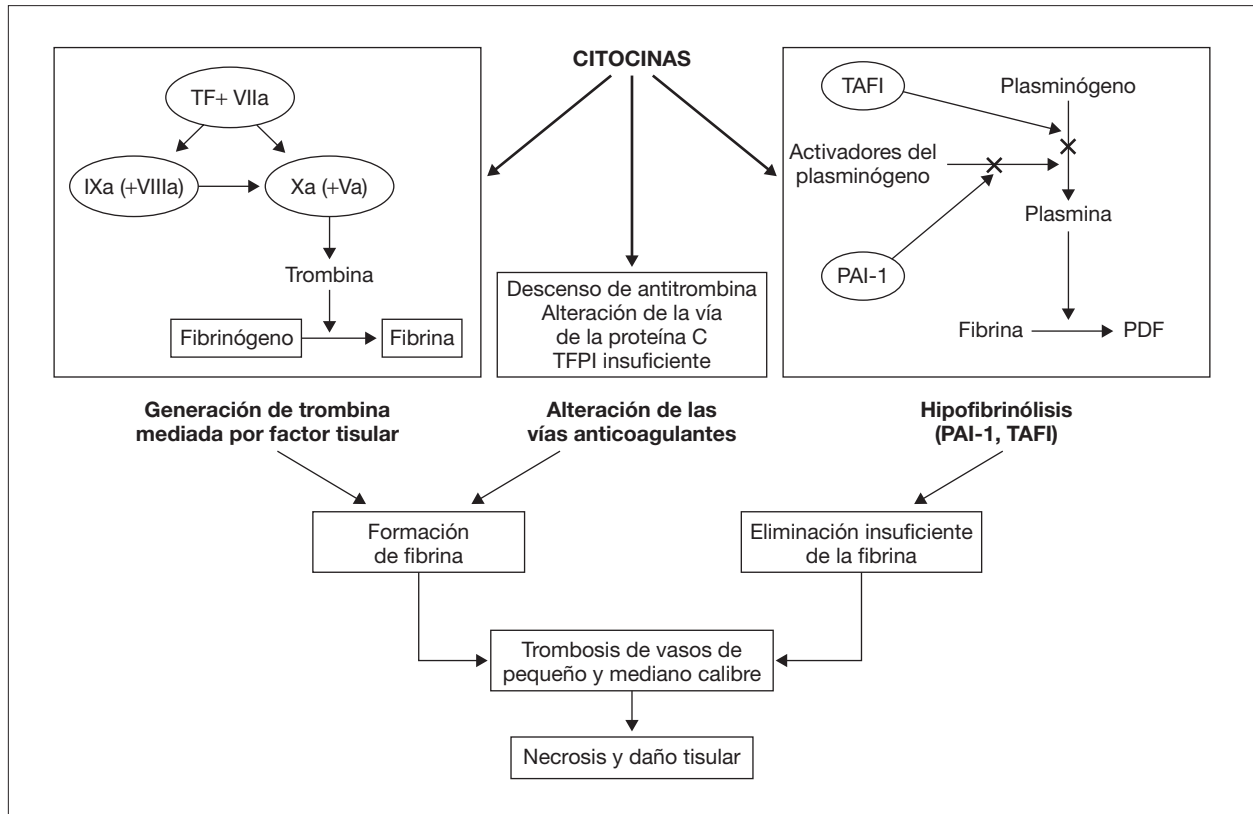


Figura 1. Vías patológicas implicadas en la CID. En la CID, la fibrina se forma como resultado de la generación de trombina mediada por el factor tisular (TF). El TF se une al factor VII y lo activa. El complejo FVIIa/TF activa directamente el FX o indirectamente a través de la activación del FIXa (+ FVIIIa). El complejo FXa/FVa genera trombina a partir de protrombina. Simultáneamente, las vías anticoagulantes (antitrombina, TFPI y sistema de la proteína C) están alteradas. La formación de fibrina intravascular no está equilibrada con la adecuada eliminación porque la fibrinólisis está disminuida por niveles elevados de PAI-1 y aumento de TAFI. La combinación de un aumento de la formación de fibrina con una eliminación inadecuada ocasiona trombosis intravascular y lesión tisular.

bina, una supresión simultánea de los mecanismos anticoagulantes fisiológicos y una eliminación retardada de la fibrina por alteración de la fibrinólisis (fig. 1)¹. Estas alteraciones están mediadas por varias citocinas proinflamatorias. Las más importantes parecen ser la interleucina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α). En la CID secundaria a infecciones, la endotoxina induce la síntesis y liberación de IL-1 y el TNF. Estas citocinas estimulan la síntesis y expresión de factor tisular en los monocitos y en las células endoteliales. El factor tisular es el principal iniciador de las reacciones de la coagulación en estas circunstancias. El hecho central en la CID es la generación incontrolada de trombina. El consumo de los inhibidores fisiológicos, puede ocasionar un incremento de la coagulación y fibrinólisis con la imposibilidad de restringir estos procesos a los lugares de la lesión vascular. El exceso de trombina produce: disminución de los factores que son sustratos de esta enzima (factores V, VIII, XIII, fibrinógeno), activación y agregación de las plaquetas, y liberación de t-PA endotelial. En presencia de monómeros de fibrina soluble, se forma plasmina a partir del plasminógeno, lo que resulta en una hiperfibrinólisis secundaria. La generación anormal de proteasas produce una alteración de otros sistemas^{1,3,4}.

Mecanismo de inicio

La CID se inicia cuando fracasan los mecanismos que limitan la generación de trombina a las zonas donde es necesaria. La vía predominante de la activación de la coagulación en la CID está mediada por el factor tisular. Existen tejidos que expresan constitutivamente factor tisular que en condiciones normales no están expuestos a la sangre: adventicia de los vasos sanguíneos, mucosas, piel, tejido nervioso, glomérulo renal, líquido amniótico⁵. La exposición del factor tisular puede ocurrir por traumatismo (sobre todo encefálico), problemas obstétricos o daño endotelial difuso. El factor tisular puede aparecer en sangre por células neoplásicas o por activación de células endoteliales o monocitos. En otras ocasiones son enzimas proteolíticas los causantes de CID ya sean de origen endógeno (enzimas pancreáticas, de células neoplásicas, de neutrófilos) o exógeno (venenos de serpiente, etc.). La activación de la coagulación por la vía intrínseca clásica no parece tener ningún papel importante en la CID⁶.

Lesión endotelial

El endotelio vascular regula la formación del coágulo y su lisis. Se puede alterar por gérmenes, toxinas, me-

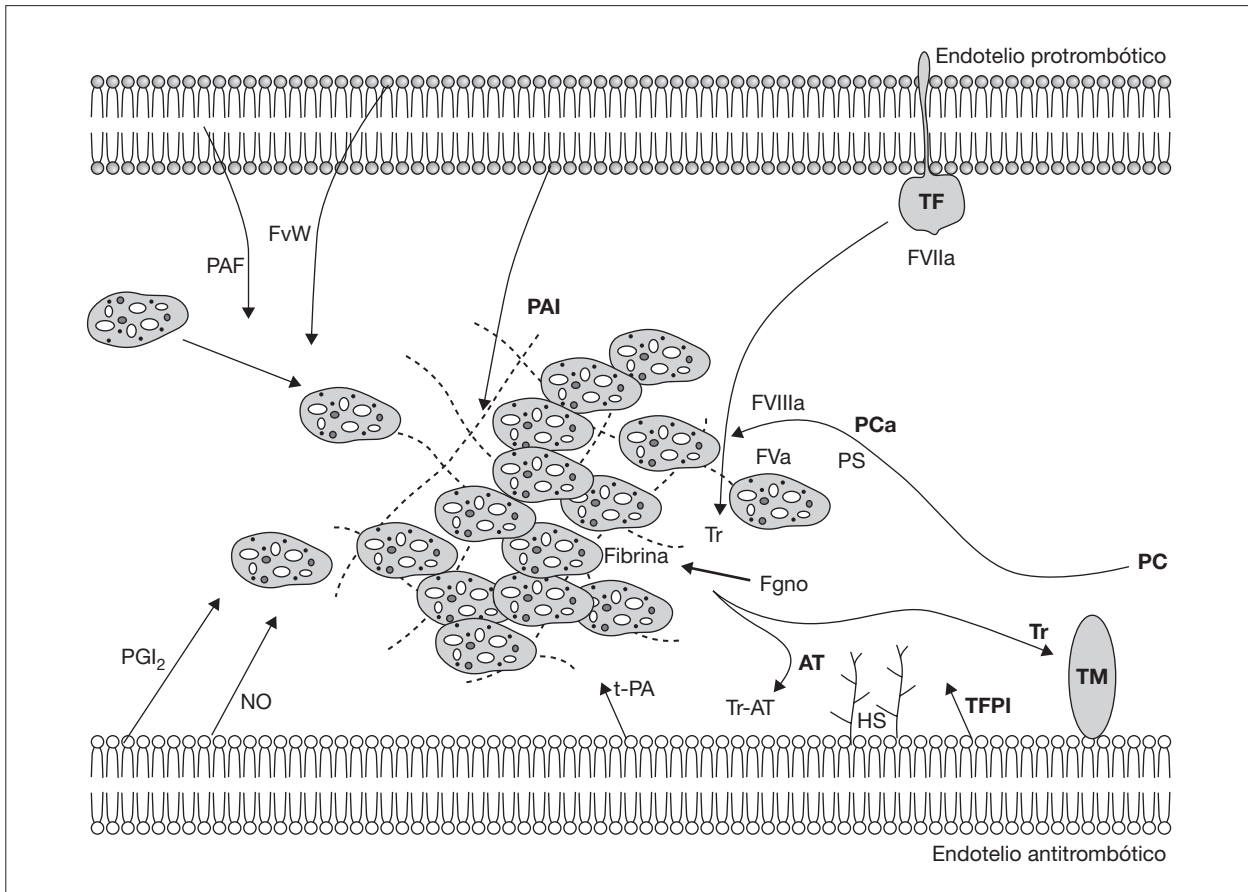


Figura 2. Papel del endotelio en los mecanismos que intervienen en la coagulación intravascular diseminada (CID). El endotelio normal presenta propiedades antitrombóticas: libera prostaciclina (PGI₂), óxido nítrico (NO), activador tisular del plasminógeno (t-PA), expone heparán-sulfato (HS), trombosmodulina (TM) e inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI). El endotelio lesionado o estimulado se convierte en protrombótico: libera PAF (factor activador de las plaquetas), factor von Willebrand (FvW), inhibidor de los activadores del plasminógeno (PAI). Asimismo expresa factor tisular (TF) y se inhiben los mecanismos anticoagulantes como la vía de la proteína C (PC). Tr: trombina; PS: proteína S; AT: antitrombina; Fgno: fibrinógeno; Los factores de la coagulación se representan por su número (con una a si están activados).

diadores inflamatorios (endotoxina, complemento, citoquinas proinflamatorias o proteasas granulocitarias) o por lesión física^{1,7}. Los agentes infecciosos (bacterias, virus, hongos, protozoos y rickettsias) pueden producir lesión directa del endotelio vascular (incluso denudación), o perturbación de las células endoteliales, lo cual ocasiona un desequilibrio de diferentes sistemas biológicos. La infección por bacterias gramnegativas puede provocar un *shock séptico* con hipotensión, CID y disfunción de órganos⁸. La sepsis es la enfermedad que más frecuentemente puede cursar con CID y su mortalidad oscila entre el 40 y el 90 %¹. En estas situaciones el endotelio se torna en procoagulante ya que expone factor tisular, disminuye la expresión de trombosmodulina, libera PAI-1, PAF (factor activador de las plaquetas), endotelina y factor von Willebrand (FvW) y disminuye la síntesis de óxido nítrico (fig. 2)⁹. La exposición del subendotelio a la sangre produce adhesión y agregación de las plaquetas y la puesta en marcha de los mecanismos de la coagulación. Estas alteraciones, por sí solas, pueden desencadenar una CID, o bien, rebajar el umbral para que ésta se inicie en respuesta a un estímulo subsiguiente.

Incremento de la actividad procoagulante¹

Los leucocitos participan de una manera importante en la CID de la sepsis. Los leucocitos estimulados por la endotoxina, el TNF o la IL-1 participan en la lesión endotelial. Además los monocitos y macrófagos sintetizan factor tisular en respuesta a la endotoxina, expresan factor tisular en su superficie e inician la vía de la coagulación por activación del factor VII. La producción de factor tisular está mediada por la IL-1 y el TNF. Las células endoteliales responden de manera similar. Las plaquetas aportan superficies fosfolípidicas, factor V, lipoproteínas, etc., que participan como cofactores en la generación de factor Xa y en la activación de la protrombina a trombina.

Disminución de las actividades anticoagulantes¹

Las actividades anticoagulantes están representadas por los inhibidores plasmáticos (antitrombina, α_2 -macroglobulina, TFPI), los inhibidores celulares (PGI₂, óxido nítrico) y la vía de la proteína C. Las células en-

doteliales sintetizan sustancias heparinoides (proteoglicanos) que unen antitrombina. La antitrombina desciende en la CID por consumo. En condiciones de exposición masiva de factor tisular, el TFPI es insuficiente para inhibirlo. En modelos experimentales, la infusión de endotoxina, IL-1 o TNF reduce la expresión de trombosmodulina en las células endoteliales y aumenta el factor tisular. Esto produce un desequilibrio procoagulante. La proteína C activada (PCa) ejerce un importante efecto anticoagulante y estimulante de la fibrinólisis. En la CID hay una intensa disminución por consumo. La administración de PCa a animales de experimentación previene la CID y el efecto letal de la infusión de cepas de *Escherichia coli*¹. Recientemente su utilización en pacientes con sepsis ha demostrado una disminución de la mortalidad¹⁰⁻¹¹.

Activación de la fibrinólisis

La fibrinólisis está activada en el curso de la CID, por ello encontramos productos de degradación del fibrinógeno y de la fibrina (PDF) en estos pacientes¹². La activación de la fibrinólisis es un mecanismo compensatorio en la CID, secundario a la activación de la coagulación. Cuando se estimula el endotelio con endotoxina el PAI se libera del endotelio. El incremento de la síntesis y liberación de activadores del plasminógeno en la CID, que puede estar mediado por la trombina, produce activación de la fibrinólisis con una rápida lisis de los trombos microvasculares. La persistencia de los trombos puede explicarse por un mayor predominio procoagulante que supere a los activadores del plasminógeno liberados, porque el PAI liberado bloquea los activadores del plasminógeno y por un incremento del inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI). El uso de fármacos antifibrinolíticos puede favorecer la persistencia de los trombos y el daño tisular¹.

Interacción de los diversos factores

La CID tiene lugar si tres procesos suceden simultánea o consecutivamente: activación de la coagulación, reacciones vasomotoras e inhibición de la fibrinólisis. Excepto en algunos estados patológicos (toxinas animales, venenos, dispositivos artificiales, etc.) las actividades procoagulantes están suprarreguladas y las anticoagulantes infrarreguladas. La expresión del factor tisular en los monocitos es importante para desencadenar una coagulación intravascular. Se producen monómeros de fibrina y la formación de fibrina soluble. La fibrina soluble puede eliminarse de la circulación o ser lisada por la acción del sistema fibrinolítico activado. Pero cuando se confina en algunas zonas, puede precipitar y polimerizar. Si las actividades fibrinolíticas están inhibidas, los microtrombos ricos en fibrina pueden persistir, dando como resultado lesión endotelial, lesión tisular y, finalmente, insuficiencia orgánica. Dependiendo de la intensidad de la reacción del organismo hacia el agente causante, o de-

pendiendo de la prevalencia de los diferentes desencadenantes de la CID, la trombosis microvascular o la hemorragia serán el hecho dominante. La lesión está causada por la combinación del consumo de factores de la coagulación y plaquetas, la activación de la fibrinólisis, el efecto de los productos de degradación fibrinolíticos y el daño vascular.

Manifestaciones clínicas: trombosis y hemorragia

Las manifestaciones pueden estar parcialmente eclipsadas por las de la enfermedad desencadenante. La trombosis macrovascular es rara en la CID ya que la formación de trombos estables está limitada por la fibrinólisis compensatoria, por el agotamiento del fibrinógeno y por la inhibición de la polimerización de la fibrina debida a los PDF. Los defectos de coagulación que favorecen el sangrado son la carencia por consumo de los factores de la coagulación y de las plaquetas, la hiperfibrinólisis y la deficiente polimerización de la fibrina. La gravedad de la CID es mayor si los mecanismos compensatorios están disminuidos. En este punto interviene la capacidad sintetizadora del hígado para reemplazar los factores de la coagulación y los inhibidores consumidos, y la capacidad de la médula ósea para generar plaquetas.³ Debido a la trombosis microvascular podemos encontrar disfunciones de órganos, a veces también causados por otras circunstancias concurrentes propias de la evolución de la enfermedad de base. Puede existir insuficiencia renal y necrosis tubular aguda, insuficiencia hepática, insuficiencia respiratoria (síndrome de distrés respiratorio del adulto) y alteraciones del estado neurológico⁷. En la CID, la hemorragia es la manifestación predominante (70-90 % de los pacientes). No suele comprometer la vida del individuo salvo en caso de hemorragias del sistema nervioso central que son poco frecuentes. Las más frecuentes son: la púrpura cutánea equimótico-petequial, el sangrado microvascular por puntos de punción, de inserción de catéteres o drenajes, por superficies cruentas o por heridas quirúrgicas. Suele haber microhematuria o, más raramente, hematuria macroscópica. En pacientes graves pueden aparecer hemorragias digestivas, en general por lesiones agudas, y hemoptisis en pacientes intubados. Las hemorragias intracraneales, suprarrenales, intraparenquimatosas o en cavidades (abdominal, pleural) son menos frecuentes.

Diagnóstico de laboratorio

No hay una única prueba de laboratorio que descarte o asegure el diagnóstico de CID. Es fundamental que el paciente esté en una situación clínica que pueda presentar una CID (tabla 1)¹³. La CID se diagnostica basándose en estos hallazgos: una enfermedad subyacente que se sabe que puede asociarse con CID, un re-

cuento de plaquetas inferior a 100.000/ μ l o una disminución rápida de la cifra, una prolongación de los tiempos de coagulación básicos (tiempo de protrombina y APTT), disminución de fibrinógeno y presencia de productos de degradación de la fibrina. Esto permite diagnosticar una CID en más del 75 % de los casos^{3,7,13}. Aunque la trombocitopenia no es sensible ni específica de la CID, los niveles normales o estables de plaquetas no sugieren su presencia. En la extensión de sangre periférica suelen observarse esquistocitos pero es un hallazgo inespecífico. En la anatomía patológica podemos encontrar trombosis en capilares y pequeños vasos en cualquier órgano y signos de hemorragia y de lesión isquémica en diversos tejidos. No es preciso realizar un diagnóstico anatomopatológico de la CID, porque las biopsias no ofrecen un rendimiento aceptable, son arriesgadas, y además la ausencia de microtrombos no excluye la CID⁷.

Indicadores de activación de la coagulación

En la CID podemos encontrar una disminución de los anticoagulantes naturales: AT y proteínas C y S. La mayor parte de los factores de la coagulación suelen estar disminuidos por consumo con excepción del factor VIII y el FvW que son liberados del endotelio y pueden estar aumentados. Los marcadores de activación de la protrombina (fragmento 1 + 2), de formación de trombina (complejos trombina-antitrombina), o del efecto de la trombina sobre el fibrinógeno (fibrinopéptido A) están elevados¹⁴. La determinación de monómeros de fibrina solubles es bastante específica. En general todas son determinaciones de interés científico pero no ofrecen ventajas definitivas por lo que no se usan de una manera generalizada en la clínica.

Marcadores de hiperfibrinólisis

El nivel de PDF circulantes es una medida sensible de la actividad fibrinolítica. En la práctica se utiliza un PDF concreto, el dímero-D, que es un producto de la degradación de la fibrina ya polimerizada y estabilizada por el factor XIIIa (fibrina que ha estado en un trombo)¹⁴. Existen otras alteraciones pero no se investigan de manera rutinaria: disminución del inhibidor de la plasmina (α_2 -antiplasmina), aumento de los complejos plasmina/ α_2 -antiplasmina y un aumento de péptidos formados por la acción de la plasmina sobre la fibrina o el fibrinógeno (péptidos B β 15-42 o B β 1-42).

Marcadores de lesión endotelial

La detección en plasma de proteínas normalmente unidas a la membrana del endotelio indica lesión endotelial amplia. Esto ocurre con la trombomodulina soluble que se ha visto aumentada en pacientes con CID¹⁵. También sucede algo similar con la determinación del factor tisular antigénico en plasma.

Diagnóstico diferencial

Existen varias enfermedades en las que los datos de laboratorio o la clínica son semejantes a los encontrados en la CID. Los pacientes sépticos pueden tener una deficiencia de vitamina K que altera los tiempos de coagulación y una trombocitopenia debida a la propia sepsis. En este caso no existe disminución del fibrinógeno ni generación excesiva de PDF. La coagulopatía que acompaña a la insuficiencia hepática a veces es muy difícil de diferenciar de una CID sobre todo si el paciente, además, está séptico. En este caso existe una trombocitopenia por hiperesplenismo, disminución de factores e inhibidores de la coagulación y elevación de PDF. Hay casos en los que sólo puede diagnosticarse una CID por un cambio rápido de los parámetros de laboratorio en controles seriados. En las transfusiones masivas y la cirugía con circulación extracorpórea hay disminución de varios factores de la coagulación o de inhibidores, como resultado de la hemodilución. Además en la circulación extracorpórea existe activación de la coagulación y de la fibrinólisis con aumento de PDF. En la enfermedad tromboembólica venosa y en las trombosis que complican la anemia falciforme aumenta el dímero-D. También puede confundirse con la CID la microangiopatía trombótica ya que produce una enfermedad aguda con disfunción multiorgánica y rápido consumo de plaquetas pero no cursa con consumo de factores ni hiperfibrinólisis. En determinadas situaciones es posible encontrar un aumento inespecífico de PDF como en la insuficiencia renal por disminución del aclaramiento. Las determinaciones con látex pueden dar falsos positivos si existe factor reumatoide. También pueden encontrarse elevados en determinadas disfi-brinogemias.

Síndromes clínicos

El más frecuente es la CID asociada a sepsis^{8,16}. Puede complicar a infecciones bacterianas (sobre todo por gramnegativos), víricas y, más raramente, fúngicas o protozoarias (malaria). Además de las alteraciones fisiopatológicas referidas anteriormente, también puede existir una lesión directa del germen sobre el endotelio. En la CID asociada a sepsis puede aparecer un grave cuadro: la *purpura fulminans*¹⁶. Se presenta con necrosis cutánea por trombosis de pequeños vasos y con gangrena de partes acras o extremidades, por trombosis de vasos de calibre grande y mediano. También puede aparecer una necrosis suprarrenal aguda. La *purpura fulminans* es más frecuente en niños. En niños, hay una entidad, que es la *purpura fulminans* postinfecciosa, siguiendo a una infección leve del tracto respiratorio superior, escarlatina o varicela. La patogénesis es poco conocida, aunque la relación temporal con la infección sugiere un mecanismo inmunológico que produce una vasculitis severa y una CID. Cuando aparece en adultos, es en el curso de una sep-

sis bacteriana fulminante. Existe una forma especial, la *purpura fulminans* neonatal, que ocurre en neonatos con déficit homocigoto de proteína C o S asociado. El diagnóstico debe ser rápido y el tratamiento (concentrado de proteína C) instaurado de inmediato.

En pacientes con neoplasias, sobre todo con adenocarcinomas, puede aparecer una CID crónica causada por una activación crónica latente de la coagulación y, secundariamente, de la fibrinólisis. Suelen presentar niveles elevados de marcadores de generación de trombina y aumento de PDF. Esta activación puede ocasionar tromboflebitis superficiales o profundas migratorias (síndrome de Trousseau)¹⁷. Además la fibrina puede depositarse en las válvulas cardíacas (endocarditis marántica) y ocasionar embolias arteriales. Puede concurrir también una anemia hemolítica microangiopática. Esta forma crónica de CID es debida a la liberación de factor tisular u otras sustancias con actividad procoagulante procedentes de células neoplásicas. La CID crónica responde bien a la administración de heparina. Con los cumarínicos, la evolución de la trombosis puede ser negativa, con frecuentes recidivas. En pacientes con alto riesgo hemorrágico o como prevención de recidivas trombóticas, es útil la administración de heparina a dosis profilácticas. La leucemia aguda en muchos casos se acompaña de datos analíticos de CID⁴. Los blastos leucémicos pueden albergar activadores del plasminógeno, elastasas con acciones fibrinolíticas. Además, contienen procoagulantes como el factor tisular o proteasas activadoras del factor X. Pueden liberar citocinas que producen lesión endotelial y activación de la coagulación. Aunque cualquier leucemia puede presentarse con CID, es muy frecuente en la leucemia promielocítica. Al contrario que en el caso de los tumores sólidos, que cursan más con trombosis, en la CID de las leucemias es más frecuente la hemorragia. Ello puede ser debido a la presencia de trombocitopenia y a un mayor componente profibrinolítico. Otro grupo de enfermedades que pueden causar CID crónica compensada son las enfermedades vasculares⁴. La activación de la coagulación y fibrinólisis se localiza en los vasos anormales pero, en casos extremos, puede desencadenarse una CID aguda o subaguda grave. Este fenómeno se ha visto en aneurismas aórticos de gran tamaño, en hemangiomas gigantes (síndrome de Kasabach-Merritt), en telangiectasias múltiples, en tumores intracardíacos. El tratamiento es quirúrgico siempre que sea posible. Pueden ser útiles la heparina a dosis bajas o los antifibrinolíticos. En ocasiones se ha intentado la radioterapia del hemangioma o el tratamiento con pentoxifilina. También se ha utilizado con éxito la esclerosis química.

La administración de fármacos trombolíticos causa una activación intensa de la fibrinólisis con disminución de fibrinógeno, disminución de α_2 -antiplasmina y consumo de plasminógeno. Esta situación, en la que existe un riesgo alto de hemorragia, puede denominarse correctamente fibrinólisis primaria ya que el sistema coagulativo no participa. La deficiencia congénita de α_2 -antiplasmina y de PAI puede causar tam-

bién hiperfibrinólisis y hemorragia. Cuando en algunos cuadros de CID existe un exceso de fibrinólisis, en comparación con el grado de activación de la coagulación, esta es secundaria. Ello puede verse en algunas leucemias o en pacientes operados con *bypass* cardiopulmonar.

El síndrome del distrés respiratorio del adulto se puede asociar con datos clínicos o biológicos de CID. La trombosis puede ser una complicación en estos pacientes. En la patogenia del síndrome del distrés respiratorio del adulto intervienen mecanismos fisiopatológicos comunes a los de la CID (lesión endotelial, activación plaquetaria, inflamación y activación celular)⁴.

Las reacciones hemolíticas agudas postransfusionales pueden causar CID, probablemente por la lesión endotelial causada por una intensa activación del complemento. Esta situación se puede acompañar de shock e insuficiencia renal aguda. Los venenos de ofidios y otros animales son mezclas complejas de toxinas con gran variedad de efectos sobre la coagulación. Pueden causar vasodilatación, aumento de permeabilidad vascular, mionecrosis, lesión endotelial generalizada y activación directa de la coagulación y fibrinólisis.

En la gestación normal los niveles de factores de la coagulación e inhibidores de la fibrinólisis ascienden, al tiempo que los activadores del plasminógeno disminuyen, lo cual protegería de la hemorragia durante el parto. Sin embargo, esta situación es propicia para el desarrollo de una CID obstétrica si el contenido uterino, rico en factor tisular y otros procoagulantes, contacta con la sangre materna. Podemos encontrar CID aguda y grave en: embolismo de líquido amniótico, *abrutio placentae*, óbitos fetales tardíos, placenta retenida, etc. El tratamiento más eficaz es extraer el feto y los restos de placenta y, si es preciso la histerectomía. El feto muerto retenido puede ser una causa de CID crónica, la cual suele responder al tratamiento con heparina. El aborto séptico u otras infecciones graves también pueden causar CID durante el embarazo. El síndrome HELLP (hemólisis, elevación de enzimas hepáticas y trombocitopenia) presenta características de síndrome microangiopático.⁴

En los síndromes microangiopáticos, aunque existen depósitos intravasculares que contienen plaquetas o fibrina, las manifestaciones biológicas de CID suelen estar ausentes.

La presentación de un paciente con CID sin causa aparente es rara y siempre se asocia a una enfermedad oculta. Los cuadros que pueden empezar con una CID suelen ser neoplasias (sobre todo adenocarcinoma de próstata), cirrosis hepática y grandes aneurismas abdominales.

Tratamiento

La mortalidad en la CID grave es muy alta aunque, aunque está muy condicionada por evolución de la

enfermedad subyacente. El tratamiento debe dirigirse a eliminar la causa y a mantener el soporte vital. No obstante, las trombosis o hemorragias graves pueden comprometer la evolución. Los tratamientos disponibles son el tratamiento sustitutivo con hemoderivados y el uso farmacológico de inhibidores de la coagulación y de la fibrinólisis^{4,16}. En un paciente con CID, pero sin hemorragia, no precisa tratamiento sustitutivo ya que su uso no ha demostrado que mejore la evolución. Si existe sangrado, está indicado el plasma fresco congelado como aporte de factores de coagulación si el tiempo de protrombina está prolongado entre 1,6-1,7 veces el control, o el APTT muestra una relación paciente-control superior a 1,5. La dosis a infundir será de 10-15 ml/kg de peso¹⁹. En algún caso con hipofibrinogenemia muy grave, puede ser necesario el aporte de fibrinógeno en forma de transfusión de crioprecipitado (1 U/10 kg de peso). El plasma, además de factores de la coagulación, aporta antitrombina y proteína C. En cuanto a la trombocitopenia, si el paciente sangra y las plaquetas son inferiores a $50 \times 10^9/l$, deben transfundirse plaquetas (1 U/10 kg de peso)¹⁹. Se ha propuesto el tratamiento con concentrados de antitrombina en la CID, pero no hay evidencia de reducción de la mortalidad por lo que no se recomienda su uso sistemático^{16,19}. Los niveles de proteína C están muy descendidos en la CID grave y los concentrados de proteína C y de PCa, pueden ser útiles en el tratamiento y control de la CID. Además de la detención de la generación de trombina, la proteína C tiene propiedades antiinflamatorias beneficiosas en estos pacientes. El uso de PCa en la sepsis grave disminuye la de la mortalidad^{10,11}. Aunque la heparina puede empeorar la hemorragia y los antifibrinolíticos la trombosis, en algunas situaciones concretas, su uso puede ser recomendable. Así, en los pacientes con CID en los que predomine la trombosis, como en la CID asociada a neoplasia, la heparina suele ser útil y corregir la alteración hemostática y tratar el episodio de tromboembolismo venoso³. Los antifibrinolíticos pueden ser útiles en cuadros hemorrágicos con un marcado predominio de la fibrinólisis. Se usan en la leucemia promielocítica y en pacientes con síndrome de Kasabach-Merritt⁷. De manera experimental se han intentado utilizar antagonistas de las citocinas implicadas. Se han utilizado anticuerpos antiendotoxina en humanos, con resultados decepcionantes por incremento de la mortalidad. Los anticuerpos contra la IL-1 y el TNF ha conseguido prevenir el desarrollo de síndrome séptico y CID en animales de experimentación. Los anticuerpos antifactor tisular o antifactor VIIa también han demostrado capacidad para impedir la aparición o progresión de CID, pero no se han empleado en humanos³.

Bibliografía

- Müller-Berghaus G. Pathophysiologic and biochemical events in disseminated intravascular coagulation: dysregulation of procoagulant and anticoagulant pathways. *Semin Thromb Hemost.* 1989;15:58-87.
- ACCP/SCCM Consensus Conference. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med.* 1992;20:864-74.
- Ten Cate H, Brandjes DPM, Wolters HJ, Van Deventer SJH. Disseminated Intravascular Coagulation: Pathophysiology, diagnosis and treatment. *New Horizons.* 1993;1:312-23.
- Mateo J, Souto JC, Santamaría, Fontcuberta J. Trombocitopenias por consumo. Coagulación intravascular diseminada. En: Pujol-Moix N, editor. *Trombocitopenias.* 2.ª ed. Madrid: Harcourt; 2002. p. 258-68.
- Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues: implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol.* 1989;134:1087-97.
- Furie B, Furie BC. Molecular basis of blood coagulation. En: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silverstein LE, McGlave Ph, editors. *Hematology. Basic principles and practice.* 3.ª ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000. p. 1783-804.
- Calverley DC, Liebman HA. Disseminated intravascular coagulation. En: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, et al, editors. *Hematology. Basic principles and practice.* 3.ª ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000. p. 1983-95.
- Bone RC. Modulators of coagulation. A critical appraisal of their role in sepsis. *Arch Int Med.* 2000;152:1381-9.
- Karsan A, Harlan JM. The blood vessel wall. Endothelial cell structure and function. En: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, et al, editors. *Hematology. Basic principles and practice.* 3.ª ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000. p. 1770-82.
- Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, et al. Recombinant human protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis (PROWESS) study group. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med.* 2001;344:759-62.
- Fourrier F. Recombinant human activated protein C in the treatment of severe sepsis: An evidence-based review. *Crit Care Med.* 2004;32:S534-S41.
- Bick RL, Kunkel LA. Disseminated intravascular coagulation syndromes. *Int J Hematol.* 1992;55:1-26.
- Taylor FB Jr, Toh CH, Hoots WK, Wada H, Levi M. Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost.* 2001;86:1327-30.
- Carr JM, McKinney M, McDonagh J. Diagnosis of disseminated intravascular coagulation. Role of D-Dimer. *Am J Clin Pathol.* 1989;91:280-7.
- Wada H, Ohiwa M, Kaneko T, et al. Plasma thrombomodulin as a marker of vascular disorders in thrombotic thrombocytopenic purpura and disseminated intravascular coagulation. *Am J Hematol.* 1992;39:20-4.
- Dempfle CE. Coagulopathy of sepsis. *Thromb Haemost.* 2004;91:213-24.
- Nand S, Messmore H. Hemostasis in malignancy. *Am J Hematol.* 1990;35:45-55.
- Mateo J, Muñoz-Díaz E, Fontcuberta J, Madoz J. Indicaciones para el uso de plaquetas, plasma y fármacos antihemorrágicos. *Rev Esp Anestesiol Reanim.* 1992;39:355-61.
- Eisele B, Lamy M, Thijs LG, et al. Antithrombin III in patients with severe sepsis. A randomized, placebo-controlled, double-blind multicenter trial plus a meta-analysis on all randomized, placebo-controlled, double-blind trials with antithrombin III in severe sepsis. *Intensive Care Med.* 1998;24:663-72.

Genómica y proteómica en hemostasia

J. CORRAL^{1,2}, R. GONZÁLEZ-CONEJERO^{1,2}, D. HERNÁNDEZ-ESPINOSA², C. MARTÍNEZ^{1,2} Y V. VICENTE²

¹Investigadores Ramón y Cajal de la Universidad de Murcia. ²Centro Regional de Hemodonación. Universidad de Murcia.

Introducción

El conocimiento profundo de una enfermedad compleja, no sólo su base patológica, sino también aspectos de diagnóstico, pronóstico, seguimiento y tratamiento, no puede abarcarse de forma simple, empleando un solo método, evaluando un simple marcador, o haciendo uso de una sola prueba. Si son muchos los elementos biológicos que desempeñan un papel (aunque sea pequeño) en una enfermedad y son afectados por la misma, el estudio completo de dicha enfermedad debería incluir la evaluación de todos estos elementos. Este tipo de aproximación ha sido imposible de realizar en el siglo XX no sólo por dificultades técnicas, sino incluso por carencias en conocimientos básicos. Los recientes avances en biología molecular, la creación de bases de datos y bancos de muestras, el desarrollo tecnológico aplicado a la biomedicina y la bioinformática han permitido en la era posgenómica poder evaluar simultáneamente miles de elementos biológicos en una muestra de un paciente de forma rápida, con un coste y con un manejo razonable de los datos generados. Son las llamadas tecnologías "omic". Estos métodos, aplicados a cada uno de los procesos biológicos, pretenden recabar datos del genoma (genómica), genoma funcional o ARN (transcriptómica), proteínas (proteómica), y metabolitos (metabolómica) generados por perturbaciones genéticas o ambientales en un paciente o una muestra (fig. 1). Especialmente la genómica, transcriptómica y proteómica se han mostrado como aproximaciones efectivas que permiten identificar factores genéticos y ambientales relacionados con enfermedades tan complejas como el cáncer, y han permitido identificar marcadores específicos que pueden ayudar tanto a la prevención, diagnóstico y pronóstico como a la selección de estrategias terapéuticas de diferentes enfermedades. Además, mediante el análisis de miles de elementos, estas técnicas permitirán definir un perfil propio e individual del paciente que, en un futuro no muy lejano, facilite el desarrollo de una medicina individualizada, pues cada individuo es diferente también en el enfermar.

En esta revisión evaluaremos el empleo y posibilidades de estas técnicas en hemostasia y las patologías

derivadas de un incorrecto funcionamiento del sistema hemostático, especialmente la enfermedad tromboembólica.

Genómica en hemostasia

Muchas de las enfermedades del sistema hemostático se han considerado monogénicas y asociadas a la deficiencia de una sola molécula. La simple alteración de un solo gen (en muchos casos causadas por simples mutaciones puntuales) es suficiente para desarrollar enfermedades como la hemofilia o ciertas trombosis (causadas por mutaciones en el gen del FVIII o de la proteína C, respectivamente como ejemplos). En este contexto, parece irracional el empleo de técnicas genómicas que evalúen alteraciones genéticas de forma masiva (análisis del genoma completo con técnicas como cariotipo, pintado de cromosomas, o de *linkage*). La simple secuencia (tras amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa [PCR] o PCR-transcripción inversa [RT-PCR]) del gen candidato podría identificar la mutación responsable. Pero cada día van apareciendo nuevas evidencias que apoyan la complejidad de las consideradas como enfermedades monogénicas. Otras características genéticas propias de cada individuo pueden tener importantes implicaciones pronósticas y terapéuticas en pacientes portadores de una misma mutación responsable de una enfermedad. Por ejemplo, diferentes polimorfismos protrombóticos podrían atenuar la clínica hemorrágica de pacientes hemofílicos que portan la misma alteración genética¹. De hecho, manipulaciones genéticas en diferentes cepas de ratón han mostrado que ciertas delecciones provocan patologías graves (incluso mortales) en unas cepas pero menos graves en otras². Además, diferentes factores ambientales también pueden modificar el efecto de una alteración genética. Por otra parte, otras enfermedades del sistema hemostático mucho más frecuentes, como todas las resultantes de procesos tromboembólicos, son enfermedades complejas en las que intervienen cientos (posiblemente miles) de elementos. Recientemente, se ha demostrado que polimorfismos funcionales, algunos hemostáticos, están implicados en el riesgo de sufrir trastornos trombóticos y hemorrágicos. También los polimorfismos pueden desempeñar un papel impor-

Este trabajo ha sido realizado gracias a los proyectos SAF2003-00840 y Fundación Séneca 00583/PI/04.

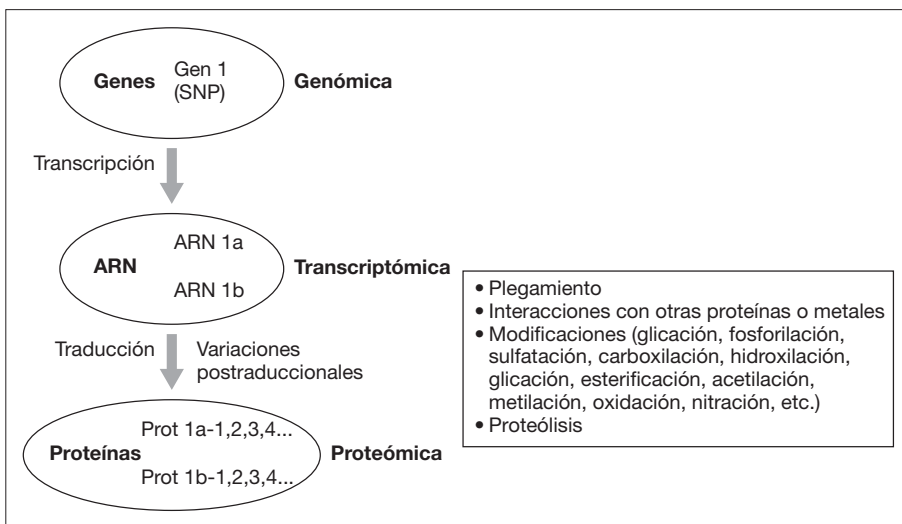


Figura 1. Transmisión de información biológica y técnicas “ómicas” de análisis masivo de elementos. Los genes (analizado por la genómica) se expresan en ARN (estudiado por la transcriptómica). En este nivel existe cierto grado de variabilidad generado por inicios transcripción y procesamientos de intrones alternativos. La mayoría de ARN son traducidos para generar proteínas (evaluadas por la proteómica). En este proceso existe un alto nivel de heterogeneidad ya que la proteína recién sintetizada puede experimentar multitud de modificaciones postraduccionales, muchas de ellas con relevante significado funcional.

tante en el pronóstico y evolución de la enfermedad o incluso en aspectos farmacogenómicos, afectando a la eficacia o efectos adversos de tratamientos como la anticoagulación, la fibrinólisis o la antiagregación plaquetaria³. Por todo ello, han sido muchos los estudios de polimorfismos de factores hemostáticos en patologías trombóticas y hemorrágicas que se han realizado. Sin embargo, en todos los casos, la evaluación de un sólo polimorfismo no es de gran utilidad clínica por el bajo riesgo asociado. Por tanto, y gracias al desarrollo de las bases de SNP (*single nucleotide polymorphisms*), y las facilidades tecnológicas de *arrays* de SNP parece recomendable estudiar cientos o miles de polimorfismos en estos pacientes para poder establecer los denominados perfiles de polimorfismos que permitan definir con exactitud la influencia genética de cada sujeto en el parámetro que estemos evaluando⁴. Finalmente, es muy probable que existan múltiples factores que no se han incluido clásicamente en el sistema hemostático pero que van a desempeñar un papel relevante en el desarrollo de diferentes patologías hemostáticas. Cualquier gen que codifique una molécula que afecte a proteínas del sistema hemostático (porque regule su expresión, su correcto plegamiento y estabilidad, esté implicado en cambios postraduccionales, o degrade las proteínas hemostáticas) también pueden alterar el balance hemostático facilitando el desarrollo de enfermedades trombóticas o hemorrágicas, y por lo tanto deben ser identificados, al igual que sus posibles variaciones genéticas. Existen diferentes aproximaciones metodológicas que evalúan el genoma completo empleando análisis de ligamiento en grandes familias o gemelos para intentar identificar estos genes y sus modificaciones responsables de la enfermedad estudiada, que ya están dando sus frutos⁵.

Transcriptómica en hemostasia

Una enfermedad se acompaña de cambios en la expresión (en unos casos significativos, en otros más sutiles) de varios genes. Algunos de estos cambios van a ser

responsables del desarrollo de la enfermedad, otros son resultado del propio proceso patológico. La determinación del patrón de expresión de miles de genes simultáneamente mediante el empleo de tecnologías de *microarrays* de expresión o SAGE (*serial analysis of gene expression*) ha sido y será de gran utilidad en múltiples enfermedades hematológicas. La transcriptómica proporciona información sobre el grado de actividad génica en la muestra y su relación con la función celular, estado de desarrollo, respuesta a estímulos, o enfermedad. Por ello, llama poderosamente la atención que frente a la explosión de artículos que emplean esta metodología en otros campos, apenas existan estudios de este tipo en enfermedades del sistema hemostático. La explicación es la peculiaridad transcripcional de este sistema: los elementos celulares (las plaquetas) tienen poca actividad transcripcional y la síntesis de factores de la coagulación se produce en células de difícil acceso (hígado o pared endotelial). Hasta la fecha, la mayoría de estudios realizados en este campo se centran en patología tromboembólica arterial. Estos estudios han utilizado tres tipos de aproximaciones: paralela (evaluando dos muestras en paralelo, una de ellas control), temporal (evaluando la evolución de la expresión de una misma muestra con el tiempo, en los diferentes estados de la enfermedad o en diferentes puntos de un tratamiento) o secuencial (estudiando diferencias en la expresión de diferentes células de un individuo o de diferentes localizaciones). Son estudios realizados en pacientes, pero más frecuentemente en modelos animales o cultivos celulares. A menudo son estudios *post mortem* o con biopsias de pared vascular de diferentes arterias y pacientes que nunca han sufrido eventos cardiovasculares, o de zonas afectadas y zonas no afectadas. Algunos estudios evalúan ciertos tipos celulares con un papel importante en estos procesos (como monocitos en aterosclerosis) o incluso en líneas celulares en presencia de ciertos estímulos o en respuesta a ciertos fármacos⁶. Mediante *microarrays* se han identificado genes implicados en estos procesos, algunos como el gen *FOS*, que podría ser mejor marcador de aterosclerosis que la PCR⁷.

También se ha analizado el transcriptoma plaquetario. El *microarray* muestra un patrón reproducible y único de plaquetas, con relativa pobreza de transcritos comparado con otras células (2928 ARN mensajeros)⁸. Con estos estudios se han podido identificar 50 genes específicos de plaquetas. Este tipo de experimentación puede permitir que se definan con precisión los genes que pudieran regular las funciones normales y patológicas de plaquetas y megacariocitos. La potencial aplicación de *microarrays* específicos de plaquetas también implica aspectos mucho más prácticos y de aplicación clínica en temas relacionados con la producción plaquetaria, trombopatías, enfermedad cardiovascular y cerebrovascular, y terapia antitrombótica⁹.

Proteómica en hemostasia

El proyecto genoma humano ha sido el gran reto de la ciencia moderna. El resultado, prácticamente concluido, evidencia un genoma finito con un grado de variabilidad relativamente bajo. En contraste, el proteoma de un organismo (tejido, célula o muestra), que se define como el contenido total de proteínas en un momento dado, es altamente dinámico, con un número prácticamente infinito de posibles variaciones. La genómica y transcriptómica aportan datos que reflejan los objetivos del genoma para la síntesis proteica pero no proporcionan información sobre la finalización de esos objetivos. Existen modificaciones postraduccionales, que además de incrementar la heterogeneidad proteica, tienen relevantes efectos funcionales y patológicos (fig. 1). Alteraciones en la abundancia de una proteína, en su estructura, localización o en su función, aspectos que pueden ser valorados mediante proteómica, pueden ser excelentes biomarcadores de anomalías patológicas previas al desarrollo de manifestaciones clínicas, útiles marcadores diagnósticos o pronósticos. Por ello, la proteómica está superando a la genómica como herramienta que permita un análisis global y en el tiempo de los elementos relacionados con procesos fisiopatológicos y en la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas y fármacos. Pero es más, la proteómica original cuyo objetivo fue identificar el conjunto de proteínas que cambian sus niveles como causa o consecuencia de diferentes factores (genéticos o no), ahora permite conocer aspectos mucho más profundos de la estructura y función de cada proteína identificada, las interacciones con otras moléculas, las modificaciones postraduccionales que ha experimentado o incluso su localización celular. Por todo ello, y porque las técnicas genómicas han sido más revisadas en nuestro congreso, nos centraremos más profundamente en este apartado de proteómica. La técnica que analiza mezclas de proteínas y que ha permitido el desarrollo de la proteómica es la espectrometría de masas (*mass spectrometry* o MS). Se trata de un método prácticamente insuperable debido a su precisión, sensibilidad (del rango de femtomoles), especificidad, resolución y automatización en ciertas formas. Existen diferentes sistemas para preparar y

cargar las proteínas en estos sistemas. Quizás el más usado sea el *matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI). Posteriormente, la muestra ionizada se pasa a analizadores de masas, el más empleado es el *time of flight* (TOF).

Pero antes hay que separar las proteínas de una muestra. Existen dos grandes aproximaciones de separación de proteínas con fines proteómicos:

1. Empleando metodología proteómica clásica de separación de proteínas, básicamente mediante sistemas de electroforesis en dos dimensiones (2-DE) que separan las proteínas por carga y masa molecular, identificación y aislamiento de "spots" diferentes y finalmente determinación de la identidad de la proteína mediante digestión enzimática (normalmente con tripsina) y determinación del patrón de masas peptídico empleando espectrometría de masas. Este patrón de masas de péptidos se compara con la masa esperada de las proteínas incluidas en potentes bases de datos (como DMSR, SWISS-PROT y TrEMBL), generando un listado de posibles candidatos (fig. 2). Las proteínas también pueden separarse mediante cromatografía líquida ortogonal (LC) (un sistema multidimensional que separa proteínas usando cromatografía de intercambio iónico y de fase reversa) acoplada directamente a sistemas de espectrometría de masas, método que está prácticamente automatizado y que detecta proteínas que no entran o no se separan fácilmente en geles 2-DE, pero no diferencia formas proteolizadas (fig. 2).
2. Mediante el estudio sistemático y a gran escala de muestras sin separación electroforética de las proteínas para la identificación de perfiles proteicos. Normalmente, esta aproximación emplea como sistema el SELDI-TOF (*surface enhanced laser/desorption ionization*) de alta resolución tras capturar las proteínas de una muestra con diferentes chips analíticos (diferentes tipos de matrices capaces de unir las proteínas de una muestra empleando distintas características físico-químicas: anticuerpos, afinidad, polímeros sintéticos, etc.). En esta aproximación también se pueden emplear chips funcionales para evaluar el proteoma de una muestra atendiendo a la característica funcional que deseamos evaluar (p. ej., actividad proteasa, otras actividades bioquímicas o interacciones con ciertas proteínas u otras moléculas) (fig. 2).

Actualmente se han desarrollado equipos complejos como el MS/MS en tándem que además de proporcionar la masa de forma precisa, determinan la secuencia proteica y por tanto consiguen una identificación absoluta de las proteínas de una muestra. Finalmente, se están desarrollando métodos analíticos que además permitan cuantificar cada proteína, lo que haría a la proteómica claramente superior a la genómica. Para una mayor revisión de técnicas e instrumentación de espectrometría de masas y proteómica recomendamos revisar el excelente trabajo de Cristea et al¹⁰.

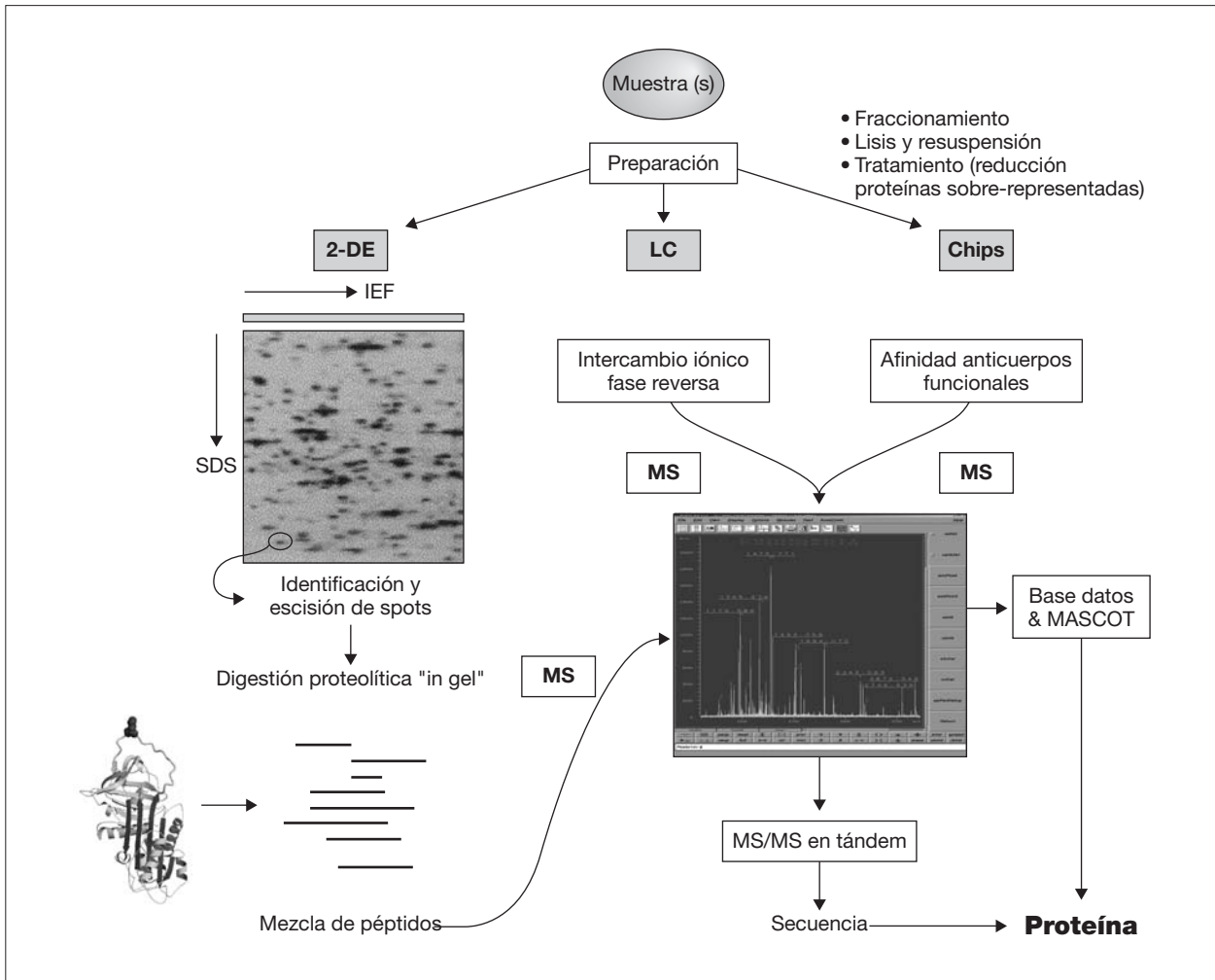


Figura 2. Principales métodos proteómicos. Las proteínas de una muestra se pueden separar empleando tres sistemas diferentes: 1) En geles o sistemas 2-DE (con 1.ª separación por pI mediante isoelectroenfoque y 2.ª por tamaño mediante SDS-PAGE). Las proteínas se identifican con diferentes sistemas de tinción. Una vez identificadas las proteínas de interés (p. ej., comparando el proteoma de una muestra control con la de un paciente), el punto del gel se corta y se somete a digestión proteolítica, normalmente con tripsina. Los fragmentos peptídicos generados se analizan mediante espectrometría de masas (MS). 2) Mediante cromatografía líquida (LC), directamente acoplada a un sistema de MS. 3) Finalmente, se pueden seleccionar determinados tipos de proteínas de una muestra mediante el empleo de chips de proteínas que emplean características físico-químicas o funcionales de las proteínas que se desea capturar. Las proteínas capturadas son evaluadas mediante MS. Los datos generados en los sistemas de espectrometría de masas, se cotejan con bases de datos empleando programas informáticos que permiten una correcta identificación de las proteínas de la muestra. La completa identificación de una proteína puede realizarse empleando sistemas de espectrometría en tándem que identifican la secuencia de la muestra.

Las principales limitaciones de las técnicas proteómicas derivan de la incapacidad de amplificar las proteínas (a diferencias de los ácidos nucleicos), a pesar de la elevada sensibilidad de estas técnicas. Además, la gran heterogeneidad proteica de un tejido o plasma puede hacer que dos muestras de un mismo sujeto sean ligeramente diferentes, lo que exige al menos repetir tres veces cada muestra para obtener resultados fiables.

Existen dos grandes materiales en hemostasia susceptibles de ser evaluados mediante técnicas proteómicas: el plasma y diferentes tipos celulares, especialmente plaquetas.

El estudio del proteoma del plasma es complejo y difícil por dos razones: cantidad y heterogeneidad. En el plasma existen más de 10.000 proteínas diferentes y

heterogéneas tanto en características estructurales como en variaciones conformacionales y postraduccionales de una misma molécula (de hecho se estima en más de un millón las diferentes formas proteicas del plasma). Además, estas proteínas pueden interactuar entre ellas. Y finalmente existe una significativa heterogeneidad en la concentración de cada proteína en plasma (que oscila entre valores milimolares a femtomolares). A pesar de las dificultades del estudio del proteoma del plasma, la información que podemos obtener de él es inmensa. No sólo el plasma contiene la mayoría de las proteínas hemostáticas, y por tanto su análisis podría ayudar a definir patologías hemostáticas como veremos después. Además, el plasma también es el fluido que se ve afectado por el estado de la mayoría de los tejidos. Este dato, junto a la faci-

lidad para obtener muestra suficiente de cualquier paciente en cualquier situación hace que sea el sustrato idóneo donde buscar marcadores asociados a diferentes enfermedades, o reflejo de la influencia de diferentes factores externos (incluidos fármacos). Desde el año 1991, se emplea plasma para identificar patrones 2-DE asociados a enfermedades. Centrándonos en la enfermedad tromboembólica, recientes estudios aplican técnicas proteómicas al plasma para definir marcadores de enfermedad cardiovascular. Por ejemplo, un estudio realizado por un grupo español empleando 2-DE observó nuevos marcadores asociados a enfermedad cardiovascular que no se sospechaban pudieran estar relacionados con esta patología, como ciertas isoformas de la antitripsina¹¹. Además, variaciones en el nivel de diferentes isoformas de la cadena γ del fibrinógeno o la apolipoproteína A-I diferencian infarto agudo de miocardio de angina inestable¹¹. En otro trabajo, empleando SELDI-TOF acoplado a un chip de intercambio aniónico, se identificó un nuevo marcador asociado con síndrome coronario agudo¹². El patrón proteómico del plasma puede por tanto, ser empleado para identificar pacientes de alto riesgo, más susceptibles de tener una placa inestable que lleve a infarto de miocardio. Otros estudios proteómicos relacionados con la enfermedad cardiovascular evalúan el proteoma de células endoteliales, monocitos, miocitos, y otras células implicadas en estas enfermedades^{6,13}.

Centrándonos más en los aspectos específicos de la patología hemostática, el análisis completo del proteoma hemostático, complejo por su heterogeneidad, puede tener un impacto crucial en el diagnóstico, profilaxis e intervenciones terapéuticas en enfermedades trombóticas y hemorrágicas. Las concentraciones de factores de la coagulación en la población sana varían en rangos de 2 a 4 veces. Además, las características funcionales finales de estas proteínas están determinadas por diferentes mecanismos moleculares influenciados tanto por instrucciones genéticas independientes del gen codificante que provocan modificaciones postraduccionales como por factores ambientales. En consecuencia, el conjunto de reacciones que sigue a la presentación del factor tisular en sangre y la subsecuente expresión de trombina es muy variable en la población "normal". Las consecuencias de esta heterogeneidad y su caracterización mediante técnicas proteómicas es relevante por su potencial influencia en el diagnóstico, profilaxis y terapia de enfermedades del sistema hemostático¹⁴.

Finalmente, como ocurría con la transcriptómica, también se ha avanzado significativamente en el proteoma de plaquetas. Trabajos recientes muestran un proteoma plaquetario complejo, mayor del que se podría esperar y que vuelve a mostrar las discrepancias entre genómica y proteómica. Además de los propios genes plaquetarios, las plaquetas son capaces de almacenar otras proteínas en su interior que tienen un papel importante en la función plaquetaria y en el sistema hemostático en general (como el factor V) o incluso otras funciones como la inflamación, mitogénesis, etc.

(como TGF- β , antitripsina, IL- β , etc.). Hasta la fecha, estudios completos del proteoma plaquetario detectan de 760 a 2.300 proteínas diferentes (varias identificadas por primera vez en estos estudios), que abarcan múltiples funciones (citoesqueleto, señalización, procesamiento proteico, receptores de membrana, etc.)^{15,16} aunque se estiman en más de 10.000 las proteínas presentes en plaquetas¹⁷. Además, este tipo de estudios ofrece la oportunidad de describir de forma comprensiva las proteínas y sus modificaciones implicadas en procesos específicos de la función plaquetaria, desde los primeros procesos que desencadena la adhesión, hasta los cambios producidos por la agregación o las proteínas secretadas, y especialmente los procesos de señalización intracelular como la fosforilación asociada a diferentes agonistas¹⁸. Así, recientemente se han identificado DOK-2 y la fosforilación de proteínas RGS como relevantes en la respuesta de las plaquetas a TRAP¹⁹. Finalmente, la proteómica plaquetaria también puede ser útil para identificar potenciales dianas terapéuticas²⁰.

Conclusiones

Los avances científicos y tecnológicos que permiten la evaluación simultánea en un solo experimento de miles de características genéticas y proteicas de una muestra han sido ampliamente empleados en diferentes campos de la medicina con un futuro prometedor. El análisis y comparación de patrones genéticos y proteicos permitirá en un futuro cercano definir marcadores que sirvan en el diagnóstico o pronóstico de múltiples patologías, algunos cuya asociación con dicha enfermedad ni siquiera se había considerado. La disponibilidad de marcadores diagnósticos tempranos, especialmente si pueden ser determinados y valorados en sangre u otros fluidos, podrán utilizarse para reducir la morbilidad y mortalidad de muchas enfermedades. Además, estos estudios pueden facilitar la identificación de nuevas dianas terapéuticas o evaluar con mayor fiabilidad y especificidad la eficacia y efectos adversos de tratamientos. En resumen, las técnicas "omic" permiten definir perfiles específicos de una persona que facilitarán el desarrollo de una medicina individualizada. Hasta la fecha no hay muchos estudios de este tipo en hemostasia, pero dada la enorme heterogeneidad interpersonal que afecta a factores hemostáticos, el desarrollo de estos métodos puede ayudar no sólo a caracterizar mejor un sistema todavía bastante desconocido pese a su relevancia biológica, sino a definir la base molecular de enfermedades de gran trascendencia asociadas a su incorrecta función (tanto trombóticas como hemorrágicas), definir marcadores de riesgo, identificar factores de riesgo genético y ambientales, evaluar los efectos de procedimientos terapéuticos e incluso establecer nuevas terapias. ¡La hemostasia no se baja de este tren!

Bibliografía

1. Do prothrombotic factors influence clinical phenotype of severe haemophilia? A review of the literature. *Thromb Haemost.* 2004;92:305-10.
2. Combined deficiency of protease-activated receptor-4 and fibrinogen recapitulates the hemostatic defect but not the embryonic lethality of prothrombin deficiency. *Blood.* 2004;103:152-4.
3. Corral J, González-Conejero R, Vicente V. Variabilidad polimórfica en el sistema hemostático: efecto en trombosis, hemorragia y farmacogenética. *Haematologica.* 2001;86:227-33.
4. Pollak ES, Feng L, Ahadian H, Fortina P. Microarray-based genetic analyses for studying susceptibility to arterial and venous thrombotic disorders. *Ital Heart J.* 2001;2:568-72.
5. Novel family-based approaches to genetic risk in thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2003;1:1391-7.
6. Prentice H, Webster KA. Genomic and proteomic profiles of heart disease. *Trends Cardiovasc Med.* 2004;14:282-8.
7. Circulating transcriptome reveals markers of atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:3423-8.
8. Integration of proteomics and genomics in platelets: a profile of platelet proteins and platelet-specific genes. *Mol Cell Proteomics.* 2004;3:133-44.
9. Bahou WF, Gnatenko DV. Platelet transcriptome. The application of microarray analysis to platelets. *Semin Thromb Haemost.* 2004;30:473-8.
10. Cristea IM, Gaskell SJ, Whetton AD. Proteomic techniques and their application to hematology. *Blood.* 2004;103:3624-34.
11. Proteomic analysis of plasma from patients during an acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44:1578-83.
12. Biomarker profiling of plasma from acute coronary syndrome patients. Application of ProteinChip Array analysis. *Int Angiol.* 2004;23:246-54.
13. Proteomics: state of the art and its application in cardiovascular research. *Curr Med Chem.* 2004;11:3203-18.
14. Does the genotype predict the phenotype? Evaluations of the hemostatic proteome. *J Thromb Haemost.* 2004;2:1727-34.
15. Towards complete analysis of the platelet proteome. *Proteomics.* 2002;2:288-305.
16. Extensive analysis of the human platelet proteome by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics.* 2004;4:656-68.
17. Maguire PB, Fitzgerald DJ. Platelet proteomics. *J Thromb Haemost.* 2003;1:1593-601.
18. Application of proteomics to the study of platelet regulatory mechanisms. *Trends Cardiovasc Med.* 2004;14:207-20.
19. Differential proteome analysis of TRAP-activated platelets: involvement of DOK-2 and phosphorylation of RGS proteins. *Blood.* 2004;103:2088-95.
20. Using proteomics to identify potential therapeutic targets in platelets. *Biochem Soc Trans.* 2005;33:409-12.