



namplona

LXII CONGRESO
NACIONAL SEHH

V I R T U A L

XXXVI CONGRESO
NACIONAL SETH

26-30
DE OCTUBRE 2020

PROGRAMA EDUCACIONAL y PONENCIAS

Comité Organizador

Presidentes

Dr. Felipe Prósper Cardoso
Dr. José A. Páramo Fernández

Vocales

Dra. Ana Alfonso Piérola
Dr. Enrique Andreu Oltra
Dra. M.^a Luisa Antelo Caamaño
Dra. M.^a José Calasanz Abinzano
Dra. Itziar Ezpeletea Iraizoz
Dra. Rocío Figueroa Mora
Dr. José A. García Erce
Dr. Carlos Grande García
Dra. Carolina Guillén Rienda
Dr. Ramón Lecumberri Villamediana
Dra. Andrea Manubens Guarch

Dra. M.^a Carmen Mateos Rodríguez
Dra. Josune Orbe Lopategui
Dr. Bruno Paiva
Dra. M.^a José Paloma Mora
Dr. Carlos Panizo Santos
Dra. Esther Pena Carbó
Dra. Ana Margarita Redondo Izal
Dr. José Rifón Roca
Dra. Paula Rodríguez Otero
Dr. Jesús San Miguel Izquierdo
Dra. Sara Villar Fernández

Comité Científico

Comité Científico de la SEHH

Presidente

Dr. José María Moraleda Jiménez

Vocales

Dra. Ana Alfonso Piérola
Dr. Rafael Duarte Palomino
(coordinador del Programa Educativo)
Dr. Jordi Esteve Reyner
Dr. Jesús María Hernández Rivas
Dra. Rosario Morales Camacho
Dra. Gemma Moreno Jiménez
Dr. José Tomás Navarro Ferrando
Dr. José Manuel Puerta Puerta
Dr. José María Raya Sánchez
Dra. Paula Rodríguez Otero
Dr. Eduardo Salido Fierrez
Dr. Pedro Sánchez Godoy
Dr. Juan Carlos Vallejo Llamas
Dra. Lucrecia Yáñez Sansegundo

Comité Científico de la SETH

Presidenta

Dr. José Ramón González Porras

Vocales

Dra. M.^a Teresa Álvarez Román
(coordinadora del Programa Educativo)
Dr. Saturnino Haya Guaita
Dra. Mónica Martín Salces
Dra. Josune Orbe Lopategui
Dra. Vanessa Roldán Schilling
Dra. Dolors Tàssies Penella

Junta Directiva de la SEHH

Presidente

Dr. Ramón García Sanz

Vicepresidenta primera

Dra. Ángela Figuera Álvarez

Vicepresidente segundo

Dr. Pascual Marco Vera

Secretario general

Dr. José Tomás Navarro Ferrando

Secretario adjunto

Dr. Joaquín Sánchez García

Tesorera

Dra. Cristina Pascual Izquierdo

Contador

Dr. Raúl Córdoba Mascuñano

Vocales

Dra. M.ª Teresa Molero Labarta

Dra. Cristina Arbona Castaño

Dra. Sara Alonso Álvarez

Dra. Gemma Azaceta Reinares

Dra. Marta Morado Arias

Dra. Elvira Mora Casterá

Dr. Ramón Lecumberri Villamediana

Dra. María Luz Amigo Lozano

Expresidentes de la SEHH

Dr. Jorge Sierra Gil

Dr. José M.ª Moraleda Jiménez

Dra. Carmen Burgaleta Alonso de Ozalla

Dr. Evarist Feliu Frasnado

Dr. Luis Hernández Nieto

Dr. Vicente Vicente García

Dr. Eduardo Rocha Hernando

Dr. Juan M. Rodríguez Fernández

Dr. José M.ª Fernández Rañada

Dr. Manuel Giralt Raichs

Dr. Miquel Rutllant Banyeres

Dr. Antonio López Borrasca

Dr. Agustín Ríos González

Dr. Ricardo Castillo Cofiño

Dr. Julio Outeriño Hernanz

Dr. Juan Maldonado Eloy-García

Dr. Ciril Rozman Borstnar

Dr. Antonio Raichs Solé

Dr. José Sánchez Fayos

Dr. Gonzalo Díaz de Iraola

Dr. Dr. Jerónimo Forteza Bover

Dr. Pedro Farreras Valentí

Dr. Agustín Aznar Gerner

ÍNDICE

Programa Educativo

| | |
|---|-----------|
| El sistema del complemento en los pacientes hematológicos | 9 |
| Santiago Rodríguez de Córdoba | |
| Terapia génica en hematología: el modelo de la anemia de Fanconi | 10 |
| Paula Río, Susana Navarro, Josune Zubicarai, Nagore García de Andoin, Ricardo López, Albert Catalá, Roser M. Pujol, Jordi Surrallés, Jean Soulier, Cristina Díaz de Heredia, Julián Sevilla, Juan A. Bueren | |
| Puesta al día en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda | 15 |
| Jorge Sierra Gil | |

Ponencias

| | |
|--|-----------|
| Simposio. Impacto del diagnóstico molecular en hematología | 21 |
| Coordinadores: Jesús María Hernández Rivas, Rosa Ayala Díaz | |
| Red blood cell disorders | 22 |
| Celeste Bento | |
| Hemostasia | 25 |
| Javier Corral, Belén de la Morena-Barrio, María Eugenia de la Morena-Barrio, Carlos Bravo-Pérez, Rosa Riquelme, José Padilla, Antonia Miñano, Vicente Vicente | |
| Simposio. Avances recientes en gammapatías monoclonales | 31 |
| Coordinadores: Paula Rodríguez Otero, Enrique M. Ocio San Miguel | |
| Amiloidosis 2020: diagnóstico y tratamiento | 32 |
| Isabel Krsnik | |
| Simposio. Estrategias de futuro en el laboratorio de hematología | 37 |
| Coordinadores: Pedro Sánchez Godoy, José María Guinea de Castro | |
| El diagnóstico hematológico integrado en la nueva década | 38 |
| Joaquín Martínez-López, Mario Rodríguez, Sandra Gómez-Rojas, Gloria Pérez, Nerea Castro, María Linares | |

| | |
|---|-----------|
| Simposio. Actualización en medicina transfusional | 42 |
| Coordinadores: Gemma Moreno Jiménez, Pablo Rodríguez Wilhelmi | |
| Anemia hemolítica autoinmune producida por fármacos: mecanismo, diagnóstico inmunohematológico y manejo | 43 |
| Eduardo Muñoz-Díaz | |
| Manejo transfusional en el paciente hematológico | 50 |
| Ana Esther Kerguelén Fuentes, Aurora Viejo Llorente, Dolores Hernández-Maraver, Víctor Jiménez Yuste | |
| Uso óptimo de los hemoderivados plasmáticos | 59 |
| Cristina Arbona Castaño | |
| Club Español de Citología Hematológica (CECH). Casos clínicos citológicos | 62 |
| Coordinadores: Rosario Morales Camacho, Francisco Ortuño Giner | |
| Mujer de 59 años con retinosis pigmentaria y pancitopenia. Un diagnóstico no muy acertado... | 63 |
| Sandra Castaño-Díez, Carmen Martínez Muñoz, Ana Matas, José Milisenda, Mònica López-Guerra, María Rozman | |
| Paciente con componente monoclonal IgM kappa, esplenomegalia y lesiones óseas. Linfoma difuso de células grandes B MYD88mut en paciente con antecedente de macroglobulinemia de Waldenström | 68 |
| Ramón Díez-Feijoo, Leonor Arenillas, Xavier Calvo, Sara Montesdeoca, Marta Salido, Anna Puiggrós, Nieves García-Gisbert, Concepción Fernández, Ivonne Vázquez, Eugènia Abella, Blanca Espinet, Lluís Colomo, Beatriz Bellosillo, Ana Ferrer | |
| Monocitosis y displasia en un paciente con policitemia vera | 75 |
| María Huguet Mas, Elisa Orna Montero, Alba Mesa Tudel, Gustavo Tapia Melendo, Isabel Granada Font, Lurdes Zamora Plana, Marc Sorigué Tomàs, Marco Antonio Fernández Sanmartín, Blanca Xicoy Cirici, José Tomás Navarro Ferrando | |
| Lactante de 2 meses con bicitopenia y esplenomegalia | 82 |
| Raúl Azibeiro Melchor, María Díez Campelo, Beatriz Rey Bua, Félix López Cadenas, Almudena González Prieto, Carlos Romero García, Pilar Leoz Allegretti | |
| Mujer joven con astenia y trombopenia | 88 |
| María Rodríguez González, Francisco José Cabrera Ruiz, Laura González Díez, Gloria Moreno Carrasco, Myriam Revelles Peñas | |
| Mujer de 28 años con trombocitosis extrema | 93 |
| M.ª Victoria de Poo Rodríguez, Elena Bonafonte Arruga, Clara Auría Caballero, Gemma Azaceta Reinares | |

| | |
|---|------------|
| Simposio. Las nuevas tecnologías aplicadas al diagnóstico y tratamiento del linfoma difuso de célula-B grande | 100 |
| Coordinadores: José Tomás Navarro Ferrando, Antonio Gutiérrez García | |
| La biopsia líquida en el linfoma difuso de célula B grande | 102 |
| M. Alcoceba, M. García-Álvarez, A. Martín García-Sancho, L. G. Díaz González, P. Tamayo, R. García-Sanz, M.ªE. Alonso Sarasquete | |
| La inmunoterapia y la terapia celular en el tratamiento del linfoma difuso de célula-B grande | 106 |
| Eva Giné Soca | |
| Simposio. Avances en el diagnóstico y el tratamiento de las neoplasias mieloproliferativas crónicas Ph negativas | 113 |
| Coordinadores: José María Raya Sánchez, María Luisa Antelo Caamaño | |
| Novedades en el diagnóstico molecular de las neoplasias mieloproliferativas Ph-negativas | 115 |
| Beatriz Bellosillo Paricio | |
| Papel emergente de los neutrófilos en la trombosis de las neoplasias mieloproliferativas crónicas. | 116 |
| Francisca Ferrer-Marín, Ernesto José Cuenca-Zamora | |
| Tratamiento actual de la mielofibrosis | 120 |
| Juan Carlos Hernández Boluda | |
| Simposio. Superando grandes desafíos en el trasplante hematopoyético | 125 |
| Coordinadores: Juan Carlos Vallejo Llamas, José Luis Bello López | |
| Microangiopatía trombótica asociada al trasplante hematopoyético: diagnóstico y tratamientos actuales | 126 |
| Enric Carreras Pons | |
| Simposio. El mastocito: mastocitosis sistémicas avanzadas | 132 |
| Coordinadoras: María Rozman Jurado, Gemma Azaceta Reinares | |
| Citomorfología y citometría del mastocito | 133 |
| Concepción Prats Martín, Rosario M. Morales Camacho, Teresa Caballero-Velázquez, Rainiero Ávila, Ricardo Bernal | |
| Aspectos moleculares de las mastocitosis sistémicas avanzadas | 142 |
| Dolors Colomer Pujol | |
| Actualización terapéutica en mastocitosis sistémicas avanzadas | 148 |
| Iván Álvarez-Twose | |

| | |
|--|-----|
| Simposio. Novedades en piruvato kinasa. Controversias en hemoglobinopatía S heterocigota | 153 |
| Coordinadores: David Beneitez Pastor, Silvia de la Iglesia Íñigo | |
| Avances en el diagnóstico y el manejo clínico del déficit de piruvato cinasa | 155 |
| Marta Morado Arias | |
| Nuevos aspectos terapéuticos en la enfermedad por déficit de piruvato cinasa | 158 |
| Eduardo J. Salido Fierrez, Antonio J. Martínez Mellado, Elena Fernández Poveda, Valentín Cabañas Perianes | |
| Hemoglobinopatía S heterocigota. ¿Algo más que un simple rasgo? | 164 |
| F. Ataúlfo Fernández González, Celina Benavente Cuesta | |
| Simposio. Actualización en leucemia linfocítica crónica. | 172 |
| Coordinadores: Lucrecia Yáñez San Segundo, Julio Delgado González | |
| Importance of the karyotype in chronic lymphocytic leukemia (CLL) | 173 |
| Blanca Espinet, Anna Puiggros, Silvia Ramos | |
| Simposio. Nuevos retos en el manejo de los pacientes con leucemia mieloide crónica | 177 |
| Coordinadores: José Manuel Puerta Puerta, Fernando Marco de Lucas | |
| Cuánto nos ayudan los estudios mutacionales en los pacientes con fracaso al tratamiento con inhibidores de la tirosina cinasa en la práctica clínica habitual | 178 |
| M.ª Teresa Gómez Casares, Ruth Stuckey | |
| Nuevos enfoques en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica (LMC). Más allá del tratamiento con inhibidores de la tirosina cinasa: papel del asciminib (ABL001) en la LMC | 183 |
| Luis Felipe Casado Montero | |
| ¿Es la discontinuación del tratamiento el objetivo principal a medio plazo en la leucemia mieloide crónica? De los resultados de ensayos clínicos a la vida real | 189 |
| Raúl Pérez López | |

PROGRAMA EDUCACIONAL

Coordinadores

Dr. Rafael F. Duarte Palomino

Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda. Madrid

Dra. María Teresa Álvarez Román

Hospital Universitario La Paz-IdiPaz. Madrid



LXII CONGRESO
NACIONAL SEHH
VIRTUAL
XXXVI CONGRESO
NACIONAL SETH
26-30
DE OCTUBRE 2020

El sistema del complemento en los pacientes hematológicos

Santiago Rodríguez de Córdoba
Centro de Investigaciones Biológicas. Madrid

La desregulación del sistema del complemento tiene implicaciones en un amplio número de patologías sistémicas o que afectan a órganos o tejidos específicos. En algunas ocasiones, la activación del complemento exagera la inflamación y el daño tisular causado por la patología de base, mientras que en otras es el complemento el causante de la patología. En estas últimas ocasiones la desregulación del complemento suele estar asociada con factores genéticos o autoanticuerpos. El desarrollo y la aplicación durante los últimos 10 años de terapias basadas en la inhibición del sistema del complemento han mostrado eficacia en el tratamiento de muchas de estas patologías

asociadas con desregulación del complemento. En mi presentación revisaré brevemente el papel del sistema del complemento y las consecuencias de su desregulación, centrándome específicamente en el papel que esta desregulación juega en la hemoglobinuria paroxística nocturna, en el síndrome hemolítico urémico atípico y en algunas formas secundarias de microangiopatía trombótica como la asociada al trasplante de precursores hematopoyéticos. Comentaré la aplicación de las terapias anticomplemento en estas patologías y discutiré el valor del estudio genético para desarrollar una medicina de precisión en los pacientes con síndrome hemolítico urémico atípico.

Terapia génica en hematología: el modelo de la anemia de Fanconi

Paula Río¹, Susana Navarro¹, Josune Zubicarai², Nagore García de Andoin³,
Ricardo López⁴, Albert Catalá⁵, Roser M. Pujol⁶, Jordi Surrallés⁶,
Jean Soulier⁷, Cristina Díaz de Heredia⁸, Julián Sevilla², Juan A. Bueren¹

¹ División de Terapias Innovadoras del Sistema Hematopoyético, Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT)/Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER)/Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, Madrid; ² Servicio de Hemato-Oncología Pediátrica, Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid; ³ Hospital Universitario de Donostia, San Sebastián; ⁴ Hospital Universitario Cruces, Barakaldo, Bizkaia; ⁵ Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona; ⁶ Universidad Autónoma de Barcelona/CIBERER; ⁷ Hôpital Saint-Louis, University Paris Diderot, París, Francia; ⁸ Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona

► Introducción a la terapia génica en hematología

Los avances realizados en el campo de la terapia génica (TG) en enfermedades hematológicas, especialmente en las inmunodeficiencias, han permitido demostrar que la TG puede ser un tratamiento eficaz para aquellos pacientes que no tienen un donante HLA adecuado.

La TG en las enfermedades genéticas hematológicas se basa en la corrección de la población minoritaria de células madre hematopoyéticas (CMH) que, gracias a su capacidad de autorrenovación y diferenciación hacia los diferentes linajes, permiten mantener la población de CMH y dar lugar a las diferentes poblaciones maduras de la sangre periférica⁽¹⁾. De esta manera, la corrección estable de esta población de CMH permitirá corregir todas las células del sistema hematopoyético, idealmente durante toda la vida del paciente.

Los protocolos de TG en enfermedades genéticas hematológicas se basan en la obtención de las CMH, que se corrigen *ex vivo* utilizando como vehículos vectores virales que permiten la integración del gen terapéutico en las CMH. Después de un periodo corto de cultivo *in vitro*, las CMH se reinfunden en el paciente, en la mayoría de los casos después de un tratamiento submieloablatoivo o mieloablatoivo, para facilitar el injerto de las células corregidas.

Con el objetivo de asegurar la corrección estable de la enfermedad durante toda la vida del paciente, se han utilizado vectores integrativos que permiten la integración del transgén de manera semialeatoria en el genoma de la CMH. Los vectores que se han utiliza-

do fundamentalmente derivan de la familia de virus *Retroviridae*, que incluye tanto los γ -retrovirus como los lentivirus.

En todos los casos, se aprovecha la maquinaria del virus para permitir la integración del transgén terapéutico en la célula, eliminando completamente su capacidad de replicación. Además, se modifica la envuelta del virus para conseguir optimizar el tropismo hacia un tipo celular concreto. En el caso de los vectores retrovirales (RV), la envuelta más utilizada es la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), que tiene un tropismo muy amplio y es capaz también de transducir eficazmente CMH.

Aunque los estudios iniciales de TG en inmunodeficiencias como la inmunodeficiencia severa combinada asociada al cromosoma X (X1-SCID)⁽²⁾ y la deficiencia en adenosina deaminasa (ADA)⁽³⁾, y posteriormente en otras enfermedades como el síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS)⁽⁴⁾ y la granulomatosis crónica (CGD)⁽⁵⁾, demostraron la eficacia en la clínica de los vectores retrovirales para transducir las CMH y corregir la enfermedad en los pacientes, tanto en X1-SCID, como en WAS y CGD en algunos pacientes se observaron efectos adversos severos asociados al sitio de integración de los RV⁽⁴⁻⁷⁾.

La sustitución de los RV por los vectores lentivirales autoinactivantes (SIN-LV), con un patrón de integración diferente al de los RV, sin una preferencia por el sitio de inicio de la transcripción, ha permitido el desarrollo de ensayos clínicos de TG eficaces y más seguros en los que no se ha detectado ningún efecto adverso en los pacientes después de 13 años de seguimiento en los primeros pacientes tratados⁽⁸⁾. Estos resultados

han confirmado la utilidad de la TG en el tratamiento de múltiples enfermedades hereditarias que afectan al sistema hematopoyético, como es el caso de las inmunodeficiencias X1-SCID, ADA, WAS, la β -talasemia y la anemia falciforme, entre otras, y han permitido la aprobación por parte de la agencia europea del primer medicamento de TG para el tratamiento de la inmunodeficiencia ADA (Strimvelis®).

En este contexto, la TG podría ser una estrategia adecuada también para el tratamiento de otras enfermedades hereditarias hematológicas, como es el caso de la anemia de Fanconi (AF).

› La anemia de Fanconi, características de la enfermedad

La AF es una enfermedad de baja prevalencia producida por mutaciones en uno de los 22 genes descritos hasta el momento^(9,10), siendo las mutaciones en FANCA las más frecuentes en el mundo y en España⁽¹¹⁾. La ruta de AF/BRCA está implicada en la señalización y reparación del daño en el ADN, producido por entrecruzamientos entre las hebras del ADN, que bloquean la horquilla de replicación y que, por lo tanto, deben ser reparados o eliminados para permitir que la célula sobreviva. Defectos en la ruta de Fanconi/BRCA inducen una elevada sensibilidad a agentes que producen entrecruzamientos en el ADN, como la mitomicina C (MMC) y el diepoxibutano (DEB). Como resultado de la exposición a este tipo de agentes, las células de los pacientes con AF muestran un aumento en el porcentaje de aberraciones cromosómicas, así como la formación de cromosomas radiales, característica que se utiliza para el diagnóstico de los pacientes.

A nivel fenotípico, alrededor de un 60% de los pacientes presentan anomalías congénitas, una elevada predisposición al cáncer y el desarrollo en edades tempranas del fallo de médula ósea, que ocurre aproximadamente en un 70-80% de los pacientes durante la primera década de vida^(12,13). Por esta razón, el problema hematológico es el primero que se debe afrontar en estos pacientes.

Los andrógenos se han utilizado de manera exitosa en algunos pacientes para mejorar los parámetros hematológicos, pero el único tratamiento definitivo para el fallo de médula ósea en pacientes con AF es el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

Sin embargo, aunque este tratamiento ha mejorado durante los últimos años, fundamentalmente gracias a la inclusión de la fludarabina (que no produce daño en el ADN) en los tratamientos de acondicionamiento, la incidencia de efectos adversos severos, especialmente una mayor predisposición al cáncer de cabeza y cuello, suele verse incrementada en los pacientes trasplantados, probablemente debido a los regímenes de acondicionamiento genotóxicos utilizados y a la enfermedad injerto contra huésped^(14,15).

› Mosaicismo somático en pacientes con anemia de Fanconi: terapia génica natural

En un porcentaje de pacientes con AF se ha descrito que en las células hematopoyéticas se puede producir una reversión espontánea de la mutación original a la secuencia presente en personas sanas o a una secuencia que permite la recuperación del marco de lectura del gen, dando lugar a la aparición de una proteína funcional⁽¹⁶⁾. De esta manera, en el paciente coexisten células sanas con células que presentan la mutación. Además, se ha observado que en la mayoría de los casos las células revertidas de manera espontánea tienen ventaja frente a las células no corregidas, lo que permite su expansión y, en muchos casos, la recuperación de los parámetros hematológicos en los pacientes si la reversión ocurre en una CMH.

La mejora hematológica asociada a la corrección natural de la mutación en algunos pacientes fue la base para pensar que la TG en CMH utilizando vectores lentivirales podría permitir la corrección de la enfermedad en los pacientes con AF.

› Estudios previos de terapia génica en anemia de Fanconi

Diversos estudios preclínicos han demostrado la capacidad de los vectores γ -retrovirales y lentivirales para corregir la elevada sensibilidad a agentes que producen entrecruzamientos en el ADN de las células de los pacientes con AF, así como la capacidad de reconstitución *in vivo* de las células corregidas en modelos animales.

Los resultados obtenidos *in vitro* y en modelos animales hicieron pensar que la TG podía ser una alter-

nativa para el problema hematológico en los pacientes con AF⁽¹⁷⁾. Entre el año 1999 y 2006 se llevaron a cabo 3 ensayos clínicos de TG en AF en los que no se pudo demostrar el injerto de las células corregidas en los pacientes⁽¹⁸⁾. Sin embargo, estos estudios fueron claves para detectar los problemas que existían asociados a la TG en esta enfermedad y poder buscar alternativas para su tratamiento.

Entre los aspectos que probablemente contribuyeron al fallo del injerto se encontraban el bajo número de células que se pudieron obtener en los pacientes, bien mediante aspirado de médula ósea o movilización con dosis altas de G-CSF, y los tiempos largos de cultivo que se utilizaron para transducir las CMH con RV, que pudo contribuir a la pérdida de su capacidad de injerto⁽¹⁷⁾.

Por ello, nuestros estudios se centraron en mejorar el número de CMH que se podían obtener en los pacientes y reducir el tiempo que las células permanecían en cultivo a solo 24 horas utilizando vectores lentivirales y condiciones de cultivo optimizadas. La optimización del protocolo de transducción nos permitió demostrar por primera vez que las células CD34+ de pacientes con AF obtenidas mediante movilización con plerixafor y G-CSF transducidas en estas condiciones podían injertar en ratones inmunodeficientes⁽¹⁹⁾. Además, las células corregidas mostraron una clara ventaja proliferativa *in vivo*. Estos resultados confirmaban que la capacidad de injerto de las CMH de los pacientes con AF después de la TG se mantenía y sugerían que algo similar podría pasar en los pacientes.

Estos resultados permitieron comenzar un ensayo clínico en pacientes con AF subtipo A en España (clinicaltrials.gov ID: NCT03157804) y en paralelo en los Estados Unidos (clinicaltrials.gov ID: NCT02931071)⁽¹⁸⁾.

› Ensayo clínico de terapia génica de anemia de Fanconi subtipo A desarrollado en España

El estudio clínico español se centró en la movilización de las CMH de los pacientes con G-CSF y plerixafor, y su transducción con el vector lentiviral designado como medicamento huérfano PGK-FANCAWpre* LV. Inicialmente, se trataron 4 pacientes con AF subtipo A, en los que se infundió un número de células CD34+ corregidas de entre $4,1 \times 10^5$ y $1,6 \times 10^5$ células CD34 corregidas/kg⁽²⁰⁾. Es importante destacar que, a diferencia de otros ensayos clínicos de TG, en este ensayo

las células se infundieron en ausencia de acondicionamiento en los pacientes, puesto que el acondicionamiento en estos pacientes está asociado a efectos adversos severos a largo plazo y porque la ventaja proliferativa de las células corregidas hacía pensar que las células corregidas podrían injertar y repoblar la médula ósea de los pacientes sin necesidad de eliminar las CMH endógenas no corregidas.

Los análisis realizados tanto en sangre periférica como en médula ósea han confirmado la capacidad de injerto de las células CD34+ en los 4 pacientes estudiados y la ventaja proliferativa de las células corregidas a lo largo del tiempo. El análisis de las diferentes subpoblaciones en sangre periférica y en médula ósea confirmaron la corrección y la ventaja proliferativa en las diferentes subpoblaciones, incluyendo las células CD34+, confirmando que la corrección no había ocurrido exclusivamente en un tipo celular comprometido a un linaje concreto.

Además, se realizaron estudios de seguridad donde se analizó el patrón de integración del vector lentiviral a diferentes tiempos postrasplante y se pudo confirmar que el patrón de integración era muy similar al observado en otros ensayos de TG. Los estudios realizados en los pacientes que presentaban un porcentaje de células corregidas más elevado mostraron que el patrón de reconstitución era oligoclonal. Además, es importante destacar que el aumento de las células corregidas a lo largo del tiempo se asociaba a un aumento en la diversidad de clones detectados, lo que indicaba que el aumento del porcentaje de células corregidas no estaba asociado en ningún caso a la dominancia de un clon con inserciones potencialmente genotóxicas, sino a la expansión progresiva de las células corregidas.

A nivel funcional, se realizaron estudios tanto en progenitores hematopoyéticos en médula ósea como en células T de sangre periférica. En ambos casos los estudios se centraron en confirmar la reversión de la sensibilidad de las células de pacientes con AF a agentes que producen entrecruzamientos en la doble cadena del ADN y que bloquean la horquilla de replicación, por la elevada sensibilidad de las células de los pacientes a este tipo de agentes.

Los estudios realizados en progenitores hematopoyéticos de médula ósea en los pacientes infundidos con las células corregidas confirmaron la reversión de la sensibilidad a MMC y el aumento a lo largo del tiempo del porcentaje de células corregidas.

Los análisis en sangre periférica se centraron en el estudio del porcentaje de células T aberrantes después del daño con DEB, otro agente entrecruzante del ADN. Este estudio se utiliza para diagnosticar a los pacientes con AF, que se caracterizan por la presencia de un porcentaje elevado de células T aberrantes y un número elevado de aberraciones por célula después del daño con DEB. Los estudios realizados en los 4 pacientes tratados por TG confirmaron la clara disminución del porcentaje de células aberrantes inducidas por DEB a lo largo del tiempo llegando, en el paciente con un porcentaje de células corregidas más elevado, a niveles similares a los observados en un paciente mosaico.

El análisis de la evolución hematológica en los pacientes ha confirmado la estabilización de la enfermedad en los pacientes con un porcentaje de células corregidas más alto, 30 meses después del tratamiento.

► Perspectivas futuras de la terapia génica

Los resultados positivos obtenidos en diversos ensayos clínicos han confirmado que la TG con vectores lentivirales se convertirá en un nuevo tratamiento en múltiples enfermedades genéticas que afectan al sistema hematopoyético.

En el campo de la AF, el ensayo clínico desarrollado en España ha permitido demostrar la seguridad de la TG en los pacientes con AF y la capacidad de injerto de las células corregidas en los pacientes. Resultados preliminares también sugieren la estabilización del fallo de médula ósea en los pacientes con mayor injerto de células corregidas. Todo ello ha contribuido al desarrollo de un ensayo clínico en fase 2 promovido por la empresa farmacéutica Rocket Pharmaceutical Inc. Este ensayo global desarrollado en Europa y en los Estados Unidos permitirá confirmar la eficacia a largo plazo de la TG en la AF y su potencial como futuro tratamiento de la enfermedad en los pacientes con AF-A.

► Bibliografía

1. Doulatov S, Notta F, Laurenti E, Dick JE. Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell*. 2012;10(2):120-36.
2. Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F, Bouneaud C, Hue C, De Villartay JP, et al. Sustained Correction of X-Linked Severe Combined Immunodeficiency by ex Vivo Gene Therapy. *N Engl J Med*. 2002;346(16):1185-93.
3. Aiuti A, Slavin S, Aker M, Ficara F, Deola S, Mortellaro A, et al. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science*. 2002;296(5577):2410-3.
4. Boztug K, Schmidt M, Schwarzer A, Banerjee PP, Diez IA, Dewey RA, et al. Stem-cell gene therapy for the Wiskott-Aldrich syndrome. *N Engl J Med*. 2010;363(20):1918-27.
5. Ott MG, Schmidt M, Schwarzwaelder K, Stein S, Siler U, Koehl U, et al. Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med*. 2006;12(4):401-9.
6. Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, Morillon E, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest*. 2008;118(9):3132-42.
7. Stein S, Ott MG, Schultze-Strasser S, Jauch A, Burwinkel B, Kinner A, et al. Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. *Nat Med*. 2010;16(2):198-204.
8. Cartier N, Hacein-Bey-Abina S, Bartholomae CC, Veres G, Schmidt M, Kutschera I, et al. Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science*. 2009;326(5954):818-23.
9. Bagby G. Recent advances in understanding hematopoiesis in Fanconi Anemia. *F1000Res*. 2018;7:105.
10. Knies K, Inano S, Ramírez MJ, Ishiai M, Surrallés J, Takata M, et al. Biallelic mutations in the ubiquitin ligase RFWF3 cause Fanconi anemia. *J Clin Invest*. 2017;127(8):3013-27.
11. Bogliolo M, Pujol R, Aza-Carmona M, Muñoz-Subirana N, Rodríguez-Santiago B, Casado JA, et al. Optimised molecular genetic diagnostics of Fanconi anaemia by whole exome sequencing and functional studies. *J Med Genet*. 2020;57(4):258-68.
12. Kutler DI, Singh B, Satagopan J, Batish SD, Berwick M, Giampietro PF, et al. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood*. 2003;101(4):1249-56.
13. Butturini A, Gale RP, Verlander PC, Adler-Brecher B, Gillio AP, Auerbach AD. Hematologic abnormalities in Fanconi anemia: an International Fanconi Anemia Registry study. *Blood*. 1994;84(5):1650-5.
14. Masseret C, Peffault de Latour R, Rocha V, Leblanc T, Rigolet A, Pascal F, et al. Head and neck squamous cell carcinoma in 13 patients with Fanconi anemia after hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer*. 2008;113(12):3315-22.
15. Alter BP, Giri N, Savage SA, Rosenberg PS. Cancer in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndrome cohort after fifteen years of follow-up. *Haematologica*. 2018;103(1):30-9.
16. Waisfisz Q, Morgan NV, Savino M, de Winter JP, van Berkel CG, Hoatlin ME, et al. Spontaneous functional correction of homozygous fanconi anaemia alleles reveals novel mechanistic basis for reverse mosaicism. *Nat Genet*. 1999;22(4):379-83.
17. Río P, Navarro S, Bueren JA. Advances in Gene Therapy for Fanconi Anemia. *Hum Gene Ther*. 2018;29(10):1114-23.

18. Adair JE, Sevilla J, de Heredia CD, Becker PS, Kiem HP, Bueren J. Lessons Learned from Two Decades of Clinical Trial Experience in Gene Therapy for Fanconi Anemia. *Curr Gene Ther.* 2017;16(5):338-48.
19. Río P, Navarro S, Guenechea G, Sánchez-Domínguez R, Lamana ML, Yáñez R, et al. Engraftment and in vivo proliferation advantage of gene corrected mobilized CD34+ cells from Fanconi anemia patients. *Blood.* 2017;130(13):1535-42.
20. Río P, Navarro S, Wang W, Sánchez-Domínguez R, Pujol RM, Segovia JC, et al. Successful engraftment of gene-corrected hematopoietic stem cells in non-conditioned patients with Fanconi anemia. *Nat Med.* 2019;25(9):1396-401.

Puesta al día en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda

Jorge Sierra Gil

Cátedra de Hematología y Hemoterapia. Universidad Autónoma de Barcelona.
Servicio de Hematología. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona

› Introducción, epidemiología y factores que determinan el tratamiento

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una enfermedad diversa desde el punto de vista clínico y biológico⁽¹⁾. El mayor conocimiento de su fisiopatología y marcadores moleculares y de superficie ha permitido clasificar mejor la LMA en subgrupos, precisar los factores pronóstico y administrar un tratamiento ajustado al riesgo. También, este progreso ha tenido como consecuencia identificar dianas moleculares y antigénicas, y la realización de un tratamiento de precisión y personalizado.

La incidencia de la LMA se conoce a partir de los datos del registro poblacional sueco, del danés^(2,3) y del norteamericano del Surveillance, Epidemiology and End Results Program (SEER). En función de ello, se estima que cada año se diagnostican entre 4 y 5 casos por cada 100.000 habitantes. La mayor parte de casos corresponden a LMA primaria o *de novo*, seguida de la LMA secundaria a otras hemopatías y una minoría de pacientes tiene LMA relacionada con tratamiento citotóxico previo⁽³⁾. La incidencia ajustada por edad es muy baja en niños y adolescentes, aumenta significativamente a partir de la década de los 60 años y alcanza un pico entre los 75 y 85 años. Cuando se analiza la supervivencia a lo largo de los años respecto a una población sana, ha habido una clara mejora en los pacientes hasta los 60 años, moderada entre los 61 y los 70 años y prácticamente no ha habido progreso en la supervivencia de los pacientes a partir de esa edad. Los pacientes de más de 70-75 años tienen una supervivencia a los 5 años que no supera el 10-15% según las series.

Cuando hay que decidir qué tratamiento hay que administrar a pacientes individualizados deben tenerse en cuenta factores como la edad biológica, el estado general actual y previo, las comorbilidades, los índices de riesgo de fallecer con el tratamiento intensivo y, más recientemente, las escalas de evaluación

geriátrica (G8, Geriatric Assessment in Hematology –GAH–)^(4,5). También, el tipo de LMA, sus características citogenéticas y moleculares, así como factores psicosociales como la comprensión del tratamiento, la disponibilidad de un cuidador, el sistema de salud (público, privado, mixto) y el acceso a fármacos. Finalmente, hay que tener en cuenta la actitud del médico, más o menos proclive a la terapia intensiva, y sobre todo el deseo del paciente, que en caso de edad avanzada puede preferir un tratamiento no curativo si ello le permite seguir en un entorno ambulatorio y/o asistir a celebraciones familiares clave.

› Terapia de primera línea

Hasta finales de la década de 2010, el tratamiento intensivo ha consistido, en pacientes hasta 65-70 años, en la combinación de daunorubicina o idarubicina más citarabina en infusión continua y dosis de 100-200 mg/m² en pauta 3 + 7⁽¹⁾. La consolidación ha consistido en ciclos de citarabina en dosis intermedia (DIC) o alta (DAC) seguidos de más quimioterapia, trasplante autólogo o trasplante alogénico en función del riesgo citogenético. Ya hace unos años se ha añadido al criterio de asignación terapéutica las alteraciones moleculares y la enfermedad residual mínima posquimioterapia⁽⁶⁾. La clasificación genética con impacto pronóstico y ampliamente extendida corresponde a la enunciada por la European Leukemia Net en 2017⁽⁷⁾; esta clasificación distingue 3 grupos de riesgo, uno favorable donde no se recomienda el trasplante alogénico en primera remisión completa (RC), uno desfavorable donde sí se recomienda y con rapidez, y uno intermedio donde se proponen 3 opciones: quimioterapia de consolidación, trasplante autólogo o alogénico. Con las estrategias mencionadas, la supervivencia a los 5 años del conjunto de los pacientes es de alrededor del 45-50%.

En los pacientes de edad avanzada o jóvenes con comorbilidades importantes, el tratamiento estándar a lo largo de la última década ha sido la monoterapia con agentes hipometilantes (azacitidina o decitabina, por vía subcutánea o intravenosa, respectivamente) y en algunos protocolos asistenciales la quimioterapia oral y subcutánea (esquemas con fludarabina, citarabina en dosis baja y factor estimulante de colonias de granulocitos -G-CSF-). Los resultados con estas estrategias se asocian a supervivencia a los 2 años de, como máximo, el 20%.

› Tratamiento de la leucemia mieloide aguda refractaria o en recaída

Hasta la actualidad, ambas situaciones son un reto, ya que la terapia de rescate con quimioterapia no permite una supervivencia prolongada en la gran mayoría de los pacientes⁽⁶⁾. En general, los pacientes fallecen durante el tratamiento o recaen pronto de su LMA. De hecho, la mediana de supervivencia tras la recaída suele ser de meses. Solo una minoría que reciben un trasplante alogénico y tienen baja carga leucémica tienen un pronóstico algo más favorable, particularmente con esquemas de acondicionamiento secuencial quimioterapia de rescate-acondicionamiento de intensidad reducida, seguidos de retirada rápida de la inmunodepresión e infusión preventiva o profiláctica de linfocitos del donante.

› Nuevos agentes para mejorar los resultados

Se ha investigado un número considerable de moléculas para añadir o sustituir las pautas convencionales de quimioterapia. Muchas se han quedado por el camino, pero otras han conseguido la aprobación por las autoridades reguladoras (Food and Drug Administration -FDA-, European Medicines Agency -EMA- o ambas) y han empezado a llegar a España, aunque con menor celeridad y con una amplitud de indicación menor de lo deseable. En la **Tabla 1** aparecen las recomendaciones de tratamiento de primera línea en 2020 según el criterio del autor. Después de casi dos décadas sin que aparecieran nuevos fármacos para la LMA, desde 2017 se han aprobado agentes con dianas y mecanismos de acción diversos (**Figura 1**). Entre ellos hay que destacar, en primera línea, para añadir

a la terapia intensiva, midostaurina (Rydapt[®]) para los pacientes con mutaciones de FLT3⁽⁹⁾ y gemtuzumab ozogamicina (Mylotarg[®]) en la LMA con expresión de CD33 y riesgo citogenético favorable o intermedio^(10,11). También en primera línea y para los pacientes con LMA secundaria, relacionada con el tratamiento y con cambios morfológicos y/o citogenéticos propios de mielodisplasia, pronto estará disponible en nuestro medio cpx-351 (Vyxeos[®]), una formulación encapsulada de daunorubicina y citarabina en una relación molar de 1:5. Este agente ha demostrado superioridad frente al clásico 3 x 7 en este grupo de pacientes⁽¹²⁾.

En pacientes mayores o con comorbilidades, un nuevo agente inhibidor de BCL2, venetoclax (Venclyxto[®]), junto a citarabina en dosis baja o sobre todo con agentes hipometilantes, particularmente azacitidina⁽¹³⁾, se ha asociado a más de un 60% de RC con o sin recuperación hematológica completa (RCi) y una supervivencia superior al 50% al año. El inicio de la respuesta suele aparecer tras 1 o 2 ciclos, pero se deben mantener por lo menos 4, si la toxicidad y la ausencia de progresión lo permite. Estos resultados son claramente superiores a los obtenidos con hipometilantes solo. Venetoclax está aprobado por la FDA, pero su disponibilidad con reembolso en España tardará todavía más de un año.

También para pacientes mayores, como tratamiento de primera línea, la FDA ha aprobado 2 agentes más, glasdegib⁽¹⁴⁾ e ivosidenib⁽¹⁵⁾. Glasdegib (Daurismo[®]) es un inhibidor de la ruta de Hedgehog que, junto a citarabina en dosis baja, prolonga la supervivencia frente a esta última sola. El agente ha sido aprobado por la EMA en junio de 2020. Ivosidenib (Tibsovo[®]) es un inhibidor de IDH1 aprobado en monoterapia como tratamiento de primera línea en pacientes con LMA y mutación de IDH1; este agente previamente había obtenido autorización para tratar pacientes en recaída o refractarios.

En cuanto a los nuevos agentes para pacientes con LMA en recaída o refractarios, además del ivosidenib antes mencionado, enasidenib (Idhifa[®]), un inhibidor de IDH2, está aprobado por la FDA, pero se ha retirado su tramitación en la EMA⁽¹⁶⁾. Ambos, ivosidenib y enasidenib, actúan a través de un mecanismo de diferenciador celular, con el consiguiente síndrome clínico en un 10% de los casos. Son necesarios varios ciclos consecutivos para obtener una RC o RCi que se consigue en alrededor del 30% de los pacientes. En el reciente congreso de la European Hematology Association

Tabla 1. Leucemia mieloide aguda (LMA): adaptación a España en 2020 de las recomendaciones de la European Leukemia Net

| Tratamiento estándar y aprobado | |
|--|---|
| Candidatos a QT intensiva | |
| <i>Terapia de inducción</i> | <ul style="list-style-type: none"> • QT 7 + 3 (citarabina 100-200 mg/m² IC + antraciclina DNR 60 mg/m² o IDA 12 mg/m²) En los pacientes que no responden a un primer ciclo de 7 + 3 se recomienda incluir dosis alta de citarabina (DAC) en la segunda inducción Los pacientes de ≥ 18 años aptos para QT intensiva, con LMA recién diagnosticada y mutaciones activas de FLT3 deben recibir midostaurina (Rydapt®) con la QT • Los pacientes con LMA CD33+ y riesgo favorable o intermedio se benefician de 7 + 3 + gemtuzumab ozogamicina (Mylotarg®) • Los pacientes con LMA secundaria, relacionada con tratamiento previo o con cambios de SMD tienen indicación de CPX-351 (Vyxeos®) • En los pacientes mayores y/o no aptos para terapia intensiva (generalmente de > 65-70 años), particularmente en los que tienen genética adversa, puede recomendarse terapia de baja intensidad (agentes hipometilantes o, preferiblemente, terapia de investigación) |
| <i>Terapia de consolidación</i> Edad hasta 65-70 años Genética riesgo favorable Genética intermedia Genética adversa Edad > 65 años Genética riesgo favorable Genética intermedia/adversa | <ul style="list-style-type: none"> • > 2 de ciclos DAC o dosis intermedia (DIC, particularmente si ≥ 55-60 años) o 1-2 ciclos y TPH auto • 2 o 3 ciclos de consolidación con DIC/TPH alo tras consolidación 1 o 2, o TPH auto (si EMR-) • TPH alogénico antes de 3 meses post-RC <ul style="list-style-type: none"> • DIC > 2, o 1 y TPH auto • TPH alogénico en pacientes con bajo índice de comorbilidad o terapia en investigación |
| No candidatos a QT intensiva | <ul style="list-style-type: none"> • Azacitidina, decitabina, dosis bajas de citarabina, combinación de QT oral de baja intensidad, mejor tratamiento de soporte, ensayo clínico, a la espera de aprobación de nuevos fármacos (venetoclax, inhibidores IDH, glasdegib) |

Dohner H, et al. Blood. 2017

DIC: citarabina en dosis intermedia; DNR: daunorubicina; EMR: enfermedad mínima residual; IDA: idarubicina; QT: quimioterapia; RC: remisión completa; SMD: síndrome mielodisplásico; TPH alo: trasplante de progenitores hematopoyéticos alogénico; TPH auto: trasplante de progenitores hematopoyéticos autólogo

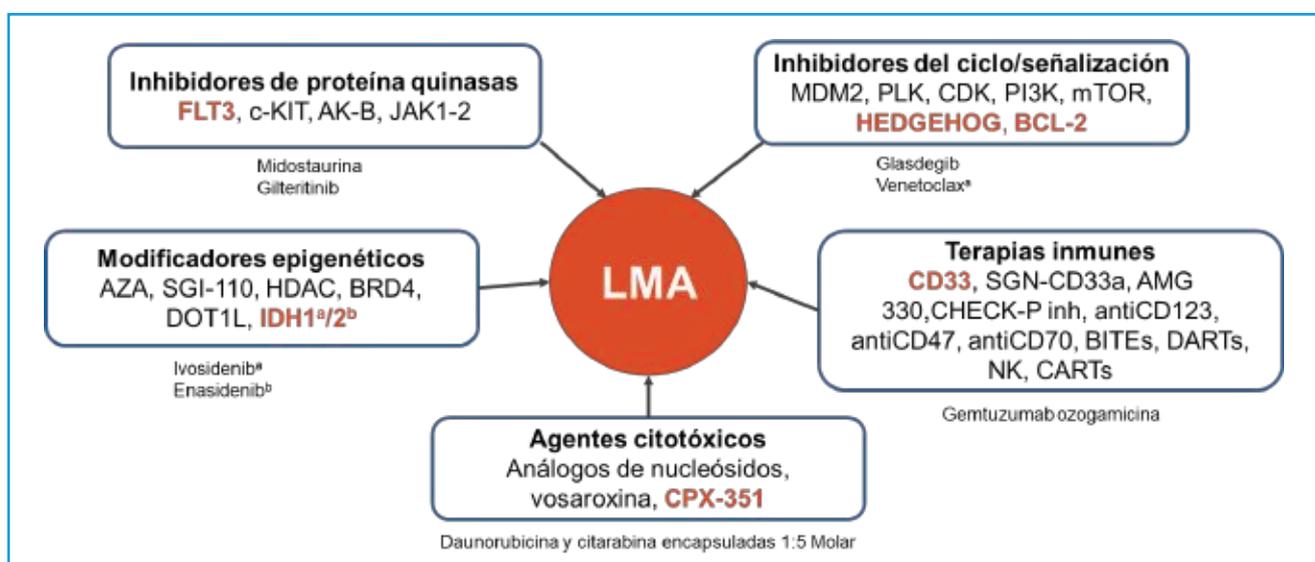


Figura 1. Nuevos agentes para tratar la leucemia mieloide aguda (LMA). En naranja se resaltan aquellas dianas para las que hay agentes nuevos aprobados. ^a No aprobado todavía en la Unión Europea para el tratamiento de la LMA; ^b retirada de la solicitud de enasidenib para la autorización de comercialización de la Unión Europea (6 de diciembre de 2019).

(EHA) se ha mostrado que la asociación de enasidenib y azacitidina prolonga la supervivencia libre de evento (SLE) respecto a la azacitidina sola. También en la LMA refractaria o en recaída, el inhibidor de FLT3 gilteritinib (Xospata®)⁽¹⁷⁾, con efecto en los casos con mutaciones de tipo ITD y/o TKD, está aprobado por la FDA y la EMA, y esperemos que esté accesible pronto en España.

En cuanto a los agentes hipometilantes, hace pocas semanas (septiembre de 2020) la FDA ha aprobado una formulación oral de azacitidina, CC-486 (Onureg®), como terapia de mantenimiento para los pacientes adultos con LMA en RC o RCi después de quimioterapia de inducción intensiva y que no pueden completar la terapia curativa intensiva posterior/básicamente trasplante hematopoyético alogénico⁽¹⁸⁾.

Otro hipometilante aprobado en julio de 2020 para síndrome mielodisplásico (SMD) y leucemia mielomonocítica crónica es la formulación oral de decitabina y el inhibidor de la citidina deaminasa cedazuridina. Este agente está en ensayos en pacientes con LMA.

Un agente en proceso de revisión rápida por considerarlo *breakthrough therapy* el 15 de septiembre de 2020 es magrolimab. Este agente es el primer anticuerpo monoclonal en investigación de su clase contra CD47 y un inhibidor del punto de control de macrófagos diseñado para interferir con el reconocimiento de CD47 por el receptor SIRP α en los macrófagos, bloqueando así la señal "no me elimines" que utilizan las células cancerosas para evitar ser ingeridas por macrófagos. Esta decisión se basa en los resultados de un estudio en fase Ib de magrolimab en combinación con azacitidina en el que se obtuvo un 42% de RC.

Otros agentes de inmunoterapia dirigida a dianas antigénicas de la superficie de la LMA, además del mencionado gemtuzumab ozogamicina, son anticuerpos dirigidos a nuevas moléculas de superficie en las células de LMA como CD70 (cusatuzumab) y los biespecíficos que aproximan los linfocitos T CD3 positivos a las células de la LMA, dirigidos a CD3. Entre estos últimos cabe mencionar AMG330 frente a CD3 y CD33 o flotetuzumab dirigido a CD3 y CD123, entre otros⁽¹⁹⁾.

Los agentes inhibidores de los puntos de control inmune que originan tolerancia al crecimiento tumoral, con notable actividad en tumores sólidos y enfermedad de Hodgkin como nivolumab o pembrolizumab, han dado resultados llamativos en la LMA.

Finalmente, la inmunoterapia celular, efectiva en neoplasias linfoides B y en mieloma, se investiga en la

LMA⁽¹⁹⁾. El principal obstáculo es que los antígenos presentes en la superficie de las células progenitoras de la LMA son compartidos por las hematopoyéticas normales; por tanto, es preciso un rescate hematológico posterior con trasplante alogénico. Los principales ensayos con células T-CAR se dirigen a Lewis Y, CLL1, CD33, CD123, CD44v6 y FLT3. La inmunoterapia celular con células NK que no dio resultados llamativos en el pasado también se beneficia de la técnica de generación de células CAR-T y han comenzado ensayos con células NK-CAR. Las vacunas antitumorales en la LMA, investigadas desde hace años, han visto un nuevo impulso recientemente, en particular las dirigidas frente a WT1.

➤ Conclusión

Tras un largo periodo sin novedades, en los últimos años se han desarrollado numerosos agentes para tratar la LMA. Algunos de ellos se han abandonado por insuficiente o nula eficacia. Otros se encuentran en fase de investigación precoz o avanzada y un número creciente los ha aprobado la FDA y/o la EMA. Los nuevos agentes son mejoras de los fármacos hasta ahora conocidos y la mayor parte se dirigen a dianas moleculares o antigénicas. Con respecto a estas últimas, destacan los nuevos anticuerpos biespecíficos y los monoclonales frente a antígenos implicados en la fisiopatología de esta enfermedad. La inmunoterapia celular, particularmente el desarrollo de células T-CAR o NK-CAR, se investiga muy activamente con la intención de extender a la LMA los resultados favorables obtenidos en las neoplasias linfoides B.

➤ Bibliografía

1. Dohner H, Weisdorf D, Bloomfield CD. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2015;373:1136-52.
2. Juliusson G, Abrahamsson J, Lazarevic V, Antunovic P, Derolf A, Garelius H, et al. for the Swedish AML Group and the Swedish Childhood Leukemia Group. Prevalence and characteristics of survivors from acute myeloid leukemia in Sweden. *Leukemia*. 2017;31:728-31.
3. Granfeldt Østgård LS, Medeiros BC, Sengeløv H, Nørgaard M, Andersen MK, Dufva IH, et al. Epidemiology and Clinical Significance of Secondary and Therapy-Related Acute Myeloid Leukemia: A National Population-Based Cohort Study. *J Clin Oncol*. 2015;33:3641-9.
4. Klepin HD. Ready for prime time: role for geriatric assessment to improve quality of care in hematology practice. *Blood*. 2019;134:2005-12.

5. Bonanad S, De la Rubia J, Gironella M, Pérez Persona E, González B, Fernández Lago C, et al. Development and psychometric validation of a brief comprehensive health status assessment scale in older patients with hematological malignancies: The GAH Scale. *J Geriatr Oncol*. 2015;6:353-61.
6. Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, Béné MC, Buccisano F, Cloos J, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. 2018;131:1275-91.
7. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129:424-47.
8. Megías-Vericat JE, Martínez-Cuadrón D, Sanz MA, Montesinos P. Salvage regimens using conventional chemotherapy agents for relapsed/refractory adult AML patients: a systematic literature review. *Ann Hematol*. 2018;97:1115-53.
9. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, Laumann K, Geyer S, Bloomfield CD, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *N Engl J Med*. 2017;377:454-64.
10. Castaigne S, Pautas C, Terré C, Raffoux E, Bordessoule D, Bastie JN, et al. Effect of gemtuzumab ozogamicin on survival of adult patients with de-novo acute myeloid leukaemia (ALFA-0701): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet*. 2012;379:1508-16.
11. Lambert J, Pautas C, Terré C, Raffoux E, Turlure P, Denis Caillot D, et al. Gemtuzumab ozogamicin for de novo acute myeloid leukemia: final efficacy and safety updates from the open-label, phase III. ALFA-0701 trial. *Haematologica*. 2019;104:113-9.
12. Lancet JE, Uy GL, Cortes JE, Newell LF, Lin TL, Ritchie EK, et al. CPX-351 (cytarabine and daunorubicin) Liposome for Injection Versus Conventional Cytarabine Plus Daunorubicin in Older Patients With Newly Diagnosed Secondary Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2018;36:2684-92.
13. DiNardo CD, Jonas BA, Pullarkat V, Thirman MJ, García JS, Wei AH, et al. Azacitidine and Venetoclax in Previously Untreated Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2020;383:617-29.
14. Cortes JE, Heidel FH, Hellmann A, Fiedler W, Smith BD, Robak T, et al. Randomized comparison of low dose cytarabine with or without glasdegib in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome. *Leukemia*. 2019;33:379-89.
15. DiNardo CD, Stein EM, de Botton S, Roboz GJ, Altman JK, Mims AS, et al. Durable Remissions with Ivosidenib in IDH1-Mutated Relapsed or Refractory AML. *N Engl J Med*. 2018;378:2386-98.
16. Eytan M, Stein EM, DiNardo CD, Pollyea DA, Fathi AT, Roboz GJ, et al. Enasidenib in mutant IDH2 relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*. 2017;130:722-31.
17. Perl AE, Martinelli G, Cortes JE, Neubauer A, Berman E, Paolini S, et al. Gilteritinib or Chemotherapy for Relapsed or Refractory FLT3-Mutated AML. *N Engl J Med*. 2019;381:1728-40.
18. Wei AH, Döhner H, Pocock C, Montesinos P, Afanasyev B, Dombret H, et al. The QUAZAR AML-001 Maintenance Trial: Results of a Phase III International, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of CC-486 (Oral Formulation of Azacitidine) in Patients with Acute Myeloid Leukemia (AML) in First Remission. *Blood*. 2019;134(Supplement_2):LBA-3.
19. Liu Y, Bewersdorf JP, Stahl M, Zeidan AM. Immunotherapy in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes: The dawn of a new era? *Blood Rev*. 2019;34:67-83.



namplona

LXII CONGRESO
NACIONAL SEHH

V I R T U A L

XXXVI CONGRESO
NACIONAL SETH

26-30

DE OCTUBRE 2020

PONENCIAS

SIMPOSIO IMPACTO DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR EN HEMATOLOGÍA

Coordinadores:

Dr. Jesús María Hernández Rivas. Hospital Clínico Universitario de Salamanca

Dra. Rosa Ayala Díaz. Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid

Red blood cell disorders

Celeste Bento

Hematology Department. Centro Hospitalar e Universitario de Coimbra. Portugal.
CIAS – Research Centre for Anthropology and Health. University of Coimbra. Portugal

Red blood cells (RBC) are biconcave disks without nucleus, mitochondria and other organelles. They are formed by the membrane skeleton, some metabolic enzymes and are rich in hemoglobin (Hb), which comprises of globin subunits and iron-containing heme groups. In a normal healthy individual the number of circulating RBC and their precursors remain more or less constant, with a balance between the continuous loss of mature cells by senescence and new RBC production in the bone marrow. There are precise homeostatic mechanisms to ensure sufficient, but not excess, RBCs production. Congenital disorders affecting the constituents of the RBC (namely hemoglobinopathies, membranopathies or enzymopathies) or affecting the erythropoiesis, can lead to anemia or to excess of RBC production (erythrocytosis).

The most common inherited RBC disorders are congenital hemolytic anemias (CHA), caused by α - and β -hemoglobinopathies, red cell pyruvate kinase (PKLR) or glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency, and hereditary spherocytosis (HS), which affect millions of people worldwide. CHA can also be caused by other RBC enzymes deficiency, other forms of membranopathies and, more rarely, by ineffective erythropoiesis as in congenital sideroblastic anemia (CSA) or congenital dyserythropoietic anemia (CDA).

RBC disorders can also be caused by congenital iron deficiency, leading to severe microcytic hypochromic anemia, as in Iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA) and DMT1-deficiency anemia.

› Red blood cells disorders diagnosis

Traditional diagnosis of CHA has been done via a step-by-step process starting to evaluate the disorder in the proper clinical context, the family history and transmission pattern, the hematological parameters and the morphological analysis of peripheral blood. In the great number of cases this is enough to lead to the suspicious

of a hemoglobinopathy, membranopathy or enzymopathy. Biochemical tests as Hb capillary electrophoresis or high performance liquid chromatography (HPLC), combination of an eosin-5'-maleimide test (EMA) with ektacytometry, and measurement of the RBC enzyme levels, can confirm the diagnosis of thalassemia, sickle cell disorders or other Hb variants, RBC membrane disorders or RBC enzymes deficiency, respectively. Complementary analysis of bone marrow smears are necessary for the diagnosis of CDA and CSA.

› Molecular studies

Although in the most of cases it's possible to do the diagnosis without molecular studies, they are usually necessary to confirm the diagnosis, in order to establish suitable prognostic and treatment, and propose genetic counselling to the couples at risk. Molecular test are also used to find the disease-causing mutations in cases where traditional testing has failed, or when a patient has been transfused, leading to confounding biochemical testing findings due to mixed RBC populations.

For β -hemoglobinopathies, membrane and enzyme defects, CDA, CSA, IRIDA and DMT1-anemia, Sanger sequencing of the affected gene(s) is usually sufficient to find the pathogenic variant(s) causing the disorder.

For α -thalassemia, $\delta\beta$ -thalassemia and $\gamma\delta\beta$ -thalassemia, caused by large deletions of the corresponding genes, a GAP-PCR or MLPA study must be done.

Examples of situations when molecular diagnosis is crucial to establish prognostic and treatment or perform genetic counselling are:

- **Hemoglobinopathies:**

- Differentiation between moderate β -thalassemia intermedia (homozygous or compound heterozygous β^+ mutations; association of β^0 mutations with α -genes triplication), severe β -thalassemia intermedia (β^0/β^+) and dominant β -thalassemia intermedia.

► Bibliography

– Differentiation between α -thalassemia ($-\alpha/-\alpha$) α -thalassemia ($---/\alpha\alpha$), $\delta\beta$ -thalassemia or large β -gene cluster deletions ($\delta\beta$ -thal or $\gamma\delta\beta$ -thal) in presence of microcytic hypochromic anemia and normal quantification of HbA2.

– Identification of unstable Hbs, Hb-M or high affinity Hbs, when they are silent in electrophoresis or HPLC.

- **Enzymopathies:** in patients with a high reticulocyte count, because it interferes with the measurement of the enzyme.

- **Membranopathies:** identification of pathogenic variants in *PIEZO1* or *KCNN4* genes, as splenectomy is contraindicated in hereditary xerocytosis, due to increased risk of thromboembolic complications.

► Next generation sequencing (NGS)

Accurate diagnosis of congenital RBC disorders can be challenging because the clinical features may overlap with different etiologies and it is not possible to distinguish between them using conventional biochemical and molecular techniques. Sanger sequencing is not useful for the diagnoses of complex, multi-gene disorders or those with locus heterogeneity.

The wide use of NGS, either whole genome sequencing (WGS), whole exome sequencing (WES) or targeted gene panels, applied to the study of RBC disorders allowed to the identification of new genes, new variants and also to the detection of interaction of pathogenic variants in different genes causing disorders with complex phenotypes.

RBC disorders' targeted NGS panels (Table 1) improved the precise diagnosis of CHAs and other RBC disorders, reducing time to diagnosis and ameliorating differential diagnosis in terms of identification of new causative or modifier variants. Moreover, it allowed the identification of polygenic conditions, in which the phenotypic variability could be explained by the coinheritance of multiple disease genotypes. This enhances management and counselling of the patient and their family.

For those who are familiar with the NGS technology, it is not a surprise to be drowned in lots of variants, pathogenic, likely pathogenic or of unknown significance (VUS). Mutation databases, as HGMD, Varsome or Clinvar are of great help to classify these variants and we should contribute and register the variants (VUS, likely pathogenic or pathogenic) found in our patients.

- Agarwal AM, Nussenzweig RH, Reading NS, Patel JL, Sangle N, Salama ME, et al. Clinical utility of next-generation sequencing in the diagnosis of hereditary haemolytic anaemias. *Br J Haematol*. 2016 Sep;174(5):806-14.
- Andolfo I, Alper SL, Delaunay J, Auriemma C, Russo R, Asci R, et al. Missense mutations in the ABCB6 transporter cause dominant familial pseudohyperkalemia. *Am J Hematol*. 2013;88(1):66-72.
- Andolfo I, Russo R, Gambale A, Iolascon A. New insights on hereditary erythrocyte membrane defects. *Haematologica*. 2016;101:1284-94.
- Andolfo I, Russo R, Manna F, Shmukler BE, Gambale A, Vitiello G, et al. Novel Gardos channel mutations linked to dehydrated hereditary stomatocytosis (xerocytosis). *Am J Hematol*. 2015;90(10):921-6.
- Bae C, Gnanasambandam R, Nicolai C, Sachs F, Gottlieb PA. Xerocytosis is caused by mutations that alter the kinetics of the mechanosensitive channel PIEZO1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(12):E1162-8.
- Colosimo A, Gatta V, Guida V, Leodori E, Foglietta E, Rinaldi S, et al. Application of MLPA assay to characterize unsolved α -globin gene rearrangements. *Blood Cells Mol Dis*. 2011;46:139-44.
- Del Orbe Barreto R, Arrizabalaga B, De la Hoz AB, García-Orad Á, Tejada MI, García-Ruiz JC, et al. Detection of new pathogenic mutations in patients with congenital haemolytic anaemia using next-generation sequencing. *Int J Lab Hematol*. 2016;38:629-38.
- Del Orbe Barreto R, Arrizabalaga B, De la Hoz Rastrollo AB, García-Orad A, González Vallejo I, Bento C, et al. Hereditary xerocytosis, a misleading anemia. *Ann Hematol*. 2016 Sep;95(9):1545-6.
- Gambale A, Iolascon A, Andolfo I, Russo R. Diagnosis and management of congenital dyserythropoietic anemias. *Expert Rev Hematol*. 2016;9(3):283-96.
- Hamada M, Doisaki S, Okuno Y, Muramatsu H, Hama A, Kawashima N, et al. Whole-exome analysis to detect congenital hemolytic anemia mimicking congenital dyserythropoietic anemia. *Int J Hematol*. 2018 Sep;108(3):306-11.
- Kim Y, Park J, Kim M. Diagnostic approaches for inherited hemolytic anemia in the genetic era. *Blood Res*. 2017 Jun;52(2):84-94.
- Lette G. The search for genetic modifiers of disease severity in the β -hemoglobinopathies. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Oct 1;2(10):a015032.
- Mansour-Hendili L, Aissat A, Badaoui B, Sakka M, Gameiro C, Ortonne V, et al. Exome sequencing for diagnosis of congenital hemolytic anemia. *Orphanet J Rare Dis*. 2020 Jul 8;15(1):180.
- Mutlu B, Yilmaz Keskin E, Oliveira AC, Relvas L, Bento C. A Rare Cause of Cyanosis Since Birth: Hb M-Iwate. *Turk J Haematol*. 2019;36(4):299-301.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17:405-24.
- Roy NB, Wilson EA, Henderson S, Wray K, Babbs C, Okoli S, et al. A novel 33-Gene targeted resequencing panel provides accurate, clinical-grade diagnosis and improves patient management for rare inherited anaemias. *Br J Haematol*. 2016;175:318-30.

Table 1. Genes in the red blood cells (RBC) disorders' targeted next generation sequencing (NGS) panel, associated clinical phenotypes and Mendelian inheritance patterns

| Genes | Clinical phenotypes | Inheritance |
|---|--|------------------------------------|
| α- and β-globin genes | Hemoglobinopathies | |
| <i>HBB</i> | β -thalassemia major | Autosomal recessive |
| | β -thalassemia intermedia | Autosomal recessive |
| | Dominant β -thalassemia intermedia | Autosomal dominant |
| | Sickle cell disease | Autosomal recessive |
| <i>HBA1, HBA2</i> | Hb H disease | Autosomal recessive |
| <i>HBB, HBA1, HBA2</i> | Hemolytic anemia due to unstable Hb | Autosomal dominant |
| | Congenital erythrocytosis due to high affinity Hbs | Autosomal dominant |
| | Cyanosis due to Hb M | Autosomal dominant |
| RBC enzymes | Enzymopathies | |
| <i>G6PD</i> | Acute/Chronic hemolytic anemia | X-linked |
| <i>PGK1</i> | Chronic hemolytic anemia | X-linked |
| <i>ALDOA, AK1, GPI, PKLR, HK1, NT5C3A, TPI1, GSR, GSS</i> | Congenital hemolytic anemia | Autosomal recessive |
| RBC membrane | Membranopathies | |
| <i>ANK1, SLC4A1, SPTB</i> | Hereditary spherocytosis | Autosomal dominant, <i>de novo</i> |
| <i>EPB42, SPTA1,</i> | Hereditary spherocytosis | Autosomal recessive |
| <i>EPB41, SPTA1, SPTB</i> | Hereditary elliptocytosis | Autosomal dominant |
| <i>EPB41, SPTA1, SPTB</i> | Hereditary pyropoikilocytosis | Autosomal recessive |
| <i>SLC4A1</i> | Ovalocytosis Southeast Asian type | Autosomal dominant |
| <i>PIEZO1, KCNN4</i> | Dehydrated hereditary stomatocytosis (xerocytosis) | Autosomal dominant |
| <i>RHAG</i> | Overhydrated hereditary stomatocytosis | Autosomal dominant |
| <i>ABCB6</i> | Familial pseudohyperkalemia | Autosomal dominant |
| Erythroid differentiation | Congenital dyserythropoietic anemia | |
| <i>CDAN1, C15ORF41</i> | CDA type I | Autosomal recessive |
| <i>SEC23B</i> | CDA type II | Autosomal recessive |
| <i>KIF23</i> | CDA type III familial | Autosomal dominant |
| <i>KLF1, GATA-1</i> | CDA like | Autosomal dominant, X linked |
| Heme metabolism | Congenital sideroblastic anemia | |
| <i>ALAS2</i> | X-linked sideroblastic anemia | X-linked |
| <i>SLC25A38, GLRX5, HSPA9</i> | Sideroblastic anemia | Autosomal recessive |
| Iron metabolism | | |
| <i>TMPRSS6</i> | Iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA) | Autosomal recessive |
| <i>SLC11A2</i> | DMT1-deficiency anemia | Autosomal recessive |

Russo R, Andolfo I, Iolascon A. Next generation research and therapy in red blood cell diseases. *Haematologica*. 2016;101:515-7.

Russo R, Andolfo I, Manna F, Gambale A, Marra R, Rosato BE, et al. Multi-gene panel testing improves diagnosis and management of patients with hereditary anemias. *Am J Hematol*. 2018 May;93(5):672-82.

Sankaran VG, Gallagher PG. Applications of high-throughput DNA sequencing to benign hematology. *Blood*. 2013;122:3575-82.

Taylor JC, Martin HC, Lise S, Broxholme J, Cazier JB, Rimmer A, et al. Factors influencing success of clinical genome sequencing across a broad spectrum of disorders. *Nat Genet*. 2015 Jul;47(7):717-26

Hemostasia

Javier Corral, Belén de la Morena-Barrio, María Eugenia de la Morena-Barrio, Carlos Bravo-Pérez, Rosa Riquelme, José Padilla, Antonia Miñano, Vicente Vicente

Servicio de Hematología y Oncología Médica. Hospital General Universitario Morales Meseguer. Centro Regional de Hemodonación. Universidad de Murcia. Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB)-Arrixaca, Murcia. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER)

› Introducción

Mientras los estudios moleculares en el campo de las hemopatías malignas, por su valor diagnóstico, pronóstico y de respuesta terapéutica, son rutinarios y habituales en muchos hospitales españoles, existen muchos grupos trabajando en el campo y han incorporado la última tecnología molecular, las pruebas moleculares realizadas de forma rutinaria en el campo de la hemostasia se restringen casi exclusivamente a los estudios de trombofilia y en algunos centros a la hemofilia. De hecho, incluso los estudios de trombofilia están cuestionados, ya que solo se analizan las alteraciones trombóticas más comunes con bajo riesgo trombótico absoluto, por lo que los beneficios clínicos obtenidos son muy dudosos o restringidos a muy pocos pacientes. Solo grupos especializados, referentes nacionales para el diagnóstico de enfermedades específicas y con más enfoque de investigación, realizan otras pruebas moleculares, que afortunadamente están haciendo evolucionar esta área, con aportaciones destacadas que serán la base de la presente revisión que se enfoca en 2 situaciones diferentes: enfermedades complejas y enfermedades monogénicas.

› Enfermedades complejas: trombosis

El carácter multifactorial asociado con las enfermedades complejas como la trombosis lleva implícita la participación de diferentes genes y factores ambientales (Figura 1). Por ello, la búsqueda de la base molecular de la trombosis ha sido y será complicada. Existen casos en los que se ha identificado un componente mayoritario monogénico, como las recientes identificaciones de alteraciones en los genes de la protrom-

bina o del FIX^(1,2). Los estudios de familias con trombofilia y el desarrollo de los sistemas de secuenciación masiva sin duda identificarán nuevas alteraciones monogénicas implicadas en trombosis. Sin embargo, en la mayoría de los casos con trombosis, la base patogénica es multifactorial, con la participación de múltiples factores genéticos y factores ambientales. Dentro de los factores genéticos implicados, sin duda existen polimorfismos protrombóticos que juegan su

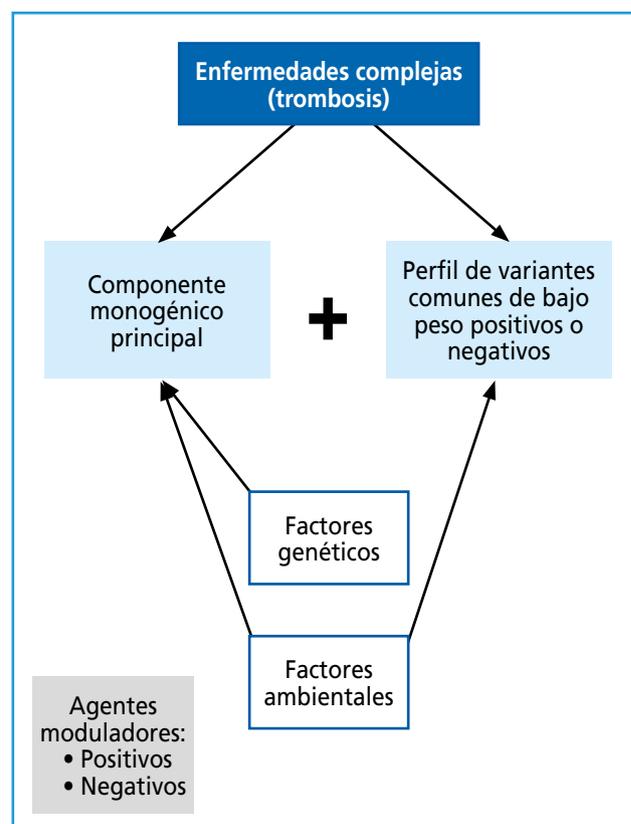


Figura 1. Elementos implicados en enfermedades complejas como la trombosis.

papel en esta enfermedad compleja; aunque los recientes metaanálisis de GWAS realizados en trombosis venosa o arterial coinciden en indicar que el número de polimorfismos implicados no es alto, pueden implicar proteínas que no se vinculan directamente con el sistema hemostático y el peso que tienen es siempre moderado, con un riesgo relativo que solo para el FV Leiden supera el 2%^(3,4).

En este contexto, se ha intentado desarrollar modelos predictivos basados en la presencia de perfiles de polimorfismos y de otros factores de riesgo⁽⁵⁾, y aunque sin duda es la aproximación más correcta a la realidad, todavía estamos muy lejos de conseguir unos modelos que sean de utilidad, en parte porque no tienen en cuenta todos los elementos implicados, ya que no incluyen alteraciones menos comunes, y porque todavía no sabemos parametrizar (la mayoría de los modelos solo usan escalas aditivas) las relaciones de diferentes alteraciones genéticas y/o ambientales, como discutiremos posteriormente.

El aspecto novedoso que en nuestra opinión debemos destacar en este contexto es el de los elementos protectores, generalizable a todas las enfermedades, pero que tiene especial peso en las que afectan al delicado balance hemostático. Hemos asistido a la búsqueda sistemática de elementos patogénicos o que incrementen el riesgo de sufrir enfermedades, pero se han hecho pocos esfuerzos en investigar variaciones genéticas que pudieran ejercer el efecto contrario: proteger frente a alteraciones patogénicas o modular el efecto patogénico de otras alteraciones genéticas⁽⁶⁾. Y, como hemos indicado, en un sistema que se caracteriza por ser un equilibrio entre elementos procoagulantes y anticoagulantes, las alteraciones que juegan un papel en un lado de la balanza pueden tener consecuencias antagónicas en el otro lado. Lo realmente curioso es que este concepto ya debíamos tenerlo integrado, pues es la base del tratamiento anticoagulante con antivitamina K. Sin embargo, solo desde hace pocos años se están implementando actuaciones con este mismo objetivo, como son la generación de estados protrombóticos para reducir el riesgo hemorrágico en hemofílicos empleando silenciamiento de antitrombina o proteína S o la inhibición del TFPI (*tissue factor pathway inhibitor*)⁽⁷⁻⁹⁾.

Desde el punto de vista molecular y ya en el lado de la trombosis, el ejemplo más interesante, que estamos seguros no será el último, es el potente efecto protector que la deficiencia congénita de FXI, a la que se

había denominado hemofilia C, tiene frente a la patología trombótica, especialmente en territorio venoso. La protección antitrombótica observada en pacientes con deficiencia de FXI⁽¹⁰⁾, junto a los datos de diferentes modelos animales, ha propiciado el desarrollo de nuevos tratamientos anticoagulantes basados en la reducción de niveles de FXI (y FXII) por el bajo riesgo hemorrágico asociado^(11,12).

› Enfermedades monogénicas

Este ámbito se ha visto significativamente implementado con el desarrollo de la *next generation sequencing* (NGS). Varios grupos de nuestras sociedades están produciendo excelentes resultados identificando nuevos genes y variantes génicas con distintos mecanismos implicados en distintas enfermedades monogénicas de la hemostasia. Destacamos la contribución del Dr. Rivera y el Dr. Bastida en Murcia y Salamanca en el campo de las trombopatías⁽¹³⁾; la del Dr. Vidal en Barcelona en la enfermedad de von Willebrand y otras coagulopatías⁽¹⁴⁾, y la del Dr. Soria también en Barcelona por su experiencia en GWAS⁽¹⁵⁾. En este campo, al igual que ocurre con cualquier otra enfermedad en la que se emplean sistemas de secuenciación masiva para identificar la base molecular, las variantes identificadas deben validarse para confirmar su efecto funcional y patológico. Por ello, además de una segregación familiar, en muchos casos hay que recurrir a modelos celulares y animales para confirmar que sea la alteración responsable de la enfermedad.

Sin embargo, existen algunos aspectos relacionados con el diagnóstico molecular de enfermedades monogénicas que las técnicas de NGS no consiguen aclarar y que detallamos a continuación.

› Variantes estructurales

Las variantes estructurales (SV) son alteraciones genéticas de más de 50 pb. Aunque sean mucho menos abundantes numéricamente en el genoma que las variantes puntuales (SNV), el hecho de que afectan a mucha más cantidad de bases hace que el potencial patogénico de las SV sea mucho mayor que el de las SNV⁽¹⁶⁾. Desgraciadamente, las SV son de difícil diagnóstico empleando sistemas de secuenciación masiva basados en lecturas cortas y, aunque hay sis-

Tabla 1. Métodos diagnósticos capaces de identificar variantes estructurales

| Método | Transl | Inv | CNV (> 50 Kb) | Indel (1-50 Kb) | SV < 1 Kb | Sec punto ruptura |
|--------------------------|-------------|-------------|---------------|-----------------|-----------|-------------------|
| Análisis genoma | | | | | | |
| Cariotipo | Sí (> 3 Mb) | Sí (> 3 Mb) | Sí (> 3 Mb) | No | No | No |
| aCGH | No | No | Sí (> 5 Kb) | No | No | No |
| aSNP | No | No | Sí | Sí | Sí (SNP) | No |
| Sec PE | Sí | Sí | Sí | Sí | No | Sí |
| Sec Nanoporo | Sí | Sí | Sí | Sí | Sí | Sí |
| Análisis dirigido | | | | | | |
| MLPA | No | No | No | Sí | Sí | No |
| RT-qPCR | No | No | No | Sí | Sí | No |
| FISH | Sí | Sí | Sí | Sí | Sí | No |

aCGH: *array comparative genome hybridization*; aSNP: *array single nucleotide polymorphism*; CNV: *copy number variation*; FISH: *fluorescence in situ hybridization*; Inv: *inversión*; Kb: *kilobase*; Mb: *megabase*; MLPA: *multiple ligation probe amplification*; RT-qPCR: *real time quantitative PCR*; Sec PE: *secuenciación paired-end*; Sec: *secuenciación*; SV: *structural variant*; Trans: *translocación*

temas tanto dirigidos a genes específicos como que abarcan el genoma completo capaces de detectar las SV, es cierto que algunos tipos de SV (por ejemplo, inversiones o inserciones de retrotransposones) y especialmente algunas localizaciones, como intrónicas o reguladoras, son muy difíciles de detectar o no se caracterizan a nivel de la secuencia con muchos de los métodos moleculares empleados rutinariamente⁽¹⁷⁾ (Tabla 1).

Nuestro grupo ha desarrollado un proyecto que ha investigado las SV implicadas en la deficiencia de antitrombina, la trombofilia más grave. Para ello, hemos comparado diferentes metodologías moleculares empleadas en identificar estas alteraciones, desde MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) a *array* de hibridación genómica comparada (CGHa) o PCR largas y posterior secuenciación, y, sobre todo, hemos empleado sistemas de secuenciación de tercera generación con nanoporos, que permiten un estudio del genoma completo sin ninguna manipulación generando secuencias extralargas (de hasta 2,5 Mb)⁽¹⁸⁾.

El estudio se ha realizado en 2 cohortes: por una parte, casos con deficiencia de este anticoagulante que tenían una SV que afecta a *SERPINC1*, el gen que codifica antitrombina, identificada mediante MLPA; y, por otra parte, casos en los que ni la secuenciación (NGS o Sanger) ni el MLPA identificaron alteraciones relevantes en *SERPINC1*. En el grupo de SV la secuenciación por nanoporos identificó todas las SV, independientemente de la extensión (desde 193 pb a

2 Mb) o tipo (deleción o duplicación); definió exactamente la extensión de la SV y estableció la secuencia exacta del punto de ruptura⁽¹⁹⁾. Este último aspecto es clave en varios aspectos. Primero, ayuda a diseñar con precisión los sistemas de verificación que validen los resultados obtenidos. En segundo lugar, ayuda a definir el mecanismo implicado.

Así, en nuestros casos, la identificación en la mayoría de los casos de secuencias repetitivas en la cercanía del punto de ruptura y la presencia de microhomología (de 3 a 30 pb) en el punto de ruptura muestran la relevancia de las secuencias repetitivas (abundantes en *SERPINC1*) en el desarrollo de estas SV y la implicación de un mecanismo basado en replicación (BIR/MMBIR/FoSTeS) que explique la aparición de estas SV. Pero quizás la mayor ventaja desde el punto de vista diagnóstico es que la secuenciación por nanoporos permite conocer la arquitectura genética general aclarando casos con un diagnóstico incorrecto o contradictorio, o identificando nuevos mecanismos de esta enfermedad.

De esta forma, pudimos demostrar que la supuesta deleción del exón 1 diagnosticada por MLPA en un caso, contradictoria con el diagnóstico de deleción de los exones 1 y 2 que sugería el análisis por LR-PCR y secuenciación, en realidad era una variante estructural compleja (CxSV) que implicaba una duplicación de los exones 2 y 3, con posterior deleción de los exones 1 y 2, siendo la primera CxSV identificada en la deficiencia de antitrombina⁽¹⁹⁾. Pero el resultado más interesante implica los casos

sin base molecular conocida con los métodos moleculares convencionales.

El empleo de secuenciación de tercera generación nos ha permitido identificar la base molecular en 4 de los 14 casos analizados. En un caso, la deficiencia se debía a la delección de gran parte del intrón 1 y los primeros nucleótidos del exón 2⁽²⁰⁾. Los 3 casos restantes compartían la inserción de un retrotransposón de 2,4 Kb del tipo SVA-E (aunque con algunas peculiaridades que se pudieron identificar al generar el ensamblaje *de novo* de la secuencia que obtuvo con nanoporos) en el intrón 6 de *SERPINC1*. Este estudio es la primera descripción de que la inserción de un retrotransposón constituye la base molecular de la deficiencia de antitrombina y amplía el número de enfermedades en las que la inserción de elementos móviles está implicada⁽¹⁹⁾.

› Otras fortalezas de la secuenciación de tercera generación

La secuenciación de tercera generación tiene otras fortalezas que merecen ser destacadas. Especialmente interesante es la oportunidad de definir haplotipos en secuencias largas. Poder secuenciar grandes fragmentos de ADN (tanto genómico como amplicones) permite conocer el ligamiento de alteraciones genéticas y poder definir haplotipos sin necesidad de clonación o estudios familiares. Esta posibilidad la hemos explorado para determinar, gracias al haplotipo común de 14 SNV, el efecto fundador de la primera mutación recurrente identificada en pacientes africanos portadores de la variante p.Thr147Ala de *SERPINC1*, causante de una deficiencia de antitrombina presente en más del 1% de esa población⁽²¹⁾. En este congreso, el Dr. Teruel, de nuestro grupo, presenta una comunicación sobre el uso de esta tecnología en el diagnóstico de mutaciones bialélicas en *CEBPA*.

› Implicación de otros genes en enfermedades monogénicas. Papel de modificaciones postraduccionales

Tendemos a pensar que solo las alteraciones en el gen codificante son las que pueden justificar un defecto en una proteína. Sin embargo, cada día aparecen más evidencias de otros mecanismos implicados en lo que se consideraban enfermedades monogé-

nicas. Ya se conocía que deficiencias combinadas de FV y FVIII pueden ser causadas por alteraciones en proteínas implicadas en el transporte intracelular (*LMAN1* y *MCFD2*)⁽²²⁾ o que la deficiencia combinada de proteínas vitamina K puede explicarse por alteraciones en cualquiera de los 2 elementos del ciclo de la vitamina K, γ -GGCX o VKORC1, con diferentes mecanismos desde mutaciones recesivas a la disomía uniparental⁽²³⁾. Nuestro grupo, estudiando la base molecular de la deficiencia de antitrombina en casos sin alteraciones en *SERPINC1*, descubrimos que hasta el 25% de estos casos se deben a defectos de glicosilación con base molecular en alguno de los 25 genes implicados en la ruta de N-glicosilación⁽²⁴⁾. Es cierto que, en todas estas situaciones, los defectos normalmente afectan más de una proteína y podrían asociarse con más manifestaciones clínicas, pero también es cierto que identificar la base molecular en estos pacientes abre nuevas perspectivas terapéuticas de las que estos pacientes se podrían beneficiar⁽²⁵⁾.

› Nuevas patologías

Aunque nos parezca mentira en el siglo XXI, con el desarrollo de la medicina molecular, todavía quedan desórdenes cuya base molecular es desconocida. Es el caso de la agenesia de cava, una malformación congénita que se había relacionado con eventos trombóticos durante el desarrollo embrionario⁽²⁶⁾. La identificación casi casual de agenesia de vena cava en un caso con trombosis juvenil y deficiencia de antitrombina causada por una de las trombofilias congénitas más graves, la variante Budapest 3 (p.Leu131Phe) en homocigosis, que se asocia con trombosis neonatal o infantil⁽²⁷⁾, nos llevó a plantear si esta trombofilia tan grave podría asociarse con este defecto vascular.

El estudio de más de 1.000 sujetos con deficiencia congénita de antitrombina de 2 cohortes (Española y Húngara) nos permitió reclutar la serie más grande de homocigotos Budapest 3 (N = 59). Las pruebas de imagen realizadas en 22 casos nos permitieron identificar atresia del sistema de la vena cava en 15 casos (14 en la cava y uno en la iliaca), todos con mecanismos vasculares compensatorios (dilatación de ácigos y hemiácigos, principalmente), lo que nos lleva a plantear que las trombofilias graves pueden ser la base molecular que cause la agenesia de cava,

al favorecer el desarrollo de un evento trombótico en esa localización durante el desarrollo embrionario⁽¹⁹⁾.

› Interacción genético-ambiental

Aunque una alteración genética germinal es permanente y se puede transmitir a la siguiente generación, las consecuencias funcionales o patológicas de la misma no tienen que ser siempre las mismas. El ejemplo más claro de cómo las consecuencias de una mutación pueden verse condicionadas por factores ambientales son las mutaciones sensibles a temperatura, alteraciones genéticas que modifican ligeramente la estructura de la proteína afectada de forma que en temperaturas permisivas permiten un correcto plegamiento, localización celular y función, pero que, sometidas a temperaturas más elevadas, acentúan el efecto estructural de la mutación y estas dan su cara patológica⁽²⁸⁾. En hemostasia, en particular para la deficiencia de antitrombina, hemos identificado 2 situaciones en las que 2 tipos de alteraciones genéticas se ven influenciadas por 2 factores ambientales diferentes que condicionan la aparición de la deficiencia del anticoagulante y el consiguiente riesgo trombótico, con una dificultad diagnóstica que puede justificar por qué estas alteraciones hayan estado subestimadas. En primer lugar, la particularidad estructural de esta serpina, que tiene que plegarse en una conformación metaestable para que funcione, hace que pequeñas alteraciones, incluso cambios *missense*, puedan facilitar el plegamiento en conformaciones no funcionales como la forma latente o polimerice quedando retenida en el interior celular⁽²⁹⁾. Ya Robin Carrell descubrió que algunas mutaciones *missense* generan formas de antitrombina completamente funcionales en condiciones normales, pero que, en condiciones inflamatorias o infecciosas, asociadas a moderados incrementos de temperatura, la forma variante se transforma a forma latente y pierde su actividad anticoagulante⁽³⁰⁾. Nuestro grupo ha incrementado el número de mutaciones de este tipo⁽³¹⁾ y ha demostrado que buena parte de los casos con deficiencia transitoria de antitrombina, en los que no se continúa su caracterización molecular porque en una segunda muestra los estudios funcionales no detectan deficiencia de antitrombina, en realidad tienen alteraciones moleculares que causan deficiencia de antitrombina y sin duda con-

tribuyen al riesgo trombótico de los portadores⁽³²⁾. En este estudio también comprobamos cómo los defectos de glicosilación pueden ser consecuencia de un defecto bialélico en genes de esta ruta (desorden recesivo), pero también pueden ser consecuencia de la combinación, transitoria, de una alteración molecular en uno de esos genes y un factor ambiental que también actúa en la misma ruta de N-glicosilación: el consumo de alcohol⁽³²⁾. Por tanto, los estudios funcionales en estos casos solo permitirían detectar el defecto si la muestra se toma cuando está presente el factor ambiental y, por tanto, se recomiendan los estudios moleculares en casos en los que se haya identificado un solo defecto funcional. Este resultado también es una llamada de atención a la penetrancia de un defecto molecular sobre un fenotipo intermedio o clínico: siempre hay que tener en cuenta otros factores moduladores, capaces de actuar, tanto positiva como negativamente, aditiva o sinérgicamente junto a defectos moleculares.

› Agradecimientos

Este trabajo ha sido posible gracias a los proyectos PI18/00598 (ISCIII&FEDER) y 19873/GERM/15 (Fundación Séneca). María Eugenia de la Morena-Barrio disfruta de un contrato posdoctoral de la Universidad de Murcia; Belén de la Morena-Barrio de un contrato predoctoral de la Fundación Séneca; y Rosa Cifuentes de un contrato predoctoral PFIS del ISCIII.

› Bibliografía

1. Simioni P, Tormene D, Tognin G, Gavasso S, Bulato C, Iacobelli NP, et al. X-linked thrombophilia with a mutant factor IX (factor IX Padua). *N Engl J Med*. 2009 Oct 22;361(17):1671-5.
2. Miyawaki Y, Suzuki A, Fujita J, Maki A, Okuyama E, Murata M, et al. Thrombosis from a prothrombin mutation conveying antithrombin resistance. *N Engl J Med*. 2012 Jun 21;366(25):2390-6.
3. Germain M, Chasman DI, de Haan H, Tang W, Lindström S, Weng LC, et al. Meta-analysis of 65,734 individuals identifies TSPAN15 and SLC44A2 as two susceptibility loci for venous thromboembolism. *Am J Hum Genet*. 2015 Apr 2;96(4):532-42.
4. Lee JJ, Wedow R, Okbay A, Kong E, Maghziyan O, Zacher M, et al. Gene discovery and polygenic prediction from a genome-wide association study of educational attainment in 1.1 million individuals. *Nat Genet*. 2018 Jul 23;50(8):1112-21.

5. Folsom AR, Tang W, Weng LC, Roetker NS, Cushman M, Basu S, Pankow JS. Replication of a genetic risk score for venous thromboembolism in whites but not in African Americans. *J Thromb Haemost*. 2016 Jan;14(1):83-8.
6. Schwartz MLB, Williams MS, Murray MF. Adding Protective Genetic Variants to Clinical Reporting of Genomic Screening Results: Restoring Balance. *JAMA*. 2017 Apr 18;317(15):1527-8.
7. Pasi KJ, Rangarajan S, Georgiev P, Mant T, Creagh MD, Lissitchkov T, et al. Targeting of Antithrombin in Hemophilia A or B with RNAi Therapy. *N Engl J Med*. 2017 Aug 31;377(9):819-28.
8. Prince R, Bologna L, Manetti M, Melchiorre D, Rosa I, Dewarrat N, et al. Targeting anticoagulant protein S to improve hemostasis in hemophilia. *Blood*. 2018 Mar 22;131(12):1360-71.
9. Mahlangu J, Oldenburg J, Paz-Priel I, Negrier C, Niggli M, Mancuso ME, et al. Emicizumab Prophylaxis in Patients Who Have Hemophilia A without Inhibitors. *N Engl J Med*. 2018 Aug 30;379(9):811-22.
10. Preis M, Hirsch J, Kotler A, Zoabi A, Stein N, Rennett G, Saliba W. Factor XI deficiency is associated with lower risk for cardiovascular and venous thromboembolism events. *Blood*. 2017 Mar 2;129(9):1210-5.
11. Büller HR, Bethune C, Bhanot S, Gailani D, Monia BP, Raskob GE, et al.; FXI-ASO TKA Investigators. Factor XI antisense oligonucleotide for prevention of venous thrombosis. *N Engl J Med*. 2015 Jan 15;372(3):232-40.
12. DeLoughery EP, Olson SR, Puy C, McCarty OJT, Shatzel JJ. The Safety and Efficacy of Novel Agents Targeting Factors XI and XII in Early Phase Human Trials. *Semin Thromb Hemost*. 2019 Jul;45(5):502-8.
13. Bastida JM, Benito R, González-Porrás JR, Rivera J. ABCG5 and ABCG8 gene variations associated with sitosterolemia and platelet dysfunction. *Platelets*. 2020 Jun 16:1-5.
14. Borràs N, García-Martínez I, Batlle J, Pérez-Rodríguez A, Parra R, et al. Unraveling the Influence of Common von Willebrand factor variants on von Willebrand Disease Phenotype: an Exploratory Study on the Molecular and Clinical Profile of von Willebrand Disease in Spain Cohort. *Thromb Haemost*. 2020 Mar;120(3):437-48.
15. Pujol-Moix N, Martínez-Pérez A, Sabater-Lleal M, Llobet D, Vilalta N, Hamsten A, et al. Influence of ABO Locus on PFA-100 Collagen-ADP Closure Time Is Not Totally Dependent on the Von Willebrand Factor. Results of a GWAS on GAIT-2 Project Phenotypes. *Int J Mol Sci*. 2019 Jun 30;20(13):3221.
16. Spielmann M, Lupiáñez DG, Mundlos S. Structural variation in the 3D genome. *Nat Rev Genet*. 2018 Jul;19(7):453-67.
17. Logsdon GA, Vollger MR, Eichler EE. Long-read human genome sequencing and its applications. *Nat Rev Genet*. 2020;21(10):597-614.
18. Kono N, Arakawa K. Nanopore sequencing: review of potential applications in functional genomics. *Dev Growth Differ*. 2019 Jun;61(5):316-26.
19. de la Morena-Barrio B, Stephens J, de la Morena-Barrio ME, Stefanucci L, Padilla J, Miñano A, et al. Long-read sequencing resolves structural variants in SERPINC1 causing antithrombin deficiency and identifies a complex rearrangement and a retrotransposon insertion not characterized by routine diagnostic methods. *bioRxiv* 2020.08.28.271932; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.08.28.271932>
20. De la Morena-Barrio B, Borràs N, Rodríguez-Alén A, de la Morena-Barrio ME, García-Hernández JL, Padilla J, et al. Identification of the first large intronic deletion responsible of type I antithrombin deficiency not detected by routine molecular diagnostic methods. *Br J Haematol*. 2019 Aug;186(4):e82-e86.
21. Orlando C, de la Morena-Barrio B, Pareyn I, Vanhoorelbeke K, Martínez-Martínez I, Vicente V, et al. Antithrombin p.Thr147Ala, the first founder mutation from African origin responsible for inherited antithrombin deficiency *Thromb Haemost*. 2020 Sept 13. Online ahead of print.
22. Spreafico M, Peyvandi F. Combined FV and FVIII deficiency. *Haemophilia*. 2008 Nov;14(6):1201-8.
23. Dasi MA, González-Conejero R, Izquierdo S, Padilla J, García JL, García-Barberá N, et al. Uniparental disomy causes deficiencies of vitamin K-dependent proteins. *J Thromb Haemost*. 2016 Dec;14(12):2410-8.
24. De la Morena-Barrio ME, Martínez-Martínez I, de Cos C, Wypasek E, Roldán V, Undas A, et al. Hypoglycosylation is a common finding in antithrombin deficiency in the absence of a SERPINC1 gene defect. *J Thromb Haemost*. 2016 Aug;14(8):1549-60.
25. De la Morena-Barrio ME, Wypasek E, Owczarek D, Miñano A, Vicente V, Corral J, Undas A. MPI-CDG with transient hypoglycosylation and antithrombin deficiency. *Haematologica*. 2019 Feb;104(2):e79-e82.
26. Ramanathan T, Hughes TM, Richardson AJ. Perinatal inferior vena cava thrombosis and absence of the infrarenal inferior vena cava. *J Vasc Surg*. 2001 May;33(5):1097-9.
27. Kovac M, Mitic G, Djilas I, Kuzmanovic M, Serbic O, Lekovic D, et al. Genotype phenotype correlation in a pediatric population with antithrombin deficiency. *Eur J Pediatr*. 2019 Oct;178(10):1471-8.
28. Friedberg EC. Hot news: temperature-sensitive humans explain hereditary disease. *Bioessays*. 2001 Aug;23(8):671-3.
29. Corral J, Vicente V, Carrell RW. Thrombosis as a conformational disease. *Haematologica*. 2005 Feb;90(2):238-46.
30. Beauchamp NJ, Pike RN, Daly M, Butler L, Makris M, Dafforn TR, et al. Antithrombins Wibble and Wobble (T85M/K): archetypal conformational diseases with in vivo latent-transition, thrombosis, and heparin activation. *Blood*. 1998 Oct 15;92(8):2696-706.
31. Navarro-Fernández J, de la Morena-Barrio ME, Padilla J, Miñano A, Bohdan N, Águila S, et al. Antithrombin Dublin (p.Val30Glu): a relatively common variant with moderate thrombosis risk of causing transient antithrombin deficiency. *Thromb Haemost*. 2016 Jul 4;116(1):146-54.
32. Bravo-Pérez C, Vicente V, Corral J. Management of antithrombin deficiency: an update for clinicians. *Expert Rev Hematol*. 2019 Jun;12(6):397-405.

AVANCES RECIENTES EN GAMMAPATÍAS MONOCLONALES

Coordinadores:

Dra. Paula Rodríguez Otero. Clínica Universidad de Navarra. Pamplona

Dr. Enrique M. Ocio San Miguel. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander

Amiloidosis AL 2020: diagnóstico y tratamiento

Isabel Krsnik

Servicio de Hematología. Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda. Madrid

› Introducción

La amiloidosis es una enfermedad de baja incidencia producida por el depósito de proteínas en formas de amiloide. Hay descritas unas 20 proteínas capaces de producir amiloidosis sistémica. Sin embargo, más del 95% de las amiloidosis que se diagnostican habitualmente son la amiloidosis AL (amiloidosis de cadenas ligeras), en la que se depositan fragmentos de cadenas ligeras de inmunoglobulinas, y la amiloidosis ATTR (depósito de transtiretina). Se diagnostican unos 10-12 nuevos casos $\times 10^6$ /año de amiloidosis AL. No se conoce la incidencia real de la amiloidosis ATTR, pero en estudios necrópsicos se puede encontrar depósito de TTR hasta en un 20% de los ancianos estudiados.

› Datos del Hospital Universitario Puerta de Hierro

En nuestro servicio, hemos diagnosticado y tratado 108 casos de amiloidosis AL (2005-2020; 55 mujeres:53 hombres; edad mediana: 65; rango: 31-86). La mayor parte de los enfermos presentaban ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) avanzado al diagnóstico, afectación de múltiples órganos y afectación cardiaca severa (NT-proBNP > 8.500 pg/mL: 38%). La mayor parte de los enfermos se diagnosticaron por causa cardiológica y la disfunción cardiaca ha sido la responsable de la mayor parte de los fallecimientos. Se utilizarán los datos de este grupo para apoyar la presentación.

› Diagnóstico

Los hematólogos debemos sospechar una amiloidosis AL en toda gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) con alguno de los siguientes datos: aumento del NT-proBNP, albuminuria, patrón restrictivo en ecocardiograma, hepatomegalia con aumento

de la fosfatasa alcalina o polineuropatía en ausencia de diabetes mellitus. El protocolo inicial de estudio de una GMSI debería incluir una determinación de NT-proBNP y una proteinuria.

Si se sospecha una amiloidosis AL, se debe proceder a un estudio completo con las mismas exploraciones complementarias que en el caso del mieloma múltiple (MM).

El estudio de proteínas debe incluir no solo proteino-grama en suero y orina, sino inmunofijación (IF), aunque no se evidencien componentes monoclonales, y determinación de cadenas ligeras libres (CLL, ensayo Freelite®). Los resultados del estudio inicial de inmun-química en suero y orina en 90 casos de amiloidosis AL de nuestro centro muestra que, en comparación con el MM, predomina la clonalidad lambda, que es frecuente que no se detecten componentes monoclonales en suero y que, por el contrario, es raro que no se evidencien cifras patológicas de CLL (Figura 1). Hay un 1-5% de amiloidosis AL que no presenta ni IF positiva en suero/orina ni cifras patológicas de CLL.

Respecto al estudio de médula ósea (MO), se recomienda que se haga siempre biopsia por 2 motivos: el porcentaje de células plasmáticas (CP) es con frecuencia superior a las que se cuentan en el aspirado (dato con valor pronóstico) y se puede evidenciar material amiloide. Se debe solicitar siempre hibridación *in situ* fluorescente (FISH) que incluya, al menos, del 17p y roturas del gen IgH (valor pronóstico y posiblemente terapéutico).

Es imprescindible la evaluación cuidadosa de la posible afectación orgánica (sobre todo cardiaca con ecocardiograma y/o resonancia magnética -RM-, NT-proBNP y troponina).

El diagnóstico de la amiloidosis AL es obligado por biopsia que demuestre la presencia de material amiloide. La elección del órgano o tejido a biopsiar depende de la experiencia de cada centro y de la afectación orgánica que presente el paciente. La

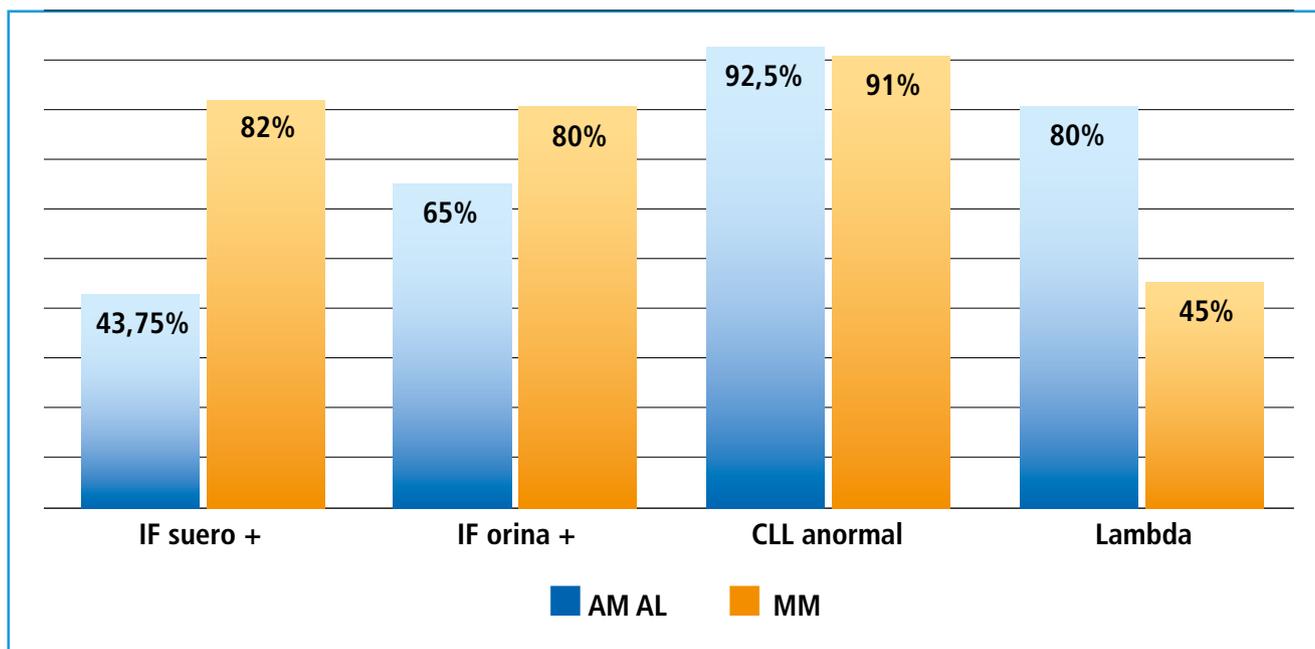


Figura 1. Inmunoquímica en suero y orina al diagnóstico en 100 casos de mieloma múltiple (MM) y 90 de amiloidosis AL (AM AL) de diagnóstico consecutivo. Datos del Hospital Universitario Puerta de Hierro presentados en el International Symposium on Amyloidosis (ISA) 2020. CLL: cadenas ligeras libres; IF: inmunofijación.

biopsia de MO tiene una rentabilidad superior al 40% y las biopsias de órganos con datos de afectación clínica casi del 100%. Las biopsias de grasa o encía tienen una rentabilidad baja en nuestro centro (Tabla 1). Se debe insistir al patólogo en la realización de inmunohistoquímica del amiloide, ya que no es rara la combinación de una GMSI + depósito de TTR en el corazón en pacientes de edad avanzada. En casos dudosos, puede ser necesario remitir la muestra de tejido al centro de referencia oportuno para su estudio mediante espectrometría de masas.

La gammagrafía con ^{99m}Tc -DPD puede ayudar en el diagnóstico diferencial en los casos con afectación cardíaca, ya que se observa captación intensa en el área cardíaca en el 100% de las amiloidosis cardíacas por depósito de TTR. Un 10-20% de las amiloidosis AL pueden presentar captación en el área cardíaca.

➤ Pronóstico

El sistema de estratificación pronóstica más utilizado es el Mayo modificado (NTproBNP > 1.800 pg/mL, troponina > 0,07 ng/mL, diferencia entre CLL involucrada y no involucrada -dCLL- > 180 mg/L). Se obtienen

Tabla 1. Sensibilidad de 272 biopsias (107 pacientes con amiloidosis AL). Datos del Hospital Universitario Puerta de Hierro presentados en el International Symposium on Amyloidosis (ISA) 2020

| Tejido | Biopsia/Amiloide + |
|---------------------------|----------------------------------|
| Médula ósea | 101/43 (43%) |
| Corazón | 59/57 (96%) |
| Riñón | 17/17 (todos síndrome nefrótico) |
| Grasa subcutánea | 38/10 |
| Glándulas salivares/Encía | 19/6 |
| Colon/Recto/Estómago | 17/13 |
| Lengua | 10/9 (macrogllosia) |
| Pulmón | 4/4 (lesión Rx) |
| Nervio sural | 3/3 (PNP) |
| Hígado | 2/2 (hepatomegalia + ↑ FA) |
| Piel | 2/2 (bultomas) |
| Ganglio linfático | 1/1 (adenopatías) |
| Amígdala | 1 / 1 (hipertrofia) |

4 grupos con medianas de supervivencia entre 6 y > 120 meses. Se puede utilizar también el BNP y las nuevas troponinas.

Otros factores con valor pronóstico pretratamiento son: > 10% de CP en MO, FISH con alteraciones -t(11;14), +1q21-, insuficiencia renal, afectación > 2 órganos y aumento de LDH.

Tanto la calidad como la rapidez de la respuesta al tratamiento mejoran el pronóstico.

› Respuesta al tratamiento

En amiloidosis AL hay que valorar no solo la respuesta hematológica sino la de los órganos. Si no hay respuesta hematológica, no puede mejorar la afectación de órganos, pero una respuesta hematológica no se sigue inmediatamente de respuesta orgánica. Es necesario un tiempo que es variable según el órgano, el NT-proBNP puede mejorar rápidamente, pero la proteinuria puede tardar meses. El grado de respuesta hematológica, la calidad de la misma y la rapidez condicionan el pronóstico.

La respuesta tanto hematológica como orgánica están definidas en los criterios publicados.

› Tratamiento

El tratamiento de un paciente con amiloidosis AL es multidisciplinar y debe incluir 3 aspectos: el tratamiento sintomático, el tratamiento antineoplásico y la eliminación del amiloide.

El tratamiento sintomático es muy variable de un enfermo a otro y requiere el concurso de otros especialistas.

El tratamiento antineoplásico se debe considerar una urgencia (sobre todo si hay afectación cardiaca). Respecto a la duración, existe numerosa evidencia publicada de que se debe intentar conseguir la mejor respuesta posible valorando tanto la cantidad absoluta de la CLL involucrada (CLLi) como el diferencial (dCLL); el cálculo de la ratio carece de valor pronóstico. En casos seleccionados, puede ser de interés medir la enfermedad mínima residual (EMR) en MO mediante citometría al final del tratamiento.

La elección de los fármacos se debe ajustar al enfermo, su ECOG, su edad y la afectación orgánica.

Los enfermos frágiles no candidatos definitivamente a trasplante autólogo de progenitores hematopoyéti-

cos (TASPE) pueden beneficiarse de combinaciones de tipo melfalán/dexametasona o ciclofosfamida/dexametasona con o sin bortezomib (muy recomendable el esquema melfalán/bortezomib/dexametasona).

Los enfermos candidatos, o potencialmente candidatos, a TASPE deben recibir alguna combinación con bortezomib, evitando melfalán.

El TASPE, tanto como parte del tratamiento inicial como en diferido, se debe reservar para pacientes en los que no suponga un riesgo vital (edad, ECOG, afectación cardiaca no severa, etc.). Al igual que en el MM, se debe considerar un tratamiento de consolidación. Teniendo en cuenta la efectividad de los nuevos fármacos antimieloma, cada vez está menos justificado proceder a TASPE en directo.

Si no se obtiene una respuesta hematológica precoz y de calidad, se debe plantear con prontitud cambiar los fármacos usados teniendo en cuenta las toxicidades propias de cada uno (Tabla 2). Las combinaciones con daratumumab están consiguiendo resultados muy prometedores en primera línea y retratamiento, con escasa toxicidad.

Hay también experiencia publicada con otros inhibidores del proteasoma (carfilzomib e ixazomib) e inmunomoduladores (lenalidomida o pomalidomida).

Asimismo, se debe valorar, según la edad y la afectación, la conveniencia de reanudar tratamiento en el caso de que reaparezca enfermedad hematológica, sobre todo en los casos de afectación cardiaca.

Tabla 2. Fármacos potencialmente utilizables en el tratamiento de la amiloidosis AL. Ventajas e inconvenientes

| Grupo | Fármacos | | Problemas |
|-------------|--|--|---|
| Corticoides | Prednisona Dexametasona | Combinaciones DMS > PND | ↑ DMS en ICC |
| Alquilantes | Melfalán Ciclofosfamida Bendamustina | BMDex/CyBorDex/ Benda/bor/DMS | Movilización PHSP IR y mel Cor y CFM |
| IP | Bortezomib Carfilzomib Ixazomib | Combinaciones Rápidos Bien tolerados | Bor: PNP CFZ: cor Ixa: no PNP, no cor |
| IMiD | (Talidomida) Lenalidomida Pomalidomida | Lentos Menos datos | Tal: PNP Lena: cor, IR L+P: movilización |
| AcMo | Daratumumab | Rápido Bien tolerado | IV, volumen IV S. nefrótico |

Respecto a los fármacos antiamiloides, existen 2 monoclonales en desarrollo (birtamimab y CAEL-101) a la espera de resultados de nuevos ensayos.

La utilización de doxiciclina, antibiótico con analogía estructural con las antraciclinas, puede inhibir la formación de amiloide y se debe considerar su uso durante el tratamiento de inducción.

› Novedades recientes (American Society of Hematology –ASH– 2018, ASH 2019, ISA 2020)

› No relacionadas con el tratamiento

- Aumento del número de nuevos diagnósticos: se calcula que deberíamos diagnosticar 1-2 amiloidosis AL/10 MM.
- Mejoría del pronóstico y descenso de las muertes relacionadas con el tratamiento (MRT) (TASPE).
- Se confirma la importancia de obtener una respuesta rápida y de calidad (dCLL o CLLi < 5-10 mg/L+ IF neg).
- Es imprescindible realizar estudio de FISH al diagnóstico en MO, con atención a la t(11,14), con implicaciones terapéuticas.
- Nuevas técnicas:
 - Detección de CLL monoclonales mediante MASS-FIX: en diagnóstico y seguimiento.
 - Utilidad de la detección de EMR (NGF) en la valoración de la respuesta tras tratamiento.

› Relacionadas con el tratamiento

- No candidatos a TASPE: excelentes resultados con el esquema Mel/Bor/dex.
- Candidatos a TASPE: muy buenos resultados con inducción con esquemas de bortezomib previos al TASPE (↑ RR pos-TASPE).
- Buenos resultados con nuevos fármacos:
 - Daratumumab. Publicados resultados preliminares alentadores con dara-CyBorDex en primera línea (estudio *Andromeda*).
 - Otros fármacos con publicaciones recientes cuyo uso puede considerarse en situaciones seleccionadas: venetoclax, ixazomib, pomalidomida, bendamustina.
- Existen 2 anticuerpos antiamiloides con ensayos en curso (birtamimab y CAEL 101).

› Puntos imprescindibles en el manejo de la amiloidosis AL

- Diagnóstico precoz correcto.
- Valoración cuidadosa de órganos afectados.
- Tratamiento ajustado al enfermo.
- Tratamiento lo más efectivo posible (inicial y recaídas).

› Bibliografía

› Revisiones generales

- Merlini G. AL amyloidosis: from molecular mechanisms to targeted therapies. Ham-Wasserman lecture. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2017;2017(1):1-12.
- Vaxman J, Gertz MA: Recent advances in the diagnosis, risk stratification and management of systemic light chain amyloidosis. Acta Haematol Am J Hematol. 2019;141:93-106.

› Estratificación, pronóstico, evaluación de respuesta

- Comenzo RL, Reece D, Palladini G, Seldin D, Sancharawala V, Landau H, et al. Consensus guidelines for the conduct and reporting of clinical trials in systemic light-chain amyloidosis. Leukemia. 2012;26:2317-25.
- Dittrich T, Kimmich C, Hegenbach U, Schönland S. Prognosis and staging of AL amyloidosis. Acta Haematol. 2020;143(4):388-400.
- Kastritis E, Kostopoulos IV, Terpos E, Paiva B, Fotiou D, Gavriatopoulou M, et al. Evaluation of minimal residual disease using next-generation flow cytometry in patients with AL amyloidosis. Blood Cancer J. 2018 May 24;8(5):46.
- Kumar S, Dispenzieri A, Lacy MQ, Hayman SR, Buadi FK, Colby C, et al. Revised prognostic staging system for light chain amyloidosis incorporating cardiac biomarkers and serum free light chain measurements. J Clin Oncol. 2012;30:989-95.
- Manwani R, Foard D, Mahmood S, Sachchithanatham S, Lane T, Quarta C, et al. Rapid hematologic responses improve outcomes in patients with very advanced (stage IIIb) cardiac immunoglobulin light chain amyloidosis. Haematologica. 2018 Apr;103(4):e165-e168.
- Muchtar E, Gertz M, Lacy M, Dispenzieri A, Leung N, Buadi F, Dingli D. Refining amyloid complete hematological response: Quantitative serum free light chains superior to ratio. Am J Hematol. 2020; doi: 10.1002/ajh.25940.
- Palladini G, Dispenzieri A, Gertz MA, Kumar S, Wechalekar A, Hawkins PN, et al. New criteria for response to treatment in immunoglobulin light chain amyloidosis based on free light chain measurement and cardiac biomarkers: impact on survival outcomes. J Clin Oncol. 2012;30:4541-9.
- Sidana S, Milani P, Binder M, Basset M, Tandon N, Foli A, Dispenzieri A, et al. A validated composite organ and hematologic response model for early as-

assessment of treatment outcomes in light chain amyloidosis. *Blood Cancer J.* 2020;10:41-9.

› *Trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos*

Sharpley FA, Petrie A, Mahmood S, Sachchithanantham S, Lachmann HJ, Gillmore JD. A 24-year experience of autologous stem cell transplantation for light chain amyloidosis patients in the United Kingdom. *Br J Haematol.* 2019 Dec;187(5):642-52.

› *Tratamiento citostático*

Cohen O, Sharpley F, Gillmore JD, Lachmann HJ, Sachchithanantham S, Mahmood S. Use of ixazomib, lenalidomide and dexamethasone in patients with relapsed amyloid light-chain amyloidosis. *Br J Haematol.* 2020 May;189(4):643-9.

Kastritis E, Leleu X, Arnulf B, Zamagni E, Cibeira MT, Kwok F. Bortezomib Melphalan and Dexamethasone for light-chain amyloidosis. *J Clin Oncol.* 2020 Jul 30;JCO2001285.

Manwani R, Mahmood S, Sachchithanantham S, Lachmann HJ, Gillmore JD, Yong K. Carfilzomib is an effective upfront therapy in AL amyloidosis patients with peripheral and autonomic neuropathy. *Br J Haematol.* 2019 Dec;187(5):638-41.

Milani P, Schönland S, Merlini G, Kimmich C, Foli A, Dittrich T, et al. Treatment of AL amyloidosis with bendamustine: a study of 122 patients. *Blood.* 2018 Nov 1;132(18):1988-91.

Palladini G, Kastritis E, Maurer MS, Zonder J, Minnema MC, Wechalekar AD. Daratumumab plus CyBORd for patients with newly diagnosed AL amyloidosis: safety run-in results of ANDROMEDA. *Blood.* 2020 Jul 2;136(1):71-80.

Palladini G, Milani P, Foli A, Basset M, Russo F, Perlini S, Merlini G. A phase 2 trial of pomalidomide and dexamethasone rescue in patients with AL amyloidosis. *Blood.* 2017;129(15):2120-3.

Palladini G, Sachchithanantham S, Milani P, Gillmore J, Foli A, Lachmann H, et al. A European collaborative study of cyclophosphamide, bortezomib, and dexamethasone in upfront treatment of systemic AL amyloidosis. *Blood.* 2015 Jul 30;126(5):612-5.

Varga, Lentzsch S, Comenzo RL. Beyond NEOD001 for Systemic Light-chain Amyloidosis. *Blood.* 2018 Nov 1;132(18):1992-3.

Wechalekar AD, Whelan C. Encouraging impact of doxycycline on early mortality in cardiac light chain (AL) amyloidosis. *Blood Cancer J.* 2017;7(3):e546.

ESTRATEGIAS DE FUTURO EN EL LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA

Coordinadores:

Dr. Pedro Sánchez Godoy. Hospital Universitario Severo Ochoa. Leganés, Madrid

Dr. José María Guinea de Castro. Hospital Universitario Araba. Vitoria-Gasteiz

El diagnóstico hematológico integrado en la nueva década

Joaquín Martínez-López, Mario Rodríguez, Sandra Gómez-Rojas,
Gloria Pérez, Nerea Castro, María Linares

Servicio de Hematología. Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid

El diagnóstico de las enfermedades hematológicas ha adquirido una gran complejidad en los últimos años. La incorporación de las nuevas técnicas genómicas, citómicas y proteómicas implica una aproximación multidisciplinaria y a veces multicéntrica, así como una adecuada optimización de los procesos diagnósticos y trabajo en equipo y coordinado. La adecuada informatización y gestión de la calidad y el adecuado uso de las tecnologías de la información son otros de los grandes retos a los que nos estamos enfrentando. La centralización de los estudios más complejos para una mejor optimización de los recursos y permitir economías de escala es un proceso irreversible. En función del análisis de la actividad de nuestro laboratorio, las pruebas hematológicas corresponden al 40% del global de las pruebas realizadas en el laboratorio; de esto se desprende que existe gran carga de trabajo en los laboratorios de hematología, sin olvidar el alto grado de cualificación y tecnificación. En nuestra opinión estos son los mayores retos a los que nos enfrentamos.

Las fortalezas de la especialidad de hematología son claras: el mismo médico es capaz de participar en el diagnóstico y el tratamiento de un enfermo, es lo que podemos llamar una especialidad bilingüe. Nada más y nada menos que brindar una atención integral y dentro de un proceso transversal, más eficiente.

En el Hospital Universitario 12 de Octubre hemos apostado por un modelo en que el hematólogo realiza el diagnóstico global de la patología hematológica desde un estudio de coagulación básico o hemograma hasta el diagnóstico molecular de última generación. Además de ofertar los estudios más complejos a centros donde no se dispone de ellos que permiten una economía de escala, permitiendo que trabajemos en red.

Desde el año 2011, en el que dispusimos de nuevas instalaciones en nuestro hospital, se inició un proceso de integración funcional de todos los laboratorios, basado en un programa informático (SIL, Infinity) común

a todos los laboratorios que permitía una fase preanalítica y postanalítica comunes. Este proceso que se ha implementado consiste en un sistema de gestión de información de laboratorio (LIMS) basado en un entorno web que permite tener acceso *on-line* a los resultados de las pruebas de nuestro laboratorio y asimismo poder realizar petición electrónica.

Durante décadas, los analizadores en el laboratorio de coagulación han detectado la formación de coágulos de fibrina de 2 maneras: óptica o mecánica. Actualmente, la mayoría de los analizadores utilizan otros métodos, tales como test cromogénicos, aglutinación en látex e inmunoensayos.

Sin embargo, métodos adicionales como la quimioluminiscencia están actualmente disponibles y presentan un gran potencial, mejorando la sensibilidad y la precisión de las mediciones. En este momento, es posible determinar mediante quimioluminiscencia niveles de factor de von Willebrand (FvW) antigénico, FvW RCo, unión de FvW al colágeno, anticuerpos IgG anti-FP4 para el diagnóstico y seguimiento de trombocitopenia inducida por heparina (TIH), niveles de ADAMTS13 y anticuerpos antifosfolípido, tanto anticardiolipinas IgG e IgM como anti-B2GP IgG e IgM.

Un estudio australiano⁽¹⁾ comparó la quimioluminiscencia con enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA) automatizado para el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand y para la prueba de respuesta a la desmopresina. Ambos métodos resultaron ser totalmente comparables, mostrando la quimioluminiscencia mayor sensibilidad a la hora de detectar y monitorizar niveles bajos de FvW, junto con menor variabilidad intratest.

Los test que evalúan la hemostasia de forma global, la tromboelastografía, tromboelastometría (ROTEM) y el test de generación de trombina, tienen cada vez mayor uso en el ámbito hospitalario.

La tromboelastografía y, especialmente, la tromboelastometría son muy útiles en situaciones clínicas

que conllevan un importante sangrado, ya que además se obtienen resultados en pocos minutos. Ambas hacen una evaluación gráfica de todo el proceso coagulativo, desde la formación del coágulo hasta la fibrinólisis. Clásicamente, su principal uso ha sido a pie de cama en el quirófano de cirugía cardíaca, en trasplante hepático y en unidades de politrauma, para guiar la administración de hemoderivados, ya que el uso de tromboelastometría en estas situaciones ha demostrado reducir los requerimientos transfusionales. Otros posibles usos de la tromboelastometría son la monitorización y optimización de agentes *bypass* en hemofilias A y B con sangrado en presencia de inhibidor. Adicionalmente, algunos autores han utilizado con éxito la tromboelastometría para evaluar el riesgo trombótico en pacientes sometidos a cirugía mayor y prevenir las complicaciones tromboembólicas.

El test de generación de trombina ha sido muy utilizado en el ámbito de la investigación para monitorizar tratamientos anticoagulantes y antiagregantes, determinar riesgo hemorrágico en pacientes con enfermedad de von Willebrand o hemofilia A, monitorizar la administración de factor en hemofilia A, evaluar el riesgo trombótico en pacientes con trombofilias diagnosticadas, estimar el riesgo de recurrencia de enfermedad tromboembólica venosa (ETE), establecer nuevos factores de riesgo trombótico, evaluar la hipercoagulabilidad en gestantes o en mujeres en tratamiento con anticonceptivos, etc. Una importante limitación de esta prueba es la falta de una estandarización de la técnica, lo cual dificulta su uso en laboratorios clínicos.

El examen microscópico y la clasificación de las células hematopoyéticas constituyen todavía un paso crítico para el diagnóstico de las enfermedades hematológicas. Sin embargo, es una técnica laboriosa, que consume mucho tiempo y cuyos resultados están ligados a la variabilidad entre los observadores.

La digitalización de imágenes puede ayudar a estandarizar de una manera más eficiente el análisis de médula ósea y sangre periférica, además de poder ser una herramienta excelente para fines docentes. Además, el uso de *softwares* para la clasificación y cuantificación de células podría aportar un valor adicional a la digitalización de muestras para su diagnóstico.

Sin embargo, hay muy poca literatura científica que explore el diagnóstico automático de la médula ósea. Por ello, en el Laboratorio de Hematología del Hospital Universitario 12 de Octubre, nos planteamos desarro-

llar un sistema basado en algoritmos de inteligencia artificial que permita la automatización del proceso. Para ello, contamos con la experiencia de SpotLab.

SpotLab es una *spin-off* de la Universidad Politécnica de Madrid cuyo origen se remonta al desarrollo de videojuegos para el diagnóstico de malaria. El videojuego MalariaSpot demostró la capacidad del *crowdsourcing* y la inteligencia artificial para el diagnóstico hematológico⁽²⁾. En la actualidad, SpotLab desarrolla tecnología pionera e innovadora en el campo de la telemedicina.

En primer lugar, se realizará una base de datos anotada de médulas óseas que pueda utilizarse para entrenar redes neuronales artificiales, a la vez que se desarrolla un entorno digital que facilite el diagnóstico hematológico en el entorno clínico. La adquisición de imágenes se realizará a través de teléfonos móviles de tipo *smartphones* acoplados a dispositivos impresos mediante tecnología de impresión 3D. Para el análisis, se desarrollará una plataforma web que permita no solo la interacción entre citólogos del hospital, sino poder conectar de forma remota con otros hospitales.

Una vez desarrollada y anotada la base de datos de médulas óseas, se desarrollarán algoritmos de inteligencia artificial que facilitarán el proceso de diagnóstico de enfermedades hematológicas (Figura 1).

La hematimetría está sufriendo una gran revolución; además de los parámetros habituales del hemograma, existen nuevos parámetros en investigación que van más allá y nos van a ayudar de forma rápida y eficaz en el *screening* diagnóstico de diferentes patologías:

- Parámetros eritrocitarios. Fundamentalmente, el estudio de parámetros de reticulocitos, que están aportando gran información en el diagnóstico diferencial de anemias: algunos ya validados por la Food and Drugs Administration (FDA), como el %Hipo (porcentaje de hematíes hipocromos) o la CHR (concentración de hemoglobina reticulocitaria), y otros en investigación, como LHD (*low hemoglobin density*), MAF (*microcytic anemia factor*) o Rsf (*red cell size factor*). Ayudan en el diagnóstico diferencial de anemias microcíticas (anemia de trastornos crónicos -ATC- vs. ferropénica, déficit funcional de hierro). Se estudia también la capacidad de estos parámetros para predecir la respuesta hematopoyética de la médula ósea.

- Parámetros plaquetarios: de forma equiparable a los parámetros de reticulocitos, se estudian las plaquetas reticuladas (RP) y la fracción de plaquetas in-

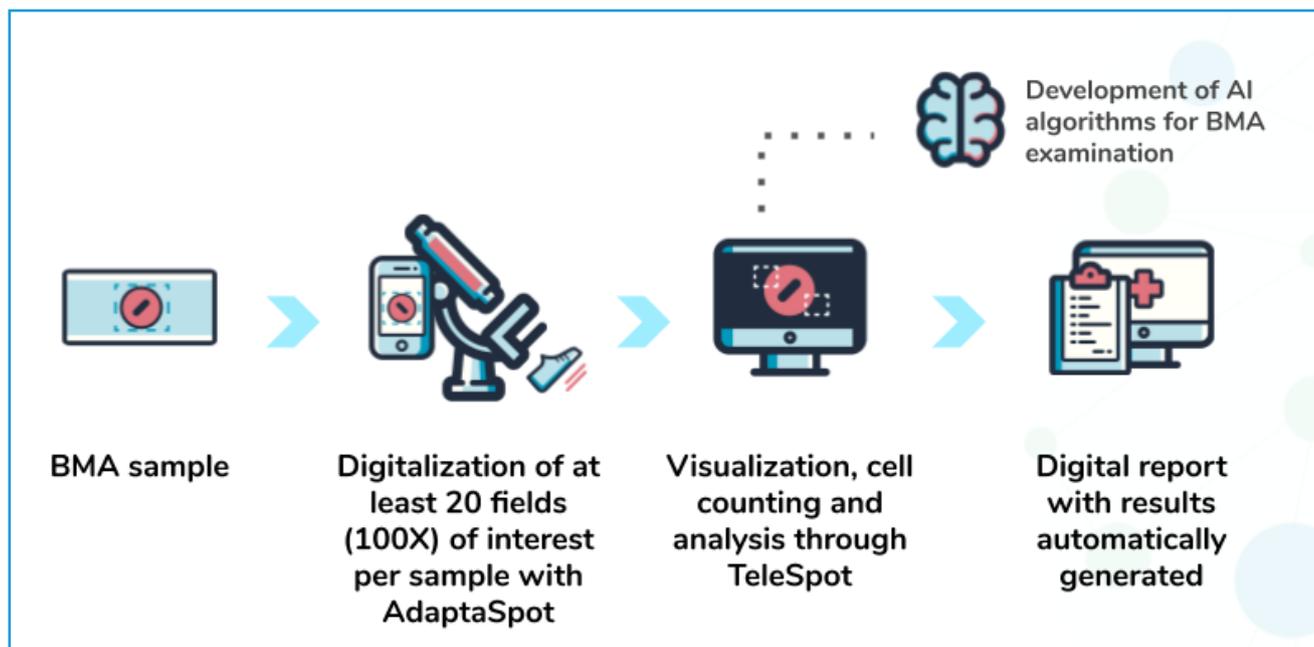


Figura 1. Algoritmo de digitalización y análisis automatizado de estudios de médula ósea (SpotLab).

maduras (IP), para diferenciar trombopenias centrales vs. periféricas.

- Parámetros de serie blanca. La variabilidad morfológica de los 5 tipos leucocitarios en sangre periférica en distintos supuestos clínicos es capaz de ser detectada de forma eficaz y objetiva por los analizadores automáticos. De esta manera, están en auge nuevos parámetros que desde el hemograma nos ayudan en la detección de patología. En este sentido, podemos destacar:

- MDW (*monocyte distribution wide*). A través de la tecnología de Beckman Coulter (volumen conductividad y *scatter* -VCS-), se ha validado (FDA) este parámetro basado en las diferencias en volumen y tamaño de los monocitos, siendo un marcador temprano de sepsis (*early sepsis indicator* -ESI-), equiparable en S y E a otros parámetros clásicos como la proteína C reactiva (PCR) y la procalcitonina (PCT), con la ventaja de ser obtenido de forma más rápida y coste efectiva. Están en desarrollo varios ensayos clínicos.

Otros de los grandes retos son la telemedicina y el *big data*; en estos momentos estamos trabajando para el desarrollo de sistemas expertos de análisis de datos agregados para el diagnóstico diferencial de algunas enfermedades infecciosas como COVID-19; en este congreso presentaremos una comunicación oral sobre este tema. También, se están desarrollando

algoritmos expertos automatizados para el análisis de imágenes microscópicas de médula ósea y sangre periférica.

Las estrategias de *machine learning*⁽³⁻⁵⁾ probablemente constituyan el futuro de todos los laboratorios automatizados. Es un método de análisis de datos que automatiza la construcción de modelos analíticos. Está basado en la inteligencia artificial y en la idea de que los sistemas pueden aprender de datos, identificar patrones y tomar decisiones con mínima intervención humana. De esta forma, en el laboratorio el objetivo sería la construcción de algoritmos de predicción de forma automática que sirvieran como *screening*.

Finalmente, otro proceso inexorable es acercar al pie de la cama del enfermo algunas pruebas en las que el resultado tiene que estar en minutos, por ejemplo, la elastotrombografía y los hemogramas en algunas situaciones. El laboratorio se encargaría de asegurar la calidad de los resultados, pero la técnica se realizaría a pie de cama por el personal que atiende directamente al enfermo.

Otro aspecto importante que no debemos olvidar es la mejora continua y la calidad dentro de los laboratorios; debemos dirigirnos hacia la consecución de acreditaciones de calidad de nuestros laboratorios, a pesar del gran esfuerzo que requiere.

› Bibliografía

1. Favoro EJ, Mohammed S. Evaluation of a von Willebrand factor three test panel and chemiluminescent-based assay system for identification of, and therapy monitoring in, von Willebrand disease. *Thromb Res.* 2016;141:202-11.
2. Linares M, Postigo M, Cuadrado D, Ortiz-Ruiz A, Gil-Casanova S, Vladimirov A, et al. Collaborative intelligence and gamification for on-line malaria species differentiation. *Malar J.* 2019;18(1):21.
3. Bigorra L, Larriba I, Gutiérrez-Gallego R. Machine learning algorithms for accurate differential diagnosis of lymphocytosis based on cell population data. *Br J Haematol.* 2019;184(6):1035-7.
4. Crouser ED, Parrillo JE, Seymour CW, Angus DC, Bicking K, Esguerra VG, et al. Monocyte Distribution Width: a Novel Indicator of Sepsis-2 and Sepsis-3 in High-Risk Emergency Department Patients. *Crit Care Med.* 2019;47(8):1018-25.
5. Vasse M, Ballester MC, Ayaka D, Sukhachev D, Delcominette F, Habarou F, et al. Interest of the cellular population data analysis as an aid in the early diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *Int J Lab Hematol.* 2020;00:1-7.

ACTUALIZACIÓN EN MEDICINA TRANSFUSIONAL

Coordinadores:

Dra. Gemma Moreno Jiménez. Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid

Dr. Pablo Rodríguez Wilhelmi. Complejo Hospitalario de Navarra. Pamplona

El LXII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH) lo recordaremos como diferente, pero no vamos a dejar de aprovechar la oportunidad que supone este momento, en la fórmula que sea, para continuar aprendiendo y actualizando el conocimiento en todas las disciplinas de nuestra especialidad. En este simposio de medicina transfusional, a través de 3 interesantes ponencias, abordaremos estrategias para el diagnóstico y el manejo de diferentes escenarios en nuestra práctica diaria.

La **anemia hemolítica autoinmune producida por fármacos** se trata de una complicación rara pero que puede ser producida por un gran número de fármacos, algunos de uso frecuente. Además, en los últimos años son cada vez más los casos comunicados en relación con tratamientos emergentes, como pueden ser los inhibidores de los puntos de control inmunitario. Por ello, es importante tener esta posibilidad diagnóstica presente dentro del diagnóstico diferencial del paciente con anemia hemolítica. Según el fármaco implicado, los mecanismos fisiopatológicos pueden ser diferentes en cada caso y la confirmación de la sospecha diagnóstica requerirá la realización de un estudio serológico específico. El **Dr. Eduardo Muñiz** nos acercará a las distintas hipótesis que explican estos mecanismos y a los últimos avances en su conocimiento, los fármacos que hay que tener en consideración de forma más frecuente en la actualidad y las técnicas inmunohematológicas, algunas a nuestro alcance y otras disponibles en laboratorios de referencia, que permitirían documentar de forma correcta esta etiología.

En cuanto al **manejo transfusional en el paciente hematológico**, en los últimos años en nuestro ámbito existe una creciente sensibilidad en cuanto al uso óptimo de componentes sanguíneos, pero en la práctica diaria resulta difícil extender la implementación de estas políticas restrictivas en pacientes oncohematológicas por falta de evidencia científica en este ámbito, así como por la complejidad de los pacientes. La **Dra. Ana Kerguelen** revisará cuál es la situación actual y profundizará en el conocimiento actual de las guías de práctica clínica, la evidencia existente en determinados supuestos y la posibilidad de utilizar alternativas a la transfusión en nuestros pacientes.

Por último, con respecto al **uso óptimo de hemoderivados plasmáticos**, es necesario realizar una reflexión profunda en cuanto a la situación de abastecimiento de plasma y sus derivados en nuestro país. Dentro de las medidas que se pueden adoptar para mejorar esta situación está la implementación de estrategias hospitalarias para el uso racional de derivados plasmáticos. La **Dra. Cristina Arbona** nos expondrá una revisión basada en la evidencia científica existente de las indicaciones de los derivados plasmáticos más utilizados, así como las dosis óptimas recomendables en cada caso.

Anemia hemolítica autoinmune producida por fármacos: mecanismo, diagnóstico inmunohematológico y manejo

Eduardo Muñiz-Díaz

División de Inmunohematología. Banc de Sang i Teixits. Barcelona

› Introducción

La primera referencia sobre anemia hemolítica autoinmune producida por fármacos (AHAIPF) data de 1953 cuando se describe un caso producido por un anticonvulsivo, la mefenitoína⁽¹⁾. Tres años más tarde se publica el primer caso en el que la sospecha clínica viene apoyada por un estudio serológico que demuestra que el estibofeno, empleado para el tratamiento de la esquistosomiasis, es capaz de producir una anemia hemolítica⁽²⁾. No se conoce la prevalencia exacta de esta complicación, pero en los Estados Unidos se estima que un 10% de las anemias hemolíticas autoinmunes que se diagnostican cada año (1 caso por cada 100.000 habitantes) corresponde en realidad a una AHAIPF⁽³⁾. Seguramente, el número de casos debe ser superior, si pensamos que los datos se obtienen a partir de los casos más graves que son los únicos habitualmente reportados.

En 2017 se estimó que alrededor de 130 fármacos habían estado implicados en casos de AHAIPF en los que la sospecha clínica venía avalada por un estudio serológico confirmatorio⁽⁴⁾. En las series más amplias de casos clínicos reportados⁽⁵⁾ destacan, por su mayor prevalencia, los antimicrobianos (42%), antiinflamatorios (16%), antineoplásicos (13%) y antihiper tensivos/diuréticos (6%). Los ejemplos más frecuentes son debidos a cefalosporinas de segunda y tercera generación, diclofenaco, rifampicina, oxaliplatino y fludarabina⁽⁶⁾.

Para que una sustancia química resulte inmunogénica se requiere que esta tenga un peso molecular superior a 1.000 kDa, preferiblemente > 10.000 kDa. La penicilina está muy por debajo, con un peso molecular de 300 kDa. Estos "haptenos" son antigénicos pero no inmunogénicos, a menos que se conjuguen con otra molécula de mayor peso molecular como una proteína. Los conjugados resultantes sí que pueden

desencadenar una respuesta inmune y producir la aparición de anticuerpos dirigidos contra el fármaco, contra un antígeno constituido por una parte del fármaco y una parte de la proteína, o solamente contra la proteína. El bajo peso molecular de la mayoría de los fármacos puede explicar, en parte, por qué la AHAIPF es una entidad rara. Lo que todavía no conocemos con exactitud es por qué solo algunas personas desarrollan esta complicación o, lo que es aún más importante, por qué solo algunas de ellas acaban presentando un cuadro clínico grave, cuando muchos de los fármacos implicados están siendo empleados en el tratamiento de miles de pacientes.

› Mecanismo patogénico

Los anticuerpos implicados en la AHAIPF son de 2 tipos: farmacoindependientes y farmacodependientes.

Los **anticuerpos farmacoindependientes** son aquellos que podemos detectar *in vitro* sin necesidad de añadir el fármaco, porque los anticuerpos desencadenados por el fármaco reaccionan contra los hematíes del paciente de la misma manera que lo hacen los autoanticuerpos responsables de una anemia hemolítica autoinmune (AHAI) primaria o secundaria. Ambos tipos de anticuerpos son indistinguibles. El prototipo de fármaco es la metildopa, capaz de inducir la formación de anticuerpos en un 15% de los pacientes que la toman y de producir una anemia hemolítica en un 0,5-1% de los mismos (Figura 1). En la actualidad, la fludarabina ha tomado el relevo de la metildopa como ejemplo de los fármacos que se asocian al mecanismo farmacoindependiente.

Los **anticuerpos farmacodependientes** son los que solo se ponen en evidencia *in vitro* en presencia del fármaco, ya sea recubriendo unos hematíes con el fármaco o poniéndolo en contacto con el plasma

del paciente. Estos anticuerpos están dirigidos contra un epítipo presente en el fármaco y/o en uno de sus metabolitos, o bien contra un epítipo resultante de la combinación del fármaco con la proteína de mem-

brana del hematíe a la que se ha unido. En el históricamente conocido como mecanismo de "adsorción", el fármaco se une de forma covalente a proteínas de la membrana del hematíe y, cuando el paciente

desarrolla anticuerpos IgG, estos se fijan al fármaco que permanece unido a la membrana; los hematíes recubiertos de fármaco con el anticuerpo unido son secuestrados por los macrófagos a través del receptor para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas IgG, produciendo una hemólisis extravascular. Ocasionalmente, el complemento puede unirse secundariamente. Este es el mecanismo empleado por la penicilina y la mayoría de las cefalosporinas (Figura 2).

La mayoría de los anticuerpos farmacodependientes capaces de provocar los cuadros clínicos más graves a través de un mecanismo de hemólisis intravascular, que suele acompañarse de insuficiencia renal, coagulación intravascular diseminada e incluso del fallecimiento del paciente, suelen actuar con la cooperación del complemento. A menudo no es posible demostrar su presencia mediante el recubrimiento de los hematíes con el fármaco y se requiere una estrategia alternativa consistente en la incubación inicial del fármaco con el plasma del paciente, donde están presentes los anticuerpos contra el fármaco, y, en un segundo tiempo, poniendo a ambos en contacto con los hematíes. Este mecanismo corresponde al

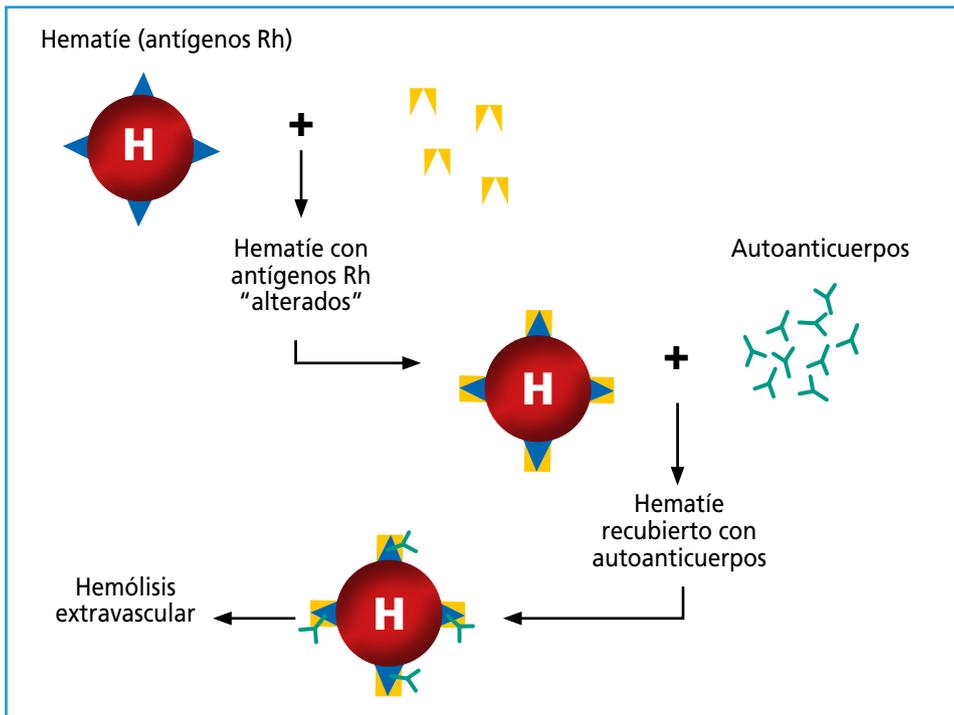


Figura 1. Anticuerpos farmacoindependientes.

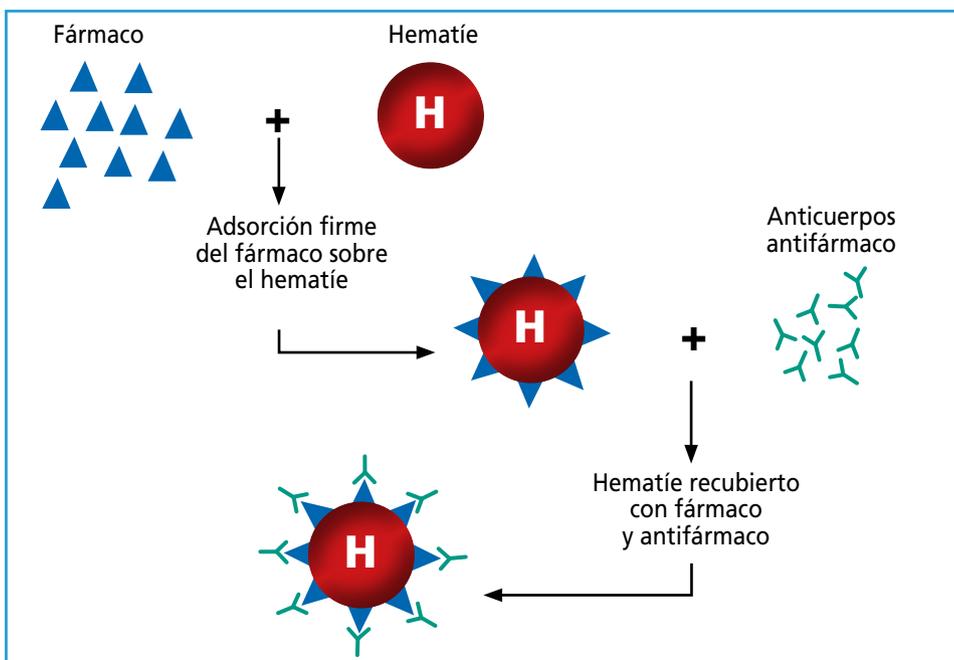


Figura 2. Anticuerpos farmacodependientes. Adsorción firme del fármaco.

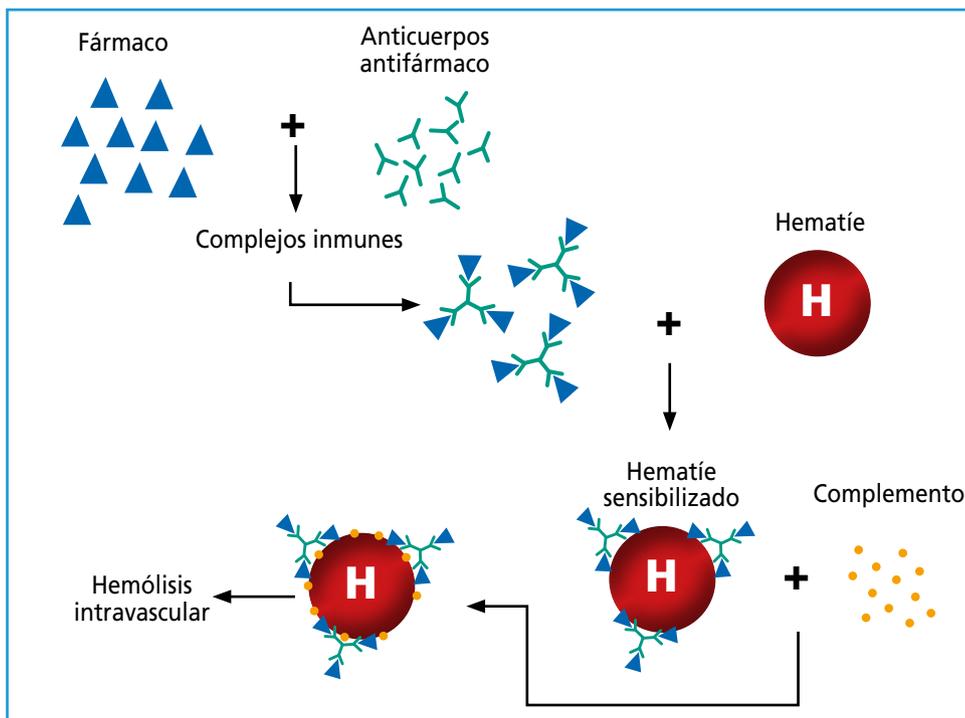


Figura 3. Anticuerpos dependientes. Formación de complejos inmunes.

que históricamente se conoce como el mecanismo de "inmunocomplejos" que, si bien tuvo un gran predicamento en los años setenta, posteriormente fue cuestionado por algunos autores⁽³⁾ (Figura 3).

Habibi⁽⁷⁾ y, posteriormente, Salama y Mueller-Eckardt⁽⁸⁾, y también Garratty⁽⁵⁾, presentaron un nuevo modelo, el del "mecanismo patogénico unificado", que integra los 3 mecanismos anteriores en uno solo. Apoyándose en diversos experimentos, el modelo señala que, cuando se inyectan sustancias químicas de bajo peso molecular a un animal, este no es capaz de producir anticuerpos, pero, si la sustancia se une a una proteína (por ejemplo, albúmina), la estructura resultante puede producir 3 tipos de anticuerpos: unos dirigidos únicamente contra la sustancia química (hapteno), otros reactivos frente a una combinación del hapteno con la proteína y, finalmente, otros capaces de reconocer exclusivamente a la proteína. En la práctica, el modelo implica que un mismo paciente puede desarrollar 1, 2 y hasta los 3 tipos de anticuerpos. Los anticuerpos de tipo penicilina se unen fuertemente a la proteína y producen la formación de anticuerpos mayoritariamente dirigidos contra el fármaco, como prueba el hecho de poder inhibir la unión de los anticuerpos a su epítipo con una incubación previa *in vitro* de los anticuerpos

con la penicilina mediante pruebas de inhibición del hapteno. Por el contrario, otros fármacos provocan la aparición de anticuerpos que reconocen un epítipo que resulta de la combinación del fármaco con la proteína de membrana del hematíe. Estos anticuerpos no son inhibidos con la presencia del fármaco *in vitro*, porque el epítipo que reconocen no es exclusivo del fármaco. Estos anticuerpos corresponden a los que se consideraban responsables del mecanismo de "inmunocomplejos".

Finalmente, se ha descrito un cuarto posible mecanismo, según el cual algunos fármacos serían capaces de modificar la membrana

del hematíe de tal manera que diversas proteínas plasmáticas serían adsorbidas por el hematíe de forma inespecífica. Este es el mecanismo no inmune que se atribuyó al fármaco cefalotina al observar que los hematíes tratados con cefalotina eran capaces de adsorber IgG, C3, albúmina, fibrinógeno y otras proteínas tras su incubación con el plasma. La presencia de estas proteínas adheridas a la membrana puede ponerse de manifiesto mediante la técnica de la anti-globulina (Figura 4).

Inicialmente, se pensó que se trataba de un fenómeno que solo acontecía *in vitro* y, por tanto, carente de significado clínico, pero pronto se observó que esta fijación no inmunológica también podía desembocar en un cuadro de anemia hemolítica. Con la técnica de los monocitos en monocapa que permite medir la actividad hemolítica *in vitro* de los anticuerpos, pudo comprobarse que, efectivamente, los macrófagos interactuaban con estos hematíes recubiertos con distintas proteínas produciendo una disminución en la supervivencia de los mismos. Algunos de los fármacos que emplean este mecanismo son los inhibidores de la β -lactamasa (clavulánico, sulbactam, tazobactam) y los fármacos de la familia del platino (cisplatino, oxaliplatino, carboplatino), sin intervención de ningún tipo de anticuerpos⁽⁵⁾.

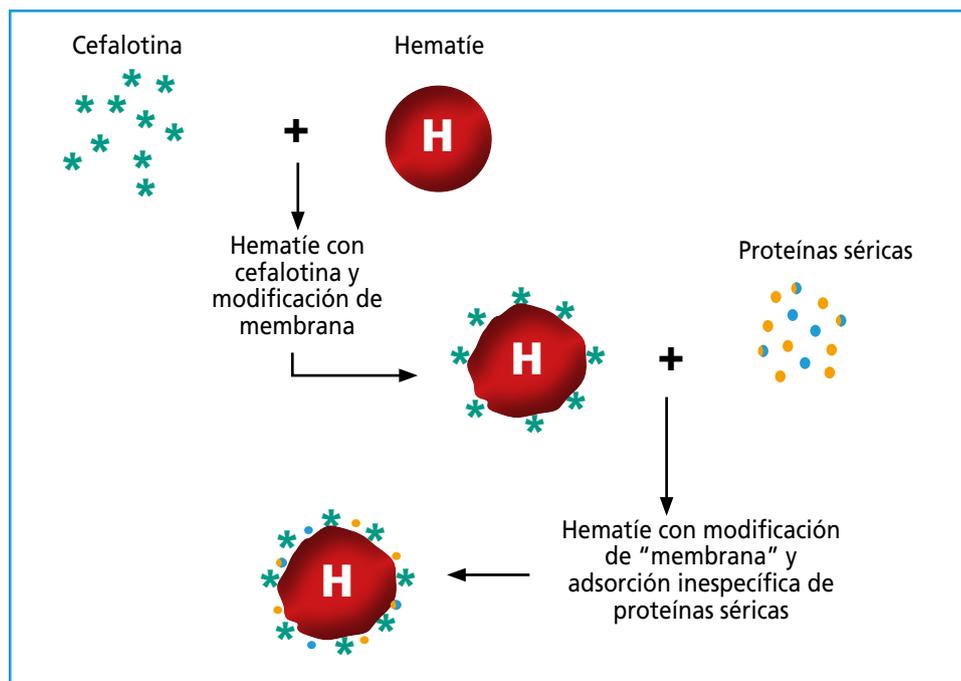


Figura 4. Adsorción inespecífica de proteínas.

> Diagnóstico

El diagnóstico de la AHAIPF se establece a partir de los datos clínicos y de laboratorio.

Las manifestaciones clínicas dependen del tipo de hemólisis inducido por el fármaco. En los pacientes que presentan una hemólisis intravascular aguda poco después del inicio del tratamiento con el fármaco van a confluir los síntomas y signos característicos de una hemólisis grave. Estos casos suelen darse en pacientes que ya habían sido medicados con el fármaco en ocasiones anteriores y que al restablecerlo presentan de forma abrupta e inesperada un episodio de anemia hemolítica grave. Probablemente, se trata de pacientes portadores de anticuerpos contra el fármaco que, al volver a tomarlo, desarrollan una respuesta inmune secundaria que desemboca en una hemólisis intravascular aguda. En los pacientes en los que la historia clínica no revela de inicio un tratamiento previo con el fármaco hay que insistir en la búsqueda de otros que compartan con el actual una misma o similar estructura bioquímica. Otros pacientes, por el contrario, presentan un cuadro clínico más moderado en el contexto de una hemólisis extravascular que se instaura de manera progresiva hasta que la anemia y/o los signos biológicos de hemólisis se hacen evidentes.

Muchos de los casos publicados de AHAIPF no tienen el grado de evidencia deseable para establecer la imputabilidad inequívoca del fármaco. Se apoyan, exclusivamente, en la coincidencia temporal entre la administración del fármaco y la aparición del cuadro clínico, y en la resolución del mismo cuando se interrumpe el tratamiento. Aunque esta observación clínica es muy importante, a veces la única posible, es necesario acompañarla de un estudio serológico que demuestre la presencia de los anticuerpos responsables. La prueba directa de la antiglobulina (PDATG) es habitualmente positiva, aunque en algunos

casos puede resultar negativa, especialmente cuando se ha producido una hemólisis masiva y/o el paciente ha sido transfundido. El resultado positivo puede deberse a la presencia de anti-IgG, de anti-C3 o a la presencia de ambos factores inmunes. Cuando el resultado positivo se hace extensivo al plasma y al eluido de los hematíes del paciente, cabe priorizar el diagnóstico de AHAI por anticuerpos calientes, mucho más frecuente que la AHAIPF. La medicación recibida por el paciente puede convertirse en un elemento de despiste si no reconocemos que estos resultados serológicos son característicos de una AHAI por anticuerpos calientes. Tal como se mencionó, no es posible diferenciar si los resultados serológicos corresponden inequívocamente a una AHAI por anticuerpos calientes o a un caso de AHAIPF cuando el fármaco genera anticuerpos farmacoindependientes (metildopa, fludarabina). Una posibilidad es observar si la interrupción del fármaco conlleva la mejora de la anemia, habitualmente entre 1 y 2 semanas más tarde, si bien el estudio serológico (PDATG positiva) se puede mantener sin cambios durante meses. En los casos en los que el paciente ha sido tratado con esteroides, el diagnóstico diferencial se complica, porque no podremos asegurar si la remisión se debe a la interrupción del tratamiento o a la acción de los esteroides.

Cuando el plasma del paciente no es reactivo o cuando el eluido de los hematíes del paciente tampoco reacciona, podemos plantearnos un estudio inmunohematológico específico para intentar demostrar la presencia de anticuerpos producidos por el fármaco. El estudio serológico se aborda en función del conocimiento que se tiene en torno al fármaco y a su mecanismo de acción en casos previos reportados. Básicamente, se reproducen *in vitro* los 2 mecanismos de acción tradicionalmente aceptados, el mecanismo de "adsorción" y el mecanismo de "inmunocomplejos". Si el fármaco está claramente asociado a unos de estos 2 mecanismos, se prioriza el estudio del mecanismo habitual. Si se desconoce el mecanismo de acción, es necesario contemplar e investigar ambas posibilidades.

En el mecanismo de "adsorción" tratamos de demostrar la presencia de anticuerpos enfrentando el plasma o eluido del paciente a unos hematíes previamente tratados con el fármaco y siempre en paralelo con los correspondientes controles (hematíes sin tratar con el fármaco) que nos permiten validar el resultado (reacción frente a los hematíes tratados con el fármaco y ausencia de reacción frente a los hematíes no tratados).

En el mecanismo de "inmunocomplejos" se realiza una incubación previa entre el plasma del paciente y el fármaco, y después la mezcla se enfrenta a los hematíes, siempre en paralelo con un control negativo consistente en la mezcla de un plasma AB con el fármaco. La validación del resultado positivo exige que la primera mezcla reaccione con los hematíes y que, por el contrario, la segunda no reaccione.

En la práctica se emplean diferentes tipos de control para ambos abordajes, pero con finalidad docente solo se explica el tipo de control más común e imprescindible.

› Tratamiento

El tratamiento más básico suele consistir en la interrupción del tratamiento, con lo que, en la mayoría de los casos, suele producirse la remisión de la anemia hemolítica⁽⁴⁾. No hay evidencia suficiente de que los esteroides consigan algún efecto en los cuadros de AHAI y es posible que el beneficio que se les atribuye en muchas publicaciones derive en realidad de la interrupción del tratamiento con el fármaco. La mayoría de los fármacos se eliminan rápidamente del torrente sanguíneo, con lo que su efecto nocivo desaparece

en poco tiempo. Una excepción es lo que acontece con el cefotetán, una cefalosporina semisintética que puede permanecer durante varias semanas después de la interrupción del tratamiento. Cuando se conoce que el fármaco del que sospechamos ha producido una hemólisis intravascular aguda, asociada en algún caso al fallecimiento del paciente, se recomienda el intercambio plasmático. A menudo se plantea la cuestión de si el fármaco retirado puede o no ser reemplazado por otro de características similares y lo cierto es que disponemos de poca evidencia para responder a esta cuestión. En el caso de las cefalosporinas se han realizado algunos estudios de reactividad cruzada entre las mismas demostrando que esta reactividad cruzada es escasa⁽⁹⁾; no obstante, resulta arriesgado prescribir un fármaco similar que pueda contribuir a agravar más el precario estado del paciente.

› Anemia hemolítica autoinmune producida por fármacos en el trasplante

La anemia hemolítica es relativamente frecuente después del trasplante. En algunos casos, obedece a una etiología inmune y, en otros, a causas no inmunes (por ejemplo, microangiopatía trombótica o síndrome urémico-hemolítico). En el grupo de las anemias hemolíticas inmunes se encuentran las de causa aloinmune (reacciones transfusionales y síndrome del linfocito pasajero), autoinmune (AHAI, aplasia de serie roja) y la AHAI PF, que puede estar mediada por anticuerpos farmacodependientes y farmacoindependientes^(4,5). Seguramente, lo que a menudo consideramos una AHAI sin más, en el paciente trasplantado, puede ser en realidad una AHAI PF, porque en la génesis de la misma pueden estar presentes algunos de los fármacos inmunosupresores que interfieren con el sistema inmunológico del paciente, favoreciendo la aparición de autoanticuerpos. Entre estos fármacos destacan el alemtuzumab (anti-CD52), la ciclosporina, el daclizumab (anti-Tac/CD25), el micofenolato de mofetilo y el tacrolimus.

Como sucede con los pacientes no trasplantados, los resultados obtenidos en el estudio serológico básico van a servir para guiar la estrategia que vamos a emplear para demostrar la implicación del fármaco. Si se trata de anticuerpos farmacoindependientes, no hay posibilidad de continuar con el estudio, ya que los autoanticuerpos propios de la AHAI y los anticuer-

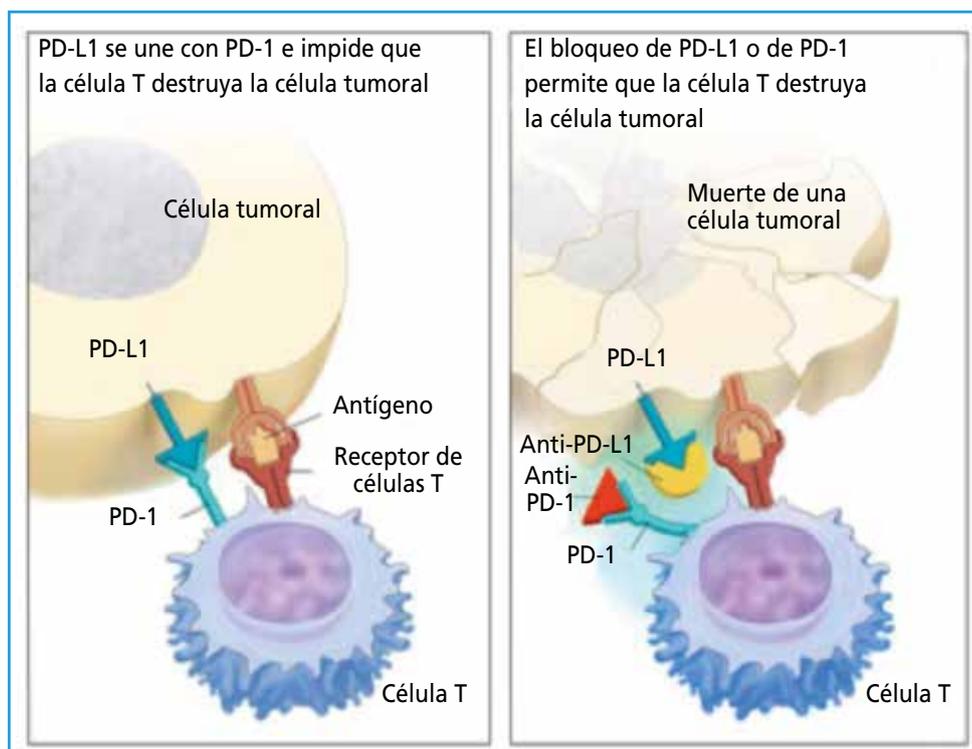


Figura 5. Mecanismo de acción de los inhibidores de los puntos de control inmunitarios.

pos farmacoindependientes son indistinguibles. Por el contrario, si el plasma y el eluido no son reactivos, tenemos la oportunidad de investigar en ambos la presencia de anticuerpos farmacodependientes.

En las AHAI postrasplante concurren ciertas características clínicas diferenciales a tener en cuenta para el correcto diagnóstico y es que a veces cursan en forma de un síndrome por aglutininas frías, algunas de ellas pueden asociarse a un síndrome linfoproliferativo postrasplante y, finalmente, pueden aparecer mucho tiempo después del trasplante (hasta más de 2 años) y del tratamiento con el fármaco sospechoso.

› Inmunoterapia y anemia hemolítica autoinmune producida por fármacos

La inmunoterapia, también denominada terapia biológica, empleada en el tratamiento de diferentes tipos de tumores sólidos y neoplasias hematológicas, estimula las defensas naturales del organismo a fin de combatir y destruir a las células neoplásicas. Utiliza sustancias producidas por el propio orga-

nismo o fabricadas en el laboratorio con el objetivo de optimizar o de restaurar la función del sistema inmune.

Los llamados inhibidores de los puntos de control inmunitarios (IPCI) o *checkpoint inhibitors*, según la terminología inglesa, constituyen uno de los posibles tipos de inmunoterapia que han venido empleándose con éxito en estos últimos años para el tratamiento del melanoma, tumores de cabeza y cuello, carcinoma pulmonar, carcinoma renal, carcinoma de vejiga y linfoma de Hodgkin. Los IPCI son proteínas presentes en diversas células del sistema inmune (linfocitos T citotóxicos) y en células tumorales, que

son necesarias para finalizar la respuesta inmune y evitar una respuesta inmune permanente y desmedida. Los IPCI actúan bloqueando estas proteínas e impidiendo la unión con el ligando presente en las células tumorales. Este efecto permite que los linfocitos T actúen de forma más eficiente y sostenida en su misión de destruir a las células tumorales. En los IPCI se incluyen la proteína CTLA-4 presente en linfocitos T citotóxicos, las proteínas B7-1/B7-2 presentes en las células presentadoras del antígeno y las proteínas de muerte programada 1 (PD-1), presentes también en los linfocitos T, y el ligando de muerte programada 1 (PD-L1), presente en las células tumorales. En 2011 fue aprobado el primer inhibidor, un anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4, conocido como ipilimumab, para el tratamiento del melanoma irsecable y, desde entonces, ha habido una afluencia progresiva y numerosa en el mercado de nuevos inhibidores dirigidos, mayoritariamente, contra la PD-1 (pembrolizumab, nivolumab, cemiplimab) y la PD-L1 (atezolizumab, avelumab, durvalumab), mientras se siguen ensayando otros nuevos inhibidores⁽¹⁰⁾ (Figura 5).

En el periodo 2012-2018 la Food and Drug Administration (FDA) tenía registrados en su base de datos

68 casos de AHAI producidos por IPCI: 43 por nivolumab, 13 por pembrolizumab, 7 por ipilimumab y 5 por atezolizumab. En general, todos los casos fueron considerados graves. En el conjunto de los efectos adversos registrados por la FDA, la AHAI inducida por IPCI es una complicación muy poco frecuente que se da en un porcentaje algo superior con los inhibidores de la PD-1/PD-L1 (0,15-0,25%) que con los inhibidores de la proteína CTLA-4 (0,06%). La mayoría de los pacientes que presentaron esta complicación estaban siendo tratados de un melanoma (32 casos) o de un carcinoma pulmonar (24 casos). En un 25% de los pacientes, la AHAI se acompañó de otros efectos indeseables de tipo inmune. La aparición de la anemia puede acontecer poco después de comenzar el tratamiento o un tiempo después, con una mediana de 10 semanas (rango: 2-78). La mayoría de los casos respondieron al tratamiento con esteroides, pero en 2 casos se produjo el fallecimiento de los pacientes.

Los resultados de la PDATG en estos casos fue muy variable, oscilando entre los casos positivos debidos a IgG, a C3 o a ambos factores inmunes y los casos negativos que en una serie publicada de 15 pacientes alcanzaban el 36% de los casos, mientras que la AHAI primaria o asociada solo supone el 3-11% de los casos. El estudio serológico a realizar ante la sospecha de que un IPCI ha causado un episodio de anemia hemolítica debe incluir la investigación de los diferentes mecanismos capaces de producir la hemólisis, a menos que el estudio inicial nos sitúe en el modelo

propio de las AHAIPIF debidas a anticuerpos farmaco-independientes.

► Bibliografía

1. Snapper I, Marks D, Schwartz L, Hollander I. Hemolytic anemia secondary to Mesantoin. *Ann Intern Med.* 1953;39:619-23.
2. Harris JW. Studies on the mechanisms of a drug-induced hemolytic anemia. *J Lab Clin Med.* 1956;47:760-5.
3. Petz LD, Garratty G. Immune hemolytic anemias. 2nd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2004.
4. Hill QA, Stamps R, Massey E, Grainger JD, Provan D, Hilla A. Guidelines on the management of drug-induced immune and secondary autoimmune, haemolytic anaemia. *Br J Haematol.* 2017;177:208-20.
5. Garratty G. Immune hemolytic anemia associated with drug therapy. *Blood Rev.* 2010;24:143-50.
6. Salama A. Drug-induced immune hemolytic anemia. *Expert Opin Drug Saf.* 2009;8:73-9.
7. Habibi B. Drug-induced red cell autoantibodies co-developed with drug specific antibodies causing hemolytic anemias. *Br J Haematol.* 1985;61:139-43.
8. Mueller-Eckhardt C, Salama A. Drug-induced immune cytopenias: a unifying pathogenic concept with special emphasis on the role of drug metabolites. *Transfus Med Rev.* 1990;IV:69-77.
9. Arndt PA, Garratty G. Cross-reactivity of cefotetan and ceftriaxone antibodies associated with hemolytic anemia with other cephalosporins and penicillin. *Am J Clin Pathol.* 2002;118:256-62.
10. Tanius G, Doley PB, Munker R. Autoimmune hemolytic anemia and checkpoint inhibitors: 68 cases from the FDA database and critical review. *Blood.* 2018;Supplement 1:2324.

Manejo transfusional en el paciente hematológico

Ana Esther Kerguelén Fuentes, Aurora Viejo Llorente,
Dolores Hernández-Maraver, Víctor Jiménez Yuste
Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Universitario La Paz. Madrid

› Introducción

La transfusión de sangre alogénica sigue siendo uno de los pilares fundamentales del tratamiento del paciente hematológico adulto. La autoevaluación continua de los procesos médicos y la revisión multidisciplinar de las pautas de transfusión es primordial para un empleo seguro, clínicamente efectivo y eficiente de esta terapéutica, así como para garantizar la calidad de la atención.

› Transfusión de concentrados de hemáties

› Generalidades

La anemia se define en función de los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1968 (OMS 2011) como una concentración de hemoglobina (Hb) < 13 g/dL para hombres y < 120 g/dL para mujeres. El 75% de los pacientes hematológicos presentan anemia al diagnóstico⁽¹⁾ y hasta un 70-90% la desarrolla durante su curso evolutivo, siendo la prevalencia más alta en niños con leucemia aguda (97% aprox.) y linfoma (93% aprox.)⁽²⁾. La etiología de la anemia es multifactorial (Tabla 1) y es causa de hospitalización, morbilidad y/o mortalidad. El impacto económico de todo lo expuesto, así como de los riesgos asociados a la terapéutica tradicionalmente más utilizada (transfusión de concentrado de hemáties -CH-), ha concienciado a los servicios de transfusión a promover una política restrictiva ("menos es más") tan controvertida⁽³⁻⁵⁾ e impulsar otras alternativas (Tabla 2) (*patient blood management* -PBM-).

El síndrome anémico se ha relacionado específicamente con una mala calidad de vida y un deterioro significativo del estado funcional de los pacientes de

edad avanzada. Los signos y síntomas varían según la instauración de la anemia, la presencia o no de sangrado y el desarrollo de mecanismos compensatorios cardiovasculares, como son el aumento y la redistribución del flujo sanguíneo, el aumento del difosfoglicerato y el gasto cardiaco y la disminución de la viscosidad sanguínea. No está claro si un mejor control de la anemia revertiría el remodelamiento

Tabla 1. Causas de anemia en el paciente oncológico

Patrón inflamatorio asociado al cáncer (y al tratamiento)

- Descenso relativo de la producción de eritropoyetina (EPO)
- Resistencia a la EPO de la médula ósea
- Anticuerpos anti-eritropoyetina
- Atrapamiento del hierro por los macrófagos del sistema mononuclear fagocítico
- Incremento de hepcidina

Ferropenia/Déficit funcional de hierro

- Anemia ferropénica previa
- Anemia ferropénica secundaria a la neoplasia y a la cirugía
- Flebotomías repetidas
- Sangrado crónico

Otras causas

- Insuficiencia renal
- Déficit de vitamina B₁₂/Déficit de B₁₂ funcional
- Malabsorción/Desnutrición
- Anemia secundaria a infiltración medular por la enfermedad de base
- Anemia secundaria a la supresión de la eritropoyesis por infección/inflamación (liberación de citocinas)
- Anemia secundaria a quimioterapia/radioterapia
- Anemia hemolítica mecánica
- Anemia hemolítica microangiopática (fármacos/TPH)
- Anemia hemolítica autoinmune por anticuerpos calientes (fludarabina, análogos de purinas o enfermedad de base)
- Anemia hemolítica autoinmune por anticuerpos fríos (SLP)
- Aplasia pura de la serie roja secundaria a TPH ABO incompatible
- Aplasia pura de la serie roja secundaria a infección por virus de Epstein-Barr
- Coagulación intravascular diseminada (leucemia aguda promielocítica)

SLP: síndrome linfoproliferativo; TPH: trasplante de progenitores hematopoyéticos

Tabla 2. Alternativas a la transfusión de componentes sanguíneos

Alternativas a la transfusión de concentrados de plaquetas

Ácido tranexámico:

- Pacientes quirúrgicos en los que se espera pérdida de sangre > 500 mL
- Politrauma susceptible de sangrado
- Trombocitopenia secundaria a fallo medular crónico con sangrado
- Sangrado gastrointestinal secundario a úlcera y/o erosión en mucosa (grado 2A)^a

Sangrado grave: **fibrinógeno** (si concentración plasmática < 1,5 g/L)

Uremia con sangrado o previo a procedimiento: diálisis, corregir anemia, considerar **desmopresina**, etc.

Análogos de trombopoyetina^b: a valorar en SMD, AM refractaria, PTI, etc.

Inmunoglobulinas intravenosas: trombopenia inmune, aplasia medular (PTI, refractariedad plaquetaria, etc.)

Controvertido: sustitutos de plaquetas artificiales, plasma pobre en plaquetas, rFVIIa, rFXIII, interleucina 6, interleucina 11, etc.

Alternativas a la transfusión de concentrados de hematíes

Hierro

- Anemia absoluta o deficiencia funcional de hierro (grado 1B)^c
- Pacientes no anémicos con bajas reservas de hierro (ferritina < 100 ng/mL y saturación de transferrina < 20%) (grado 1B)^c
- En caso de intolerancia o no respuesta al hierro oral está indicada la administración intravenosa (grado 1B)^c

Terapia con agentes estimulantes de la eritropoyesis (AE)

- Indicación individualizada (valor de hemoglobina, antecedentes trombóticos, enfermedad renal crónica, tratamiento QT no curativo, etc.)
- Solicitar estudio del perfil férrico para valorar su uso concomitante y maximizar la eficacia de AE (grado 1A^c/grado 1A^a)

- Anemia preoperatoria en pacientes que rechazan la transfusión de componentes sanguíneos (grado 2B)^c
- Anemia preoperatoria en aloimmunizados, especialmente frente a antígenos de alta incidencia (grado 2B)^c
- Anemia secundaria a radioterapia/QT (grado 2B)^a
- Síndromes linfoproliferativos crónicos y mieloma múltiple en remisión completa^d
- SMD de bajo riesgo y niveles de eritropoyetina ≤ 500 UI/L^b
- Síndrome hiperhemolítico en la ACF

Desmopresina (DDAVP: *1-deamino-8-D-arginine-vasopressin*): a valorar en la disfunción plaquetaria o toma de antiagregantes; ACF: anemia de células falciformes; **Inmunoglobulinas intravenosas**: síndrome hiperhemolítico en la ACF

Alternativas a la transfusión de PFC

Vitamina K

- Pacientes (grado 1B)^c con TP prolongados y deficiencia adquirida de vitamina K

Concentrado de complejo protrombínico

- Pacientes tratados con antagonistas de vitamina K y que presentan alguna de estas situaciones clínicas:
 - Hemorragia intracraneal (grado 1C)^a
 - Hemorragia activa (grado 2A)^a
 - Pacientes que necesitan reversión de anticoagulación (grado 2C)^a y/o cirugía urgente (grado 2A)^a

^a Documento de Sevilla 2013; ^b Grupo Español de SMD 2012, TPH 2019 y SEHH; ^c Recomendaciones de las British Society of Haematology Guidelines de 2015; ^d Guías de ASCO/ASH 2020

PFC: plasma fresco congelado; PTI: púrpura trombocitopénica inmune; QT: quimioterapia; SMD: síndrome mielodisplásico; TP: tiempo de protrombina

cardíaco (hipertrofia ventricular izquierda). Por este motivo, cuando la anemia es de naturaleza crónica, en el paciente joven y sin cardiopatía, los síntomas generalmente son bien tolerados y se desconocen los efectos beneficiosos de la transfusión.

En los pacientes más transfundidos, como son los síndromes mielodisplásicos (SMD) y las hemoglobinopatías (HB), hay 2 cuestiones pendientes de resolver: el **umbral de Hb** y el **número de CH**.

El umbral exacto de Hb es muy heterogéneo y varía en las diferentes guías de práctica clínica (GPC), pero desde hace tiempo el criterio es unánime en que la transfusión no es beneficiosa cuando la Hb > 10 g/dL y se cree que sí podría serlo cuando la Hb < 6-7 g/dL⁽¹⁾.

Los pacientes sometidos a **trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) alogénico y la leucemia aguda en inducción** suelen presentar síndrome anémico secundario a la trombocitopenia y las ma-

nifestaciones hemorrágicas agudas, y puede ser prudente mantener un hematocrito alrededor del 25% (Hb \geq 8 g/dL). En los pacientes con **SMD** parece recomendable mantener una Hb pretransfusional entre 8 y 10 g/dL, en función del estilo de vida del paciente y de la existencia o no de comorbilidades (Hb de 10 g/dL en el cardiópata). Sin embargo, en la **aplasia medular (AM)** asintomática solo se debe transfundir cuando la Hb $<$ 6-7 g/dL para evitar el riesgo de sensibilización frente a los antígenos (Ag) del donante y la sobrecarga férrica.

La hemosiderosis postransfusional es un factor de mal pronóstico debido a los efectos secundarios de su depósito en el tejido cardíaco y hepático, y favorecer la aparición de procesos infecciosos, fundamentalmente bacterianos y fúngicos.

La práctica de la transfusión de 2 CH sigue siendo generalizada pese a ser inapropiada (estudios retrospectivos)⁽⁶⁾. Los autores no han encontrado diferencias significativas en la duración de la hospitalización y/o la mortalidad a los 30 días cuando la media de la Hb al alta fue menor (8,9 vs. 9,5 g/dL; $p = 0,005$). La transfusión en oncohematología de un único CH es segura y eficaz, y los sistemas electrónicos de solicitud de transfusión podrían facilitar la implantación de esta medida restrictiva⁽⁷⁾.

► **Transfusión en situaciones clínicas especiales**

► **Síndromes mielodisplásicos, aplasia de médula ósea y hemoglobinopatías: anemia de células falciformes y síndromes talasémicos**

Para una práctica transfusional correcta en los pacientes diagnosticados de anemia de células falciformes (ACF) (grado 1C)⁽⁸⁾, AM y SMD es esencial la estrecha comunicación entre las unidades clínicas y el servicio de transfusión.

En los pacientes con anemia grave (hombres con Hb $<$ 12 g/dL, mujeres con Hb $<$ 10 g/dL o de acuerdo con criterios locales acordados) de causa no conocida y sin déficit de hierro es obligado descartar una HB hereditaria (grado 1B)⁽⁹⁾.

En la ACF las modalidades de transfusión son: transfusión simple (corto o largo plazo), recambio eritrocitario (RE) y RE con hemodilución isovolumétrica. La decisión de una u otra debe ser multidisciplinar, especialmente en los pacientes con complicaciones (gra-

Tabla 3. Manejo transfusional de la anemia de células falciformes (ACF)

VARIABLES A TENER EN CUENTA EN LA INDICACIÓN DE RECAMBIO ERITROCITARIO (RE)

- Régimen transfusional crónico
- Reacciones transfusionales previas
- Motivo de transfusión (empeoramiento de la anemia y/o complicaciones agudas como síndrome torácico agudo)
- Aloinmunización
- Umbral de hemoglobina (Hb) y/o hematocrito^a, concentración de Hb y % HbS^b (grado 1C)¹
- Anemia preoperatoria

PRUEBAS A SOLICITAR EN RÉGIMEN TRANSFUSIONAL CRÓNICO

- Serologías (VHB, VHC y VIH) (grado 1C)¹, al diagnóstico y anualmente en caso de trasfusión crónica
- Ferritina sérica cada 3 meses (grado 1C)¹
- Medición de hierro hepático cada 1-2 años (si sobrecarga férrica probada o sospecha) (grado 1C)¹

^a Los pacientes con Hb basal $<$ 90 g/L y sin régimen transfusional regular, la Hb postransfusión no debe exceder de 100 g/L, particularmente si % HbS $>$ 30%. El umbral de Hb postransfusión podría ser mayor en pacientes transfundidos crónicamente o si % HbS es bajo (grado 1C)¹; ^b mantener HbS $<$ 30% trata las complicaciones agudas y previene las complicaciones a largo plazo en pacientes transfundidos de forma crónica

¹ Davis BA, Allard S, Qureshi A, Porter JB, Panchar S, Win N, et al.; British Committee for Standards in Haematology. (2017). Guidelines on red cell transfusion in sickle cell disease. Part I: principles and laboratory aspects. *Br J Haematol.* 2017;176(2):179-91

VHB: virus de la hepatitis B; VHC: virus de la hepatitis C; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

do 1C)⁽⁸⁾ (Tabla 3). Los servicios de transfusión de los centros de referencia deben contar con instalaciones adecuadas y el personal entrenado en procedimientos de recambio manual y/o automatizado (mayor rapidez de disminución de HbS) para situaciones de emergencia (grado 1C)⁽⁸⁾.

► **Recomendaciones para la práctica clínica transfusional⁽¹⁰⁾**

- Realizar fenotipo eritrocitario (previo a la primera transfusión) y/o genotipo (si ha sido transfundido en los últimos 3 meses) a todos los pacientes diagnosticados de HB, AM y SMD.
- Transfusión de CH ABO compatible e isof(g)enotipo Rh y Kell (baja calidad de evidencia, recomendación débil)⁽¹⁰⁾ en pacientes no aloinmunizados. En caso de AM⁽¹¹⁾, SMD y/o HB ya aloinmunizados (baja calidad de evidencia, recomendación débil)⁽¹⁰⁾, con antecedentes de reacciones hemolíticas y/o transfusión compleja (grado 1C)⁽¹⁰⁾, se recomienda ampliar a Fya/Fyb, Jk^a/Jk^b, S/s, siempre y cuando este hecho

no suponga un retraso en la transfusión. Se debe conocer el manejo clínico e inmunohematológico de las reacciones hemolíticas y notificarlas al sistema de hemovigilancia (grado 1C)⁽¹⁰⁾.

- La sangre proporcionada a los pacientes con ACF debe ser HbS negativa y, cuando sea posible, debe tener < 10 días de edad para la transfusión simple y < 7 días de edad para el RE. Se puede administrar sangre > 10 días en ausencia de disponibilidad (grado 1C)⁽¹⁰⁾.

- Los pacientes aloinmunizados con uno o más anticuerpos clínicamente significativos se deben transfundir con CH carentes del Ag para el cual han desarrollado el aloanticuerpo (evidencia de baja calidad, recomendación fuerte, grado 1C)⁽¹⁰⁾. Para asegurar que esto se cumple, se recomienda una estrategia transfusional acordada entre la unidad clínica y el centro de transfusión local/nacional (especialmente en anticuerpos frente a Ag de alta incidencia) (grado 1C)⁽¹⁰⁾. El paciente debe disponer de un informe/tarjeta que presentará en cada hospitalización (grado 2C)⁽¹⁰⁾.

► Indicaciones de transfusión en anemia de células falciformes⁽¹²⁾

- **Enfermedad cerebrovascular.** La enfermedad cerebrovascular incluye el accidente cerebrovascular (ACV) isquémico agudo y/o el infarto cerebral silente (ICS). El objetivo de la transfusión es **siempre** mantener HbS < 30%.

- Transfusión profiláctica:

- Primaria:

- Talasemia SS o S/ β_0 (2 a 16 años) con ecografía Doppler transcranial de alto riesgo (AR) de un primer ACV (grado 1A)⁽¹²⁾. La duración del régimen transfusional debe ser individualizada y como mínimo de 1 año. La alternativa terapéutica es la hidroxiurea.

- Secundaria:

- Talasemia SS o S/ β_0 (5 a 15 años) de AR de un segundo ACV silente (grado 1A)⁽¹²⁾.

- Prevención de ACV isquémicos recurrentes tanto en niños como en adultos (grado 1B)⁽¹²⁾.

- **Transfusión terapéutica.** La transfusión es urgente en caso de signos o síntomas que sugieran un ACV isquémico agudo, aunque se desconozca la causa. Si se confirma que es debido a la ACF, las transfusiones regulares deben continuarse a largo plazo (grado 1B)⁽¹²⁾.

- **Cirugía.** Son pacientes quirúrgicos de AR y es esencial la optimización pre- y postoperatoria de for-

ma consensuada (grado 1C)⁽¹²⁾. La transfusión o RE preoperatorio es objeto de controversia⁽¹³⁾ pero se recomienda mantener una Hb > 9 g/dL en las siguientes situaciones:

- SS (grado 1A)⁽¹²⁾ y SC (grado 1C)⁽¹²⁾ y cirugía de riesgo medio (por ejemplo, abdominal, amigdalectomía, ortopedia).

- Cirugía de AR (por ejemplo, cardiovascular, cerebral) independientemente del genotipo (grado 1C)⁽¹²⁾.

- En cirugía de emergencia y Hb < 9 g/dL se valorará de forma consensuada el momento de la transfusión (pre-, intra- o postoperatorio) en función de la urgencia y la complejidad (grado 1D)⁽¹²⁾. Si la transfusión está indicada y Hb > 9 g/dL, está indicado el RE mejor que la transfusión simple.

- En procedimiento de derivación o drenaje bajo anestesia general, se valorará de forma consensuada (grado 2C)⁽¹²⁾.

- **ACF grave y paciente crítico.** La decisión de transfusión o RE (grado 2C)⁽¹²⁾ debe ser consensuada en las siguientes situaciones:

- El secuestro de esplénicos y/o el secuestro hepático (grado 1B)⁽¹²⁾.

- La crisis aplásica (grado 1B)⁽¹²⁾.

- El síndrome torácico agudo (STA) grave (grado 1B)⁽¹²⁾. La hidroxiurea se recomienda como tratamiento de primera línea para la prevención del STA recurrente o episodios dolorosos repetidos asociados con el STA (grado 1A)⁽¹²⁾. Se debe valorar la transfusión regular para los pacientes sin tratamiento, intolerantes o para los que la hidroxiurea está contraindicada (grado 1B)⁽¹²⁾. Instaurado el STA no hay evidencia del mejor beneficio del RE frente a la transfusión simple. Si no responde a la transfusión simple y/o hay un alto nivel de Hb, estaría indicado el RE.

- Insuficiencia aguda multiorgánica (grado 2C)⁽¹²⁾.

- Síndrome mesentérico (grado 1C)⁽¹²⁾.

- Sepsis grave (grado 2C)⁽¹²⁾.

En pacientes seleccionados con ACF grave, la transfusión de CH puede ser eficaz para aliviar la sintomatología y disminuir los días de hospitalización, aunque no hay evidencia de que acorte la duración de una crisis dolorosa.

- **Embarazo.** La transfusión profiláctica de CH **estaría indicada en las siguientes situaciones:**

- Patología obstétrica-fetal anterior o actual relacionada con la ACF.

- Embarazo múltiple (grado 1C)⁽¹²⁾ y/o AR.

- ACF grave en tratamiento con hidroxiurea.
- Pacientes con régimen crónico de transfusiones como profilaxis de ACV o tratamiento de complicaciones graves (grado 1B)⁽¹²⁾.
- Empeoramiento de la anemia o desarrollo de complicaciones agudas del ACF (grado 1B)⁽¹²⁾.

No estaría indicada en las siguientes situaciones:

- Tratamiento de la anemia asintomática y cifras estables de Hb (por ejemplo, con el desarrollo de enfermedad renal crónica) (grado 1C)⁽¹²⁾.
- Tratamiento de la crisis dolorosa no complicada, a menos que haya anemización brusca, compromiso hemodinámico o de órganos críticos (grado 1C)⁽¹²⁾.
- Tratamiento del priapismo agudo (falta de ensayos controlados aleatorizados).

› Transfusión en cuidados paliativos

Las transfusiones de CH son una práctica clínica habitual en los cuidados paliativos (CP) a pesar de la poca evidencia (estudios observacionales) del beneficio clínico y el conocido riesgo de sobrecarga circulatoria en la enfermedad avanzada. Algunos autores⁽¹⁴⁾ reportan que solo el **18%** de los pacientes transfundidos tuvieron una mejoría mantenida hasta los 30 días, el 42% no tuvo beneficio o fue transitorio y el 32% estaban muertos a los 30 días. La investigación más exhaustiva de la causa de su anemia (es obligado descartar anemia de enfermedad crónica) permitiría la implantación de alternativas terapéuticas como suplementación con B₁₂, folato y/o hierro. En aquellos pacientes en los que estaría indicada la transfusión tras un análisis riesgo/beneficio, el desarrollo de circuitos de fácil acceso evitaría la derivación tardía⁽¹⁵⁾ a las unidades de CP domiciliarios, tan importantes al final de la vida.

› Alosensibilización eritrocitaria

La formación de anticuerpos frente a Ag eritrocitarios de los que carece el receptor (alosensibilización eritrocitaria) se produce en un 11% de los pacientes diagnosticados de SMD⁽¹⁶⁾ y en un 2,3% en la AM⁽¹⁷⁾. En la ACF, la tasa de aloinmunización es la más alta (18,6%)⁽¹⁸⁾ debido a las discrepancias del fenotipo entre el donante (raza caucásica) y el receptor (raza afroamericana), y el 60-70% de los pacientes aloinmunizados es frente a Ag del sistema Rh y Kell. Si la aloinmunización se produce frente a Ag de alta incidencia, la posibili-

dad de encontrar CH compatibles disminuye y puede ser causa de un retraso en la transfusión y/o el RE.

El desarrollo de una reacción hemolítica retardada (RHRT) es una de las consecuencias clínicas más relevantes de la aloinmunización. La RHRT se produce por una respuesta anamnésica en el receptor ante una nueva exposición al Ag. El sistema de Ag eritrocitarios más implicado en la RHRT es el sistema Kidd. En un estudio francés (Pirenne *et al.*, ASH 2016), los autores analizaron 694 episodios transfusionales (ET) en 311 pacientes con ACF, 200 pacientes recibieron 358 transfusiones puntuales y 111 pacientes 336 ET crónicos. Los pacientes transfundidos puntualmente tienen un riesgo de RHRT mayor que los transfundidos de forma crónica ($p < 0,0001$).

En la ACF, la RHRT está infradiagnosticada debido a que las características clínico-analíticas están enmascaradas con las de la crisis vasooclusiva (aumento de HbS y LDH, reticulocitosis, etc.). La sospecha diagnóstica (anemización a los 11 días \pm 9 tras transfusión)⁽¹⁹⁾ desde las unidades clínicas facilitaría la identificación precoz del aloanticuerpo desde los servicios de transfusión.

› Transfusión de concentrados de plaquetas (CP)

› Generalidades

La incidencia de trombocitopenia en pacientes hematológicos es muy variable y depende de la enfermedad de base. Las formas graves ($< 10 \times 10^9/L$) repercuten en la mortalidad de causa hemorrágica y en la supervivencia, especialmente de los pacientes que han desarrollado refractariedad plaquetaria. Es preciso descartar causas de la trombocitopenia de origen no central (inmunológica, por consumo, farmacológica, etc.) que puedan beneficiarse de otros tratamientos. Igualmente, hay que recordar la posibilidad de que exista una trombocitopenia adquirida a pesar de un recuento normal.

La estrategia óptima (restrictiva vs. liberal) en la transfusión de plaquetas es controvertida, debido a la heterogeneidad en la cuantificación del sangrado en los ensayos clínicos aleatorizados (ECA) más relevantes y a las dificultades metodológicas (seguimiento a largo plazo, duración y frecuencia de los ingresos hospitalarios, evaluación de la calidad de vida, etc.) de los metaanálisis.

Tabla 4. Transfusión de plaquetas en trombopatía y/o trombopenia no central
1. Trombopatía
Congénita (indicación por especialista en hemostasia):

- Previo a procedimiento invasivo
- Sangrado
- Si alternativa terapéutica (rFVIIa, ácido tranexámico, desmopresina, etc.) contraindicada o inefectiva
- Trombastenia de Glanzmann: transfusión de plaquetas HLA compatibles

Adquirida (uremia, ácido acetilsalicílico, inhibidores de glicoproteína IIa/IIIb, antagonistas P2Y₁₂, etc.)

- Solo indicado en sangrado grave

2. Trombopenia no central
2.1. Púrpura trombocitopénica trombótica (PTT)

- La transfusión de plaquetas no siempre está contraindicada (sangrado que compromete la vida, colocación de CVC, etc.)

2.2. Trombocitopenia inmune (PTI, TIH, PPT)

- Previo a procedimiento invasivo y/o urgente
- Sangrado que compromete la vida
- Alternativa terapéutica inefectiva
- Tratamiento concomitante con inmunoglobulina intravenosa (PTI/PPT)
- PPT: transfusión de plaquetas HPA compatibles

CVC: catéter venoso central; PPT: púrpura posttransfusional; PTI: púrpura trombocitopénica idiopática

En los pacientes con quimioterapia (QT) intensiva y/o sometidos a TPH⁽²⁰⁾, la **transfusión terapéutica** (vs. profiláctica) estaba asociada con un mayor riesgo de hemorragia y no se demostraron diferencias en relación con la tasa de remisión completa, eventos adversos, mortalidad y/o supervivencia general. En una revisión posterior⁽²¹⁾, en el fallo medular tanto congénito como adquirido, los estudios publicados no demostraron la mayor eficacia y seguridad de la transfusión terapéutica.

La **transfusión profiláctica** de plaquetas podría seguir siendo el estándar para los pacientes con leucemia mieloide aguda y/o TPH alogénico. Sin embargo, hay 2 cuestiones aún pendientes de resolver: umbral de transfusión y dosis (estándar, baja o alta) del CP.

El umbral de transfusión de $10 \times 10^9/L$ sería razonable⁽²²⁾ en ausencia de otros factores de riesgo de hemorragia. En relación con las dosis de CP, la mayoría de las GPC publicadas no concluyen una dosis óptima, pero algunos autores⁽²³⁾ recomiendan dosis **bajas** para pacientes hospitalizados con tratamiento intensivo y dosis **estándar** ($2.5-3 \times 10^{11}$) en el ambulatorio. La transfusión rutinaria con dosis altas aumenta el riesgo

de eventos adversos relacionados con la transfusión sin disminuir el riesgo de sangrado o el número total de transfusiones.

Los pacientes oncohematológicos diagnosticados de trombopenia (central o periférica) y/o trombopatía deben transfundirse de acuerdo con las pautas nacionales y/o internacionales⁽²⁴⁾ de transfusión (**Figura 1 y Tabla 4**).

La política "restrictiva" repercutiría en una exposición a un menor número de donantes, menor desarrollo de refractariedad plaquetaria, menor consumo de CP, menor asistencia al hospital de día y, por tanto, mejora en la calidad de vida de los pacientes.

► Transfusión en pacientes refractarios

La refractariedad se atribuye a la aloinmunización del receptor contra Ag plaquetarios humanos (HPA) específicos del donante o Ag. HLA de clase I que se expresan tanto en las plaquetas como en todas las células nucleadas.

En pacientes con SMD, el desarrollo de refractariedad plaquetaria puede ocurrir hasta en un 85% de los politransfundidos. En los pacientes que han desarrollado refractariedad plaquetaria, la transfusión se debe ajustar a las siguientes pautas y/o recomendaciones:

- Descartar trombocitopenia hipoproliferativa con o sin presencia de anticuerpos anti-HLA y/o anti-HPA.
- En caso de presencia de anticuerpos anti-HLA y/o anti-HPA se debe realizar transfusión de plaquetas ABO compatibles (para incrementar su rendimiento) y obtenidas por aféresis a partir de un único donante o varios inmunológicamente compatibles (HLA y/o HPA compatibles).

► Recomendaciones generales para la práctica clínica transfusional⁽²⁴⁾

- En pacientes que **no** requieran transfusión regular, se acepta la transfusión de plaquetas ABO incompatibles. En su defecto, se recomienda (grado 2B)⁽²⁴⁾ la transfusión de CP ABO compatibles.
- El riesgo de hemólisis es menor si se transfunden plaquetas con bajo título de isohemaglutininas o de grupo ABO diferente al grupo O, así como las plaquetas suspendidas en solución aditiva plaquetaria.
- En niñas o mujeres en edad fértil Rh (D) negativas se deben transfundir plaquetas Rh (D) negativas y administrar profilaxis IgG anti-D en caso de transfun-

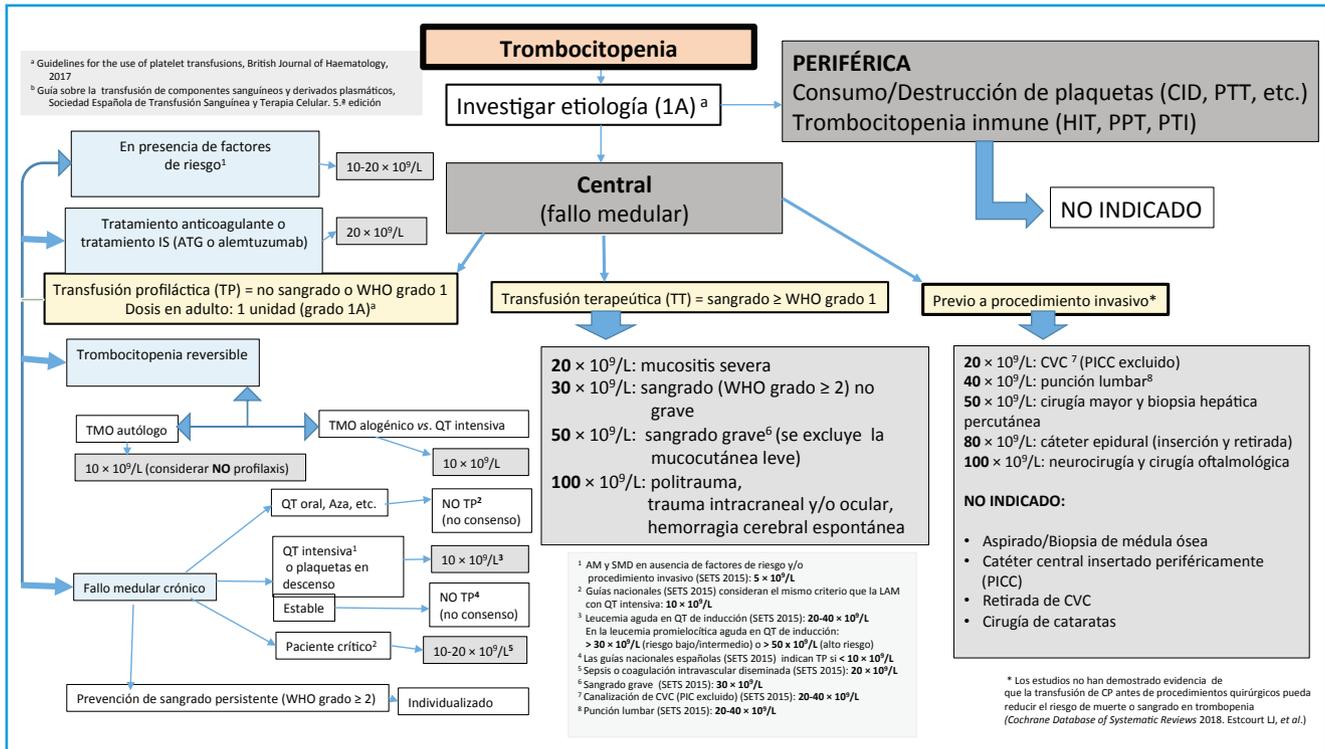


Figura 1. Manejo transfusional del paciente trombopénico. AM: aplasia medular; CID: coagulación intravascular diseminada; CP: concentrados de plaquetas; CVC: catéter venoso central; HIT: trombopenia inducida por heparina; IS: inmunosupresor; PPT: púrpura postransfusional; PTI: púrpura trombocitopénica idiopática; PTT: púrpura trombocitopénica trombótica; QT: quimioterapia; SMD: síndrome mielodisplásico; TMO: trasplante de médula ósea.

dir positivas. En adultos varones menores de 18 años aloimmunizados con anti-D y/o dependientes de transfusiones en caso de **no** transfundir plaquetas Rh (D) negativas, **no** administrar profilaxis IgG anti-D.

- En caso de reacción transfusional alérgica grave, transfundir plaquetas lavadas.

Finalmente, las unidades clínicas deben tener fácil acceso a las guías de manejo de reacciones adversas transfusionales.

➤ Transfusión de plasma fresco congelado (PFC) y/o crioprecipitado

La transfusión de PFC en el paciente oncohematológico es infrecuente, pero en ocasiones está sobreutilizada.

No estaría indicada en las siguientes situaciones⁽²⁵⁾:

- Como solución de reposición de volumen sanguíneo (2C)⁽²⁵⁾.
- En pacientes con test de coagulación estándar alterados previos a un procedimiento (2C)⁽²⁵⁾ como

puede ser el aspirado/biopsia de médula o la colocación de un catéter venoso central (CVC).

- Para corregir un test de coagulación alterado y/o reducir el riesgo de sangrado, particularmente cuando los tiempos de coagulación (tiempo de protrombina -TP- o International Normalized Ratio -INR-) están entre 1,5-1,9.

Sí estaría indicada en las siguientes situaciones:

- En deficiencias congénitas de los factores de coagulación (1C)⁽²⁵⁾, si no se dispone del factor de coagulación específico.
- En el tratamiento de la coagulopatía de la leucemia aguda promielocítica.
 - Hemorragia masiva de causa no filiada.
 - Hemorragia por antagonistas de la vitamina K si no se dispone del preparado comercial.
 - Hemorragia por hepatopatía.
 - Coagulación intravascular diseminada.
 - Como solución de reposición para recambio plasmático terapéutico en la púrpura trombocitopénica trombótica.

- El crioprecipitado está en desuso en algunos centros porque ha quedado sustituido por las preparaciones comerciales de fibrinógeno.

› Transfusión de concentrado de granulocitos

La utilidad clínica es el tratamiento de la sepsis bacteriana o fúngica grave que no responde al tratamiento antibiótico, en pacientes con neutropenia intensa ($< 100 \times 10^9/L$).

Los granulocitos se obtienen mediante aféresis de donantes que han recibido dexametasona, o G-CSF, o una combinación de ambos. El producto necesita ser irradiado antes de la administración para prevenir la enfermedad injerto contra receptor y tienen que ser transfundidos lo antes posible, no más tarde de 24 horas desde la obtención.

› Conclusiones

- La política transfusional restrictiva debe extenderse a la gran mayoría de los pacientes oncohematológicos.

- El umbral de Hb para la transfusión de CH es "conocido" por los servicios clínicos, no así el número óptimo de unidades a transfundir. La realización de auditorías permitirá identificar las áreas de mejora, como puede ser el TPH alogénico y/o el paciente crítico.

- La indicación del uso profiláctico o terapéutico de CP, así como el umbral de transfusión, necesitan de metaanálisis concluyentes. Para conseguir este objetivo, los médicos prescriptores deben basarse en guías nacionales y/o internacionales universalmente aceptadas.

- Los resultados clínicos (nivel 1 de evidencia) y la calidad de vida de los pacientes mejoran cuando se administra un menor número de transfusiones y se siguen criterios no solo cuantitativos (transfusión en función de pruebas de la función plaquetaria, pruebas viscoelásticas, masa plaquetaria, número absoluto de plaquetas inmaduras, etc.).

- La notificación de todas las reacciones adversas asociadas a la transfusión desde las unidades clínicas (hematología, medicina interna, medicina intensiva, etc.) ayudaría a los servicios de transfusión al uso individualizado de los diferentes componentes sanguíneos.

› Estrategias futuras

- El desarrollo de ECA sobre la eficacia clínica de otras alternativas históricamente cuestionadas (agentes estimulantes de la eritropoyesis, análogos de la trombopoyetina, DDAVP, etc.) y la repercusión económica de estas estrategias de PBM mejorarían la implantación de una política restrictiva universal.

- Dada la baja prevalencia de la enfermedad en los pacientes más transfundidos (pacientes paliativos, SMD, síndromes talasémicos, inducción de leucemia aguda, etc.) son necesarios ECA metodológicamente bien diseñados. Los resultados permitirían identificar un subgrupo de pacientes para los que puede ser segura una política transfusional exclusivamente terapéutica, como es el trasplante de médula ósea (TMO) autólogo.

- Esta nueva estrategia debe ser utilizada solo si el personal está bien formado y con experiencia en el nuevo enfoque y puede reaccionar de manera precoz ante los primeros signos de hemorragia grave.

- En la ACF, los ECA comparativos de las alternativas de transfusión y de la duración (corto o largo plazo) permitirían analizar la calidad de vida y el desarrollo neurocognitivo de los pacientes asintomáticos que desarrollan complicaciones crónicas como el ACV silente. La adherencia a los tratamientos y un mayor reclutamiento de pacientes (de todos los genotipos) consolidarían las conclusiones de estos estudios.

› Bibliografía

1. Shah N, Andrews J, Goodnough LT. Transfusions for anemia in adult and pediatric patients with malignancies. *Blood Rev.* 2015;29(5):291-9.
2. Michon J. Incidence of anemia in pediatric cancer patients in Europe: results of a large, international survey. *Med Pediatr Oncol.* 2002;39:448-50.
3. Estcourt LJ, Malouf R, Trivella M, Fergusson DA, Hopewell S, Murphy MF. Restrictive versus liberal red blood cell transfusion strategies for people with haematological malignancies treated with intensive chemotherapy or radiotherapy, or both, with or without haematopoietic stem cell support. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017;1(1):CD011305.
4. DeZern AE, Williams K, Zahurak M, Hand W, Stephens RS, King KE, et al. Red blood cell transfusion triggers in acute leukemia: a randomized pilot study. *Transfusion.* 2016;56(7):1750-7.
5. Carson JL, Stanworth SJ, Roubinian N, Fergusson DA, Triulzi D, Doree C, Hebert PC. Transfusion thresholds and other strategies for guiding allogeneic red blood cell transfusion. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016(10):CD002042.

6. Bowman Z, Fei N, Ahn J, Wen S, Cumpston A, Shah N, et al. Single versus double-unit transfusion: safety and efficacy for patients with hematologic malignancies. *Eur J Haematol*. 2019;102(5):383-8.
7. Warner MA, Jambhekar NS, Saadeh S, Jacob EK, Kreuter JD, Mundell WC, et al. Implementation of a patient blood management program in hematopoietic stem cell transplantation (Editorial, p. 2763). *Transfusion*. 2019 Sep;59(9):2840-8.
8. Davis BA, Allard S, Qureshi A, Porter JB, Pancham S, Win N, et al. British Committee for Standards in Haematology. (2017). Guidelines on red cell transfusion in sickle cell disease. Part I: principles and laboratory aspects. *Br J Haematol*. 2017;176(2):179-91.
9. Kotzé A, Harris A, Baker C, Iqbal T, Lavies N, Richards T, et al. British committee for standards in haematology guidelines on the identification and management of pre-operative anaemia. *Br J Haematol*. 2015 Nov;171(3):322-31.
10. Trompeter S, Massey E, Robinson S; Transfusion Task Force of the British Society of Haematology Guidelines Committee. Position paper on International Collaboration for Transfusion Medicine (ICTM) Guideline 'Red blood cell specifications for patients with hemoglobinopathies: a systematic review and guideline'. *Br J Haematol*. 2020;189(3):424-7.
11. Killick SB, Bown N, Cavenagh J, Dokal I, Foukaneli T, Hill A, et al. Guidelines for the diagnosis and management of adult aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 2016 Jan;172(2):187-207.
12. Davis BA, Allard S, Qureshi A, Porter JB, Pancham S, Win N, et al.; British Society for Haematology. Guidelines on red cell transfusion in sickle cell disease Part II: indications for transfusion. *Br J Haematol*. 2017 Jan;176(2):192-209.
13. Estcourt LJ, Fortin PM, Trivella M, Hopewell S. Preoperative blood transfusions for sickle cell disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016;4(4):CD003149.
14. Neoh K, Gray R, Grant-Casey J, Estcourt L, Malia C, Boland JW, Bennett MI. National comparative audit of red blood cell transfusion practice in hospices: Recommendations for palliative care practice. *Palliat Med*. 2019 Jan;33(1):102-8.
15. Odejide OO, Steensma DP. Patients with haematological malignancies should not have to choose between transfusions and hospice care. *Lancet Haematol*. 2020;7(5):e418-e424.
16. Chhetri R, Wee A, Sinha R, Kutyna MM, Gupta S, Nath L, et al. Red Cell Alloimmunisation Is Associated with Increased Red Cell Transfusion Requirements in Myelodysplastic Syndrome. *Blood*. 2018;132(Supplement 1):1826.
17. Cohen D, Hartung H, Evans P, Friedman DF, Chou ST. Red blood cell alloimmunization in transfused patients with bone marrow failure syndromes. *Transfusion*. 2016;56(6):1314-9.
18. Rosse WF, Gallagher D, Kinney TR, Castro O, Dosik H, Moehr J, et al. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease Transfusion and alloimmunization in sickle cell disease. *Blood*. 1990;76(7):1431-7.
19. Chou ST, Alsawas M, Fasano RM, Field JJ, Hendrickson JE, Howard J, et al. American Society of Hematology 2020 guidelines for sickle cell disease: transfusion support. *Blood Adv*. 2020;4(2):327-55.
20. Crighton GL, Estcourt LJ, Wood EM, Trivella M, Doree C, Stanworth S. A therapeutic-only versus prophylactic platelet transfusion strategy for preventing bleeding in patients with haematological disorders after myelosuppressive chemotherapy or stem cell transplantation. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;9(9):CD010981.
21. Malouf R, Ashraf A, Hadjinicolaou AV, Doree C, Hopewell S, Estcourt LJ. Comparison of a therapeutic-only versus prophylactic platelet transfusion policy for people with congenital or acquired bone marrow failure disorders. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;5(5):CD012342.
22. Estcourt LJ, Stanworth SJ, Doree C, Hopewell S, Trivella M, Murphy MF. Comparison of different platelet count thresholds to guide administration of prophylactic platelet transfusion for preventing bleeding in people with haematological disorders after myelosuppressive chemotherapy or stem cell transplantation. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;11(11):CD010983.
23. Estcourt LJ, Stanworth S, Doree C, Trivella M, Hopewell S, Blanco P, Murphy MF. Different doses of prophylactic platelet transfusion for preventing bleeding in people with haematological disorders after myelosuppressive chemotherapy or stem cell transplantation. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015 Oct 27;10(10):CD010984.
24. Estcourt LJ, Birchall J, Allard S, Bassey SJ, Hersey P, Kerr JP, et al. Guidelines for the use of platelet transfusions. *Br J Haematol*. 2017 Feb;176(3):365-94.
25. Green L, Bolton-Maggs P, Beattie C, Cardigan R, Kallis Y, Stanworth SJ, et al. British Society of Haematology Guidelines on the spectrum of fresh frozen plasma and cryoprecipitate products: their handling and use in various patient groups in the absence of major bleeding. *Br J Haematol*. 2018 Apr;181(1):54-67.

Uso óptimo de los hemoderivados plasmáticos

Cristina Arbona Castaño

Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana

› Introducción

Los derivados plasmáticos son productos medicinales procedentes del fraccionamiento industrial del plasma humano que ha sido separado desde la sangre total o directamente mediante aféresis.

En España apenas cubrimos la mitad del consumo de inmunoglobulinas intravenosas (Ig i.v.) y menos de las dos terceras partes de la albúmina con el plasma procedente de la donación de sangre total y aféresis, el resto es importado, fundamentalmente desde los EE. UU. Dicho plasma importado, aunque cumple las mismas especificaciones de seguridad, procede de donantes remunerados. Este claro déficit de abastecimiento nos coloca claramente en una situación precaria y nos deja expuestos a un déficit de suministro ante posibles situaciones: incremento del consumo mundial, políticas comerciales de los países productores o de las grandes empresas fraccionadoras o pandemias o epidemias que afecten a los donantes. Por esto, se ha llegado a considerar el plasma como un recurso estratégico y, como tal, es necesario que cada país establezca los programas necesarios para llegar a la autosuficiencia.

Existen varias vías para poder paliar esta situación, la primera definir un plan nacional o local de obtención de plasma que incremente de forma significativa los litros de plasma obtenidos y posteriormente fraccionados. Este incremento en la obtención de plasma debe basarse en la donación de aféresis: la donación de sangre total en los últimos años ha disminuido como consecuencia de la aplicación de políticas de uso óptimo y *patient blood management* (PBM), por lo que el plasma de recuperación ha llegado al límite. Pero, aunque esto se ponga en marcha, es necesario también definir cuál es la demanda real de cada proteína para poder asegurar la cobertura adecuada.

Durante los años setenta, la definición de autosuficiencia en derivados plasmáticos se basaba en el consumo de albúmina; con la estabilización de su consumo en los ochenta, fue sustituida por el factor VIII. La epidemia de sida, que afectó de manera significativa a la población con hemofilia, y el desarrollo posterior del factor recombinante modificaron la definición a las Ig. Actualmente, todos los consumos están cambiando. Es necesario definir cuáles son las indicaciones con suficiente evidencia científica de eficacia terapéutica con cada uno de estos 3 hemoderivados, los posibles sustitutos beneficiosos para cada una esas patologías y precisar cuál es su posible proyección de consumo futuro para poder establecer estrategias que sean viables económicamente, optimizándose los recursos y manteniendo las condiciones más seguras de donación que proclama la Organización Mundial de la Salud (OMS), mediante la donación voluntaria y no remunerada. Dada su disponibilidad limitada, a la que debemos añadir su alto coste, se hace esencial especificar recomendaciones para su uso apropiado, bien como productos de primera elección, cuando así se indique, o como alternativa a otras estrategias terapéuticas, para poder asegurar la cobertura adecuada. A continuación, repasamos los 3 principales derivados plasmáticos.

› Inmunoglobulinas inespecíficas o polivalentes

Constituyen hoy en día la mayor demanda y, por lo tanto, la que marca el grado de autosuficiencia. Los datos disponibles hasta ahora demuestran que la demanda de Ig seguirá aumentando como consecuencia de su utilización para nuevas indicaciones, pero también por los mercados emergentes.

Los datos publicados por el National Health Service (NHS) británico destacan un incremento de consumo

anual del 10%, similar a otros países de la Unión Europea (UE), y que las indicaciones neurológicas lideran actualmente el consumo de Ig i.v. en un 45%, seguidas de las inmunodeficiencias tanto primarias, con un 35%, como secundarias de origen oncohematológico, con un 9% de consumo global.

En relación con las indicaciones, se reconocen 2 grandes grupos: las inmunodeficiencias humanas primarias (PID) o secundarias, y las indicaciones en el entorno inmunomodulador, basadas en sus principios efectores: capacidad para combatir infecciones, efecto antiinflamatorio y modulador de la respuesta inmune. Para las primeras y de forma global, el mayor conocimiento fisiopatológico y el desarrollo de métodos diagnósticos más precisos han incrementado el número de pacientes que se pueden beneficiar de su uso; en estos, las Ig administradas actúan con efecto de reposición y con indicación prioritaria de profilaxis. Para las segundas, podemos encontrar patologías en las que las Ig tienen indicaciones aprobadas con un nivel elevado de evidencia sobre su efecto positivo en la enfermedad, en algunas pocas para las que no existe alternativa de tratamiento, aunque en la mayoría su uso se considera como de segunda opción terapéutica. Es necesario establecer por ello prioridades de uso en caso de déficit de este hemoderivado: las condiciones que requieren prioridad absoluta incluyen la inmunodeficiencia primaria de origen humoral (PID), la enfermedad de Kawasaki, el síndrome de Guillain-Barré y la polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), la púrpura trombocitopénica inmune (PTI) infantil y otras enfermedades que ponen en peligro la vida y que otros medicamentos no pueden mejorar.

Existe también un grupo de enfermedades en las que su utilización está fuera de indicación o no se ha demostrado todavía evidencia, tanto dentro del entorno inmunomodulador como en la reposición en las inmunodeficiencias secundarias. Este grupo es en el que, de forma mucho más evidente, se ha disparado su utilización. Actualmente, es difícil estimar en cuántas de estas condiciones los ensayos con Ig realmente llegarán a buen término (dermatomiositis, aborto espontáneo recurrente, mielopatía asociada al virus de la inmunodeficiencia humana -VIH-, etc.), ya que el mecanismo subyacente de acción de la Ig en cualquier trastorno inmunomodulador todavía es poco conocido y no hay que olvidar que la eficacia y también los efectos secundarios de las Ig pueden diferir

de un producto a otro e incluso de un lote a otro.

No solo es importante definir las indicaciones y establecer prioridades de uso de las Ig, sobre todo en tiempos de déficit del producto, también se hace necesaria una revisión periódica de las mismas, ya que la evidencia clínica de la eficacia o la prioridad cambia con el tiempo para muchas de ellas. Otro dato a tener en cuenta es que es importante establecer las dosis óptimas de tratamiento para cada una de las indicaciones y, yendo más lejos, establecer la "dosis clínicamente efectiva" para cada paciente, que sobre todo en las inmunodeficiencias primarias debe ajustarse a la eficacia efectiva. Se estima que cerca de un 50% de estos pacientes no está correctamente tratado.

› Albúmina

La albúmina humana es la proteína más abundante en el plasma y, aunque multifuncional, destacan 2 funciones principales: reguladora del volumen plasmático y del balance con los fluidos tisulares mediante su efecto oncótico, es decir, es el expansor fisiológico del plasma, y además es una molécula transportadora (iones, ácidos grasos, bilirrubina, hormonas y muchos fármacos). De estas funciones se derivan sus principales aplicaciones clínicas:

- Hipovolemia: en ciertas condiciones agudas (*shock* hipovolémico, cirugía mayor, cirugía cardiaca, quemaduras graves, etc.) en las que se hace necesario expandir el volumen y mantener la circulación, la administración de albúmina es indicación secundaria cuando ha fallado el tratamiento primario (soluciones cristaloides/coloides) o existe contraindicación para su uso. Revisaremos las evidencias actuales en cada una de estas circunstancias. Una indicación claramente establecida es como líquido de sustitución en los recambios plasmáticos de más de 20 mL/kg.

- Hipoalbuminemia crónica. Existe una gran controversia en el uso de albúmina en la cirrosis hepática grave, aunque cierto grado de evidencia permite su uso en 3 condiciones: paracentesis de gran volumen como prevención de los trastornos hemodinámicos posparacentesis, el síndrome hepatorenal y la peritonitis espontánea. Otras 2 circunstancias crónicas, el síndrome nefrótico con edema pulmonar y fallo renal y la malnutrición grave con diarrea que no responde al tratamiento, son subsidiarias de tratamiento con albúmina.

Al igual que las Ig, el consumo de albúmina se ha incrementado a un ritmo del 10% anual. Las razones fundamentales son también similares, la aparición de nuevas indicaciones terapéuticas sin el soporte de evidencia científica de calidad e, incluso, el uso en aplicaciones no médicas.

› Factores de la coagulación (FVIII y FIX)

Los factores de la coagulación tienen un papel claro en el tratamiento de los pacientes con hemofilia A y B, y en ciertos casos de la enfermedad de von Willebrand. Sin embargo, el tratamiento de la hemofilia está en continuo cambio en los últimos años. La aparición de nuevas opciones terapéuticas (factores con vida media alargada, terapias con nanofactores e incluso la terapia génica) puede revolucionar el tratamiento de esta enfermedad. Sin embargo, hay que recordar que, según la Federación Mundial de Hemofilia, de los 400.000 hemofílicos que se estima existen en el mundo (3.000 en España), no más de una cuarta parte están correctamente tratados y ello es debido fundamentalmente al elevado coste del tratamiento y/o la disponibilidad del mismo, hablando del tratamiento básico con factores de la coagulación bien recombinantes o plasmáticos.

› Conclusiones

Actualmente, todos los consumos están cambiando. Es necesario definir cuáles son las indicaciones ac-

tuales de tratamiento con estos 3 hemoderivados, sus posibles sustitutos para cada una de las patologías y definir cuál es su posible proyección de consumo futuro para poder establecer estrategias que sean viables económicamente, optimizándose los recursos y manteniendo las condiciones más seguras de donación que proclama la OMS mediante la donación voluntaria y no remunerada.

› Bibliografía

- Bernardi M, Angeli P, Claria J, Moreau R, Jalan R, et al. Albumin in decompensated cirrhosis: new concepts and perspectives. *Gut*. 2020 Jun;69(6):1127-38.
- Carrock WA, Kerr J, Behr-Gross ME. European consensus proposal for immunoglobulin therapies. *Eur J Immunol*. 2014;44:2207-14.
- European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines for the management of patients with decompensated cirrhosis. *J Hepatol*. 2018;69:406-60.
- Farrugia A, Grazzini G, Quinti I, Candura F, Profili S, Liunbruno GM. The growing importance of achieving national self-sufficiency in immunoglobulin in Italy. The emergence of a national imperative. *Blood Transfus*. 2019;17:449-58.
- Giangrande PLF, Peyvandi F, O'Mahony B, Behr-Gross ME, Hilger A, Schramm W, Mannucci PM, Kreuth IV. European consensus proposals for treatment of haemophilia with coagulation factor concentrates. *Haemophilia*. 2017 May;23(3):370-5.
- Quinti I, Pesce AM, Bonanni L, Rubino C, Pulvirenti F, Milito C. Clinical use of polyvalent immunoglobulins. *Blood Transfus*. 2013;11 Suppl 4:s33-9.
- Strengers P. Plasma is a strategic resource. *Transfusion*. 2016;56:3133-7.

CLUB ESPAÑOL DE CITOLOGÍA HEMATOLÓGICA (CECH). CASOS CLÍNICOS CITOLÓGICOS

Coordinadores:

Dra. Rosario Morales Camacho. Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla

Dr. Francisco Ortuño Giner. Hospital Universitario Morales Meseguer. Murcia

Mujer de 59 años con retinosis pigmentaria y pancitopenia. Un diagnóstico no muy acertado...

Sandra Castaño-Díez¹, Carmen Martínez Muñoz¹, Ana Matas², José Milisenda², Mònica López-Guerra³, María Rozman³

¹ Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Clínic de Barcelona;

² Servicio de Medicina Interna. Departamento de Trastornos Metabólicos y Musculares. Hospital Clínic de Barcelona;

³ Unidad de Hematopatología. Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Clínic de Barcelona

› Motivo de consulta

Presentamos el caso de una mujer de mediana edad diagnosticada de síndrome mielodisplásico (SMD) y remitida para trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

› Historia clínica

Se trata de una mujer de 59 años de edad, natural de Barcelona, residente en Santo Domingo. Como antecedentes patológicos refería haber sido diagnosticada a los 15 años de retinosis pigmentaria, por cuya causa presentaba un déficit visual que le condicionaba una dependencia parcial. Asimismo, padecía una anemia megaloblástica crónica por supuesto déficit de vitamina B₁₂, para la cual recibía suplementos semanales de esta vitamina por vía oral, con aparente buen control.

La enfermedad actual se inicia un año antes, cuando a los 58 años sufrió un cuadro de dengue hemorrágico en Santo Domingo, durante el cual presentó una pancitopenia severa que se mantuvo una vez superado el episodio agudo. En aquel momento se practicó un aspirado de médula ósea que se informaba como hiper celular, con eritroblastos megaloblásticos, serie granulopoyética desviada a la izquierda, con megaloblastosis, gigantismo y algunos elementos hipogranulados, y serie megacariocítica muy disminuida con megacariocitos de tamaño pequeño, de núcleo hipo/monolobulado o con núcleos desconectados; el recuento de blastos era del 5%. También se le practicó una biopsia de médula ósea en la que se describía una reducción relativa de las series roja y megacariocítica, la presencia de una población blástica mie-

loide morfológicamente superior al 10% y no se evidenciaba mielofibrosis. A la luz de estos resultados fue diagnosticada de un SMD con exceso de blastos de tipo 1. Con este diagnóstico recibió tratamiento con eritropoyetina y análogos de la trombopoyetina, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y danazol, sin obtener respuesta y presentando un estado de dependencia transfusional semanal tanto de hematíes como de plaquetas. Por ello, fue derivada a España para la realización de un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

› Exploración física

En la consulta pretrasplante destacaba una importante fragilidad general, una severa limitación visual y una aparente mayor edad que la que correspondería a la cronológica. El resto de la exploración física no mostró alteraciones significativas.

› Pruebas complementarias

El hemograma constató una pancitopenia con hemoglobina (Hb) de 94 g/L, un volumen corpuscular medio (VCM) de 92,6 fL, cifras de leucocitos de $1,3 \times 10^9/L$ (neutrófilos 37%, linfocitos 62%, monocitos 0%, eosinófilos 1%, basófilos 0%) y de plaquetas de $34 \times 10^9/L$. La bioquímica, incluyendo el perfil renal y el hepático, fue normal; la cifra de LDH era de 184 U/L (N < 234), la vitamina B₁₂ de 627 pg/mL (N > 300), el ácido fólico de 24 ng/mL (N > 5) y la ferritina de 1.715 ng/mL (N 15-200).

Durante el periodo en el que se efectuaban las pruebas pretrasplante se decidió administrar trata-

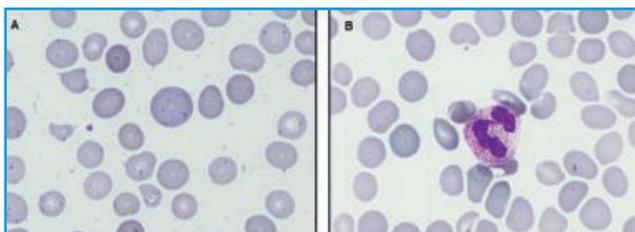


Figura 1. Frotis de sangre periférica (May-Grünwald-Giemsa $\times 1.000$). A: macrocitos, megalocitos y algún ovalocito. B: neutrófilo hipersegmentado.

miento hipometilante con azacitidina, del cual recibió 4 ciclos sin objetivarse mejoría. Al finalizar dicha terapia, se constataba una pancitopenia grave en el hemograma, con una Hb de 83 g/L, un VCM de 98,6 fL, una cifra de leucocitos de $1,76 \times 10^9/L$ (neutrófilos 21%, linfocitos 66%, monocitos 11%, eosinófilos 1%, basófilos 1%) y un recuento de plaquetas de $32 \times 10^9/L$.

Ante estos hallazgos, se realizó un aspirado de médula ósea (Figuras 1 y 2) que dio lugar a los siguientes hallazgos: la celularidad estaba aumentada, con disminución de la grasa y presencia de las 3 series hematopoyéticas. La serie roja constituía el 34% del total celular y presentaba disminución de las formas más maduras, así como una marcada megaloblastosis, con abundantes elementos gigantes, eritroblastos con cromatinas nucleares perlas y severo asincronismo madurativo núcleo-citoplasmático. Los megacariocitos eran abundantes y algunos tenían el núcleo hipersegmentado, si bien se observaba un 20% de elementos de tamaño pequeño. La serie blanca representaba el 50% de la celularidad y morfológicamente mostraba macrocitosis con bandas y metamielocitos gigantes e hipogranulados. El recuento de blastos fue del 4%.

En el estudio citoquímico mediante la tinción de Perls (Figura 3) se constató un aumento de los depósitos macrofágicos de hierro medular y un recuento de sideroblastos de 84%, sin observarse sideroblastos en anillo. El score de Ogata para el despistaje fenotípico de SMD por citometría de flujo fue de 2 puntos. El estudio citogenético de médula ósea mostró un cariotipo normal (46,XX[20]). Se practicó también un estudio de secuenciación masiva mediante *next generation sequencing* (NGS) (panel mieloide, OncoPrint[®] Myeloid Research Assay) objetivándose una mutación de *DNMT3A* (C.2391C>A p.Asn797Lys) con una frecuencia alélica del 5,5%.

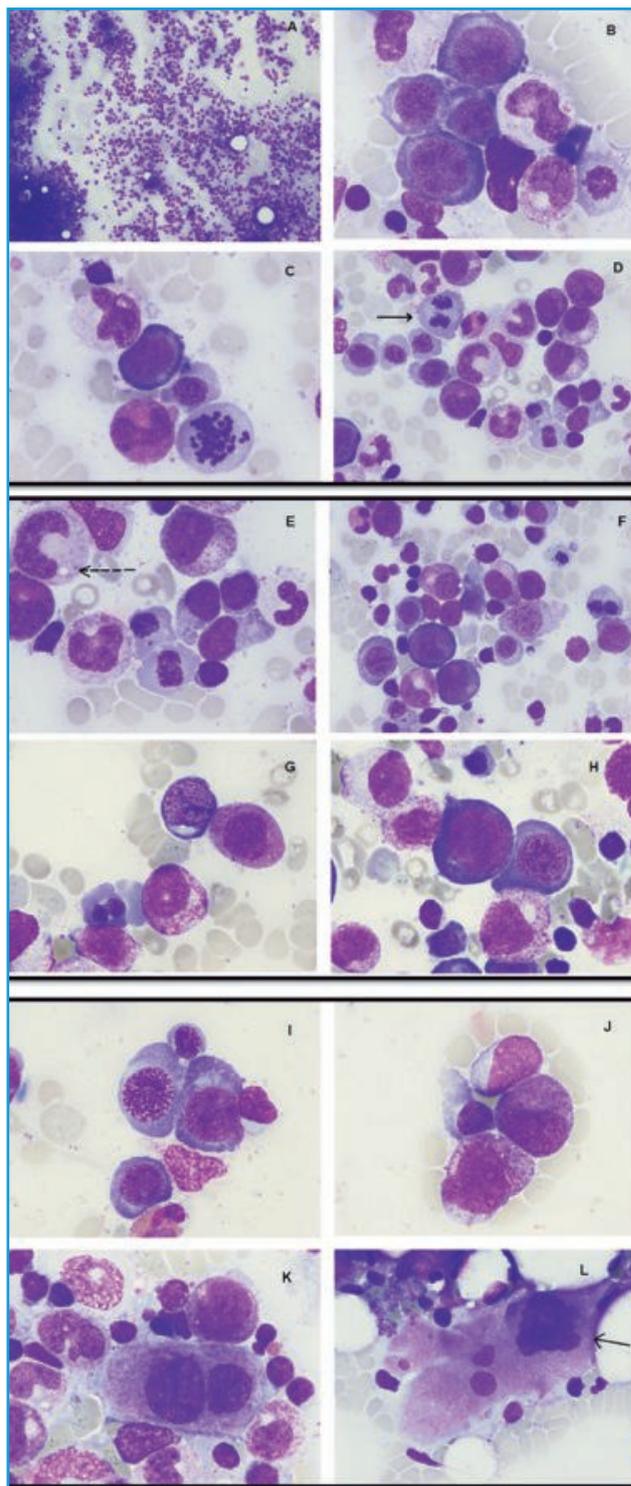


Figura 2. Aspirado de médula ósea (May-Grünwald-Giemsa). A: hipercelular; B-K: marcada megaloblastosis en serie roja y granulocítica, figuras de mitosis (flecha), bandas/metamielocitos gigantes degranulados (flecha discontinua); D: megacariocito de talla grande e hiperlobulado.

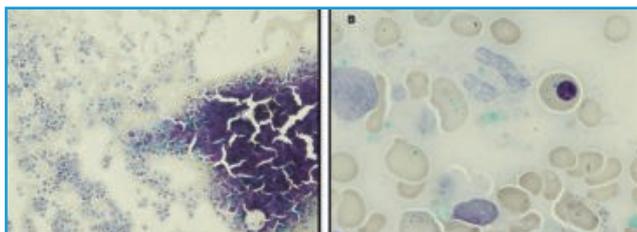


Figura 3. Tinción de Perls con aumento del hierro macrofágico y abundantes sideroblastos.

Ante unos hallazgos morfológicos tan llamativos, característicos de una anemia megaloblástica, y en ausencia de datos patognomónicos de SMD, se replanteó el diagnóstico. En resumen, se trataba de una paciente con retinosis pigmentaria desde la infancia, aparente déficit crónico de vitamina B₁₂ y marcada megaloblastosis medular. Como alternativa diagnóstica, se planteó entonces la posibilidad de un cuadro sindrómico congénito de origen metabólico. Para su confirmación, se realizó un estudio analítico específico, que mostró una homocisteína basal en plasma elevada de 33 $\mu\text{mol/L}$ ($N < 15$), así como una elevación de ácido metilmalónico en la orina de 18 mmol/mol ($N < 8$). Estos hallazgos eran compatibles con una alteración del metabolismo de la vitamina B₁₂. Se procedió entonces a un análisis genético dirigido (Nextera® DNA Exome Kit, Illumina), que confirmó la presencia de una mutación en el gen *TCN2* (c.[871C>T]) de la transcobalamina.

A la luz de estos resultados, se reinterrogó a la familia de forma dirigida. Los familiares de primera línea se mostraron reacios a facilitar información, pues al parecer consideraban un descrédito una enfermedad congénita. Finalmente, un sobrino confirmó que la paciente tenía antecedentes de consanguinidad entre sus progenitores (padre y madre eran primos de quinta generación) y que tuvo una hermana que falleció a los 3 meses de vida a causa de las complicaciones derivadas del tratamiento de una supuesta leucemia. Además, este pariente, residente en Santo Domingo, nos facilitó 2 trabajos científicos publicados en 1977^(1,2), que describían a nuestra enferma y donde constaba que había sido controlada en nuestro centro durante su infancia y adolescencia. En estas publicaciones se refería que la enferma presentaba crisis megaloblásticas desde los 11 meses de edad, desencadenadas en diversas situaciones (infecciones, menarquia...) y que eran tratadas mediante

complejos multivitamínicos con resolución posterior. Por tanto, interpretamos que la infección por dengue podría haber sido el desencadenante de una nueva crisis megaloblástica. Estos datos nos permitieron cerrar el círculo completo de la integración diagnóstica.

› Diagnóstico

Anemia megaloblástica por acidemia metilmalónica y homocistinuria por alteración del metabolismo de la transcobalamina con mutación del gen *TCN2*.

› Tratamiento y evolución

En cuanto se confirmó el diagnóstico de anemia megaloblástica por acidemia metilmalónica y homocistinuria, y a la espera de los resultados de los estudios genéticos, se inició tratamiento con hidroxocobalamina intramuscular a dosis de 1 mg al día. Se asistió a una resolución progresiva de la pancitopenia que permitió poder espaciar la terapia a cada 3 semanas.

› Discusión

El déficit de vitamina B₁₂ es fácilmente tratable, pero frecuentemente poco reconocido. Sus síntomas clínicos pueden ser sutiles y analíticamente puede cursar con anomalías hematológicas variables, desde un aumento aislado en el volumen corpuscular medio de los hematíes en pacientes asintomáticos, pasando por una anemia megaloblástica en casos más floridos o, en el caso más extremo, producir pancitopenia o anemia hemolítica. Los hallazgos morfológicos característicos en el frotis de sangre periférica incluyen macrocitos de la serie roja, neutrófilos gigantes con el núcleo hipersegmentado (pleocariocitos) y plaquetas gigantes. La médula ósea suele ser hiper celular, con aumento de la serie roja y marcada diseritropoyesis, consistente fundamentalmente en megaloblastosis (asincronismo madurativo nucleocitoplasmático de los eritroblastos, con los núcleos inmaduros y citoplasma bien hemoglobinizado). Todo ello se acompaña de anomalías en la serie granulocítica, como metamielocitos y bandas gigantes y desgranulados, y en la megacariocítica, con elemen-

tos de talla grande y núcleo hiperlobulado^(3,4). Estos hallazgos pueden dar lugar a un diagnóstico erróneo de síndrome mielodisplásico o, incluso, de leucemia aguda (por el incremento en los proeritroblastos)⁽⁵⁾. Esta circunstancia había ocurrido probablemente con la hermana de nuestra paciente, que había sido erróneamente diagnosticada de leucemia aguda y tratada como tal^(1,2).

En aquellos casos en que el paciente presenta una historia clínica compatible y unos niveles de vitamina B₁₂ inferiores a 200 pg/mL no es necesario ningún estudio adicional para el diagnóstico de anemia megaloblástica por déficit de B₁₂. Sin embargo, en los pacientes con niveles de esta vitamina de entre 200 y 300 pg/mL, es necesario analizar el ácido metilmalónico y/o la homocisteína en suero para descartar un trastorno congénito de la metilación de la cobalamina (cbl) como el que presentaba nuestra enferma. La biopsia de la médula ósea no es necesaria para el diagnóstico, si bien en muchos pacientes se practica en el contexto del estudio de una pancitopenia severa⁽⁵⁾. El diagnóstico diferencial de una anemia megaloblástica por déficit de vitamina B₁₂ debe incluir no solo otras formas de anemia de origen carencial, sino también alteraciones constitucionales en las vías de metabolización de esta vitamina.

La anemia megaloblástica por acidemia metilmalónica con homocistinuria forma parte de un grupo de entidades hereditarias infrecuentes⁽⁶⁾. Hasta el momento, la patogenia de esta enfermedad no es conocida con certeza, pero existen múltiples hipótesis. Estas apuntan al daño en la capacidad de metilación celular, la toxicidad por metabolitos acumulados, la existencia de estrés oxidativo y la posible alteración de las funciones proteicas no enzimáticas. Existen determinados trastornos genéticos en la vía de transporte y procesamiento intracelular de cbl que causan un déficit en la síntesis no solo de metilcobalamina, sino también de adenosilcobalamina, el cofactor de metilmalonil-CoA mutasa, siendo las más conocidas las que afectan a los genes *MMACHC*, *MMADHC*, *LMBRD1*, *ABCD4*, *HCFC1* y *TCN2*. Las mutaciones en estos genes representan los diferentes tipos de trastorno, que se conocen como cblC, cblD, cblF, cblJ y cblX, respectivamente⁽⁶⁾. La más frecuente y grave de ellas es la alteración en el gen *MMACHC*, localizado en el cromosoma 1p34.12. Las mutaciones en el gen de la transcobalamina (*TCN2*) son más raras y conducen a una entidad de

herencia autosómica recesiva⁽⁷⁾. La transcobalamina es una proteína transportadora de la vitamina B₁₂ que facilita su endocitosis a la célula, permitiendo que actúe como cofactor de diversas reacciones celulares (transformación de homocisteína en metionina y de metilmalónico en succinil-colina).

La presentación clínica de este tipo de enfermedades es muy variable, siendo sus principales manifestaciones clínicas de 2 tipos, fundamentalmente: afectación del sistema nervioso tanto central como periférico, en forma de encefalopatía aguda severa y/o déficit visual^(8,9); y trastorno de la médula ósea en forma de anemia megaloblástica. El diagnóstico diferencial debe establecerse con cualquier causa que disminuya la disponibilidad de los factores madurativos como la vitamina B₁₂ (déficit nutricional como en las dietas veganas, malabsorción intestinal, alteración en el metabolismo intracelular) y el ácido fólico (déficit en la dieta, absorción inadecuada, fármacos), y que curse con clínica hematológica y neurológica (déficit severo de hierro, enfermedad infecciosa, leucemia, síndrome mieloproliferativo, SMD). La confirmación del diagnóstico requiere un estudio bioquímico que muestre elevación de la homocisteína plasmática (por encima de 15 μmol/L) y del ácido metilmalónico en la orina. El hallazgo de una de las múltiples alteraciones genéticas características es de gran utilidad para confirmar el diagnóstico etiológico. Una vez establecida la sospecha diagnóstica, debe iniciarse de manera inmediata el tratamiento con hidroxicobalamina parenteral, ya que se consigue así una rápida resolución de la clínica hematológica (no de la neurológica).

La paciente discutida en este caso fue derivada a nuestro centro con el diagnóstico de un SMD. Sin embargo, la citología medular tan característica de anemia megaloblástica nos llevó a plantear una alternativa diagnóstica. En cuanto a la demostración de clonalidad en la hematopoyesis, el cariotipo resultó normal y, si bien la mutación de *DNMT3A* podía favorecer el diagnóstico de SMD, su baja carga alélica sugería un bajo potencial patogénico. La historia clínica con retinosis pigmentaria desde la infancia y anemia megaloblástica de larga evolución, junto a unos niveles de vitamina B₁₂ normales, sugerían un cuadro sindrómico constitucional, pudiéndose demostrar finalmente una alteración del metabolismo de la cbl (mutación del gen de la transcobalamina 2).

› Para recordar

- La citología medular y la historia clínica son los pilares fundamentales en que debe basarse el abordaje diagnóstico de una pancitopenia.
- Displasia morfológica no es sinónimo de SMD.
- La anemia megaloblástica presenta unas alteraciones morfológicas características y puede ser de etiología adquirida o constitucional.
- La mutación del gen de la transcobalamina 2 (*TCN2*) provoca un trastorno hereditario infrecuente que forma parte de las alteraciones congénitas del metabolismo de la cbl que dan lugar a anemia megaloblástica por acidemia metilmalónica y homocistinuria.

› Bibliografía

1. Mañe JV, Vives-Corrons JL, Rozman C. Congenital folate-dependent megaloblastic anaemia of unknown aetiology. *Lancet*. 1977 Jan 29;1(8005):262-3.
2. Vives-Corrons JL, Vives Mañe J, Rozman C. Congenital folate dependent megaloblastic anaemia. Clinical and biological study of a new form of congenital megaloblastic (author's transl). *Sangre (Barc)*. 1978;23(2):163-72.
3. Florensa L, Arenillas L, Calvo X, Pérez-Vila E, Montesdeoca S, Ferrer A, Woessner S. The importance of adequate recognition of normal and dysplastic myelopoiesis for the diagnosis of myelodysplastic syndromes. *Histol Histopathol*. 2019;34:857-73.
4. Woessner S, Florensa L. La citología óptica en el diagnóstico hematológico. 5.ª ed. Madrid: Acción Médica y FEHH; 2006.
5. Konda M, Godbole A, Pandey S, Sasapu A. Vitamin B12 deficiency mimicking acute leukemia. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*. 2019;32(4):589-92.
6. Huemer M, Diodato D, Schwahn B, Schiff M, Bandeira A, Benoist JF, et al. Guidelines for diagnosis and management of the cobalamin-related remethylation disorders cblC, cblD, cblE, cblF, cblG, cblJ and MTHFR deficiency. *J Inherit Metab Dis*. 2017 Jan;40(1):21-48.
7. Trakadis YJ. Update on transcobalamin deficiency: clinical presentation, treatment and outcome. *J Inherit Metab Dis*. 2014;37:461-73.
8. Carrillo-Carrasco N, Venditti CP. Combined methylmalonic acidemia and homocystinuria, cblC type. II. Complications, pathophysiology, and outcomes. *J Inherit Metab Dis*. 2012;35:103-14.
9. Weisfeld-Adams JD, Bender HA, Miley-Åkerstedt A, Frempong T, Schragger NL, Patel K, et al. Neurologic and neurodevelopmental phenotypes in young children with early-treated combined methylmalonic acidemia and homocystinuria, cobalamin C type. *Mol Genet Metab*. 2013;110:241-7.

Paciente con componente monoclonal IgM kappa, esplenomegalia y lesiones óseas Linfoma difuso de células grandes B *MYD88*mut en paciente con antecedente de macroglobulinemia de Waldenström

Ramón Díez-Feijoo¹, Leonor Arenillas^{1,6}, Xavier Calvo^{1,6}, Sara Montesdeoca^{1,6}, Marta Salido^{2,6}, Anna Puiggrós^{2,6}, Nieves García-Gisbert^{3,7}, Concepción Fernández^{3,7}, Ivonne Vázquez⁴, Eugènia Abella^{5,7}, Blanca Espinet^{2,6}, Lluís Colomo^{4,6}, Beatriz Bellosillo³, Ana Ferrer^{1,6}

¹ Laboratorio de Citología Hematológica. Servicio de Patología. Hospital del Mar. Barcelona; ² Laboratorio de Citogenética Molecular. Servicio de Patología. Hospital del Mar. Barcelona; ³ Laboratorio de Biología Molecular. Servicio de Patología. Hospital del Mar. Barcelona; ⁴ Servicio de Patología. Hospital del Mar. Barcelona; ⁵ Servicio de Hematología. Hospital del Mar. Barcelona; ⁶ Grup de Recerca Translacional en Neoplàsies Hematològiques (GRETNHE); ⁷ Grup de Recerca Clínica Aplicada en Neoplàsies Hematològiques

› Motivo de consulta

Se trata de un varón de 66 años que acude a urgencias por presentar disestesias mentonianas, fiebre de predominio vespertino, dolor en el hipocondrio izquierdo y sudoración nocturna de una semana de evolución.

› Antecedentes

Tres años y medio antes del cuadro actual, el paciente había sido remitido a las consultas de hematología por anemia de 106 g/L y componente monoclonal IgM kappa de 32 g/L detectados en una analítica realizada para el estudio de un cuadro de cefalea y acrocianosis. Dos semanas antes había presentado una infección diseminada por virus herpes varicela-zóster. La exploración física era normal. El hemograma mostró anemia normocítica normocrómica y la bioquímica resultó normal. La cuantificación de IgM fue de 43 g/L, con IgG e IgA normales. En la inmunofijación urinaria se detectó la presencia de cadenas ligeras kappa. El estudio de crioglobulinas y crioglobulinas fue negativo. La morfología de sangre periférica (SP) mostró la presencia de un 55% de linfocitos atípicos de aspecto maduro, tamaño heterogéneo, cromatina condensada, la mayoría con citoplasma moderadamente amplio, basófilo y algún linfoplasmocito (Figura 1). Se realizó un aspirado de médula ósea (MO) que mostró la presencia de un 39% de linfocitos (con áreas de hasta el 85%) de pequeño y mediano tamaño, núcleo regular y escaso citoplasma en la mayoría de los elementos, algún linfoplasmocito y un 5% de células plasmá-

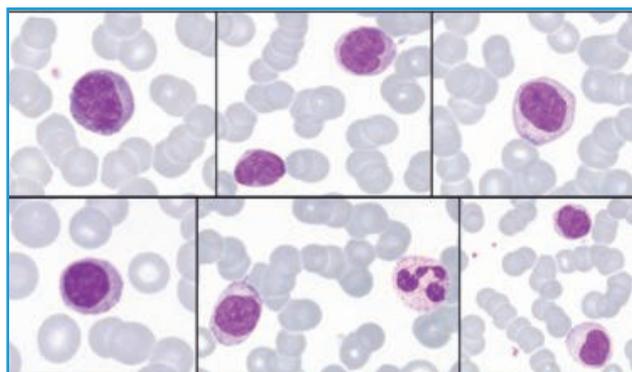


Figura 1. Morfología de sangre periférica. May-Grünwald Giemsa. Se observan linfocitos atípicos de aspecto maduro, tamaño heterogéneo, cromatina condensada, la mayoría con citoplasma moderadamente amplio, basófilo y algún linfoplasmocito.

ticas, así como abundantes mastocitos de morfología normal en las zonas de grumo (Figura 2).

El estudio inmunofenotípico de MO puso de manifiesto la presencia de linfocitos B de fenotipo anómalo (CD19+, CD22+, CD79b++, CD20++, FMC7-, CD5-, CD10-, CD23-, CD43-, CD11c-, CD25+) y expresión monotípica débil de cadena ligera de superficie kappa (20% de la celularidad medular) (Figura 3) junto con una población de células plasmáticas (1% de la totalidad celular) de fenotipo diferente al observado habitualmente en el mieloma múltiple, con positividad parcial de CD20 y expresión monotípica de cadenas ligeras kappa intracitoplasmáticas (Figura 4). En el inmunofenotipo de SP se observó una población linfocítica B con las mismas características observadas en la MO (30% de los leucocitos) y una segunda población,

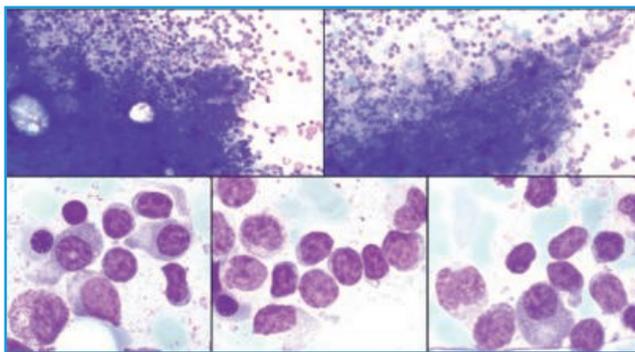


Figura 2. Aspirado de médula ósea. May-Grünwald Giemsa. Infiltración medular por un 39% de linfocitos (con áreas de hasta el 85%) de pequeño y mediano tamaño, núcleo regular y escaso citoplasma en la mayoría de los elementos. Algún linfoplasmocito y un 5% de células plasmáticas. Abundantes mastocitos de morfología normal en las zonas de grumo.

minoritaria (10% de los leucocitos), de mayor tamaño, expresión más intensa de CD19, CD20 y cadenas ligeras kappa, y positividad de FMC7 y CD11c (**Figura 5**).

El cariotipo tras cultivo de 72 horas en SP mostró pérdida del cromosoma Y en 15 metafases. El estudio molecular realizado en SP (reordenamientos completos e incompletos de IgH) resultó clonal y sugirió la existencia de más de una población linfoide B sin poder descartar que se tratara de una única población con reordenamiento bialélico (**Figura 6**).

Se detectó la mutación p.L265P de *MYD88* mediante RT-qPCR y mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) digital se cuantificó la carga alélica de dicha mutación que resultó del 24,72% (**Figura 7**). La biopsia de MO fue compatible con infiltración nodular e intersticial por linfoma linfoplasmocitoide.

El paciente fue diagnosticado de una macroglobulinemia de Waldenström (MW) sintomática (anemia e hiperviscosidad). La tomografía computarizada (TC) mostró una esplenomegalia de 14 cm y 2 adenopatías retroperitoneales en el límite superior de la normalidad, inespecíficas, así como signos de afectación por linfoma a nivel perirrenal/periuireteral proximal. Se efectuaron plasmaféresis con descenso de la IgM sérica a 22 g/L y desaparición de la cefalea, y se inició tratamiento con rituximab, ciclofosfamida y dexametasona (5 ciclos), y rituximab y bendamustina (3 ciclos), alcanzando una respuesta parcial con disminución del componente monoclonal en > 50% (12 g/L) y persistencia de infiltración linfoplasmocítica en la biopsia de MO. Posteriormente, el paciente se

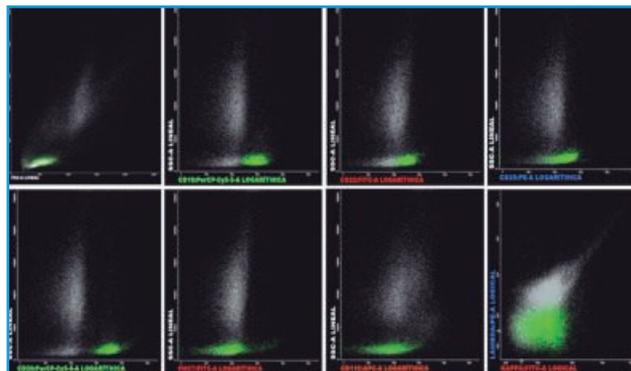


Figura 3. Estudio inmunofenotípico por citometría de flujo de médula ósea. Presencia de un 20% de linfocitos B de fenotipo anómalo: CD19+, CD22+, CD79b+ +, CD20+ +, FMC7-, CD5-, CD10-, CD23-, CD43-, CD11c-, CD25+, kappa+.

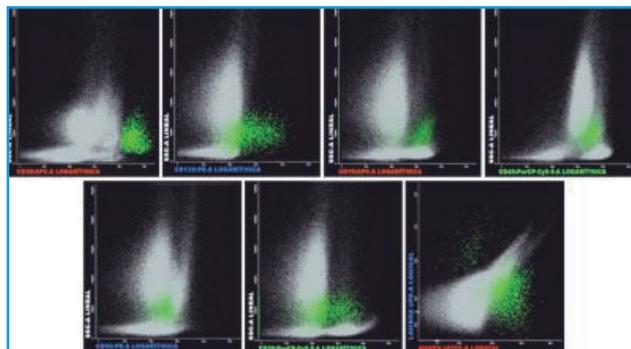


Figura 4. Estudio inmunofenotípico por citometría de flujo de médula ósea. Presencia de un 1% de células plasmáticas de fenotipo diferente al observado habitualmente en el mieloma múltiple, con positividad parcial de CD20, kappa+.

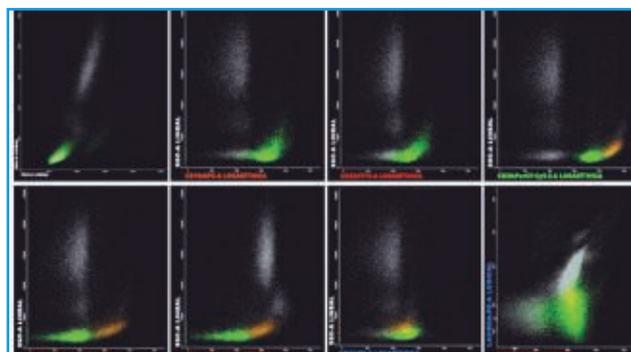


Figura 5. Estudio inmunofenotípico por citometría de flujo de sangre periférica. Presencia de un 30% linfocitos B con las mismas características observadas en la médula ósea (verde). Presencia de una segunda población constituida por un 10% de linfocitos B de mayor tamaño y fenotipo CD20+ +, FMC7+ +, CD11c+, kappa+ + (naranja).

mantuvo libre de progresión con estudio molecular en SP (reordenamiento completo e incompleto de IgH y

determinación de *MYD88* por RT-qPCR) repetidamente negativo. En diversos controles analíticos, se observó persistencia del componente monoclonal sérico IgM kappa (con valores que oscilaron entre 7 y 12 g/L) sin evidencia de componente monoclonal en la orina.

» Enfermedad actual

El paciente acudió por disestesias mentonianas, dolor en el hipocondrio izquierdo, fiebre de predominio vespertino y sudoración nocturna de una semana de evolución. En la exploración física, destacaba la presencia de adenopatías cervicales y axilares izquierdas de 2 cm, junto con leve esplenomegalia (2 cm por debajo del reborde costal).

» Exploraciones complementarias

En la analítica realizada a su ingreso, destacaba una anemia normocítica normocrómica (hemoglobina: 85 g/L) y un importante aumento de la LDH (901 UI/L). El componente monoclonal sérico fue el mínimo detectado hasta el momento en la evolución de la enfermedad (IgM kappa de 3,2 g/L). La morfología de SP mostró un 4% de células de aspecto linfóide, tamaño grande, cromatina en ocasiones poco condensada, algunas con uno o varios nucleolos visibles y citoplasma amplio y basófilo (Figura 8). En el estudio inmunofenotípico de SP se identificó una población linfóide B clonal (1,5% de los leucocitos) de tamaño grande y fenotipo anómalo diferente a las observadas al diagnóstico de la MW (CD45+++ , CD19+ , CD79b++ , CD20++ , CD22+ , FMC7+/++ , CD5+ , CD10- , BCL-2+++ , CD11c- , CD25-/+ , CD38+ , lambda+), sin ninguna evidencia de las poblaciones B kappa anómalas observadas previamente (Figura 9). En el estudio molecular en SP se observó clonalidad de IgH, con un tamaño de los amplicones no coincidente con los observados en la muestra de SP del diagnóstico, y presencia de la mutación p.L265P de *MYD88* con una carga alélica del 11,6%. El estudio del líquido cefalorraquídeo no mostró evidencia morfológica ni inmunofenotípica de infiltración del sistema nervioso central.

Se realizó una tomografía por emisión de positrones (PET)-TC en la que destacaba una voluminosa esplenomegalia intensamente hipermetabólica (*maximum standardized uptake value* -SUVmax- de 9,7 g/mL),

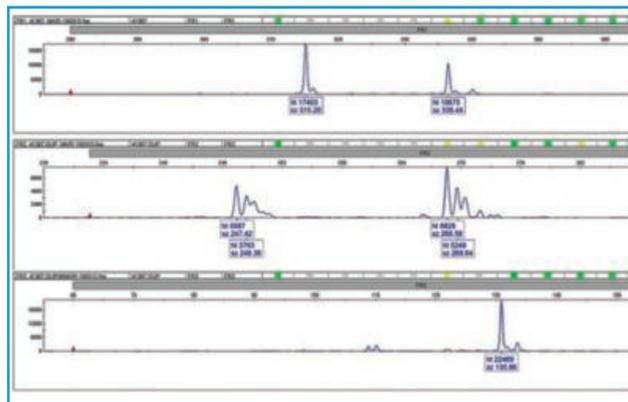


Figura 6. Estudio del reordenamiento de IgH realizado en sangre periférica. Resultado clonal que sugiere la existencia de más de una población linfóide B sin poder descartar que se trate de una única población con reordenamiento bialélico.

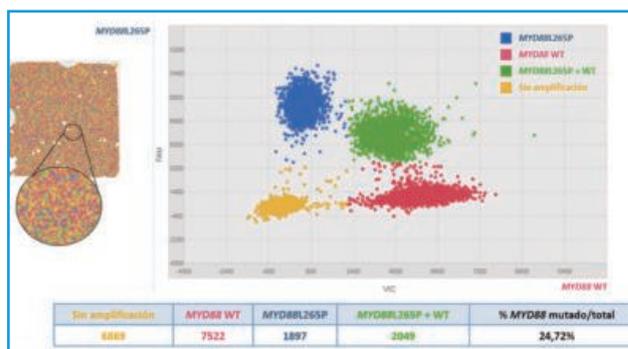


Figura 7. Cuantificación de la carga alélica de la mutación p.L265P de *MYD88* en sangre periférica mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) digital. Se obtuvo una carga alélica al diagnóstico del 24,72%.

con distribución marcadamente heterogénea de la fluorodesoxiglucosa (FDG) y presencia de algunas áreas hipodensas sugestivas de infartos esplénicos, 2 lesiones sacras, una derecha (SUVmax de 7,7 g/mL) y una izquierda (SUVmax de 4,8 g/mL), así como afectación amigdalara izquierda (SUVmax de 9 g/mL) y ganglionar supra- e infradiaphragmática (SUVmax de 4,6 g/mL) (Figura 10).

La biopsia de una de las lesiones óseas sacras hipermetabólicas mostró la presencia de células grandes, atípicas, de núcleo vesiculoso, alguna con nucleolos, así como figuras de mitosis y apoptosis. El estudio inmunohistoquímico mostró que la población neoplásica expresaba marcadores de línea B, CD5, BCL6 y MYC; por el contrario, no se observó expresión de CD10 ni LMO2. El índice proliferativo, valorado con Ki-67, fue superior al 95%. No se observaron áreas de

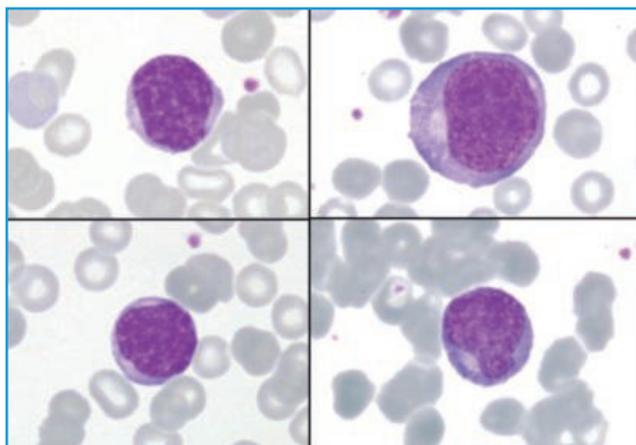


Figura 8. Morfología de sangre periférica. May-Grünwald Giemsa. Presencia de un 4% de células de aspecto linfoide, tamaño grande, cromatina en ocasiones poco condensada, algunas con uno o varios nucleolos visibles y citoplasma amplio y basófilo.

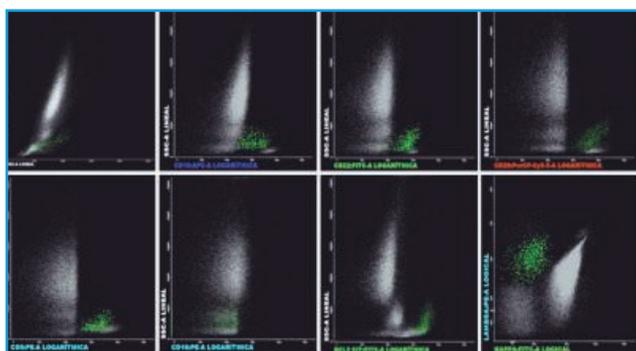


Figura 9. Estudio inmunofenotípico por citometría de flujo de sangre periférica. Presencia de un 1,5% de linfocitos B de tamaño grande y fenotipo anómalo, diferente al observado al diagnóstico de la macroglobulinemia de Waldenström: CD45+++ , CD19+ , CD79b++ , CD20++ , CD22+ , FMC7+/+ , CD5+ , CD10- , BCL-2+++ , CD11c- , CD25-/+ , CD38+ , lambda+.

linfoma de bajo grado residual (**Figura 11**). El estudio citogenético mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) mostró delección de *TP53*, reordenamiento *MYC-IGH*, la presencia de múltiples señales de *BCL2* y *BCL6* en ausencia de reordenamientos de estos 2 genes (hallazgo sin impacto diagnóstico o pronóstico conocido) (**Figura 12**). A nivel molecular, se detectó clonalidad de IgH (productos de PCR de tamaño coincidente con la SP actual pero no con los observados al diagnóstico) (**Figura 13**) y presencia de la mutación p.L265P de *MYD88* con una carga alélica del 19,78%.

Con el diagnóstico de linfoma difuso de células grandes B (LDCG-B) CD5+ con reordenamiento de *MYC*,

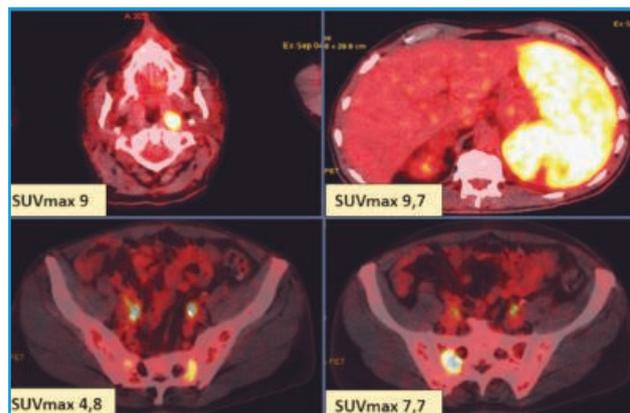


Figura 10. Tomografía por emisión de positrones (PET)-tomografía computarizada (TC). Se observa una esplenomegalia intensamente hipermetabólica con distribución heterogénea de la fluorodesoxiglucosa (FDG) y presencia de algunas áreas hipodensas sugestivas de infartos esplénicos. Dos lesiones sacras. Afectación amigdalilar izquierda y ganglionar supra- e infradiafragmática.

delección de *TP53* y mutación de *MYD88* (p.L265P), el paciente inició tratamiento quimioterápico según el esquema R-CHOP, del que hasta el momento ha recibido 3 ciclos.

➤ Discusión

La MW es una neoplasia de células B maduras caracterizada por la presencia de un componente monoclonal sérico IgM y de infiltración medular por linfocitos, linfoplasmocitos y células plasmáticas. Su curso clínico es variable y con frecuencia los pacientes están asintomáticos al diagnóstico. La sintomatología se relaciona con el grado de infiltración tumoral y/o con la actividad del componente monoclonal IgM (síndrome de hiperviscosidad, neuropatía, crioglobulinemia, anemia hemolítica por crioglobulinas). Más del 90% de los pacientes con MW presentan la mutación p.L265P del gen *MYD88*. A pesar de los avances terapéuticos, la MW sigue siendo incurable y las recaídas son habituales. Por el contrario, la transformación histológica, principalmente a LDCG-B, es infrecuente (5-10%), por lo que existen pocos datos al respecto^(1,2). Asimismo, en la gran mayoría de los estudios realizados no se dispone de datos moleculares que confirmen que se trata realmente de neoplasias clonalmente relacionadas o, por el contrario, de linfomas *de novo* en pacientes con el antecedente de MW. Se ha sugerido que los pacientes con MW tratados con agentes

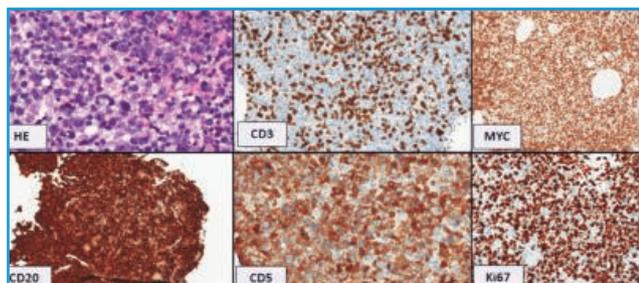


Figura 11. Biopsia de una lesión ósea sacra hipermetabólica derecha. Presencia de células grandes, atípicas, de núcleo vesiculoso, alguna con nucleolos, así como figuras de mitosis y apoptosis. El estudio inmunohistoquímico mostró que la población neoplásica expresaba marcadores de línea B, CD5, BCL6 y MYC. El índice proliferativo, valorado con Ki-67, fue superior al 95%. No se observaron áreas de linfoma de bajo grado residual.

alquilantes o análogos de las purinas presentan un mayor riesgo de transformación a linfoma agresivo^(1,3).

Al igual que en el resto de los linfomas agresivos ocurridos como transformación de linfomas B de bajo grado, la heterogeneidad anatomopatológica es habitual. Aunque el subtipo histológico más frecuente en la MW es el LDCG-B, se han descrito casos aislados asociados a virus de Epstein-Barr (VEB), linfomas T, linfomas anaplásicos de células grandes e incluso proliferaciones de células plasmáticas. En la mayoría de estos casos, los niveles de IgM sérica son inferiores en el momento de la transformación, en la mayoría de los pacientes por existir una respuesta al tratamiento administrado previamente para la MW y, en otros, por el fenómeno de desdiferenciación que experimenta la clona agresiva, que pierde la capacidad de secretar IgM⁽⁴⁾. En función de este dato y de la expresión de la misma cadena ligera en la MW y el LDCG-B, la aparición de un linfoma agresivo en los pacientes diagnosticados de MW ha sido descrita tradicionalmente como transformación y no como nueva hemopatía. No obstante, existen muy pocos estudios que hayan analizado la relación clonal existente entre ambos procesos a nivel molecular⁽¹⁻⁶⁾. En los casos de leucemia linfática crónica (LLC) transformada a LDCG-B (síndrome de Richter) sí existen evidencias al respecto. Estudios recientes han demostrado que los casos de transformación sin relación clonal entre la LLC y el LDCG-B presentan un mejor pronóstico que los clonalmente relacionados, debido a que los primeros presentan con menor frecuencia alteraciones genéticas de mal pronóstico (deleción de *TP53* y/o

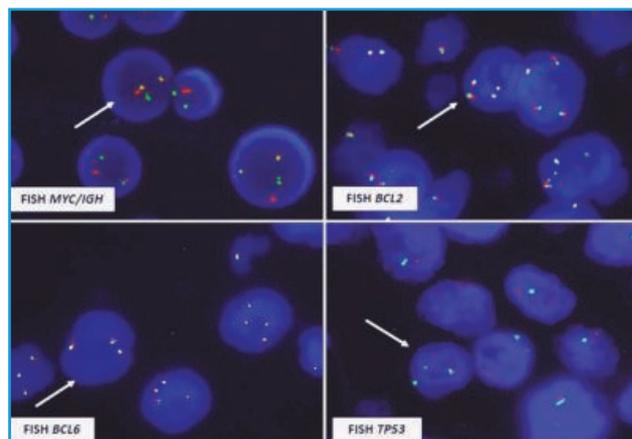


Figura 12. Estudio citogenético por técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en la biopsia de una lesión ósea sacra derecha. Se observa (marcado con flechas) reordenamiento MYC-IGH, la presencia de múltiples señales de BCL2 y BCL6 (pero ausencia de reordenamientos de estos 2 genes) y deleción de TP53.

reordenamiento de *MYC*). Este subgrupo de pacientes con transformaciones no clonalmente relacionadas muestran una biología y una supervivencia similares a las del LDCG-B *de novo*. Por ello, se tiende actualmente a considerar síndrome de Richter únicamente a los casos de linfoma agresivo clonalmente relacionados con la LLC⁽⁷⁾.

Los pacientes con MW que presentan una transformación histológica lo hacen, en general (84-100%), en forma de afectación extraganglionar, habitualmente de MO, hueso, bazo y sistema nervioso central^(1-3,5) y, con menor frecuencia, piel y testículo. Es destacable que las contrapartidas *de novo* de estas localizaciones (linfoma cerebral primario, LDCG-B de tipo piernas, LDCG-B testicular primario) presentan una elevada frecuencia de mutación de *MYD88* (entre el 59 y el 79%)^(8,9). En este sentido, la mutación de *MYD88* desempeña probablemente un papel fundamental en la patogénesis y el desarrollo de estas hemopatías en tales localizaciones. Aunque no existen series largas que lo demuestren, la mutación de *MYD88* está presente en los escasos casos de MW transformados a LDCG-B en que ha sido estudiada^(1,3); cabe suponer que dicha mutación desempeña un papel similar en la localización predominantemente extraganglionar de estos casos de MW transformados.

Presentamos el caso de un paciente diagnosticado de una MW sintomática *MYD88*mut tratada con inmunoterapia, que 3 años y medio después desarrolló un LDCG-B sin aparente relación clonal con la

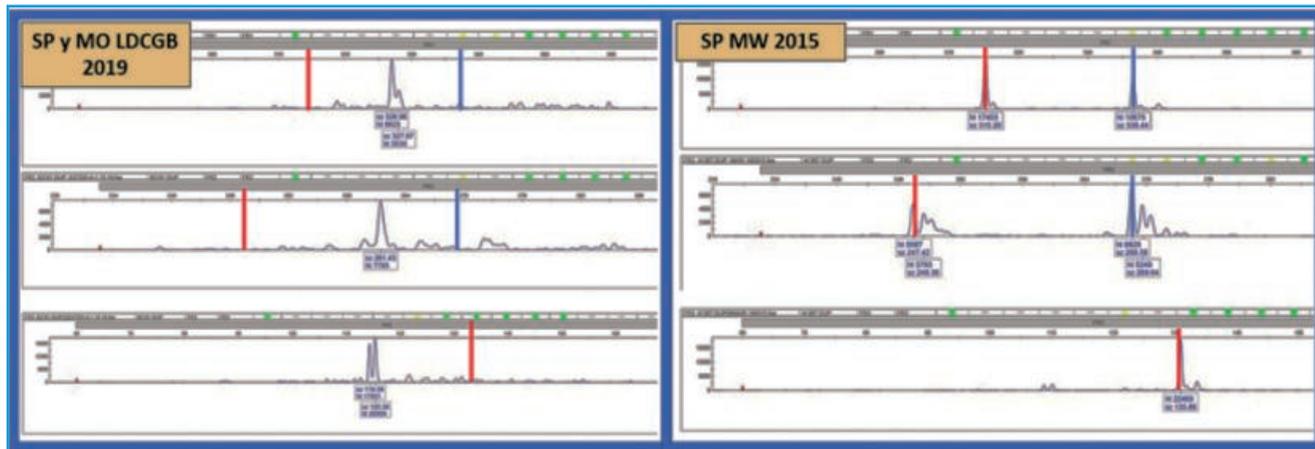


Figura 13. Estudio comparativo del reordenamiento de IgH observado en las muestras de la fase linfoma difuso de células grandes B (LDCG-B) frente al del diagnóstico de macroglobulinemia de Waldenström (MW). Se detectó en la fase LDCG-B clonalidad de IgH. Los productos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) resultaron de tamaño no coincidente con los observados al diagnóstico de la MW, demostrando así ausencia de relación clonal entre ambas fases de la enfermedad.

MW (expresión de diferente cadena ligera y diferente reordenamiento clonal de IgH en ambas neoplasias). En línea con lo anteriormente descrito y dada la ausencia de relación clonal entre ambos procesos, consideramos que el LDCG-B es una neoplasia *de novo* y no una transformación de la MW previa. De forma similar a los casos descritos de LDCG-B *MYD88*mut, presentó una localización extraganglionar. Se observó una disminución del componente monoclonal IgM en el momento del diagnóstico del LDCG-B que se interpretó como una probable persistencia de una pequeña clona residual de su MW, dada la ausencia de relación clonal entre ambas neoplasias. La mutación de *MYD88* resultó positiva también en esta segunda neoplasia, lo que nos llevó a considerar una posible relación biológica entre ambas fases de la enfermedad, aun en ausencia de relación clonal. Se realizó un estudio mediante *next generation sequencing* (NGS) de los genes más frecuentemente mutados en patología linfóide de las muestras obtenidas en las fases de MW y de LDCG-B. Se observó un perfil mutacional diferente en ambas fases (mutaciones de *MYD88*, *CD79B*, *IGLL5*, *EZH2* en la fase MW frente a mutación de *MYD88* y *TP53* en la fase LDCG-B) (Tabla 1).

Cabe destacar la detección de las mutaciones *CD79B* e *IGLL5* con cargas alélicas muy bajas (cerca al 1%) en la MO en la fase LDCG-B que, sin embargo, no se detectaron en SP. En esta misma muestra de MO no se detectó por citometría de flujo ni por otras técnicas moleculares (reordenamiento de IgH) nin-

guna evidencia de las poblaciones linfoides clonales observadas en la fase de MW. Asimismo, un estudio inmunofenotípico de MO realizado posteriormente demostró la persistencia de células plasmáticas clonales kappa en ausencia de la población linfóide clonal detectada al diagnóstico de MW. Por lo tanto, la persistencia de mutaciones de la fase MW en la fase LDCG-B se debe a la persistencia de células plasmáticas clonales kappa, que son responsables también de la

Tabla 1. Estudio mediante *next generation sequencing* (NGS) de los genes más frecuentemente mutados en patología linfóide de las muestras obtenidas en las fases de macroglobulinemia de Waldenström (MW) y de linfoma difuso de células grandes B (LDCG-B)

| Mutación | SP 2015 VAF (%) | SP 2019 VAF (%) | Biopsia sacra 2019 VAF (%) |
|--------------------------------|-----------------|-----------------|----------------------------|
| <i>CD79B</i> p.Tyr208Ter | 24,92 | – | 0,73 |
| <i>IGLL5</i> p.Arg69Thr | 24,13 | – | 1,24 |
| <i>MYD88</i> p.Leu265Pro | 24,52 | 18,55 | 10,00 |
| <i>EZH2</i> p.Tyr641Asn | 9,46 | – | – |
| <i>TP53</i> p.Gly154AlafsTer16 | – | 26,34 | 17,20 |
| <i>CXCR4</i> | – | – | – |
| <i>TET2</i> p.Cys1135Tyr | 0,40 | 3,80 | 8,18 |

Se observó un perfil mutacional diferente en ambas fases (mutaciones de *MYD88*, *CD79B*, *IGLL5*, *EZH2* en la fase MW frente a mutación de *MYD88* y *TP53* en la fase LDCG-B). Se detectó una mutación de *TET2* en ambas fases posiblemente relacionada con una hematopoyesis clonal de base
Azul: MW; rojo: LDCG-B

secreción del componente monoclonal IgM kappa que se sigue detectando en todo momento, aunque con una clara tendencia al descenso. La detección de una mutación de *TET2* en ambas fases sugiere la presencia de una hematopoyesis clonal de potencial indeterminado (CHIP) de base.

Trabajos recientes indican que la mutación aislada de *MYD88* no parece capaz de inducir una expansión clonal y que es necesaria la adquisición de mutaciones adicionales para el desarrollo de la clona tumoral⁽¹⁰⁾. Asimismo, otros estudios han demostrado la presencia de dicha mutación en células precursoras B y linfocitos B normales de pacientes con MW⁽¹¹⁾. Cabe plantearse la posibilidad de que nuestro paciente presentara una linfopoyesis portadora de la mutación *MYD88*, que inicialmente adquiriera mutaciones adicionales en las células linfoides *MYD88mut*, responsables de la expansión clonal con diferenciación a MW y años más tarde desarrollara otros eventos genómicos (en este caso, la mutación de *TP53* y el reordenamiento de *MYC*) en células linfoides asimismo *MYD88mut*, que indujeron una expansión clonal en forma de linfoma agresivo.

► Para recordar

La aparición de un linfoma agresivo en un paciente con MW puede corresponder a una transformación (en presencia de relación clonal) o a una nueva neoplasia.

La mutación de *MYD88* de manera aislada no parece capaz de inducir una expansión clonal y necesita de alteraciones genómicas adicionales para el desarrollo de una clona tumoral.

Algunos pacientes podrían presentar *MYD88mut* en células B precursoras y, por tanto, predisposición a desarrollar diferentes neoplasias linfoproliferativas *MYD88mut* motivadas por la aparición de alteraciones genómicas adicionales en dichas células.

► Bibliografía

1. Castillo JJ, Gustine J, Meid K, Dubeau T, Hunter ZR, Treon SP. Histological transformation to diffuse large B-cell lymphoma in patients with Waldenström macroglobulinemia. *Am J Hematol*. 2016;91(10):1032-5.
2. Owen RG, Bynoe AG, Varghese A, de Tute RM, Rawstron AC. Heterogeneity of histological transformation events in Waldenström's macroglobulinemia (WM) and related disorders. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2011;11(1):176-79.
3. Durot E, Tomowiak C, Michallet AS, Dupuis J, Hivert B, Leprière S, et al. Transformed Waldenström macroglobulinaemia: clinical presentation and outcome. A multi-institutional retrospective study of 77 cases from the French Innovative Leukemia Organization (FILO). *Br J Haematol*. 2017;179(3):439-48.
4. Lin P, Mansoor A, Bueso-Ramos C, Hao S, Lai R, Medeiros LJ. Diffuse large B-cell lymphoma occurring in patients with lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenström macroglobulinemia. Clinicopathologic features of 12 cases. *Am J Clin Pathol*. 2003;120(2):246-53.
5. Zanwar S, Abeykoon JP, Durot E, King R, Perez Burbano GE, Kumar S, et al. Impact of *MYD88*^{265P} mutation status on histological transformation of Waldenström Macroglobulinemia. *Am J Hematol*. 2020;95(3):274-81.
6. Okolo ON, Johnson AC, Yun S, Arnold SJ, Anwer F. Rare transformation to double hit lymphoma in Waldenström's macroglobulinemia. *Immunotherapy*. 2017;9(9):709-14.
7. Rossi D, Spina V, Deambrogi C, Rasi S, Laurenti L, Stamatopoulos K, et al. The genetics of Richter syndrome reveals disease heterogeneity and predicts survival after transformation. *Blood*. 2011 Mar 24;117(12):3391-401.
8. De Groen RAL, Schrader AMR, Kersten MJ, Pals ST, Vermaat JSP. *MYD88* in the driver's seat of B-cell lymphomagenesis: from molecular mechanisms to clinical implications. *Haematologica*. 2019;104(12):2337-48.
9. Vermaat JS, Somers SF, de Wreede LC, Kraan W, de Groen RAL, Schrader AMR, et al. *MYD88* mutations identify a molecular subgroup of diffuse large B-cell lymphoma with an unfavourable prognosis. *Haematologica*. 2020;105(2):424-34.
10. Sewastianik T, Guerrero ML, Adler K, Dennis PS, Wright K, Shanmugam V, et al. Human *MYD88* L265P is insufficient by itself to drive neoplastic transformation in mature mouse B cells. *Blood Adv*. 2019;3(21):3360-74.
11. Rodríguez S, Botta C, Celay J, Goicoechea I, García-Barchino MJ, Valdés-Más R, et al. Waldenström's macroglobulinemia (WM) Is Preceded By Clonal Lymphopoiesis Including *MYD88* L265P in Progenitor B Cells. *Blood*. 2019;134(Supplement_1):1527.

Monocitosis y displasia en un paciente con policitemia vera

María Huguet Mas¹, Elisa Orna Montero¹, Alba Mesa Tudel¹, Gustavo Tapia Melendo², Isabel Granada Font¹, Lurdes Zamora Plana¹, Marc Sorigué Tomàs¹, Marco Antonio Fernández Sanmartín³, Blanca Xicoy Cirici¹, José Tomás Navarro Ferrando¹

¹ Servicio de Hematología. Institut Català d'Oncologia-Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Instituto de Investigación contra la Leucemia Josep Carreras. Universitat Autònoma de Barcelona; ² Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario Germans Trias i Pujol. Barcelona; ³ Institut de Recerca Germans Trias i Pujol. Barcelona

› Historia clínica

Se trata de un hombre de 64 años de edad, con antecedentes de hipertensión arterial y policitemia vera (PV) diagnosticada en julio de 2013 al objetivarse poliglobulia en una analítica rutinaria. Al diagnóstico presentaba la mutación *JAK2* V617F con una ratio de 34,13 (estudio cuantitativo por reacción en cadena de la polimerasa -PCR-). En cuanto al estudio medular, se objetivó un aumento de la serie eritroide sin otras alteraciones y el cariotipo era normal. En la biopsia se descartó la presencia de fibrosis.

Inicialmente, realizó tratamiento con flebotomías periódicas, con buen control clínico, hasta mayo de 2016, cuando apareció leucocitosis y trombocitosis, por lo que se decidió iniciar tratamiento con hidroxiurea. El paciente mantuvo un hemograma con recuentos celulares dentro de la normalidad hasta septiembre de 2019.

› Motivo de consulta

En septiembre de 2019 el paciente consultó por astenia de unas semanas de evolución. En el hemograma se detectó pancitopenia.

› Exploración física

Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) de 1. No se palparon adenopatías periféricas ni visceromegalias. Auscultación cardiaca y pulmonar sin alteraciones.

› Pruebas complementarias

• **Hemograma:** leucocitos de $1,80 \times 10^9/L$ (neutrófilos 12%, linfocitos 40%, monocitos 38%, metamielocitos 2%, mielocitos 1%, blastos 7%), hemoglobina de 86 g/L, volumen corpuscular medio (VCM) de 102,7 fL, plaquetas de $76 \times 10^9/L$.

• **Frotis de sangre periférica (Figura 1):** anisopoi-quilocitosis marcada, con presencia de dacriocitos. Se observaban formas con punteado basófilo y anillos de Cabot. Presencia de 13 eritroblastos por cada 100 leucocitos. Desgranulación intensa de los polimorfonucleares neutrófilos, con hiposegmentación de los núcleos y cromatina en grumos (*clumping*).

• **Eritropatología:** ferritina de 265 ng/mL, transferrina de 135 mg/dL, haptoglobina de 165 mg/dL, ácido fólico de 5,9 ng/mL y cobalamina de 505 pg/mL.

• **Bioquímica:** sin alteraciones.

• **Estudio por PCR cuantitativa de la mutación puntual de *JAK2* V617F en sangre periférica:** 84,55.

• **Mielograma (Figura 2):** celularidad global abundante. La serie eritroide estaba en proporción aumentada (44%), con rasgos megaloblásticos marcados,

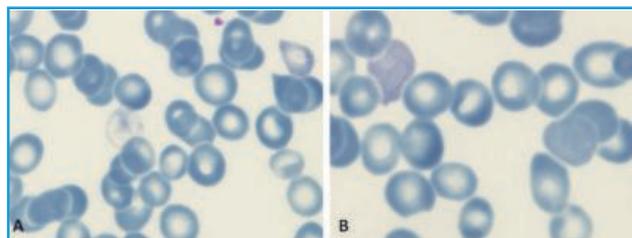


Figura 1. Extensión de sangre periférica correspondiente al momento en que se detectó la pancitopenia. May-Grünwald-Giemsa $\times 1.000$ (A) y $\times 1.000$ (B). Anisopoi-quilocitosis, con presencia de dacriocitos. Formas con punteado basófilo y anillos de Cabot.

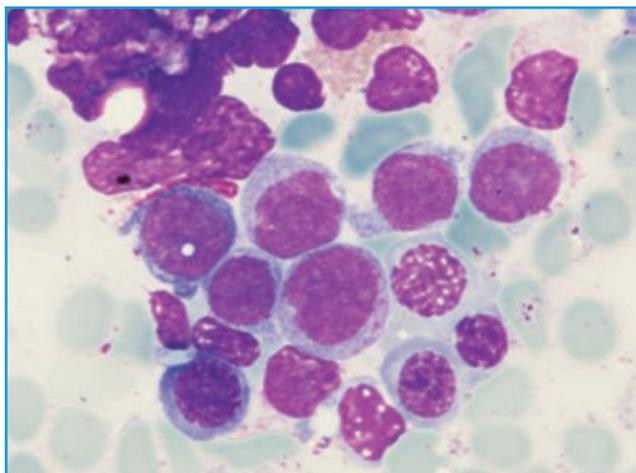


Figura 2. Aspirado de médula ósea realizado para el estudio de la pancitopenia. May-Grünwald-Giemsa $\times 1.000$.

núcleos irregulares y fenómenos de cariorrexis, alteración de la hemoglobinización y punteado basófilo. La serie granulopoyética estaba disminuida (31%), con escasas formas maduras que presentaban núcleos hiposegmentados y el citoplasma muy desgranulado. Se evidenció la presencia de eosinofilia y basofilia, así como monocitosis del 7%. Además, se observaba un 6% de promonocitos y una población de blastos del 5%. Los megacariocitos estaban en cantidad disminuida, con algunos elementos con el núcleo hipolobulado.

- **Inmunofenotipo:** destacaba la ausencia de serie granulocítica. Se observaba una población de fenotipo inmaduro que expresaba CD34, CD117, DR, CD33, CD13, CD4 y CD11b, representando el 5% de la celularidad medular. La celularidad restante estaba constituida por monocitos maduros que expresaban CD56.

- **Citogenética (Figura 3):** cariotipo 43,XY,-5,-7,der(9)t(9;17)(q11;q11.2),-17[19]/46,XY[1]. De las 20 metafases analizadas, 19 presentaban un cariotipo hipodiploide, complejo y monosómico. Las anomalías observadas eran monosomías de los cromosomas 5, 7 y 17 más un cromosoma 9 derivado de una translocación desequilibrada entre 9q11 y 17q11.2. En el estudio de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) TP53/CEP17: nuc ish(TP53,CEP17)x1 [61/100], se confirmó la delección del gen TP53.

- **Biología molecular:** estudio con panel de *next generation sequencing* (NGS) (Figura 4) en el que se identificaron, además de la mutación JAK2 V617F, 3 mutaciones *no-driver*: ASXL1, TP53 y TET2. Las 4 mutaciones presentaban una VAF (*variant allele frequency*) significativa.

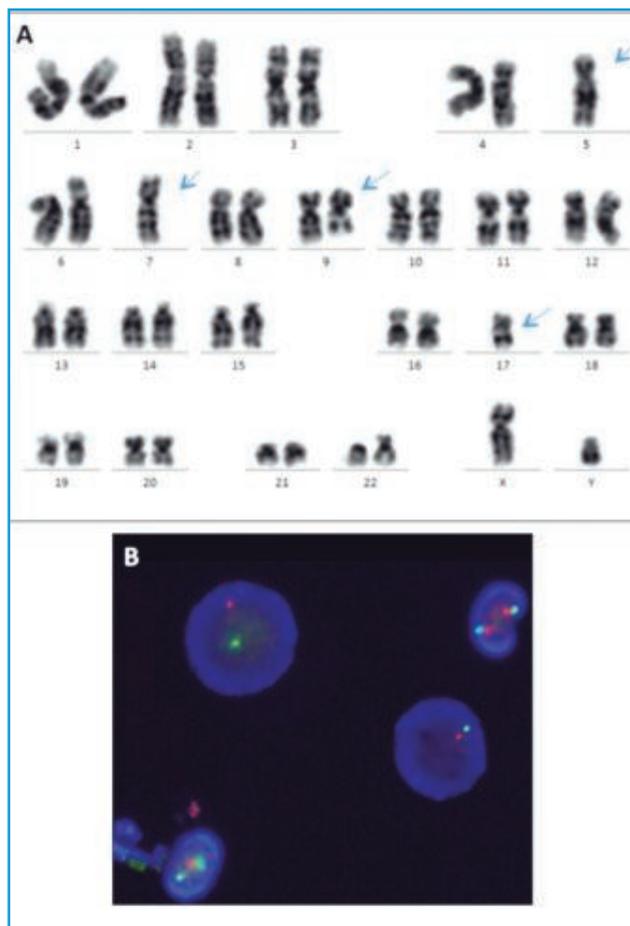


Figura 3. A: cariotipo en la muestra obtenida de la médula ósea: 43,XY,-5,-7,der(9)t(9;17)(q11;q11.2),-17[19]/46,XY[1]; B: estudio de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) TP53/CEP17: el gen TP53 se encuentra localizado en 17p13 (marcado con la señal roja) y CEP17 se encuentra en el centrómero del cromosoma 17 (señal verde). Se observa pérdida de una señal para el gen TP53 (en rojo), confirmando la delección de TP53. La pérdida de una señal para el centrómero del cromosoma 17 (en verde) puede explicarse por la translocación desequilibrada entre 9q11 y 17q11.

Ante estos hallazgos, se decidió suspender el tratamiento con hidroxiurea para valorar qué papel podía tener en relación con la mielodisplasia observada. Se realizó seguimiento semanal del paciente, observándose en el hemograma un aumento progresivo de la cifra de leucocitos, por lo que a los 30 días se realizó un nuevo estudio de la enfermedad:

- **Hemograma:** leucocitos de $28,90 \times 10^9/L$ (neutrófilos 41%, linfocitos 8%, monocitos 28%, metamielocitos 2%, mielocitos 17%, blastos 4%), hemoglobina de 96 g/L, VCM de 99,6 fL, plaquetas de $364 \times 10^9/L$.

| Classification* | Gene | Chr. | Exon | c.DNA | Protein | Total readings | VAF 2019 (%) | VAF 2013 (%) |
|-----------------|--------------|------|------|------------|--------------------|----------------|--------------|--------------|
| Class 1 | <i>JAK2</i> | 9 | 14 | c.1849G>T | p.(Val617Phe) | 5233 | 91.71 | 43.68 |
| Class 1 | <i>ASXL1</i> | 20 | 13 | c.1934dupG | p.(Gly646Trpfs*12) | 6563 | 35.91 | 10.44 |
| Class 1 | <i>TP53</i> | 17 | 5 | c.523C>G | p.(Arg175Gly) | 3325 | 82.41 | 13.18 |
| Class 3B | <i>TET2</i> | 4 | 3 | c.1285G>A | p.(Gly429Arg) | 5582 | 50.21 | 46.96 |

Figura 4. Variantes detectadas en el panel de *next generation sequencing* (NGS). * Clasificación de las variantes:

- **Clase 1:** ha sido establecida como variante patogénica en hemopatías mieloides y altera un gen accionable.
- **Clase 2:** ha sido establecida como variante patogénica en tumores sólidos o hemopatías no mieloides y altera un gen accionable.
- **Clase 3:** variante no descrita previamente como un gen objetivo en las hemopatías mieloides. Afecta a un gen accionable y lo clasifica como:
 - **Clase 3A:** presumiblemente patogénica.
 - **Clase 3B:** significado incierto.
 - **Clase 3C:** presumiblemente benigna.

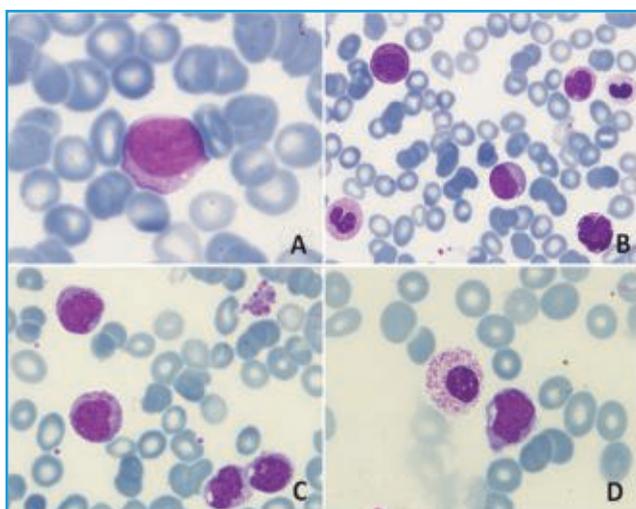


Figura 5. Extensión de sangre periférica. May-Grünwald-Giemsa $\times 1.000$. A: blasto; B: rasgos displásicos marcados en la serie granulocítica. Mielemia. Promonocito; C: monocitosis; D: monocito y neutrófilo con núcleo hiposegmentado y cromatina de tipo *clumping*.

- **Frotis de sangre periférica (Figura 5):** marcada anisopoiquilocitosis, con presencia de dacriocitos y hematíes con punteado basófilo y anillos de Cabot. Presencia de 6 eritroblastos/100 leucocitos. Neutrófilos hipogranulados, con núcleos hiposegmentados y con la cromatina hipercondensada de tipo *clumping*.

- **Bioquímica:** LDH de 747 U/L (valores normales entre 135 y 245 U/L). El resto de los parámetros estaban dentro de la normalidad.

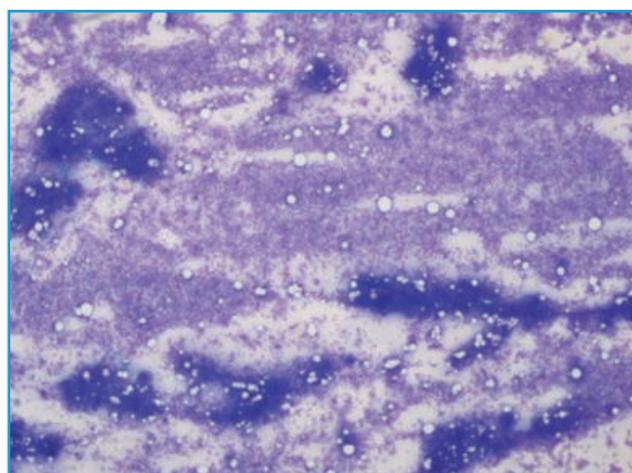


Figura 6. Médula ósea. May-Grünwald-Giemsa $\times 40$. Médula ósea con celularidad global aumentada.

- **Inmunofenotipo en sangre periférica:** un 95,16% de la población de monocitos era CD14⁺/CD16⁻ (fenotipo clásico), lo que sugería el diagnóstico de leucemia mielomonocítica crónica (LMMC)⁽¹⁾. Se observó una población de blastos del 7% de fenotipo mieloide.

- **Mielograma (Figuras 6 a 9):** médula hiper celular con disminución de la grasa. Cantidad aumentada de la serie eritroide (38%), con rasgos de diseritropoyesis en el 72% de las células. Serie granulopoyética en cantidad disminuida (35%), con predominio de las formas inmaduras. En los elementos maduros se observaba displasia en el 90% de las células, con marcada

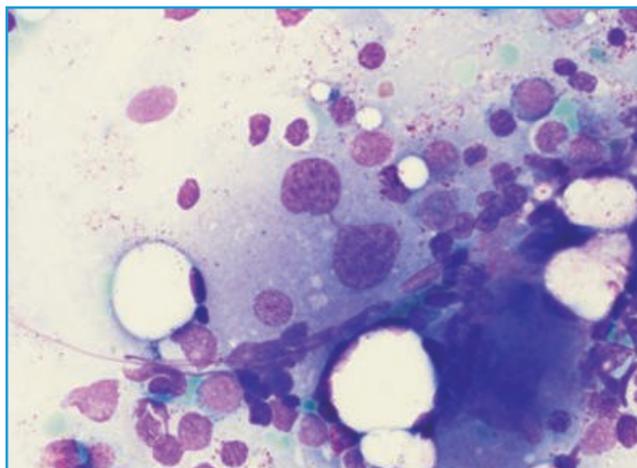


Figura 7. Médula ósea. May-Grünwald-Giemsa $\times 500$. Megacariocito hipolobulado con núcleos dispersos.

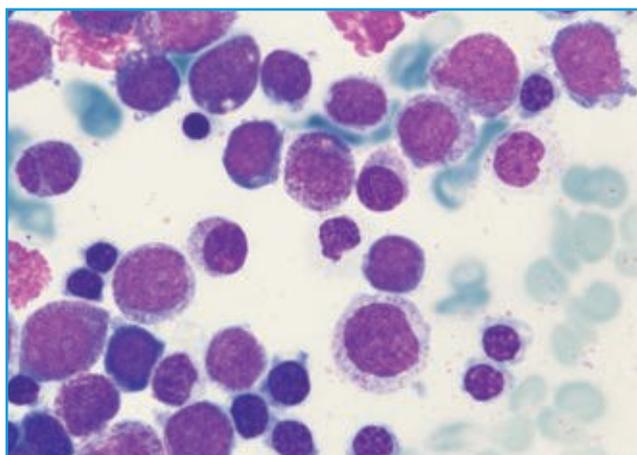


Figura 8. Médula ósea. May-Grünwald-Giemsa $\times 1.000$. Monocitosis, presencia de blastos y promonocitos. Rasgos displásicos de la serie eritroide y granulocítica.

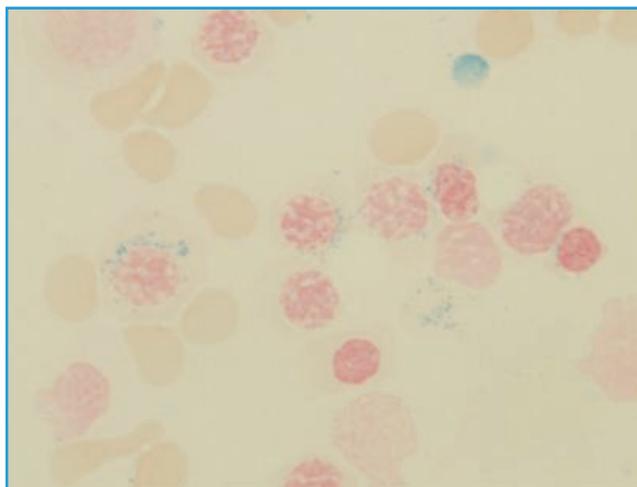


Figura 9. Médula ósea. Perl's $\times 1.000$. Sideroblastos en anillo.

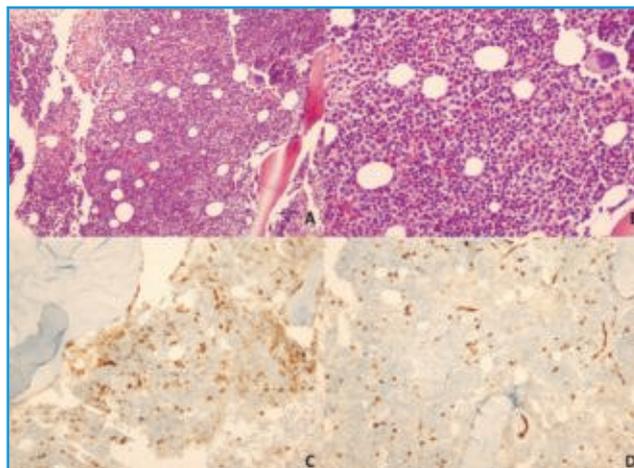


Figura 10. Médula ósea. A: hematoxilina-eosina $\times 100$; B: hematoxilina-eosina $\times 200$. Médula ósea hiper celular, con algunos megacariocitos atípicos; C: expresión de CD14 $\times 200$; D: expresión de CD34 $\times 200$.

hipogranulación e hiposegmentación de los núcleos con formas de tipo Pelger. Se observaba un 9% de monocitos, un 5% de promonocitos y una población de blastos del 6%. Además, se cuantificó un 30% de dismegacariopoyesis, con algunos megacariocitos grandes y con núcleos dispersos y otros pequeños con los núcleos monolobulados. En la tinción de Perls se observaba un hierro macrofágico disminuido, con un 65% de sideroblastos en anillo.

- **Inmunofenotipo:** estudio sin cambios significativos con respecto al anterior, a excepción de un aumento de la celularidad granulocítica. Los blastos tenían el mismo fenotipo mielode descrito en el estudio previo.
- **Citogenética:** sin cambios respecto al estudio previo.

• **Biopsia de médula ósea (Figura 10):** médula ósea hiper celular, con predominio de la serie eritroide y serie granulopoyética algo disminuida con abundantes eosinófilos. Megacariocitos abundantes, algunos de ellos con rasgos displásicos (pequeño tamaño y núcleo hipolobulado). Células blásticas CD34 positivas que representan entre el 5 y el 10% de la celularidad medular global.

Teniendo en cuenta que en el estudio de NGS se encontraron 3 mutaciones *no-driver*, 2 de las cuales representan un peor pronóstico en numerosas neoplasias mieloides, nos resultó interesante averiguar si estas mutaciones estaban ya presentes en el momento del diagnóstico de la PV 6 años atrás. Es por eso que

se realizó un estudio de NGS de forma retrospectiva y, sorprendentemente, las 3 mutaciones ya estaban presentes al diagnóstico con una VAF menor (Figura 4).

› Diagnóstico

Para intentar confirmar la hipótesis de que la LMMC se trataba de una transformación de la PV *JAK2V617* positiva se aislaron las células *CD14⁺/CD16⁻* (monocitos de fenotipo clásico, aumentados en la LMMC) de la sangre periférica a través de *cell sorting* (BD FACSAria® II) y se confirmó por método Sanger la presencia en ellos de las mutaciones *JAK2V617F* y *ASXL1* (ya presentes en el diagnóstico de la PV).

Finalmente, el paciente se diagnosticó de **PV en progresión con fenotipo de LMMC de tipo 2-like**, según la Organización Mundial de la Salud (OMS)⁽²⁾.

› Evolución

Dado que las alteraciones genéticas encontradas confieren un mal pronóstico, se decidió que el paciente era tributario de quimioterapia intensiva seguida de alotrasplante de progenitores hematopoyéticos. Antes de iniciar el tratamiento y solamente 6 semanas después del diagnóstico, se detectó la progresión a leucemia aguda mieloide. Finalmente, el paciente recibió tratamiento quimioterápico con venetoclax-azacitidina y, un mes después, falleció a causa de insuficiencia respiratoria sin aislamiento microbiológico.

› Discusión

La PV es una neoplasia mieloproliferativa que se caracteriza por la hiperplasia de la serie roja y la presencia de la mutación *JAK2V617F*. La mediana de supervivencia en los pacientes es, aproximadamente, de 14 años, llegando a ser de hasta 24 años en aquellos pacientes menores de 60 años⁽³⁾. Las principales complicaciones relacionadas con la PV con repercusión sobre la supervivencia son los eventos trombohemorrágicos y la progresión de la enfermedad a mielofibrosis o a una leucemia aguda mieloide, con una incidencia de esta última del 5,5-18,7% a los 15 años⁽⁴⁾. Muchas veces la progresión de la enfermedad a fase

blástica se asocia con la aparición de mielodisplasia y la adquisición de alteraciones genéticas^(4,5).

Si analizamos la evolución que ha seguido la PV en este caso, observamos que a lo largo de 6 años ha adquirido varios cambios que le confieren una mayor agresividad y determinan una progresión de la enfermedad. Por lo que respecta a la citología, destaca la aparición de rasgos displásicos muy llamativos en las 3 series hematopoyéticas. Se ha objetivado que la aparición de diseritropoyesis, en general, y de sideroblastos en anillo, en concreto, en pacientes con PV son marcadores de progresión a fase blástica⁽⁶⁾. Por otro lado, el cariotipo normal inicial ha evolucionado a un cariotipo complejo, con adquisición de la delección de *TP53*. Aunque solo un 20% de los pacientes con PV presentan anomalías citogenéticas en el momento del diagnóstico⁽⁶⁾, se conoce que los pacientes pueden ir adquiriendo cambios en el cariotipo con buena correlación con el curso de la enfermedad⁽⁵⁾. Numerosos estudios asocian la adquisición de un cariotipo complejo a un mayor riesgo de progresión de la PV a fase blástica^(4,6), como habría ocurrido en nuestro caso.

En cuanto a la biología molecular, en estudios retrospectivos se ha objetivado que aproximadamente un 30% de los casos de PV *JAK2* positiva presentan mutaciones *no-driver* concomitantes en el momento del diagnóstico, siendo las más frecuentes *TET2* y *ASXL1*⁽⁷⁾. La presencia de las mutaciones de *ASXL1*, *SRSF2* e *IDH2* se ha asociado a una menor supervivencia global y a mayor riesgo de progresión a fibrosis o a leucemia aguda^(7,8). Por su parte, aunque la mutación de *TP53* solo se observa en un 1% de los pacientes con PV en fase crónica^(7,9), se detecta en aproximadamente un 45% de los casos de leucemia aguda post-PV^(6,8,9). En el caso descrito, 3 de las 3 mutaciones *no-driver* se han descrito como de mal pronóstico en numerosas patologías mieloides. Curiosamente, la evolución de la PV a fenotipo LMMC-like -y la posterior progresión a leucemia aguda- va asociada a un aumento significativo de la VAF de todas las mutaciones, incluidas las de mal pronóstico. Estos hallazgos sugieren que las técnicas de NGS podrían tener un papel clave en el estudio de neoplasias mieloproliferativas, ya que podrían identificar subgrupos de pacientes con mayor riesgo de evolución a leucemia. De hecho, un estudio recientemente publicado por Tefferi *et al.* apunta la posibilidad de incluir los análisis genéticos en nuevos scores pronósticos en las neoplasias mieloproliferativas⁽¹⁰⁾.

Así como la evolución a leucemia aguda ha sido ampliamente descrita como complicación en las neoplasias mieloproliferativas, la progresión a LMMC parece ser mucho más infrecuente. Según la OMS, los casos de LMMC que provienen de un síndrome mielodisplásico o síndrome mieloproliferativo previo no pueden ser diagnosticados como tal, ya que son una forma de progresión de la enfermedad de base^(2,11,12). Así pues, nuestro caso debe ser considerado como una PV con progresión a fenotipo LMMC-like. En la literatura se encuentran pocos casos descritos. En el trabajo publicado por Holcombe *et al.* en 1991 se reportan 2 casos similares, pero en ese momento no se disponía de análisis genético⁽¹³⁾. Recientemente, ha sido publicado por Andrei *et al.* un caso de PV con transformación a LMMC y adquisición de mutaciones *no-driver*⁽¹⁴⁾. En este caso, confirman que la población CD14⁺ es portadora de la mutación JAK2 V617F, por lo que extraen la conclusión de que la población clonal de LMMC proviene de la clona de PV⁽¹⁴⁾. Por otra parte, la mutación JAK2 V617F se observa en un 7,8% de las LMMC *de novo*⁽¹⁴⁾, especialmente en las de subtipo proliferativo.

Una monocitosis absoluta no siempre implica el diagnóstico de LMMC; de hecho, puede verse en condiciones benignas reactivas o asociada a otras enfermedades hematológicas⁽¹⁵⁾. Se ha observado que en algunos casos de neoplasias mieloproliferativas es relativamente frecuente la presencia de una monocitosis no-clonal acompañante⁽¹⁵⁾. En el caso de la mielofibrosis primaria, se ha objetivado que la presencia de monocitosis se asocia a la progresión de la enfermedad a una fase acelerada⁽¹²⁾. Barraco *et al.* apunta que la incidencia de monocitosis en pacientes con PV puede ser de alrededor del 21%⁽¹⁵⁾ y, además, sugiere que los pacientes con monocitosis configuran un subgrupo de pacientes con características similares: mayor edad (> 60 años) y mayor frecuencia de mutaciones *no-driver* (especialmente *TET2* y *SRSF2*)⁽¹⁵⁾. Se detecta también una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de monocitosis y una menor supervivencia global⁽¹⁵⁾. Concluye, por tanto, que la presencia de monocitosis en la PV podría sugerir que se trate de una enfermedad biológicamente más agresiva, con características del espectro de la LMMC⁽¹⁵⁾.

En resumen, presentamos un caso infrecuente de PV en progresión con fenotipo de LMMC de tipo 2-like, objetivando que las 2 poblaciones presentan las mis-

mas alteraciones genéticas (demostrando así un origen común). El carácter agresivo de la enfermedad y la evolución fatal posterior sugieren que, como en la mielofibrosis primaria⁽¹²⁾, la aparición de monocitosis en los pacientes con PV puede ser signo de progresión de la enfermedad. Además, este caso pone de manifiesto el papel de las técnicas NGS en el diagnóstico de las neoplasias mieloproliferativas y plantea la introducción de determinadas alteraciones genéticas en nuevos scores pronósticos.

► Para recordar

- Si bien la evolución de PV a leucemia aguda mieloide es ampliamente conocida, la progresión a fenotipo de LMMC-like es poco común.
- Recientes estudios apuntan que en la PV existe una asociación estadísticamente significativa entre la aparición de monocitosis y una menor supervivencia. La monocitosis, por tanto, podría considerarse un marcador de agresividad.
- Las técnicas de NGS pueden llegar a tener un papel crucial en el diagnóstico y el seguimiento de las neoplasias mieloproliferativas, ya que determinar la presencia de determinadas mutaciones *no-driver* puede ayudar a identificar aquellos pacientes con mayor riesgo de transformación a fase blástica.

► Bibliografía

1. Selimoglu-Buet D, Wagner-Ballon O, Saada V, Bardet V, Itzyksin R, Bencheikh L, et al. Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2015;125:3618-26.
2. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO Classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. Revised 4th edition. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2017. p. 82.
3. Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2019 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2019;94:133-43.
4. Cerquozzi S, Tefferi A. Blast transformation and fibrotic progression in polycythemia vera and essential thrombocythemia: a literature review of incidence and risk factors. *Blood Cancer J*. 2015;5:e366.
5. Tang G, Hidalgo López JE, Wang Sa, Hu S, Ma J, Pierce S, et al. Characteristics and clinical significance of cytogenetic abnormalities in polycythemia vera. *Haematologica*. 2017;102:1511-8.
6. Hidalgo-López JE, Kanagal-Shamanna R, Reyes S, Zhao C, Medeiros LJ, Bueso-Ramos CE. Ring sideroblasts in chronic phase of polycythemia vera

- identifies a subset of patients with an increased risk of progression to blast phase. *Ann Diagn Pathol*. 2019;40:45-8.
7. Tefferi A, Lasho TL, Guglielmelli P, Finke CM, Rotunno G, Elala Y, et al. Targeted deep sequencing in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood Adv*. 2016;1:21-30.
 8. Yogarajah M, Tefferi A. Leukemic transformation in myeloproliferative neoplasms: a literature review on risk, characteristics and outcome. *Mayo Clin Proc*. 2017;92:1118-28.
 9. Hidalgo-López JE, Carballo-Zárate A, Verstovsek S, Wang SA, Hu S, Li S, et al. Bone marrow findings in blast phase of polycythemia vera. *Ann Hematol*. 2018;97:425-34.
 10. Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL, Coltro G, Kinke CM, Loscocco GG, et al. Mutation-enhanced international prognostic systems for essential thrombocythaemia and polycythaemia vera. *Br J Haematol*. 2020;189(2):291-302.
 11. Wang SA, Galili N, Cerny J, Sechman E, Chen SS, Loew J, et al. Chronic myelomonocytic leukemia evolving from preexisting myelodysplasia shares many features with de novo disease. *Am J Clin Pathol*. 2006;126(5):789-97.
 12. Boiocchi L, Espinal-Witter R, Geyer JT. Development of monocytosis in patients with primary myelofibrosis indicates an accelerated phase of the disease. *Mod Pathol*. 2013;26:204-12.
 13. Holcombe RF, Treseler PA, Rosenthal DS. Chronic myelomonocytic leukemia transformation in polycythemia vera. *Leukemia*. 1991;5:606-10.
 14. Andrei M, Pandey A, Avezbakiev B, Wang JC. Chronic myelomonocytic leukemia as a transformation from polycythemia vera. *Leuk Res Rep*. 2019;11:14-6.
 15. Barraco D, Cerquozzi S, Gangat N, Patnaik MM, Lasho T, Finke C, et al. Monocytosis in polycythemia vera: clinical and molecular correlates. *Am J Hematol*. 2017;92:640-5.

Lactante de 2 meses con bicitopenia y esplenomegalia

Raúl Azibeiro Melchor¹, María Díez Campelo¹, Beatriz Rey Bua¹, Félix López Cadenas¹, Almudena González Prieto², Carlos Romero García³, Pilar Leoz Allegretti¹

¹ Servicio de Hematología. Hospital Universitario de Salamanca; ² Servicio de Pediatría. Hospital Universitario de Salamanca;

³ Unidad de Cuidados Intensivos Pediátrica. Hospital Universitario de Salamanca

› Motivo de consulta

Se trata de un lactante varón de 2 meses de edad que es traído a urgencias por su madre por ictericia cutaneomucosa evidente y falta de respuesta a estímulos.

› Antecedentes

- Embarazo solo controlado en las últimas semanas. Edad gestacional 37 + 5 semanas. Séptimo hijo, con hermanos sanos. Peso del recién nacido: 3.307 gramos. Serologías negativas.

- Ingreso en neonatología a las 2 horas de vida por hipoglucemia hasta el octavo día de vida.

- A los 17 días de vida acudió a urgencias de nuestro centro por un cuadro de vómitos; la familia se fugó con el paciente sin alta médica ni voluntaria.

› Exploración física

- Mal estado general, color cetrino de piel, palidez de mucosas, ictericia conjuntival y cutánea marcadas. Mal perfundido, hidratado. Desnutrido. Aspecto distrófico. Sin exantemas ni petequias. Edema palpebral.

- Aparato cardiovascular. Auscultación cardíaca: ritmo regular, con soplo sistólico II/VI en foco pulmonar y borde esternal izquierdo alto. Pulsos periféricos conservados y simétricos.

- Aparato respiratorio: taquipneico en reposo al aire, con tiraje a 3 niveles. Auscultación pulmonar: murmullo vesicular conservado, sin ruidos sobreañadidos.

- Abdomen: distendido a tensión, con oleada ascítica. Esplenomegalia de 4 traveses de dedo y hepato-

megalia de 3 traveses de dedo. Circulación colateral visible en el abdomen.

- Genitales masculinos normales.
- No se palpan adenopatías.

› Pruebas complementarias

- **Hemograma. Hemoglobina (Hb): 5,5 g/dL;** hematocrito: 15,7%; volumen corpuscular medio (VCM): 73,0 fL; Hb corpuscular media (HCM): 25,6 pg; concentración de HCM (CHCM): 35,0 g/dL; contenido de Hb reticulocitaria: 27,8 pg; amplitud de distribución eritrocitaria (RDW): 21,9%; reticulocitos: 12,5%; **reticulocitos absolutos: 265,40 × 10⁹/L;** leucocitos: 22,44 × 10⁹/L; neutrófilos: 7,97 × 10⁹/L; linfocitos: 9,51 × 10⁹/L; monocitos 4,64 × 10⁹/L; eosinófilos: 0,08 × 10⁹/L; basófilos: 0,24 × 10⁹/L; **plaquetas: 23,0 × 10⁹/L;** fracción de plaquetas inmaduras: 8%.

- **Coagulación.** Tiempo de protrombina: 27 s; actividad de protrombina: 30%; International Normalized Ratio (INR): 2,36; tiempo de tromboplastina parcial activada: 56,6 s; fibrinógeno: 90 mg/dL.

- **Bioquímica.** Glucosa: 117 mg/dL; urea: 26 mg/dL; urato: 3,4 mg/dL; creatinina: 0,24 mg/dL; calcio: 8,2 mg/dL; fosfato inorgánico: 2,2 mg/dL; magnesio: 2,2 mg/dL; **bilirrubina total: 15,91 mg/dL; bilirrubina conjugada: 12,52 mg/dL; bilirrubina indirecta: 3,40 mg/dL;** aspartato aminotransferasa (AST): 449 U/L; alanina aminotransferasa (ALT): 146 U/L; fosfatasa alcalina: 253 U/L; gamma-glutamilttransferasa (GGT): 84 U/L; lactato deshidrogenasa (LDH): 1.858 U/L; proteínas totales: 3,9 g/dL; albúmina suero: 2,9 g/dL; sodio: 127 mmol/L; potasio: 4,5 mmol/L; cloruros: 91 mmol/L; ion amonio: 258 μmol/L.

- **Frotis de sangre periférica.** Serie roja: marcada anisopoiquilocitosis. Se observan 35 eritroblastos circu-

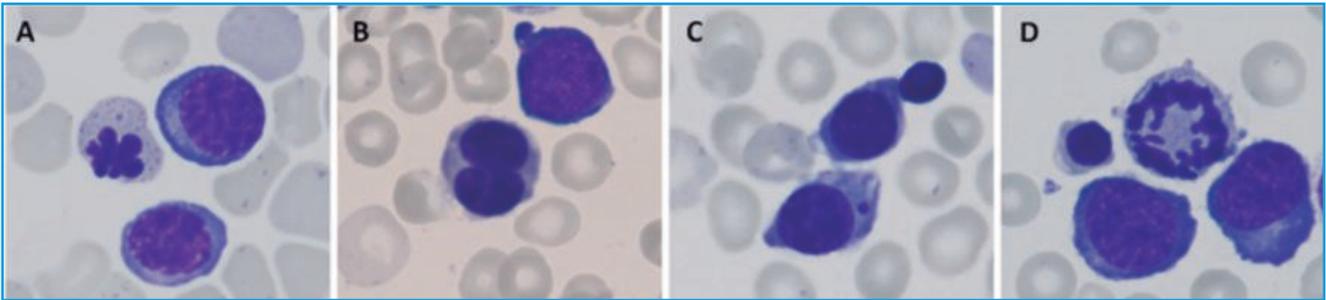


Figura 1. Diseritropoyesis en la médula ósea (MO). A: eritroblasto con núcleo de perfil irregular y punteado basófilo; B: eritroblasto binucleado con asincronismo madurativo núcleo-citoplasmático; C: cuerpo de Howell-Jolly; D: mitosis anómala.

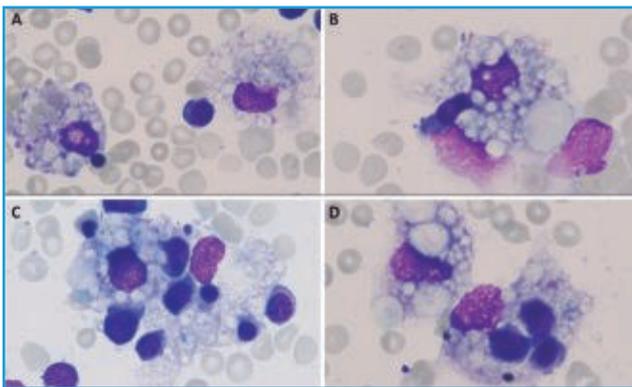


Figura 2. Macrófagos espumosos. Una minoría presentaba fenómenos de hemofagocitosis (C y D).

lantes/100 células blancas. En la serie blanca, neutrófilos segmentados: 40%; mielocitos: 2%; promielocitos: 2%; células inmaduras: 1%; eosinófilos: 1%; linfocitos: 44%; monocitos: 10%. Serie plaquetaria: anisotrombia. No se observan plaquetas agregadas.

• **Mielograma.** Dadas las citopenias no explicadas, la presencia de células inmaduras y el gran número de eritroblastos circulantes en sangre periférica, se decidió realizar un aspirado de médula ósea (MO) mediante punción en la meseta tibial.

Al microscopio nos encontramos una MO sin copo, por lo que la celularidad global no resultó valorable, pero sí llamaba la atención una hiperplasia roja con diseritropoyesis marcada prácticamente universal – más del 70%– (Figura 1).

La celularidad restante de la MO correspondía a macrófagos espumosos con el citoplasma ocupado por grandes vacuolas (Figura 2).

Finalmente, una revisión exhaustiva mostró también la presencia de pequeñas vacuolas en el citoplasma de los linfocitos (Figura 3).

• **Inmunofenotipo de MO.** En la MO se encontró una llamativa desproporción de las células inmaduras en favor de la estirpe mieloide, sin presentar un fenotipo aberrante (99,5% mieloides y 0,5% linfoides). Se confirmó, asimismo, la presencia de hiperplasia eritroide con alteraciones madurativas.

• **Inmunofenotipo de sangre periférica.** Ante la presencia de bicitopenia y fenómenos de hemofagocitosis en la MO, se decidió ampliar el estudio mediante citometría de flujo en sangre periférica. En la muestra se observó una proporción normal de las diferentes poblaciones linfocitarias y una expresión de perforina citoplasmática adecuada en las células NK, ambos hallazgos poco sugestivos de síndrome hemofagocítico congénito.

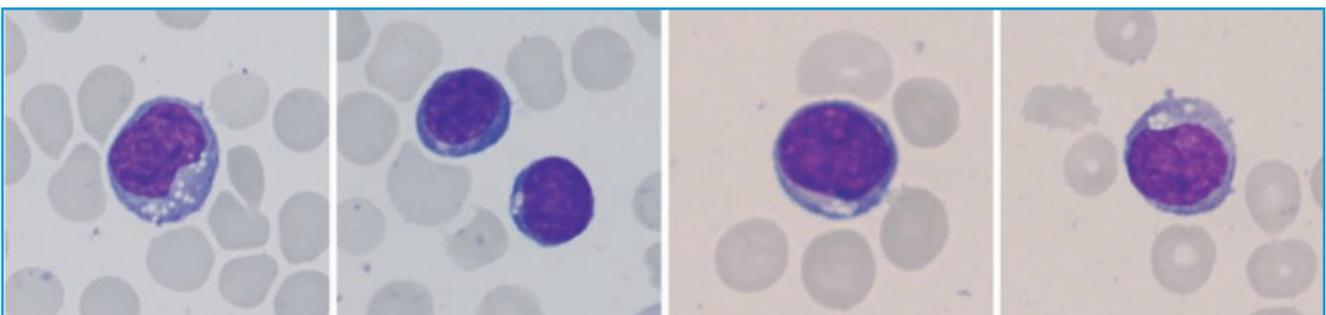


Figura 3. Linfocitos con vacuolas citoplasmáticas.



Figura 4. Radiografía de tórax y abdomen. Se observa la calcificación de ambas suprarrenales.

• Otras pruebas:

- Perfil lipídico: colesterol total de 64 mg/dL, triglicéridos 99 mg/dL.
- Perfil férrico: hierro de 74 μ g/dL, ferritina de 5.900 ng/mL, transferrina de 55 mg/dL, capacidad total de fijación del hierro de 70 μ g/dL, índice de saturación de la transferrina del 105,9%.
- CD25 soluble: 100 UI/mL (normal < 2.400 U/mL).
- Actividad de la lipasa ácida lisosomal en leucocitos de sangre periférica: 0 pmol/h (rango: 40-600 pmol/h).

Finalmente, antes del ingreso del paciente se realizó una radiografía de tórax y abdomen, y una ecografía abdominal, donde se confirmó la hepatoesplenomegalia con ascitis, como ya sugería la exploración física. Curiosamente, la radiografía de tórax y abdomen mostró como hallazgo llamativo la presencia de calcificación en ambas glándulas suprarrenales (Figura 4).

› Diagnóstico

Enfermedad de Wolman asociada a síndrome hemofagocítico.

› Tratamiento y evolución

Se inició el tratamiento sustitutivo de la enfermedad de Wolman mediante lipasa ácida lisosomal humana recombinante (sebelipasa alfa) y tratamiento del síndrome hemofagocítico según el protocolo para esta enfermedad con dexametasona. Además, dada la presencia de ascitis, se realizó paracentesis evacuadora.

Bajo dicho tratamiento, las citopenias mejoraron de manera progresiva durante los 10 días siguientes; sin embargo, el tratamiento sustitutivo no logró mejorar los datos de fallo hepático, manteniéndose prácticamente estables las transaminasas, la hiperbilirrubinemia y la coagulopatía, y requiriendo la realización de nuevas paracentesis ante el empeoramiento de la ascitis.

Finalmente, durante la última semana de ingreso, el paciente empeoró clínicamente con datos de inestabilidad hemodinámica y síndrome de distrés respiratorio agudo que no respondieron a ventilación mecánica invasiva e inotrópicos, produciéndose el *exitus* tras 24 días de ingreso.

› Discusión

Durante el primer contacto clínico, la sospecha diagnóstica del equipo de urgencias pediátricas fue la presencia de una atresia de vía biliar intrahepática dado el cuadro clínico del paciente (falta de medro, vómitos y diarrea), la hepatoesplenomegalia y la ictericia marcada.

Sin embargo, el hemograma mostró una anemia regenerativa y plaquetopenia graves no congruentes con dicho cuadro, por lo que a la primera sospecha diagnóstica se sumó la de una hemopatía aguda. Además, la presencia de hepatoesplenomegalia hizo pensar que podría tratarse de un síndrome hemofagocítico congénito.

Posteriormente, se amplió el estudio con un frotis de sangre periférica donde llamaba la atención la presencia de 35 eritroblastos circulantes por cada 100 células blancas sin poder establecer un diagnóstico claro, por lo que se realizó un aspirado medular.

En el aspirado medular encontramos una displasia prácticamente universal de la serie eritroide y abundantes vacuolas en el citoplasma de linfocitos y macrófagos, así como fenómenos de hemofagocitosis, por lo que se informó al Servicio de Pediatría de que cumplía

criterios de síndrome hemofagocítico (según HLH-04) asociado a algún tipo de enfermedad de depósito.

Entre las diversas enfermedades de depósito que aparecen en lactantes y que se asocian a hepatopatía y presencia de inclusiones citoplasmáticas destacan fundamentalmente 4: la enfermedad de Niemann-Pick, la enfermedad de Gaucher, las mucopolisacaridosis y la enfermedad de Wolman.

Actualmente, la prueba diagnóstica fundamental es la determinación específica de cada enzima. Sin embargo, estas entidades presentan diferencias a nivel citológico y clínico que pueden ayudar a hacer una aproximación diagnóstica (Tabla 1). En la más similar a la enfermedad de Wolman, la enfermedad de Niemann-Pick, también es posible encontrar macrófagos espumosos y linfocitos vacuolados, aunque las vacuolas son pequeñas y se encuentran dispersas, mientras que en la enfermedad de Wolman suelen encontrarse agrupadas en racimo. En las células de la enfermedad de Gaucher las inclusiones macrofágicas presentan un aspecto característico en "papel arrugado" y la presencia de vacuolas en los linfocitos es más rara. Por último, en las mucopolisacaridosis son típicos los linfocitos de Gasser, donde dichas vacuolas son llamativamente más numerosas y de mayor tamaño y presentan granulación morada en su interior, a diferencia de las demás entidades.

En nuestro caso, el hallazgo de la calcificación bilateral de ambas glándulas suprarrenales, considerado por algunos autores patognomónico de la enfermedad de Wolman, nos orientó a dicho diagnóstico, que se confirmó mediante la determinación de la enzima lipasa ácida lisosomal.

› Enfermedad de Wolman

La enfermedad de Wolman es una alteración congénita del metabolismo de los lípidos que se transmite de forma autosómica recesiva. Se caracteriza por el acúmulo de ésteres de colesterol y triglicéridos en la mayoría de los órganos y tejidos (especialmente hígado e intestino delgado en el interior de los macrófagos), debido a un déficit de la actividad de la lipasa ácida lisosomal⁽¹⁾.

Dicho depósito es el causante del cuadro clínico, que aparece en las primeras semanas de vida y

que se acompaña de alteraciones gastrointestinales (vómitos y esteatorrea) que causan desnutrición progresiva, hepatoesplenomegalia con fallo hepático y citopenias (fundamentalmente anemia y trombocitopenia). Las calcificaciones suprarrenales producidas por la atrofia secundaria a la incapacidad para producir ésteres de colesterol son claves para el diagnóstico, hasta el punto de que muchos autores las consideran patognomónicas⁽²⁾. La enfermedad se confirma bien mediante la secuenciación del gen afectado (*LIPA*) o bien midiendo la actividad de la lipasa ácida lisosomal⁽³⁾, como en nuestro caso.

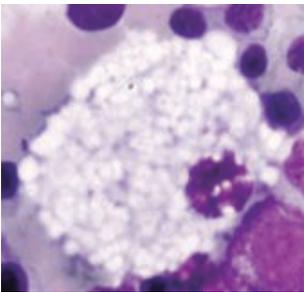
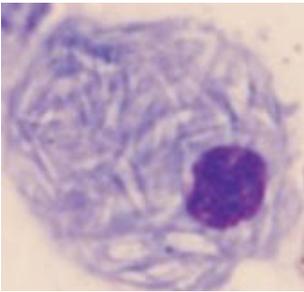
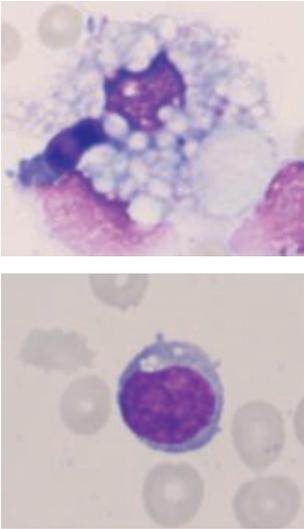
En el estudio de la MO se puede observar la presencia de macrófagos con abundantes vacuolas en su interior⁽⁴⁾ (macrófagos espumosos). En sangre periférica pueden identificarse, en algunas ocasiones, linfocitos con pequeñas vacuolas que se disponen en racimo⁽⁵⁾.

La aparición de un síndrome hemofagocítico asociado al síndrome de Wolman ya ha sido descrita en la bibliografía^(2,4,6). Aunque por el momento no existe una explicación etiopatogénica clara, la activación del fagolisosoma podría ser consecuencia de los cristales producidos por los ésteres de colesterol, de manera similar a como se produce en las placas de ateroma⁽²⁾. Tampoco existen unas directrices claras de tratamiento del mismo debido a la baja incidencia de casos y a los malos resultados que proporciona el tratamiento de la enfermedad de Wolman con terapia sustitutiva recombinante, falleciendo los pacientes habitualmente durante el primer año de vida⁽⁷⁾.

› Para recordar

- Resulta capital no detenerse en describir únicamente la hemofagocitosis medular, pues pueden encontrarse hallazgos que orienten al origen de la misma.
- El papel del estudio medular en el diagnóstico de sospecha de las enfermedades de depósito y en su diagnóstico diferencial.
- La importancia del trabajo multidisciplinar para lograr el diagnóstico de enfermedades raras como lo es la enfermedad de Wolman.

Tabla 1. Características clínico-morfológicas de las enfermedades de depósito

| Enfermedad | Enzima afectada | Célula representativa | Otros hallazgos |
|----------------------------|------------------------------------|--|---|
| Enfermedad de Niemann-Pick | Esfingomielinasa ácida |  | Linfocitos con vacuolas pequeñas dispersas |
| Enfermedad de Gaucher | Glucocerebrosidasa |  | Pueden aparecer linfocitos vacuolados, pero es más raro |
| Mucopolisacaridosis | Enzimas variables según el subtipo |  | Aparición de cataratas |
| Enfermedad de Wolman | Lipasa ácida lisosomal |  | Calcificación de glándulas suprarrenales |

› Bibliografía

1. Pericleous M, Kelly C, Wang T, Livingstone C, Ala A. Wolman's disease and cholesteryl ester storage disorder: the phenotypic spectrum of lysosomal acid lipase deficiency. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2017;2(9):670-9.
2. Taurisano R, Maiorana A, De Benedetti F, Dionisi-Vici C, Boldrini R, Deodato F. Wolman disease associated with hemophagocytic lymphohistiocytosis: attempts for an explanation. *Eur J Pediatr*. 2014;173(10):1391-4.
3. Porto AF. Lysosomal acid lipase deficiency: diagnosis and treatment of Wolman and cholesteryl ester storage diseases. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2014 Sep 1;12:125-32.
4. Rabah F, Al-Hashmi N, Beshlawi I. Wolman's disease with secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Hematol Oncol*. 2014;31(6):576-8.
5. Sadhukhan M, Saha A, Vara R, Bhaduri B. Infant case of lysosomal acid lipase deficiency: Wolman's disease. *BMJ Case Rep*. 2014;2014:bcr2013202652.
6. Elsayed S, Elsobky E, Tantawy A, Ragab E, Gil M, Lambert N, et al. Wolman disease in patients with familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL) negative mutations Wolman disease presenting as FHL. *Egypt J Med Hum Genet*. 2016;17(3):277-80.
7. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Informe de Posicionamiento Terapéutico de sebelipasa alfa (Kanuma®) en pacientes con déficit de lipasa ácida lisosomal. AEMPS; 2018. pp. 1-7. Disponible en: <https://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/informesPublicos/docs/IPT-sebelipasa-alfa-Kanuma-DLAL.pdf>.

Mujer joven con astenia y trombopenia

María Rodríguez González, Francisco José Cabrera Ruiz, Laura González Díaz, Gloria Moreno Carrasco, Myriam Revelles Peñas

Servicio de Hematología. Hospital Universitario Virgen de la Victoria. Málaga

› Motivo de consulta

Se trata de una mujer de 26 años que acude a urgencias por astenia intensa. Había iniciado unas semanas antes en otro centro un estudio por sospecha de síndrome linfoproliferativo que no llegaron a concluir.

› Historia clínica

Natural de la República Dominicana, la paciente no tenía antecedentes personales de interés; tampoco familiares. A su llegada, se encontraba clínica y hemodinámicamente estable. En la exploración física destacaba el hallazgo de adenopatías laterocervicales y supraclaviculares de pequeño tamaño, así como otras algo mayores en el área axilar de manera bilateral. El resto de la exploración por órganos y aparatos era rigurosamente normal.

› Pruebas complementarias

- **Pruebas analíticas.** En el hemograma destacaba una bicitopenia: anemia leve con hemoglobina (Hb) de 11,6 g/dL, volumen corpuscular medio (VCM) de 84,8 fL y plaquetas de $45 \times 10^9/L$. No se acompañaba de otras citopenias, siendo el recuento de leucocitos de $8,63 \times 10^9/L$ con fórmula normal. En el frotis de sangre periférica, además de comprobar la trombopenia, se objetivó la presencia de un 28% de células de aspecto blástico con 2 poblaciones: una minoritaria de células de pequeño tamaño y aspecto indiferenciado; y la población mayoritaria estaba formada por células de mediano y gran tamaño de aspecto pleomórfico, con una alta relación núcleo-citoplasma, contorno nuclear irregular con hendiduras o invaginaciones y, como característica más llamativa, citoplasma basófilo con una

intensa vacuolización que, en algunos elementos, también se disponía sobre el núcleo (Figura 1).

El estudio bioquímico revelaba una importante elevación de la lactato deshidrogenasa (LDH: 1.719 U/L), con cifras en rango del resto de los reactantes de fase aguda. La función renal, la hepática y el ionograma fueron normales.

Destaca que en la revisión del historial analítico no se encontraron alteraciones previas. Ante estos hallazgos, la paciente ingresó a cargo del Servicio de Hematología para completar el estudio.

- **Pruebas de imagen.** La radiografía de tórax mostraba ensanchamiento mediastínico (Figura 2), confirmandose posteriormente mediante tomografía computarizada (TC) como conglomerado adenopático en el mediastino anterior, además de en áreas supraclaviculares bilaterales y axilares.

- **Citometría de sangre periférica.** Estudiando las muestras iniciales de sangre periférica mediante citometría de flujo, se encontró una población del 12% de blastos según su expresión de CD34.

- **Estudio medular.** Se realizó el aspirado de médula ósea en el área esternal (con bastante dificultad en la extracción de muestras), para su estudio morfológico, citoquímico, citométrico y genético. La muestra obtenida presentaba grumos y un aspecto hiper celular y monomorfo a pequeño aumento.

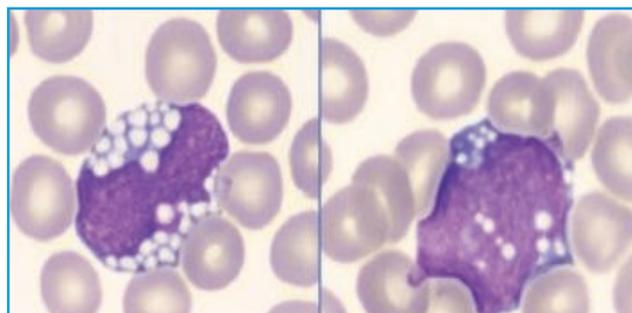


Figura 1. Morfología de blastos en sangre periférica.

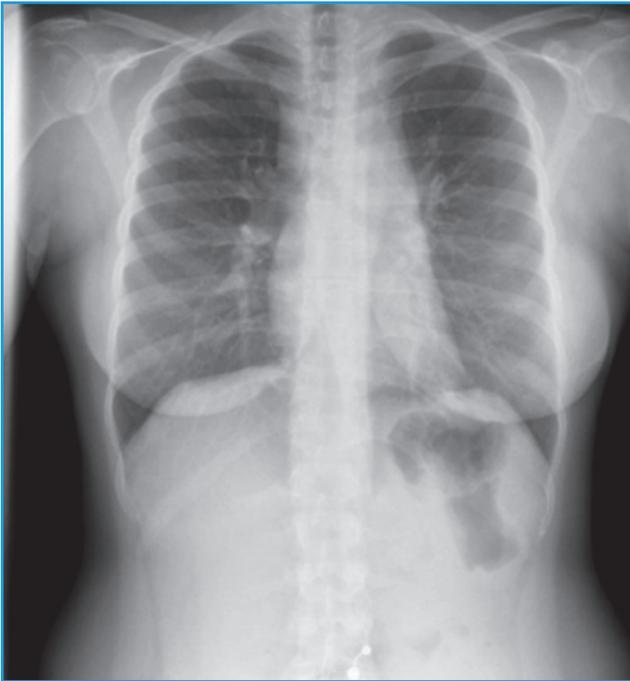


Figura 2. Ensanchamiento mediastínico, radiografía de tórax.

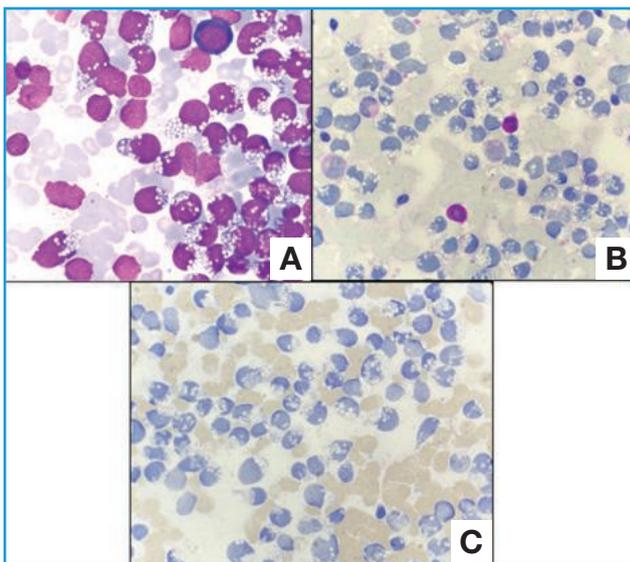


Figura 3. Morfología y citoquímica de médula ósea. A: MG-G; B: PAS; C: peroxidasa.

- **Mielograma:** con el objetivo $\times 4$ destacaba nuevamente una intensa vacuolización en la población blástica (observada previamente en sangre periférica). Con el objetivo $\times 100$ se caracterizaron como células de hábito blástico con morfología de tipo Burkitt, con cierto grado de anisocitosis, aunque predominando los elementos de mediano tamaño. Presentaban una mo-

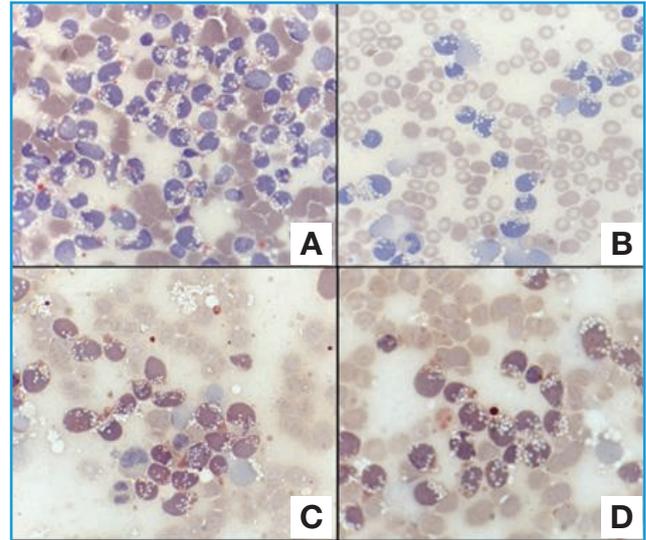


Figura 4. Citoquímica de médula ósea. A: fosfatasa ácida; B: tartrato; C: ANAE; D: ANAE, NaF.

derada relación núcleo-citoplasma, núcleo de contorno menos irregular que el visualizado en sangre periférica, observando invaginaciones nucleares en algunos elementos. La cromatina era de aspecto inmaduro con presencia de algún nucleolo poco definido. El citoplasma mostraba basofilia de grado medio (menos intensa que la que cabría esperar en un linfoma/leucemia de tipo Burkitt) e intensa vacuolización que llegaba a ocultar en ocasiones casi en su totalidad al citoplasma y parcialmente al núcleo. Con frecuencia se visualizaban células rotas y células blásticas en mitosis (**Figura 3A**).

- **Citoquímica:** la población blástica descrita fue positiva para fosfatasa ácida en un 48% (tartrato-sensible) y para alfa-naftil-acetatoesterasa en un 42% (sin inhibirse con fluoruro sódico) (**Figura 4**) y negativa para mieloperoxidasa y para la reacción del ácido periódico de Schiff (**Figuras 3B y C**).

Ante la morfología de tipo Burkitt y el comportamiento citoquímico atípico, se orientó como una leucemia aguda linfoblástica de estirpe T (LLA-T).

• **Citometría de médula ósea.** El estudio por citometría de flujo en una muestra de médula ósea mostró una población blástica (por expresión de CD34) de un 70%. Entre los marcadores positivos encontramos: CD3 de citoplasma, CD5, CD7, CD2, CD8, CD117, CD38 y TdT \pm (20%), siendo negativa la expresión de los marcadores CD45, CD13, CD33, cyMPO, cyCD79a, CD19, CD20, CD10, CD22, CD1 y CD3 de superficie (**Figura 5**).

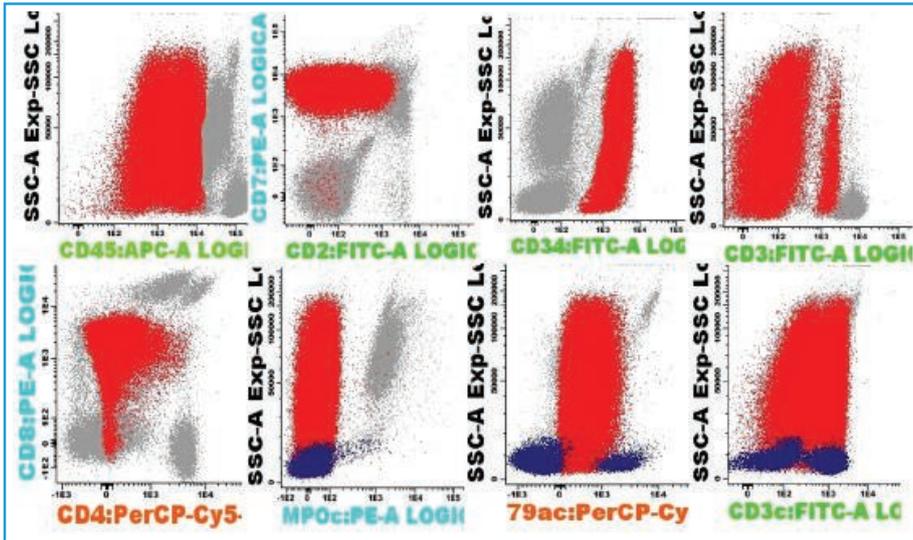


Figura 5. Estudio inmunofenotípico de médula ósea.

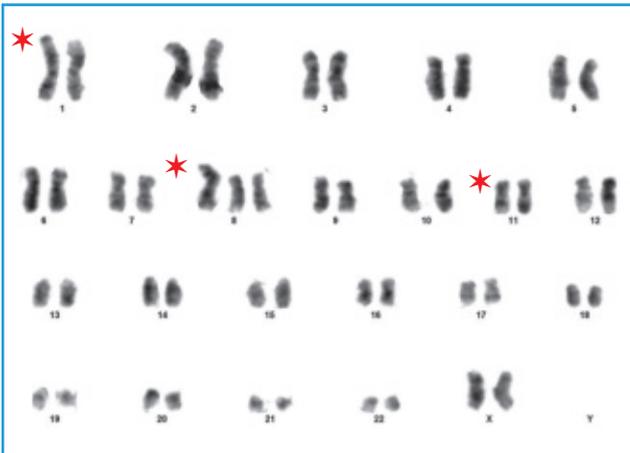


Figura 6. . Cariotipo: 47,XX,t(?1;11)(p3?:q23),+i(8)(q10)[30/30 o 100%].

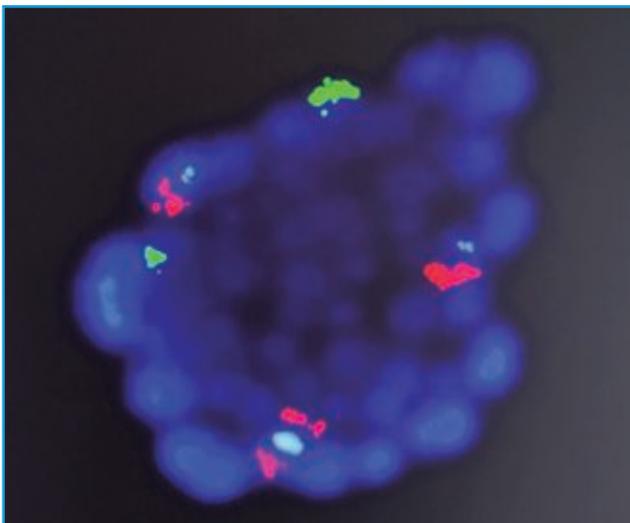


Figura 7. . Hibridación *in situ* fluorescente (FISH) de médula ósea para el reordenamiento IGH/MYC, con resultado negativo. Presencia de un isocromosoma 8q.

Es compatible con LLA de tipo T-II (pre-T) según la clasificación inmunológica del European Group of Immunological Classification of Leukemia (EGIL).

- **Estudio citogenético.** El cariotipo mostró un clon celular con translocación recíproca entre los cromosomas 1 y 11 (con puntos de rotura a nivel de las bandas 1p3 y 11q23) y un isocromosoma 8 extra (con puntos de rotura a nivel de la banda q10) (Figura 6).

Se realizaron dos estudios por hibridación *in situ* fluorescente (FISH). El primero (Figura 7) para el reordenamiento IGH/MYC mediante una sonda LSI TriColor®, con resultado negativo para la t(8;14). El segundo, mediante una sonda BreakApart® para el reordenamiento KMT2A (antiguo MLL), permitió detectar un reordenamiento positivo en uno de los cromosomas 11 (siendo su homólogo normal) con delección del brazo q, en consonancia con la translocación definida en el cariotipo (Figura 8).

El estudio por biología molecular para los reordenamientos del TCRgamma, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y electroforesis capilar en el ADN, no se pudo llevar a cabo por problemas técnicos.

› Diagnóstico

Leucemia linfoblástica T (según la Organización Mundial de la Salud –OMS–), con morfología Burkitt-like y reordenamiento de KMT2A.

› Evolución

La paciente inició tratamiento según el protocolo LLA-AR2011 del grupo PETHEMA, consiguiendo respuesta

» Discusión

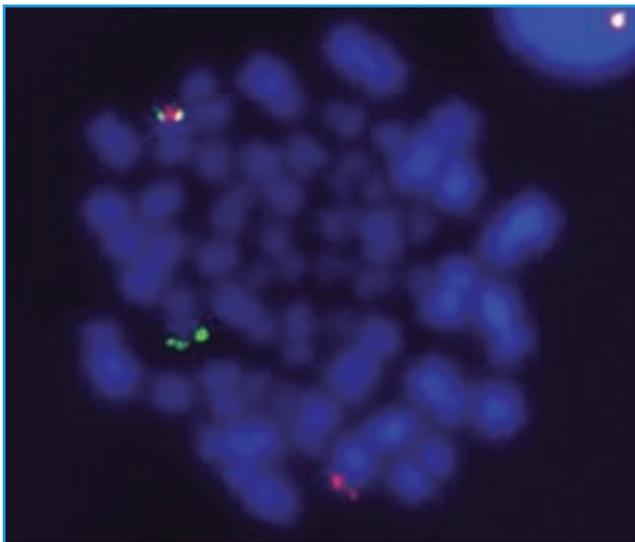


Figura 8. Hibridación *in situ* fluorescente (FISH) de médula ósea para el reordenamiento KMT2A (MLL), con resultado positivo.

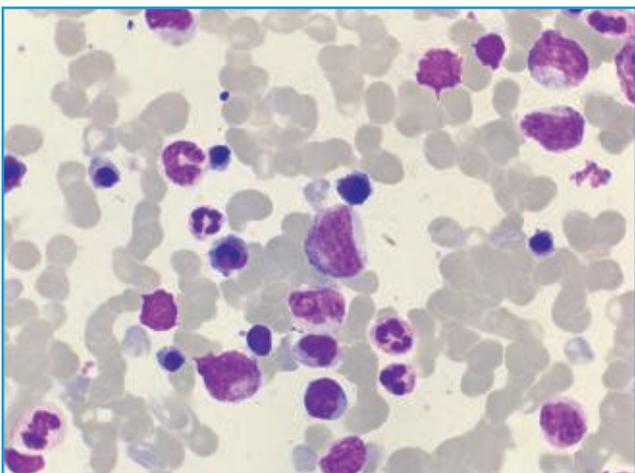


Figura 9. Morfología de médula ósea en respuesta completa tras la inducción.

completa morfológica y una enfermedad mínima residual (EMR) < 0,1% por citometría tras la inducción. El 1% de las células de aspecto blástico visualizadas tras la inducción fueron completamente distintas a los blastos del diagnóstico, siendo probablemente células regenerativas (Figura 9). Posteriormente, se administraron los tratamientos quimioterápicos de las 3 consolidaciones, sin complicaciones. Actualmente, la paciente se encuentra con muy buena evolución en la fase de consolidaciones tardías con reinducciones. El nivel de enfermedad residual, dentro de la evaluación al año del diagnóstico, fue < 0,005% en médula ósea y sangre periférica.

La principal sospecha diagnóstica en un primer momento fue el linfoma de Burkitt/leucemia de células de Burkitt, dada la morfología tan típica encontrada, en la que destacaba la intensa vacuolización y la imagen característica en cielo estrellado. Debido a la logística disponible en nuestro laboratorio, pudimos realizar un diagnóstico integrado en pocas horas que nos permitió, una vez analizado el comportamiento citoquímico y los resultados inmunofenotípicos, descartar la citada opción diagnóstica y orientar el caso hacia una LLA de estirpe T.

Aun así, cabe destacar otras posibles entidades distintas al linfoma de Burkitt en las que, aunque menos frecuente, se ha descrito morfología Burkitt-like; por tanto, serían entidades a tener en cuenta inicialmente dentro del diagnóstico diferencial. Entre los linfomas pueden tener esta morfología el linfoma Burkitt-like con alteración de 11q, el linfoma de célula B de alto grado, tanto con reordenamientos de *MYC* y *BCL2* y/o *BCL6* (linfomas doble o triple *hit*) como los "NOS" (no especificados de otra forma, sin estos reordenamientos). También el linfoma difuso de células grandes B (LDCG-B), entidad que típicamente comparte con nuestro caso la presentación clínica con afectación ganglionar pero en la que, sin embargo, no es habitual encontrar afectación de la médula ósea; en aquellos LDCG-B con afectación medular, la posible morfología de los blastos cuenta con 5 variedades, siendo la más frecuentemente encontrada la centroblastica. Las leucemias monoblasticas (variedad M5a de la clasificación francesa-americana-británica -FAB-) son otras de las entidades con posibilidad de presentarse con morfología Burkitt-like, siendo en los monoblastos más característico visualizar numerosos nucleolos y un citoplasma amplio con fina granulación azurófila, con una definitoria positividad para las esterasas inespecíficas e inhibición con fluoruro. Por último, en las leucemias linfoblásticas tanto de línea B como de línea T (como es nuestro caso), también se ha descrito morfología de tipo Burkitt, destacando por ejemplo alguna LLA pre-B (clasificación inmunológica), en las que son más habituales las morfologías de tipo L1 y L2. En estas leucemias linfoblásticas que pudieran presentarse con morfología Burkitt-like, es el estudio del inmunofenotipo el que permite diferenciar la línea y a su vez la clasificación.

En nuestra opinión, es en el anterior punto destacado donde reside el mayor interés de nuestro caso:

una entidad que parece morfológicamente una leucemia de Burkitt resulta ser finalmente una LLA-T por inmunofenotipo. En la bibliografía solo encontramos un caso recogido de LLA-T con morfología Burkitt-like, descrito en China en 2014, pero que expresaba marcadores aberrantes mieloides (como CD13+, CD33+ o CD15+), siendo catalogada como LLA-T con expresión mieloides aberrante por la Organización Mundial de la Salud (OMS), pero que usando los antiguos criterios del EGIL habría sido una bifenotípica. Nuestro caso, a diferencia del comentado, expresa únicamente marcadores de línea T.

En relación con las alteraciones citogenéticas de nuestra paciente al diagnóstico, revisando el atlas de genética y citogenética en oncohematología, en cuanto a la t(1;11)(p32;q23) existen muy pocos casos descritos en la literatura (en total 36). De ellos, 17 son LLA (en su mayoría CD19+, CD10-), correspondiendo el resto con 15 casos de leucemia mieloides aguda (LMA), 2 casos de leucemias bifenotípicas y 2 casos de síndromes mielodisplásicos. De las 17 LLA con t(1;11) el 76% son mujeres, situándose la mediana de edad al diagnóstico en 1 año. La mediana de supervivencia fue de 28 meses para las LLA. Entre las alteraciones citogenéticas adicionales al reordenamiento del *KMT2A* descritas, destacar la trisomía 21 o la delección 5q y la monosomía 7 en los casos de LMA. En los casos de LLA, únicamente está descrito un caso con trisomía 8 como alteración adicional al reordenamiento del *KMT2A*.

El isocromosoma 8 también es un hallazgo raro como anomalía única, encontrándose principalmente junto a otras aberraciones cromosómicas primarias. Más frecuentemente con t(9;22)(q34;q11), puede indicar evolución clonal a menudo asociada con la progresión de la enfermedad. Mientras que el cromosoma 8 extra es un marcador de evolución clonal común para la progresión en leucemia mieloides crónica (LMC), la aparición de i(8)(q10) solo se ha descrito raramente durante la transformación de la LMC.

› Conclusiones

- La morfología Burkitt no es específica de leucemia/linfoma de tipo Burkitt. Es importante tener en cuenta entidades que pueden presentar morfología Burkitt-like como linfomas (LDCG-B, linfoma de célula B de

alto grado, linfoma Burkitt-like con alteración de 11q), leucemias monoblásticas o LLA de línea B o T.

- En el caso presentado destaca la asociación de una morfología Burkitt-like a una citoquímica e inmunofenotipo de LAL-T, sin otros marcadores aberrantes.
- Conviene recordar que en el diagnóstico hematológico es fundamental completar el proceso con los resultados de todos los estudios y pruebas complementarias realizadas al paciente, destacando la importancia de integrar cada uno de ellos.

› Bibliografía

- Aribi A, Bueso-Ramos C, Estey E, Estrov Z, O'Brien S, Giles F, et al. Biphenotypic acute leukaemia: a case series. *Br J Haematol.* 2007;138:213-6.
- Bene MC, Nebe T, Bettelheim P, Buldini B, Bumbea H, Kern W, et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia.* 2011;25:567-74.
- Bongiovanni D, Saccomani V, Piovani E. Aberrant Signaling Pathways in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci.* 2017 Sep;18(9):1904.
- Coche D, Bergues B, Harnivel V, Guillaume N. Biphenotypic acute leukaemia with Burkitt-like cytology. *Ann Biol Clin (Paris).* 2009;67:437-40.
- De Braekeleer E, Meyer C, Douet-Guilbert N, Morel F, Le Bris MJ, Berthou C, et al. Complex and cryptic chromosomal rearrangements involving the MLL gene in acute leukemia: a study of 7 patients and review of the literature. *Blood Cells Mol Dis.* 2010 Apr 15;44(4):268-74.
- Douet-Guilbert N, Morel F, Le Bris MJ, Herry A, Morice P, Bourquard P, et al. Rearrangement of the MLL gene in acute myeloblastic leukemia: report of two rare translocations. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005 Mar;157(2):169-74.
- Hecht JL, Aster KC. Molecular biology of Burkitt's lymphoma. *J Clin Oncol.* 2000;18:3707-21.
- Meyer C, Burmeister T, Gröger D, Tsaur G, Fechina L, Renneville A, et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. *Leukemia.* 2018 Feb;32(2):273-84.
- Meyer C, Hofmann J, Burmeister T, Gröger D, Park TS, Emerenciano M, et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. *Leukemia.* 2013 Nov;27(11):2165-76.
- Meyer C, Schneider B, Jakob S, Strehl S, Attarbaschi A, Schnittger S, et al. The MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia.* 2006 May;20(5):777-84.
- Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J.* 2017 Jun;7(6):e577.
- Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 2009 Jul 30;114(5):937-51.
- Yue Q, Liu X, Chen L, Liu Z, Chen W. T-cell acute lymphoid leukemia resembling Burkitt leukemia cell morphology: a case report. *Oncol Lett.* 2015;9(3):1236-8.

Mujer de 28 años con trombocitosis extrema

M.^a Victoria de Poo Rodríguez, Elena Bonafonte Arruga,
Clara Auría Caballero, Gemma Azaceta Reinares
Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa. Zaragoza

› Motivo de consulta

Se trata de una mujer de 28 años remitida por su médico de atención primaria por un aumento exponencial de la cifra de plaquetas de una semana de evolución ($600 \times 10^9/L$, $1.000 \times 10^9/L$, $2.300 \times 10^9/L$).

› Historia clínica

Como antecedentes patológicos, destacaba un trastorno de la personalidad sin medicación en el momento actual. Sus analíticas previas no presentaban ninguna alteración. Negaba el consumo de alcohol y de drogas.

Clínicamente, predominaba una astenia moderada desde hacía una semana.

› Exploración física

Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) de 0. No se palpan adenopatías ni visceromegalias.

› Pruebas complementarias

- **Hemograma:** hemoglobina (Hb) de 92 g/L, volumen corpuscular medio (VCM) de 102 fL, leucocitos de $14,7 \times 10^9/L$ (neutrófilos 20,8%, linfocitos 25,3%, monocitos 53,8%, eosinófilos 0,1%, basófilos 0%) y plaquetas $2.987 \times 10^9/L$.

- **Bioquímica:** bilirrubina y transaminasas normales, función renal y ácido úrico sin alteraciones, lactato deshidrogenasa (LDH) de 525 U/L, potasio de 6,73 mmol/L, resto de los iones en rango normal.

- **Laboratorio de eritropatología:** reticulocitos de $66 \times 10^9/L$, eritropoyetina (EPO) de 35,81 mU/mL (5-14), vitamina B₁₂ de 307 pg/mL, ácido fólico de 3,3 ng/mL,

hierro de 259 µg/dL (37-145), transferrina de 221 mg/dL, índice de saturación de la transferrina (IST) de 92,28%, ferritina sérica de 148 ng/mL.

- **Serologías:** anti-IgG del virus de la hepatitis C (VHC), anti-HBsAg IgG del virus de la hepatitis B (VHB), anti-HBc IgG VHB, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus varicela zóster (VVZ) IgG, citomegalovirus (CMV) IgG, virus de Epstein-Barr (VEB) IgG y virus del herpes simple (VHS) negativos.

- **Frotis de sangre periférica:** displasia multilínea. Neutrófilos desgranulados con cromatinas hipercondensadas e hiposegmentación nuclear. Anisopoiquilocitosis, eritroblastos circulantes, defectos en la hemoglobinización y punteados basófilos groseros. Trombocitosis confirmada; plaquetas de gran tamaño con pseudonúcleo y prolongaciones pseudopódicas (Figuras 1 a 3). Blastos (51%) de talla media-grande con alta relación núcleo-citoplasma, citoplasmas basófilos agranulares, cromatina laxa y nucleolo visible.

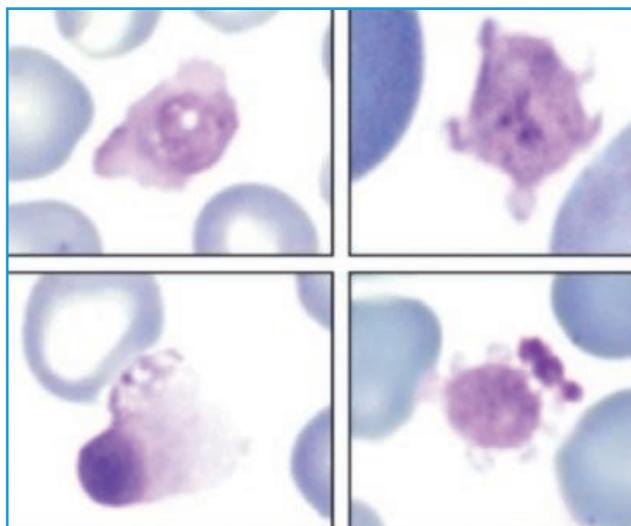


Figura 1. Frotis de sangre periférica (May-Grünwald-Giemsa $\times 1.000$). Displasia plaquetaria. Plaquetas de gran tamaño con pseudonúcleo y prolongaciones pseudopódicas.

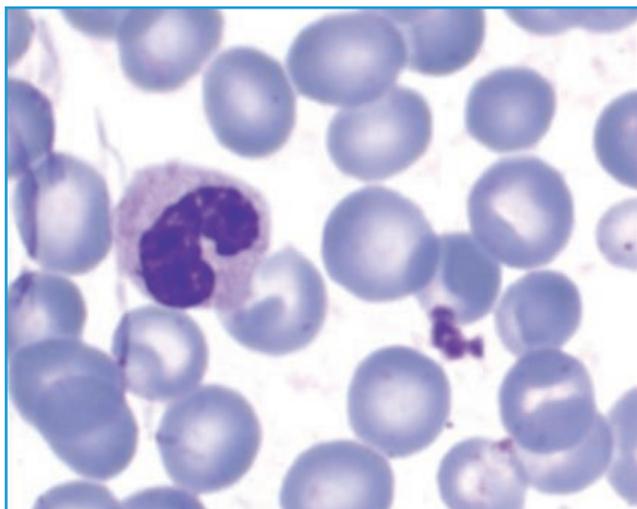


Figura 2. Frotis de sangre periférica (May-Grünwald-Giemsa $\times 1.000$). Neutrófilos desgranulados con cromatinas hipercondensadas e hipolobulación nuclear.

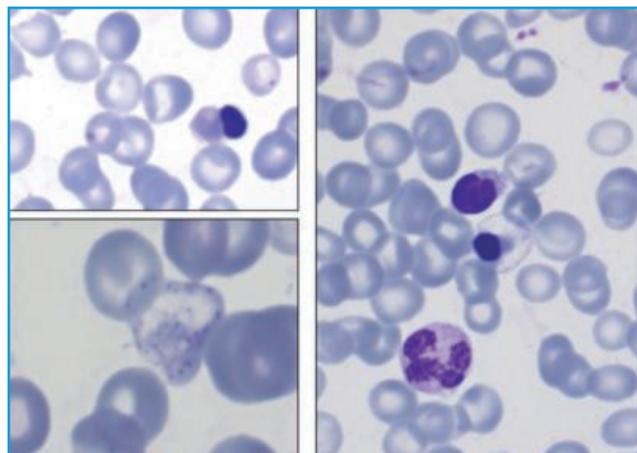


Figura 3. Frotis de sangre periférica (May-Grünwald-Giemsa $\times 1.000$). Displasia de serie roja. Eritroblastos circulantes. Defectos en la hemoglobinización. Punteado basófilo grosero.

Ocasional *cup like* nuclear y con mayor frecuencia mamelones o *blebs* citoplasmáticos (Figura 4).

- **Ecografía abdominal:** sin adenopatías ni visceromegalias.

- **Medulograma:** hipercelular con abolición de la vacuolización grasa. Serie megacariocítica muy incrementada; cúmulos de megacariocitos displásicos (80%) con formas de núcleos dispersos, así como elementos de talla pequeña hipo- y bilobulados (Figuras 5 a 7). La serie granulocítica representaba un 4% y la serie eritroide un 30%, siendo ambas displásicas. Los blastos suponían un 58%, siendo células de talla

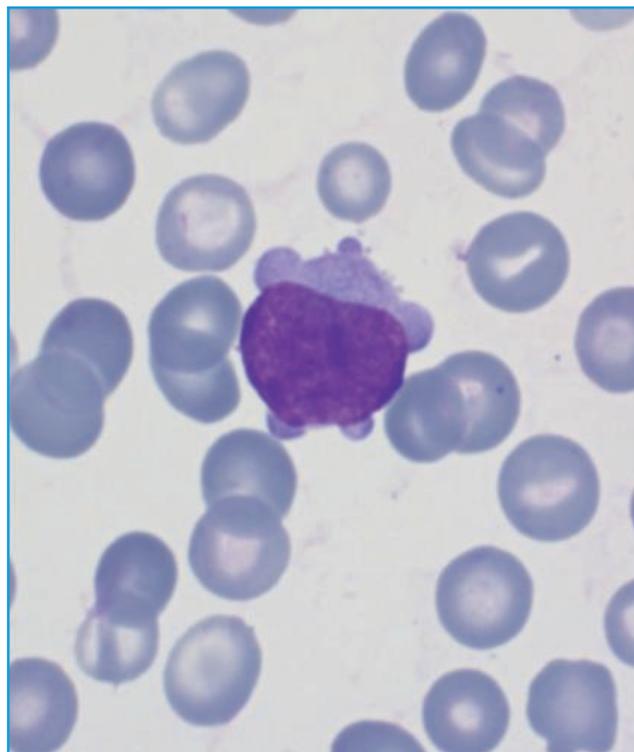


Figura 4. Frotis de sangre periférica (May-Grünwald-Giemsa $\times 1.000$). Blastos de talla mediana, cromatinas laxas con nucleolo visible. Destacan los mamelones o blebs periféricos.

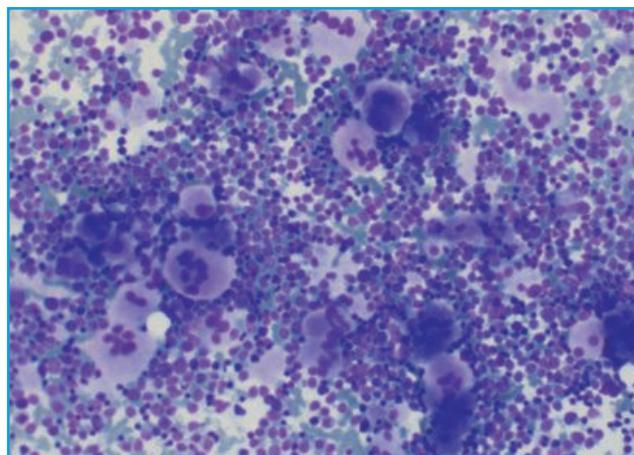


Figura 5. Aspirado de médula ósea (May-Grünwald-Giemsa $\times 100$). Médula hipercelular, serie megacariocítica incrementada y dismórfica. Elementos de núcleos dispersos, hipo- y bilobulados. Infiltrado blástico.

pequeña, pseudolinfoides, con alta relación núcleo-citoplasma, cromatina laxa con nucleolo visible y citoplasma de basofilia media agranular con frecuentes mamelones periféricos y clasmotosis.

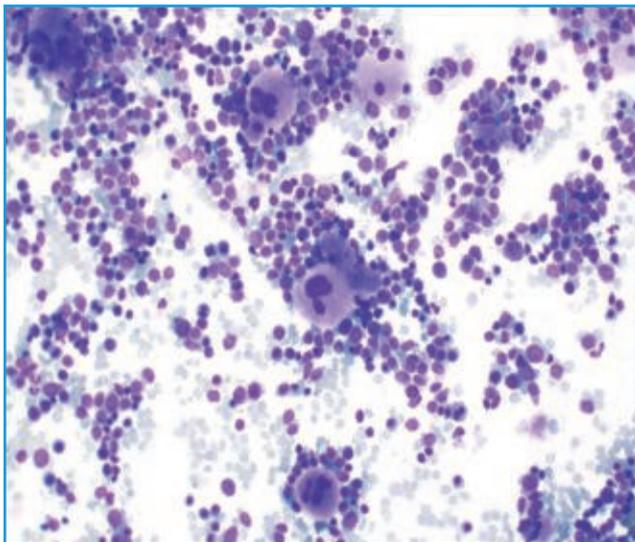


Figura 6. Aspirado de médula ósea (May-Grünwald-Giemsa $\times 500$). Displasia megacariocítica. Predominio de formas pequeñas hipoploides. Infiltrado blástico.

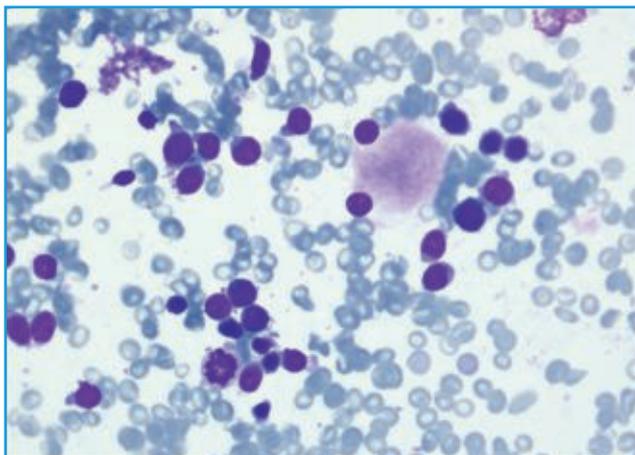


Figura 7. Aspirado de médula ósea (May-Grünwald-Giemsa $\times 500$). Megacariocitos monolobulados junto a células blásticas.

- **Citoquímica:** mieloperoxidasa negativa (**Figura 8**), alfa-naftil acetato esterasa positiva débil, difusa y ocasionalmente granular (**Figura 9**), ácido peryódico de Schiff (PAS) negativo (**Figura 10**), tinción de Perls con sideroblastos de tipo I 28%, de tipo II 17% y sideroblastos en anillo (SA) 18% (**Figura 11**).

- **Citometría de flujo (CMF):** población blástica del 73% sobre la celularidad leucocitaria con expresión de CD45 (+ débil), CD34+, CD117+, MPOc-, CD 33+, CD15-, CD13+, CD41-, HLA-DR+, marcadores de línea linfoide, eritroide y monocítica negativos.

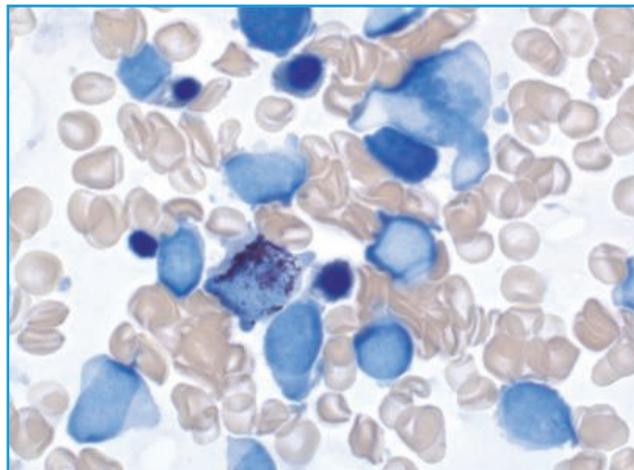


Figura 8. Aspirado de médula ósea (mieloperoxidasa $\times 1.000$). Citoquímica: blastos mieloperoxidasa negativos.

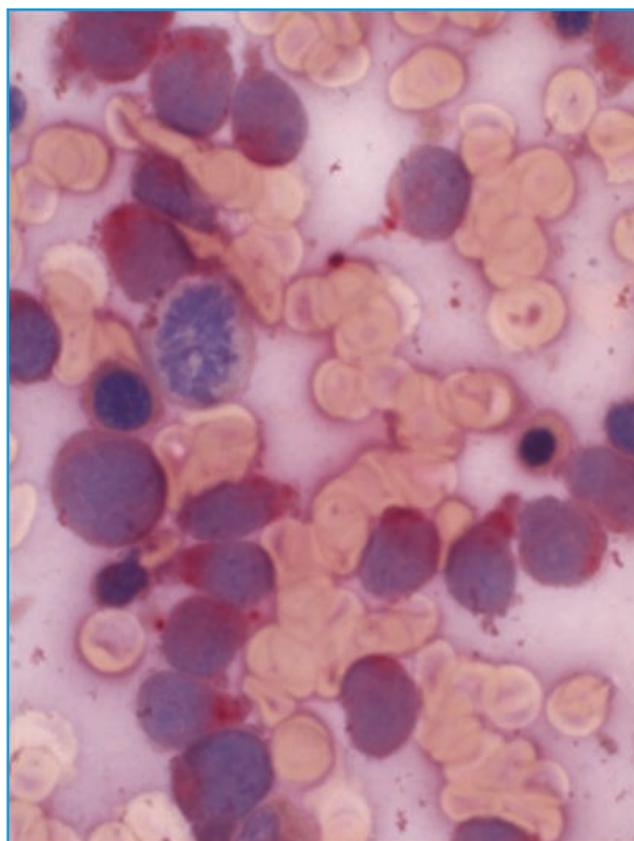


Figura 9. Aspirado de médula ósea (alfa naftil acetato esterasa $\times 1.000$). Positiva débil, difusa y ocasionalmente granular.

- **Estudio citogenético.** Cariotipo: 46,XX,inv(3)(q21q26)[30] (**Figura 12**). Hibridación *in situ* fluorescente (FISH) (del7q), (del5q) negativos, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) *BCR.ABL1* (p190, p210, p230) negativa, PCR *JAK-2* negativa.

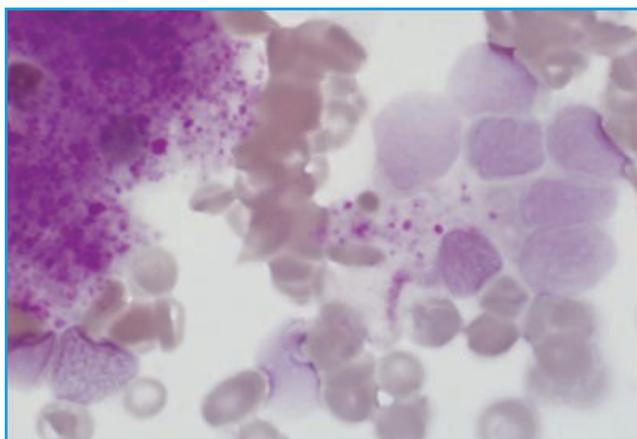


Figura 10. Aspirado de médula ósea (ácido periódico de Schiff -PAS- × 1.000). Blastos negativos.

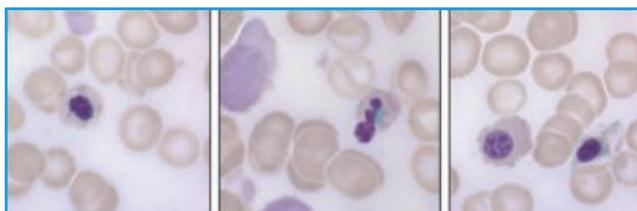


Figura 11. Aspirado de médula ósea (tinción de Perls × 1.000). Sideroblastos en anillo.

- **Next generation sequencing (NGS):** variantes en los genes SF3B1 (42%), GATA2 (42%), KRAS (12%), NRAS (11%), PTPN11 (7%) e IKZF1 (43%).

- **Estudio genómico de predisposición a neoplasias mieloides NGS (células CD3+ sangre periférica):** negativo.

› Diagnóstico

Leucemia mieloide aguda (LMA) con anomalías genéticas recurrentes $inv(3)(q21.3q26.2)$; GATA2, MECOM.

› Evolución

Recibe tratamiento de inducción con idarubicina y citarabina según el protocolo PETHEMA 2017 LMA < 65 años, alcanzando respuesta completa morfológica y enfermedad mínima residual (EMR) negativa (< 0,1%), cariotipo normal, así como ausencia de variantes génicas por NGS tras el tratamiento. Se ad-

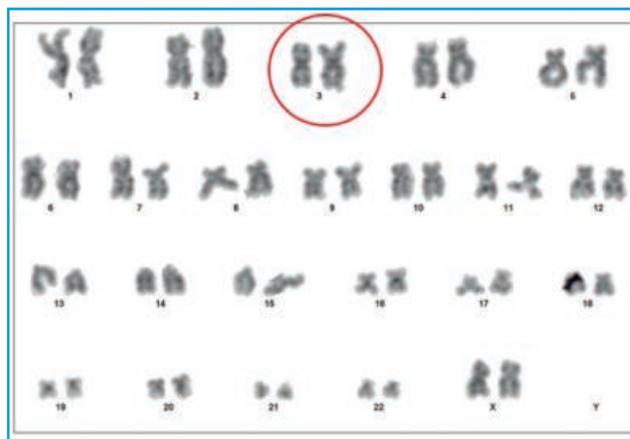


Figura 12. Cariotipo: 46,XX, $inv(3)(q21q26)$ [30].

ministra la consolidación 1 y se realiza trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) de donante no emparentado (DNE) HLA-idéntico 10/10 acondicionado con fludarabina-busulfán (Flu-Bu), quimerismo día +28, +100: mixto 78% del donante. A los 4 meses del trasplante recae, con infiltración blástica en la médula ósea del 30%.

Se introduce en un ensayo clínico fase III multicéntrico controlado con placebo: citarabina (ara-C) ± idasanutlin (antagonista de MDM2), sin obtener respuesta.

Actualmente, a los 11 meses del diagnóstico, dada la recaída precoz postrasplante, la paciente se encuentra en la tercera línea de tratamiento con venetoclax + azacitidina.

› Discusión

La LMA $inv(3)(q21.3q26.2)/t(3;3)(q21.3;q26.2)$; GATA2, MECOM solo supone del 1 al 2% de todas las LMA y se da sobre todo en adultos⁽¹⁾. La mayoría de los casos (82,6%) son *de novo* y el 17,4% relacionados con terapia.

Las primeras descripciones relacionando las alteraciones en el cromosoma 3 con el hallazgo de trombocitosis en LMA datan de los años ochenta y ya en esa década⁽²⁾ se constató que existía displasia en varias líneas hematopoyéticas, siendo especialmente frecuentes las anomalías en la serie megacariocítica, y que la baja supervivencia con resistencia al tratamiento era la norma en estos casos. Así, a principios de los noventa, se comenzó a considerar un "síndrome

3q21.3q26.2⁽³⁾ referido a síndrome mielodisplásico (SMD), LMA o crisis blástica de neoplasia mieloproliferativa (NMP) con alteración a ese nivel del cromosoma 3 y trombocitosis anómala.

Los signos guía a nivel morfológico que nos pueden hacer sospechar la presencia de esta anomalía son la displasia multilínea con destacada hiperplasia megacariocítica dismórfica (predominando los elementos hipoploides) y la trombocitosis⁽¹⁾.

Con respecto a las características clínico-biológicas, la inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2) reposiciona un potenciador (*enhancer*) distal de *GATA2* que activa la expresión del oncogén *MECOM*, y, simultáneamente, confiere haploinsuficiencia de *GATA2*. Es preciso señalar que la sobreexpresión de *MECOM* no está limitada a esta entidad; sirva como ejemplo la t(3;21)(q26.2;q22.1) que da lugar a la fusión *MECOM-RUNX1* y aparece en general en neoplasias mieloides relacionadas con terapia (NMRT)⁽¹⁾.

Por lo general, la supervivencia global (SG) es inferior al año y las respuestas al tratamiento son desalentadoras, independientemente del número de blastos al diagnóstico, de tal modo que numerosos autores y trabajos avalan que esta entidad pueda ser diagnosticada con una cifra de blastos < 20%, al igual que otras LMA con anomalías genéticas recurrentes, ya que la evolución y el tratamiento no difiere⁽⁴⁾. Por el momento, la última revisión de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) aún no clasifica esos casos como LMA, pero sí recomienda su manejo como tal⁽¹⁾.

Por otra parte, la incidencia de trombocitosis en LMA no es habitual; sin embargo, la LMA inv(3)(q21.3q26.2)/t(3;3)(q21.3q;26.2); *GATA2*, *MECOM* suele debutar con cifras de plaquetas normales o incluso elevadas (7-22% según la OMS)⁽¹⁾. En 1993 ya se publicó un estudio en 24 pacientes que relacionaba anomalías del brazo largo del cromosoma 3 (3q)⁽⁵⁾ con la presencia de trombocitosis (16% con > 500 × 10⁹/L). En estudios multicéntricos con un número importante de casos (103 SMD y LMA con esta alteración genética)⁽⁴⁾, un 5% presentaron cifras de plaquetas altas, con un máximo de 1.395 × 10⁹/L. El Grupo Español de Citología Hematológica (GECH) publicó una serie de 35 casos⁽⁶⁾, en la que un 5,7% tenía cifras de plaquetas > 450 × 10⁹/L, similar a otra serie de 30 casos⁽⁷⁾ que arrojaba un 6,7%.

Sin embargo, las cifras millonarias de plaquetas no son habituales, habiéndose comunicado en la mayo-

ría de las series máximos en torno al millón y medio^(4,8) (nuestra paciente debutó con > 3 millones/mm³). Se han objetivado diferencias raciales a este respecto, de modo que los asiáticos parecen presentar recuentos plaquetarios superiores a los occidentales⁽⁹⁾. Casos con cifras superiores a 2 y 3 millones de plaquetas se han comunicado en LMA con alteración a nivel de 3q21, aunque en el contexto de otras translocaciones como t(1;3)⁽¹⁰⁾ y t(3;16;7)⁽¹¹⁾.

Respecto al impacto clínico que pudiera tener dicha trombocitosis, no se ha documentado un incremento de eventos isquémicos o trombóticos, y tampoco relación con la supervivencia global⁽⁴⁾.

La trombocitosis extrema obliga a realizar un diagnóstico diferencial con cuadros mieloproliferativos. En relación con nuestro caso, con una cifra de blastos > 20% solo cabría considerar una transformación blástica de una patología previa no diagnosticada, teniendo en cuenta que, además, la alteración inv(3)(q21.3q26.2)/t(3;3)(q21.3;q26.2) puede darse ocasionalmente en otras neoplasias mieloides como la leucemia mielode crónica (LMC)⁽¹²⁾ (en fase acelerada o en crisis blástica), NMP Philadelphia (Ph)(-)⁽¹³⁾ y SMD/NMP⁽¹⁴⁾ como leucemia mielomonocítica crónica (LMMC).

A este respecto, ya se ha expuesto la ausencia de analíticas previas alteradas y visceromegalias, y la negatividad de *BCR-ABL* y de mutaciones en *JAK-2/CALR/MPL* que pudieran hacer sospechar un cuadro mieloproliferativo previo. No fue posible, por rechazo de la paciente (hubiera sido interesante), la realización de biopsia de médula ósea en la que analizar la morfología megacariocítica, ya que, respecto a NMP Ph(-) se ha publicado que a veces coexisten los megacariocitos hipoploides de este tipo de LMA con los hiperlobulados de la NMP. La media de tiempo desde el diagnóstico de NMP a la detección de la anomalía en 3q26.2 es de 44 meses (rango de 1 a 219 meses), por lo que no sería absolutamente imposible, aunque sí muy improbable, dado que la incidencia es de un 0,8%⁽¹³⁾. En cuanto a una LMMC previa, en ningún momento se constató monocitosis.

El hallazgo citológico de SA y la mutación en *SF3B1*, junto a la trombocitosis, también nos harían considerar una posible mielofibrosis (MF) previa o incluso un SMD/NMP con SA y trombocitosis. Sin embargo, ningún dato analítico, clínico o molecular apoyaría este supuesto.

La incidencia y el significado de los SA y *SF3B1* mutado en LMA *de novo* fueron estudiados⁽¹⁵⁾ en 1.857 ca-

sos (excluidas LMA con alteraciones genéticas recurrentes), hallando cifras de SA iguales o mayores al 15% en el 10% de los casos.

En contraste con lo que ocurre en los SMD de bajo grado con SA (en los que se observa una frecuencia inferior de citogenética adversa y menos mutaciones en genes asociados a mal pronóstico, como *TP53*), en la LMA con SA se halló mayor frecuencia de citogenética adversa (54%) (especialmente *TP53* mutado). Sin embargo, esto no se tradujo en menor supervivencia global. La incidencia de mutación del gen del espliceosoma *SF3B1* en LMA *de novo*, en teoría, es baja (está más asociada a LMA secundaria, al igual que el resto de las mutaciones del espliceosoma)⁽¹⁶⁾.

El hecho cierto de la asociación preferente de mutación en *SF3B1* en casos de LMA "secundaria" (con SMD, NMP, SMD/NMP previo o relacionada con terapia) aún podría sustentar más la hipotética posibilidad en nuestro caso de una posible patología mielóide previa no conocida. Los hallazgos moleculares de esta serie⁽¹⁵⁾, como ausencia de exclusión mutua significativa entre *NPM1* (propio de casos *de novo*) y otras mutaciones significativamente representadas en casos secundarios, como *ASXL1* o *SF3B1*, muestran que la LMA con SA presenta una ontogenia compleja que parece compartir características entre las LMA *de novo* y las secundarias.

Sin embargo, el panorama molecular⁽¹⁶⁾ cambia al hablar de LMA con *inv(3)(q21.3q26.2)/t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM* (una entidad que aparece eminentemente *de novo*), ya que el 98% de los casos presentan mutación de genes que activan la vía de señalización *RAS/RTK*, ocupando las mutaciones en genes del espliceosoma el segundo lugar en frecuencia, apareciendo en un 29% de los casos (y de ellas, el 92% corresponde a *SF3B1* mutado). Además, la mutación en *SF3B1* se asocia con frecuencia a mutación en *GATA2*, lo que explicaría su alta presencia en esta entidad. También se asocia a monosomía del cromosoma 7 (68%) y en cambio coexiste en pocos casos (5%) con *TP53* mutado (a diferencia de lo hallado en LMA *de novo* sin anomalías genéticas recurrentes en estudios previos)^(16,17).

¿Podría esto tener algún impacto en la evolución clínica? En esta cohorte de 41 casos no se hallaron diferencias en SG, supervivencia libre de progresión (SLP) o características clínicas en función del perfil mutacional⁽¹⁷⁾. Y, dada la baja incidencia de esta LMA y su corta supervivencia mediana (10 meses), hasta

el momento no se ha identificado claramente un factor molecular con valor pronóstico independiente que contribuya a un mayor conocimiento fisiopatológico de esta enfermedad.

› Para recordar

- Ante trombocitosis en el debut de una LMA, es preciso excluir anomalías del brazo largo del cromosoma 3, en concreto, LMA *inv(3)(q21.3q26.2)/t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM* (con menos frecuencia, ocurre en otros casos, como en la leucemia aguda megacarioblástica).
- La displasia multilínea no es exclusiva de "LMA con cambios relacionados con mielodisplasia", sino que aparece con frecuencia en algunas LMA con anomalías genéticas recurrentes, como LMA *inv(3)(q21.3q26.2)/t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM*.
- Dismegacariopoyesis marcada e hiperplasia megacariocítica son hallazgos constantes en la LMA *inv(3)(q21.3q26.2)/t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM*.
- La mutación en el gen del espliceosoma *SF3B1* es frecuente (27%) en la LMA *inv(3)(q21.3q26.2)/t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM* y, por tanto, también los SA, no habiéndose demostrado un valor pronóstico independiente en la evolución de la entidad.
- La LMA *inv(3)(q21.3q26.2)/t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM* se presenta en más del 80% de los casos *de novo*, pero también se ha descrito como evolución de SMD, NMP, SMD/NMP y relacionada con terapia. Dado que la mutación de *SF3B1* se asocia con más frecuencia a LMA "secundarias", su hallazgo en este contexto obliga a una investigación minuciosa a fin de establecer el carácter primario o no de la enfermedad.

› Bibliografía

1. Arber DA, Brunning RD, Le Beau MM, Falini B, Vardiman JW, Porwit A, et al. Acute myeloid leukemia with recurrent genetic abnormalities. En: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. (eds.). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised Fourth Edition. Lyon: IARC; 2017. pp. 130-49.
2. Jenkins RB, Tefferi A, Solberg LA Jr, Dewald GW. Acute leukemia with abnormal thrombopoiesis and inversions of chromosome 3. *Cancer Genet Cytogenet.* 1989;39(2):167-79.
3. Jotterand Bellomo M, Parlier V, Mühlematter D, Grob JP, Beris P. Three new cases of chromosome 3 rearrangement in bands q21 and q26 with abnor-

- mal thrombopoiesis bring further evidence to the existence of a 3q21q26 syndrome. *Cancer Genet Cytogenet.* 1992 Apr;59(2):138-60.
4. Rogers HJ, Vardiman JW, Anastasi J, Raca G, Savage NM, Cherry AM, et al. Complex or monosomal karyotype and not blast percentage is associated with poor survival in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome patients with inv(3)(q21q26.2)/t(3;3)(q21;q26.2): a Bone Marrow Pathology Group study. *Haematologica.* 2014 May;99(5):821-9.
 5. Grigg AP, Gascoyne RD, Phillips GL, Horsman DE. Clinical, haematological and cytogenetic features in 24 patients with structural rearrangements of the Q arm of chromosome 3. *Br J Haematol.* 1993;83(1):158-65.
 6. Raya JM, Martín-Santos T, Luño E, Sanzo C, Pérez-Sirvent ML, Such E, et al.; Grupo Español de Citología Hematológica (GECH), Working Group into the Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH). Acute myeloid leukemia with inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2): clinical and biological features and comparison with other acute myeloid leukemias with cytogenetic aberrations involving long arm of chromosome 3. *Hematology.* 2015 Sep;20(8):435-41.
 7. Sun J, Konoplev SN, Wang X, Cui W, Chen SS, Medeiros LJ, et al. De novo acute myeloid leukemia with inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2): a clinicopathologic and cytogenetic study of an entity recently added to the WHO classification. *Mod Pathol.* 2011 Mar;24(3):384-9.
 8. Calderón-Cabrera C, Falantes JF, Bernal R, Pérez-Simón JA. [Myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2) abnormality]. *Med Clin (Barc).* 2015 Sep 7;145(5):224-6.
 9. Gong X, Yu T, Tang Q, Fu Y, Wu J, Zhu Y, et al. Unusual findings of acute myeloid leukemia with inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2): a multicenter study. *Int J Lab Hematol.* 2019 Jun;41(3):380-6.
 10. Lim G, Kim MJ, Oh SH, Cho SY, Lee HJ, Suh JT, et al. Acute myeloid leukemia associated with t(1;3)(p36;q21) and extreme thrombocytosis: a clinical study with literature review. *Cancer Genet Cytogenet.* 2010 Dec;203(2):187-92.
 11. Chang VT, Aviv H, Howard LM, Padberg F. Acute myelogenous leukemia associated with extreme symptomatic thrombocytosis and chromosome 3q translocation: case report and review of literature. *Am J Hematol.* 2003 Jan;72(1):20-6.
 12. Wang W, Cortes JE, Lin P, Beaty MW, Ai D, Amin HM, et al. Clinical and prognostic significance of 3q26.2 and other chromosome 3 abnormalities in CML in the era of tyrosine kinase inhibitors. *Blood.* 2015 Oct 1;126(14):1699-706.
 13. Hu Z, Medeiros J, Wang W, Chen Z, Tang G, Hodjat P, et al. 3q26.2/EV11 rearrangement is associated with poor prognosis in classical Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *Modern Pathol.* 2017;30:940-5.
 14. Hu Z, Hu S, Ji Ch, Tang Z, Thakral B, Loghavi S, et al. 3q26.2/EV11 rearrangement in myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms: an early event associated with a poor prognosis. *Leuk Res.* 2018;65:25-8.
 15. Martín-Cabrera P, Jeromin S, Perglerová K, Haferlach C, Kern W, Haferlach T. Acute myeloid leukemias with ring sideroblasts show a unique molecular signature straddling secondary acute myeloid leukemia and de novo acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2017 Apr;102(4):e125-e128.
 16. Lindsley RC, Mar BG, Mazzola E, Grauman PV, Shareef S, Allen SL, et al. Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. *Blood.* 2015 Feb 26;125(9):1367-76.
 17. Gröschel S, Sanders MA, Hoogenboezem R, Zeilemaker A, Havermans M, Erpelinck C, et al. Mutational spectrum of myeloid malignancies with inv(3)/t(3;3) reveals a predominant involvement of RAS/RTK signaling pathways. *Blood.* 2015 Jan 1;125(1):133-9.

LAS NUEVAS TECNOLOGÍAS APLICADAS AL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DEL LINFOMA DIFUSO DE CÉLULA-B GRANDE

Coordinadores

Dr. José Tomás Navarro Ferrando. Institut Català d'Oncologia.

Hospital Universitario Germans Trias i Pujol. Badalona, Barcelona

Dr. Antonio Gutiérrez García. Hospital Universitario Son Espases. Palma de Mallorca

Los avances que se han producido en los últimos años en la biología molecular hacen que nos encontremos en una nueva era en la que las herramientas diagnósticas clásicas se han visto complementadas y reforzadas por las nuevas técnicas de secuenciación masiva. Este hecho, junto al extraordinario desarrollo de la inmunoterapia y la terapia celular, hace que se esté abandonando el tratamiento de las hemopatías malignas, entre ellas el linfoma difuso de célula B grande (LDCBG), basado en la quimioterapia combinada, para pasar a terapias más dirigidas a dianas terapéuticas. Estos hechos nos llevan a una medicina de precisión, que ya podemos intuir actualmente, aunque es de esperar que en los próximos años sea capaz de definir tratamientos específicos a la carta para los diversos subgrupos moleculares de estos linfomas. Sin embargo, tenemos al menos dos grandes retos para alcanzar este ambicioso objetivo. En primer lugar, obtener una definición más precisa, contrastada y reproducible de los diversos subgrupos moleculares susceptibles de ser tratados de forma diferencial. Hasta la fecha, la mayoría de los ensayos que han testado mejoras en el tratamiento de los LDCBG con la adición de nuevos fármacos al R-CHOP, tales como el *Robust* con la lenalidomida o el *Phoenix* con el ibrutinib, se han basado en una clasificación de célula de origen en LDCBG generada a partir de perfiles de expresión génica que ya sabemos que está incompleta y que recientes estudios basados en técnicas de secuenciación masiva, como los *clusters* de Harvard o los subtipos genéticos del National Cancer Institute (NCI), han superado ampliamente. Ello ha llevado a que los resultados negativos de los mencionados ensayos sean muy imprecisos y difíciles de interpretar. Y aquí conectamos con el segundo gran reto: ser capaces de testar estos nuevos subgrupos génicos o *clusters* dentro de ensayos ya llevados a cabo o de nuevo diseño, que nos permiten hacer realidad el objetivo de una medicina de precisión validada con la que poder tomar decisiones efectivas en la práctica clínica habitual.

En este simposio se pretende actualizar a los hematólogos en las aplicaciones que las nuevas tecnologías tienen en el LDCBG, tanto en el diagnóstico como en el tratamiento, y, con ello, dar una visión de cómo se está aplicando la medicina de precisión en este linfoma.

El Dr. Lenz del Hospital Universitario de Munster nos ilustrará acerca de cómo un mejor entendimiento de la biología del LDCBG puede tener implicaciones terapéuticas. En particular, nos pondrá un ejemplo de la búsqueda de terapias diana que puedan mejorar los resultados en subtipos moleculares específicos, a través de su experiencia con inhibidores de PI3K alfa/delta, el copanlisib. Nos mostrará cómo comenzando desde modelos en líneas celulares *in vitro*, pasando por modelos murinos, han acabado testando el fármaco en ensayos clínicos con el objetivo de definir los perfiles moleculares con mejores respuestas. Finalmente, estos hallazgos pueden llevar a obtener modelos de predicción de respuesta y resistencia, capaces de seleccionar aquellos pacientes candidatos a recibir estos nuevos fármacos combinados con el estándar R-CHOP en primera línea.

LAS NUEVAS TECNOLOGÍAS APLICADAS AL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DEL LINFOMA DIFUSO DE CÉLULA-B GRANDE

La Dra. Alonso Sarasquete, del Hospital Universitario de Salamanca, realizará una revisión sobre la utilidad de la biopsia líquida en el diagnóstico y el seguimiento del LDCBG. Revisará los principales estudios publicados en este campo y, además, nos presentará los datos de su centro. De esta forma, tendremos un resumen muy fidedigno de cómo podemos utilizar la biopsia líquida, tanto en el diagnóstico del LDCBG como para monitorizar la respuesta al tratamiento y detectar recaídas del linfoma antes de su presentación clínica. Además, nos ilustrará sobre los nuevos horizontes que abre esta técnica en la medicina de precisión.

La Dra. Giné nos hablará de los avances en el tratamiento del LDCBG, que vienen de la mano de la inmunoterapia y la terapia celular. En primer lugar, revisará los resultados obtenidos con los nuevos anti-CD20, los anticuerpos monoclonales con especificidades diferentes al CD20, los anticuerpos monoclonales conjugados y los biespecíficos. A continuación, nos hablará de las perspectivas que los inhibidores del *check-point* inmune ofrecen en el tratamiento del LDCBG. Finalmente, abordará los últimos avances en la terapia celular en este linfoma. Primero, revisando el papel actual del alotrasplante de progenitores hematopoyéticos y, finalmente, revisando la terapia CART disponible en la actualidad, repasando sus resultados en el LDCBG, su toxicidad y los ensayos clínicos que se están realizando actualmente.

La biopsia líquida en el linfoma difuso de célula B grande

M. Alcoceba, M. García-Álvarez, A. Martín García-Sancho, L. G. Díaz González, P. Tamayo, R. García-Sanz, M. E. Alonso Sarasquete
Complejo Asistencial Universitario de Salamanca

› ¿Qué es la biopsia líquida?

El término biopsia líquida (BL) fue acuñado hace más de una década por Pantel y Alix-Panabières para definir el uso de una prueba sanguínea como alternativa para proporcionar la misma información genética obtenida de una muestra de biopsia tisular⁽¹⁾. La BL presenta numerosas ventajas respecto a la biopsia tradicional. Dado que es mínimamente invasiva, permite la toma de muestra en varios momentos y así abordar la heterogeneidad temporal y su evolución clonal. Además, la BL refleja la heterogeneidad global del tumor, ya que no se limita a una región específica, por lo que también permite estudiar la presencia de diferentes subclones tumorales localizados en distintas regiones anatómicas del individuo, es decir, es capaz de identificar las distintas alteraciones consecuencia de la heterogeneidad espacial de los tumores.

Existen diferentes analitos que pueden ser determinados en la muestra de BL, tales como el ADN circulante (ADNc), ARN circulante (ARNc), exosomas, etc. No obstante, en el presente trabajo nos centraremos exclusivamente en el ADNc tumoral (ADNct) o fracción del ADNc derivado del tumor. El ADNct presenta como principal característica reflejar las alteraciones moleculares (variaciones de nucleótido simple -SNV-, translocaciones y/o variaciones en el número de copias) presentes en el tumor primario, permitiendo de esta forma la caracterización genética del mismo.

› La biopsia líquida en hematología

Al igual que en los tumores sólidos, en las neoplasias hematológicas la información contenida en el ADNct es más representativa del genoma tumoral que la derivada de una muestra puntual de médula ósea o de una biopsia ganglionar, hecho que queda demostra-

do a través de numerosas publicaciones en mieloma múltiple (MM)⁽²⁾.

La mayoría de las neoplasias hematológicas son circulantes, por lo que resulta fácil acceder a las células tumorales a través del torrente circulatorio. No obstante, en el caso de los linfomas, estos se manifiestan en compartimentos tisulares como órganos linfoides secundarios desde los que no circulan, asemejándose más así al comportamiento de un tumor sólido. Es por ello que, en este subgrupo de neoplasias hematológicas la BL cobra un papel importante tanto a nivel diagnóstico, para la identificación de marcadores tumorales, como durante y después del tratamiento, para el seguimiento de la enfermedad.

Dentro de los LNH, la entidad más frecuente es el linfoma difuso de célula B grande (LDCBG), caracterizado por su heterogeneidad clínica y biológica. Actualmente, varios grupos han abordado la caracterización molecular de la célula tumoral del LDCBG empleando la BL. Así Rossi *et al.*⁽⁴⁾ analizaron mediante secuenciación masiva (Next Generation Sequencing -NGS-) una serie de muestras pareadas de ADNct obtenido a partir del plasma y de ADN tumoral procedente de la biopsia (n = 36). Los resultados mostraron que el ADNct refleja la mayoría de las mutaciones presentes en la biopsia tisular, especialmente aquellas con una frecuencia alélica superior al 20% en el tumor, con una sensibilidad del 90% y una especificidad del 100%. También observaron que en el ADNct se detectaban mutaciones que no estaban en la biopsia tisular, probablemente debido a la heterogeneidad espacial del tumor. Otros grupos han analizado series pareadas similares llegando incluso a clasificar los pacientes en los subtipos moleculares en función de la célula de origen -subtipo centro germinal (GCB) o de célula B activada (ABC)- a partir de los datos obtenidos del ADNct mediante secuenciación masiva⁽⁵⁾. Resultados simi-

lares también se encuentran en la serie publicada por Bohers *et al.*⁽⁶⁾ con una tasa de concordancia de mutaciones entre la muestra tumoral y la de plasma del 85%, en la que describieron perfiles moleculares de mutaciones para clasificar los pacientes de acuerdo con el subtipo ABC (mutaciones en *MYD88*, *CD79A/B* y *PIM1*) o GCB (mutaciones en los genes *EZH2* y *BCL2*).

En nuestro centro hemos llevado a cabo un análisis preliminar sobre una serie de muestras pareadas ($n = 20$) de biopsia ganglionar (infiltración tumoral por encima del 20%) y ADNct en el momento del diagnóstico de pacientes con LDCBG. Estas muestras fueron analizadas mediante NGS utilizando un panel a medida para la detección de mutaciones, translocaciones, reordenamientos y variaciones en el número de copias. De forma que, en relación con la tasa de detección de mutaciones, los primeros resultados mostraron una concordancia del 70% entre ambas muestras, si bien también se detectaron mutaciones exclusivas de la adenopatía y otras del ADNct, estas últimas reflejo de la heterogeneidad global del linfoma capturada por la muestra de BL. Por otra parte, en relación con variaciones estructurales, nuestro panel de NGS permitió detectar en el ADNct el 90% de los casos con translocación (IgH/BCL2), el 65% de los casos con (IgH/BCL6) y el 90% con (IgH/MYC) detectados en la muestra ganglionar.

Por otra parte y dentro del mismo estudio mencionado anteriormente, hasta la fecha hemos analizado mediante NGS un total de 70 muestras de ADNct. Entre los datos más interesantes cabe señalar que la tasa de detección global de marcadores moleculares alcanzó el 100% (70/70), con una media de 7 mutaciones por paciente (rango: 2-29). Entre los genes más frecuentemente alterados se encuentran *KMTD2* (37%), *TP53* (30%), *ARID1A* (28%), *SOCS1* (21%) y *CREBBP* (19%), resultados concordantes con lo descrito en series similares^(4,5,7).

De forma global y en base a nuestros propios resultados, estos datos ponen de manifiesto la fidelidad con la que el ADNct refleja las alteraciones moleculares presentes en el tumor y cómo la secuenciación masiva constituye una alternativa sensible y eficaz para su caracterización. Por todo ello, la BL se postula como una alternativa no invasiva para la caracterización molecular de este tipo de neoplasias, ya que permite detectar tanto las SNV como las translocaciones cromosómicas presentes en el tumor.

› Aplicaciones de la biopsia líquida

La BL tiene numerosas aplicaciones que permiten profundizar en la biología de los linfomas y mejorar la atención de estos pacientes. En general, podríamos hablar de 3 momentos en los que la BL puede aportar conocimiento: en el diagnóstico, proporcionando información sobre la carga tumoral y para la identificación de marcadores moleculares pronósticos o dianas para el seguimiento de la enfermedad mínima residual (EMR); durante el tratamiento, fase en la que puede identificar pacientes no respondedores o refractarios en los que sería conveniente modificar el tratamiento o bien aquellos que alcanzan remisión completa para un reajuste de la terapia; y, por último, una vez concluido el tratamiento, para la detección precoz de recaídas, ajustes en la terapia de mantenimiento y así proporcionar una medicina de precisión para cada paciente.

Con respecto al diagnóstico, ya hemos revisado algunas de sus ventajas más importantes en el apartado anterior, por lo que nos centraremos en los estudios de seguimiento durante y después del tratamiento, o estudios de EMR. Aunque cada vez sabemos más sobre la biología y la heterogeneidad del linfoma, determinar la intensidad y la duración del tratamiento de forma individual para cada paciente continúa siendo un reto. En el momento actual, la estadificación inicial, la evaluación de la respuesta al tratamiento, así como el seguimiento posterior de los linfomas se basan en los resultados de técnicas de imagen como la tomografía por emisión de positrones (PET)/tomografía computarizada (TC). No obstante, aunque estas técnicas proporcionan información muy valiosa, presentan ciertos inconvenientes derivados de la sobreexposición del paciente a la radiación, el elevado coste, así como una tasa no desdeñable de falsos positivos y falsos negativos^(8,9). Todo ello pone de manifiesto la necesidad de disponer de otras aproximaciones más sensibles y específicas para la detección de la EMR en estos pacientes, donde la detección y la cuantificación del ADNct se postulan como una alternativa prometidora.

De hecho, ya son numerosas las publicaciones en este campo que han abordado el estudio de la EMR a través del ADNct empleando diversas tecnologías como la NGS^(10,11), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) digital⁽¹²⁾ y diversos marcadores moleculares. En concreto, 2 grupos han analizado el pa-

pel del ADNct en el seguimiento de pacientes con LDCBG mediante NGS utilizando el reordenamiento de los genes de las inmunoglobulinas (IgH)^(11,13). Ambos trabajos mostraron una tasa de detección del reordenamiento de entre un 82 y un 92% en las muestras de ADNct al diagnóstico y que, además, los niveles de ADNct se correlacionaron con otros parámetros de la carga tumoral como los niveles de LDH, el volumen metabólico tumoral y el índice pronóstico internacional (IPI). Es más, debido a la mayor sensibilidad de la BL respecto a las técnicas de imagen, el ADNct se pudo detectar entre 3 y 3,5 meses antes de que se produjera la recaída clínica de estos pacientes.

No obstante, la detección de un solo marcador (reordenamiento de IgH) tiene algunas dificultades, como una sensibilidad limitada y en ocasiones también una baja aplicabilidad por la presencia de mutaciones somáticas que dificultan la identificación del marcador. Es por ello que se han desarrollado metodologías alternativas para ampliar el número de marcadores, incluyendo mutaciones, variaciones en el número de copias, translocaciones y reordenamientos –*cancer personalized profiling by deep sequencing* (CAPP-Seq)– para aumentar la aplicabilidad y la sensibilidad⁽⁶⁾. Su aplicación en una serie de 92 pacientes con LDCBG identificó un marcador molecular en el 100% de las muestras de ADNct en el momento del diagnóstico y permitió detectar la recaída mediante técnicas no invasivas con una media de 6 meses de anterioridad a la recaída clínica^(5,11). Estos estudios muestran cómo el seguimiento de la EMR mediante técnicas de BL supera considerablemente a las técnicas de imagen de referencia en la detección precoz de la recaída clínica.

Otra aplicación muy interesante es la detección temprana de la resistencia al tratamiento. De hecho, en un trabajo reciente sobre el empleo de panobinostat en pacientes con LDCBG refractarios demostraron que los niveles de ADNct en el día 15 tenían valor predictivo sobre la respuesta a este fármaco⁽¹⁴⁾.

Finalmente, cabe señalar el papel dentro de la medicina de precisión, mediante la identificación de mutaciones susceptibles de ser “atacadas” mediante fármacos dirigidos. Un trabajo sobre el empleo de ibrutinib en el LDCBG demuestra que la presencia de

mutaciones en MYD88 y CD79B era predictivo de respuesta⁽¹⁵⁾.

› Próximos pasos para trasladar la biopsia líquida a la clínica en los linfomas

Los datos anteriores ponen de manifiesto los importantes avances que se han producido en este campo. No obstante, estas estrategias aún no se han trasladado a la práctica clínica rutinaria para el manejo de los pacientes con linfomas. Existen, por tanto, todavía cuestiones importantes por resolver y, entre las más importantes, se encuentran:

- Procesamiento de las muestras: establecimiento de protocolos normalizados para la extracción y conservación de los ácidos nucleicos.
- Estandarización de las técnicas: determinar cuál sería la técnica de elección (exoma, paneles a medida, etc.) para la detección de marcadores moleculares (reordenamiento de genes IgH, mutaciones, translocaciones, varios marcadores...). En relación con el análisis bioinformático y la posterior interpretación de los resultados obtenidos es necesario establecer criterios mínimos de calidad y, en la medida de lo posible, establecer protocolos de análisis similares.
- Una vez dispongamos de los protocolos normalizados de trabajo, sería conveniente diseñar ensayos clínicos prospectivos que compararan estas nuevas estrategias con las técnicas imagen de referencia y así confirmar los resultados en series prospectivas y mayores de pacientes.

› Bibliografía

1. Alix-Panabières C, Schwarzenbach H, Pantel K. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Annu Rev Med*. 2012;63:199-215.
2. Kis O, Koedbey R, Chow S, Danesh A, Dowar M, Li T, et al. Circulating tumour DNA sequence analysis as an alternative to multiple myeloma bone marrow aspirates. *Nat Commun*. 2017;8:15086.
3. Spina V, Brusca A, Cuccaro A, Martini M, Di Trani M, Forestieri G, et al. Circulating tumor DNA reveals genetics, clonal evolution, and residual disease in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2018;131(22):2413-25.
4. Rossi D, Diop F, Spaccarotella E, Monti S, Zanni M, Rasi S, et al. Diffuse large B-cell lymphoma genotyping on the liquid biopsy. *Blood*. 2017;129(14):1947-57.

5. Scherer F, Kurtz DM, Newman AM, Stehr H, Craig AFM, Esfahani MS, et al. Distinct biological subtypes and patterns of genome evolution in lymphoma revealed by circulating tumor DNA. *Sci Transl Med*. 2016;8(364):364ra155.
6. Bohers E, Viailly PJ, Dubois S, Bertrand P, Maingonnat C, Mareschal S, et al. Somatic mutations of cell-free circulating DNA detected by next-generation sequencing reflect the genetic changes in both germinal center B-cell-like and activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphomas at the time of diagnosis. *Haematologica*. 2015;100(7):e280-4.
7. Chapuy B, Stewart C, Dunford AJ, Kim J, Kamburov A, Redd RA, et al. Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nat Med*. 2018;24(5):679-90.
8. Cheah CY, Hofman MS, Dickinson M, Wirth A, Westerman D, Harrison SJ, et al. Limited role for surveillance PET-CT scanning in patients with diffuse large B-cell lymphoma in complete metabolic remission following primary therapy. *Br J Cancer*. 2013;109(2):312-7.
9. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Cavalli F, Schwartz LH, Zucca E, et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J Clin Oncol*. 2014;32(27):3059-68.
10. Bratman SV, Newman AM, Alizadeh AA, Diehn M. Potential clinical utility of ultrasensitive circulating tumor DNA detection with CAPP-Seq. *Expert Rev Mol Diagn*. 2015;15(6):715-9.
11. Kurtz DM, Green MR, Bratman SV, Scherer F, Liu CL, Kunder CA, et al. Noninvasive monitoring of diffuse large B-cell lymphoma by immunoglobulin high-throughput sequencing. *Blood*. 2015;125(24):3679-87.
12. Camus V, Sarafan-Vasseur N, Bohers E, Dubois S, Mareschal S, Bertrand P, et al. Digital PCR for quantification of recurrent and potentially actionable somatic mutations in circulating free DNA from patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2016;57(9):2171-9.
13. Roschewski M, Dunleavy K, Pittaluga S, Moorhead M, Pepin F, Kong K, et al. Circulating tumour DNA and CT monitoring in patients with untreated diffuse large. *Lancet Oncol*. 2015;16(5):541-9.
14. Assouline SE, Nielsen TH, Yu S, Alcaide M, Chong L, MacDonald D, et al. Phase 2 study of panobinostat with or without rituximab in relapsed diffuse large. *Blood*. 2016;128(2):185-94.
15. Wilson WH, Young RM, Schmitz R, Yang Y, Pittaluga S, Wright G, et al. Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. *Nat Med*. 2015;21(8):922-6.

› Anticuerpos monoclonales en el linfoma difuso de célula grande B

› Rituximab y otros anticuerpos anti-CD20

El rituximab es un anticuerpo que reconoce el antígeno CD20, expresado de forma selectiva por células linfoides B maduras y las neoplasias derivadas de las mismas. Desencadena la muerte de la célula tumoral principalmente gracias a la activación del sistema inmune del paciente que reconoce el anticuerpo, mediante citotoxicidad dependiente del anticuerpo y del complemento, además de inducir la muerte celular directa por apoptosis⁽³⁾. Los anticuerpos monoclonales como el rituximab inducen, en general, una baja tasa de respuestas que son de corta duración en el LDCGB u otros linfomas agresivos con expresión de CD20. Ahora bien, en combinación con quimioterapia son capaces de mejorar sustancialmente los resultados de la misma. De esta forma, se estima que el rituximab ha incrementado en un 15% la supervivencia global de los pacientes con LDCGB⁽⁴⁾.

La eficacia demostrada por el rituximab ha motivado el posterior desarrollo de biosimilares, con hasta 6 productos aprobados por la EMA y algunos de ellos también por las autoridades sanitarias españolas. Por otro lado, se han desarrollado, asimismo, otros anticuerpos monoclonales anti-CD20, con distintos epítomos o con modificaciones para incrementar la citotoxicidad, aunque desafortunadamente ninguno de ellos ha logrado demostrar un superior beneficio clínico en el LDCGB. Ejemplo paradigmático de ello ha sido el obinutuzumab, un anticuerpo monoclonal anti-CD20 humanizado de tipo II, con una mayor potencia en la citotoxicidad dependiente de anticuerpo y de muerte directa en modelos preclínicos. Sin embargo, obinutuzumab no pudo demostrar una eficacia superior al rituximab al combinarlo con CHOP en primera línea de tratamiento del LDCGB en el estudio aleatorizado GOYA, con más de 1.400 pacientes incluidos⁽⁵⁾ (Tabla 1).

› Anticuerpos monoclonales con otras especificidades

El tafasitamab (MOR208) es un anti-CD19 que se está desarrollando en combinación, principalmente con lenalidomida o bendamustina, para el tratamiento

de los pacientes con LDCGB en recaída o refractarios (R/R) no candidatos a tratamientos intensivos con trasplante autólogo⁽⁶⁾. También se está explorando en combinación con R-CHOP y lenalidomida en primera línea de tratamiento del LDCGB.

Otro anticuerpo en desarrollo es un anti-CD47, magrolimab (Hu5F9-G4), que facilita que la célula tumoral pueda ser fagocitada por los macrófagos. Estudios en fase I y II están evaluando su papel principalmente en combinación con rituximab⁽⁷⁾, este último inductor de la fagocitosis, con el que se han descrito respuestas objetivas del 50% y hasta un 36% de remisiones completas (RC) en el LDCGB en R/R (NCT02953509).

› Anticuerpos monoclonales conjugados

Los anticuerpos monoclonales conjugados se vienen desarrollando para incrementar la actividad antitumoral del anticuerpo, que suele ser baja, mediante la unión covalente de una molécula tóxica para la célula. Entre los diferentes anticuerpos monoclonales conjugados evaluados en el LDCGB en R/R destaca el polatuzumab vedotin, que es un anti-CD79b unido a una carga de monometil auristatina E (MMA). Este anticuerpo conjugado ha logrado la reciente aprobación por la EMA a su uso en combinación, junto a bendamustina y rituximab, en pacientes con LDCGB en R/R. En un estudio en fase II aleatorizado la combinación de polatuzumab vedotin con R-bendamustina (N = 40) demostró ser superior a R-bendamustina (N = 40) al conseguir una superior tasa de respuestas globales y completas (70 vs. 32,5% y 57,5 vs. 20%, respectivamente), con mejoría significativa de la supervivencia libre de progresión y de la supervivencia global a expensas de una mayor frecuencia de neuropatía periférica y de citopenias en el grupo que recibió polatuzumab vedotin⁽⁸⁾. Es significativa, sobre todo, la larga supervivencia de algunos pacientes respondedores. Su utilidad en fases más precoces de la enfermedad se está evaluando en un ensayo aleatorizado, doble ciego, en fase III con la adición de polatuzumab vedotin a R-CHP en comparación con R-CHOP como terapia inicial en el LDCGB (estudio *Polarix*, NCT03274492) (Tabla 1).

En cambio, inotuzumab ozogamicina, un anti-CD22 asociado a caliqueamicina, no pudo demostrar en monoterapia superioridad respecto al mejor tratamiento paliativo en un estudio aleatorizado en el

Tabla 1. Estudios seleccionados con nuevos anticuerpos monoclonales en el linfoma difuso de célula grande B (LDCGB)

| Producto | Tipo/Diana | Características del estudio | RG y RC | DR o SLP | Referencia |
|------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|-----------|--------------|----------------------------------|
| Obinutuzumab | AcMo/CD20 | Fase I, R/R, N = 25 | 28 y 4% | DR 9,8 m | Morshhauser F, JCO. 2013 |
| | | Fase III, 1L, N = 1.418, + R-CHP | 77 y 56% | SLP 36 m 69% | Vitolo U, JCO. 2017a |
| Tafasitamab (MOR208) | AcMo/CD19 | Fase II, R/R, N = 51, + lenalidomida | 60 y 43% | SLP 11,3 m | Salles G, Blood. 2017 |
| | | Fase II-III, R/R, + Benda o R-Benda | – | – | NCT02763319 |
| Magrolimab (Hu5F9-G4) | AcMo/CD47 | Fase Ib, R/R, N = 15, + R | 40 y 33% | – | Advani R, NEJM. 2018 |
| Polatuzumab vedotin | Ac. conjugado (MMA)/CD79b | Fase II aleat, R/R, N = 80, + R-Benda | 62 y 50% | DR 12,6 m | Sehn L, JCO. 2020b |
| | | Fase II, 1L, N = 85, + R-CHP | 89 y 77% | SLP-24 m 84% | Tilly H, Lancet Oncol. 2019 |
| Loncastuximab tesirine | Ac. conjugado (PDB)/CD19 | Fase II, R/R, N = 140 | 41,7 y – | – | NCT03589469 |
| Denintuzumab mafodotin | Ac. conjugado (MMA)/CD19 | Fase I, R/R, N = 53 | 33 y 22% | DR 10 m | NCT01786135 |
| Pinatumuzumab vedotin | Ac. conjugado (MMA)/CD22 | Fase II, R/R, N = 42, + R | 60 y 26% | DR 6,2 m | Morshhauser F, Lancet Haem. 2019 |
| Inotuzumab ozogamicin | Ac. conjugado (caliqueamicina)/CD22 | Fase III, R/R, N = 338, + R | 41 y 16% | DR 11,6 m | Dang NH, Br J Haematol. 2018a |
| Brentuximab vedotin | Ac. conjugado (MMA)/CD30 | Fase II, R/R, N = 45, ± R | 44 y 17% | SLP 4 m | Jacobsen DE, Blood. 2015 |
| Blinatumomab | Ac. biespecífico/CD19, CD3 | Fase II, R/R, N = 25 | 43 y 19% | DR 4-9 m | Viardot A, Blood. 2016 |
| Mosunetuzumab | Ac. biespecífico/CD20, CD3 | Fase I, R/R, N = 172, + ICI | – | – | NCT02651662 |
| Ipilimumab | Inhibidor de <i>check-point</i> | Fase I, R/R, N = 3 | 33 y 33% | – | Ansell SM, Clin Can Res. 2009 |
| Nivolumab | Inhibidor de <i>check-point</i> | Fase Ib, R/R, N = 11 | 36 y 18% | – | Lesokhin AM, JCO. 2016 |
| Nivolumab | Inhibidor de <i>check-point</i> | R/R PCNSL, N = 4 y 1 PTL | 100 y 80% | – | Nayak L, Blood. 2017 |
| Pembrolizumab | Inhibidor de <i>check-point</i> | Fase 1b, R/R PMBL, N = 53 | 45/11% | – | Zinzani PL, Blood. 2017 |

^a Diferencias no significativas respecto la rama control; ^b brazo con polatuzumab vedotin con diferencia estadística significativa respecto a la rama control
 Ac: anticuerpo; AcMo: anticuerpo monoclonal; DR: duración de la respuesta; ICI: *immune checkpoint inhibitor*; MMA: monometil auristatina E; PCNSL: linfoma primario del sistema nervioso central; PMBL: Linfoma primario del mediastino; PTL: linfoma testicular primario; R: rituximab; RC: respuesta completa; RG: respuesta global; SLP: supervivencia libre de progresión

LDCGB en R/R⁽⁹⁾. Por otro lado, brentuximab vedotin, un anticuerpo conjugado anti-CD30, ha demostrado una cierta eficacia en estudios en fase II en LDCGB en distintas fases del tratamiento^(10,11).

Otros anticuerpos conjugados anti-CD19 en desarrollo que se están explorando en el LDCGB en R/R son loncastuximab tesirine (ADCT-402), un anti-CD19 conjugado con dímero PDB que en monoterapia a dosis $\geq 120 \mu\text{g}/\text{kg}$ presenta una tasa de respuestas del 59% con un 40% de respuestas completas⁽¹²⁾, y el denintuzumab mafodotin, conjugado con MMA (SGN-CD19A), con una tasa de respuestas parecidas.

➤ Anticuerpos monoclonales biespecíficos

El blinatumomab es un anticuerpo biespecífico dirigido frente a CD19 y CD3 con el que se consigue un

acercamiento de las células inmunes a las células tumorales para desencadenar una respuesta inmune antitumoral. Este anticuerpo se ha mostrado razonablemente eficaz en el LDCGB en recidiva o refractario con hasta un 55% de respuestas descritas, algunas de las cuales con una duración prolongada. Su compleja administración, así como los efectos secundarios y en especial las complicaciones neurológicas, han limitado su uso^(13,14).

Otros anticuerpos biespecíficos en desarrollo en el LDCGB son mosunetuzumab, con especificidad anti-CD20 y anti-CD3 y aparentemente sin toxicidad neurológica⁽¹⁵⁾, o el CD20-TCB (RG6026). Ambos anticuerpos han mostrado tasas de respuesta del 30% con un 20% de respuestas completas que se han mostrado prolongadas incluso en pacientes que habían fracasado a terapia CART.

› Inhibidores de *check-point* en el linfoma difuso de célula grande B

Una de las más recientes y significativas revoluciones dentro de la inmunoterapia en la oncología ha sido la aparición de anticuerpos monoclonales inhibidores de los puntos de control inmunes, los llamados inhibidores del *check-point* inmune (ICI), como nivolumab, pembrolizumab, durvalumab, avelumab y atezolizumab (interfieren en el eje PD-1/PD-L1), o utomilumab (inhibidor de 4-1BB), entre otros. Estos anticuerpos facilitan la reactivación de los linfocitos T evitando que el tumor continúe escapando a la vigilancia inmune del microambiente.

Algunos subtipos de linfomas se han beneficiado en gran medida de estos tratamientos, principalmente el linfoma de Hodgkin y posiblemente el linfoma primario de mediastino, en tanto que en otros subtipos, entre los que se incluye el LDCGB, las respuestas han sido menos evidentes. Resultados iniciales en LDCGB en recaída o refractario con nivolumab mostraron una tasa global de respuestas del 36%, pero en otro estudio más reciente estas no alcanzaron más que el 10%^(16,17). Hay varios ensayos activos explorando su utilidad también en combinación.

Existen evidencias que indicarían que el tipo de microambiente, las vías de escape inmune y las alteraciones oncogénicas del tumor estarían relacionados y podrían tener un papel importante a la hora de condicionar la sensibilidad al tratamiento con ICI⁽¹⁸⁾. En la mayoría de los casos de LDCGB no existiría el estado proinflamatorio adecuado para obtener respuestas con los ICI. No obstante, en algunos subtipos como el linfoma primario de mediastino, el linfoma primario de sistema nervioso central (SNC) y el linfoma primario testicular, que con frecuencia presentan alteraciones en 9p24.1, con el consiguiente aumento de la expresión de PD-L1 y PD-L2, se han descrito respuestas en pacientes en recaída o refractarios tras tratamiento con ICI, por lo que se están realizando ensayos clínicos explorando esta nueva opción terapéutica^(19,20). Por otro lado, dada la gran heterogeneidad biológica del LDCGB, queda por acabar de discernir si algunos subtipos biológicos con activación de la señalización en *NF-κB* y *NOTCH*, que se asociarían a un mayor estado proinflamatorio y de evasión inmune, podrían también ser sensibles al tratamiento con ICI⁽¹⁸⁾.

› Terapia celular adoptiva en el linfoma difuso de célula grande B: trasplante alogénico y terapia CART

El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH) se considera dentro de la estrategia de rescate del LDCGB como alternativa al trasplante autogénico o tras el fracaso al mismo⁽²¹⁾. La importante toxicidad asociada a este procedimiento, principalmente derivada de la enfermedad injerto contra receptor, así como de la inmunosupresión prolongada y las infecciones, además del riesgo de recidiva, limitan en gran medida su eficacia. Estudios retrospectivos muestran una supervivencia global a los 3 años de entre el 30 y el 50%, con un riesgo de recidiva del 30-40% en los pacientes sometidos a alo-TPH⁽²²⁾. Esta herramienta, por lo tanto, acaba siendo aplicable a una minoría de casos muy seleccionados de LDCGB, con enfermedad sensible al tratamiento, sin comorbilidades limitantes y con disponibilidad de donante HLA compatible. Aun cuando continúa siendo una opción vigente, su papel futuro está mucho más discutido por la reciente irrupción de la terapia CART, que podría potencialmente ser aplicable a más pacientes con menor toxicidad⁽²²⁾.

El desarrollo de la ingeniería genética ha permitido modificar los linfocitos T del paciente para expresar un receptor antigénico quimérico (CART) que en su parte extracelular dispondría de un fragmento con especificidad de anticuerpo (scFv) y por la parte intracelular un dominio de señalización del TCR (CD3 ζ), además de una región transmembrana con dominios coestimuladores (CD28 o 4-1BB) para facilitar la activación y la expansión de las células CART. Esta modificación permite que los linfocitos T del paciente puedan reconocer de forma altamente específica una diana tumoral e inducir una respuesta inmune de forma independiente al complejo mayor de histocompatibilidad, contrarrestando así los mecanismos de evasión inmune del tumor.

En la actualidad, se dispone de 2 productos comerciales aprobados en el LDCGB en recaída o refractario tras 2 líneas o más de tratamiento, axicabtagene ciloleucel (Yescarta®) y tisagenlecleucel (Kymriah®), ambos con especificidad anti-CD19. Además, el primero también dispone de la aprobación en linfoma primario de mediastino. Existe un tercer producto comercial

Tabla 2. Terapia celular CART-19 en el linfoma difuso de célula grande B (LDCGB) en recidiva/refractario en estudios fase 1-2

| Características de los estudios | ZUMA-1 ⁽²⁰⁾ NCT02348216 | JULIET ⁽²¹⁾ NCT02445248 | TRASCEND CORE ⁽²²⁾ NCT02631044 |
|--|---------------------------------------|---------------------------------------|--|
| Construceto | Axicabtagene ciloleucel | Tisagenlecleucel | Lisocabtagene maraleucel |
| Dominio coestimulador | CD28 | 4-1BB | 4-1BB; ratio CD4:CD8 (1:1) |
| Histologías | LDCGB, LPM o Lft | LDCGB | LDCGB, LPM, Lft |
| Pacientes reclutados/infundidos | 119/108 | 165/115 | 342/268 |
| Edad (mediana, extremos) | 58 (23-76) | 56 (22-76) | 63 (18-86) |
| Casos refractarios (%) | 79 | 55 | 67 |
| TPH autogénico previo (%) | 21 | 49 | 34% (y un 3% TPH alogénico) |
| Tiempo aféresis-infusión (mediana, días) | 17 | 54 | 24 |
| Terapia puente | No | Sí (90%) | Sí (59%) |
| Régimen linfodepletivo | FC 30/500, 3 días | FC 25/250, 3 días | FC 30/300, 3 días |
| Mejor respuesta (RG/RC, %) | 83/58 | 52/38 | 73-53 |
| Supervivencia libre de progresión | 44%-1 año/38%-2 años | 35%-1 año | 6,8 meses (mediana) |
| Supervivencia global | 59%-1 año/51%-2 años | 49%-1 año | 19,9 meses (mediana) |
| Mortalidad asociada al procedimiento | 3% | 0% | 1,5% |
| Escala de valoración de la toxicidad | Lee | UPenn | Lee |
| CRS (Grados 1-4; Grado ≥ 3) | 93/11% | 58/22% | 42/2% |
| Neurotoxicidad (Grados 1-4; Grado ≥ 3) | 65/32% | 21/11% | 30/10% |

CRS: síndrome de liberación de citocinas; Lft: linfoma folicular transformado; LPM: linfoma primario de mediastino; RC: respuesta completa; RG: respuesta global; TPH: trasplante de progenitores hematopoyéticos

pendiente de aprobación, lisocabtagene maraleucel (JCAR017) que es el único que tiene una composición controlada de células CD4 y CD8 con una relación 1:1. Los ensayos clínicos con estos 3 productos han demostrado que la terapia CART es eficaz en los pacientes con LDCGB en fases avanzadas de enfermedad, con un 30-40% de los pacientes que alcanzan la remisión completa a largo plazo⁽²³⁻²⁵⁾. La comparación directa de los resultados de estos 3 estudios es difícil, puesto que existen diferencias a muchos niveles, incluyendo los criterios de inclusión, la existencia de tratamiento puente, la quimioterapia de acondicionamiento linfodepletiva, el tipo de construcción del producto CART, las escalas de evaluación de la toxicidad, el número de pacientes y el tratamiento previo con auto-TPH (Tabla 2).

Esta nueva terapia celular CART va asociada a nuevas toxicidades que pueden ser potencialmente muy graves. Las más características son el síndrome de liberación de citocinas (CRS), que en los casos más graves y de forma excepcional podría acabar en una linfocitosis hemofagocítica o un síndrome de ac-

tivación macrofágico, y la toxicidad neurológica principalmente en forma de encefalopatía (ICAN). Los pacientes con estado general afectado o los pacientes con alta carga tumoral que provocan una rápida expansión de las células CART o con parámetros proinflamatorios muy elevados antes de la infusión suelen desarrollar más CRS. Asimismo, la toxicidad neurológica se asocia a la infusión de dosis elevadas de CART y a un pico en sangre de células CART elevado. Por otro lado, también está descrita típicamente la toxicidad en forma de citopenias que puede ser prolongada en el tiempo y más en relación con la especificidad anti-CD19 del CART, la aplasia B prolongada y la hipogammaglobulinemia, contribuyendo todas ellas a un incremento de las infecciones. La comparación directa de la toxicidad entre los 3 estudios en fase II realizados no es factible por la utilización de diferentes escalas de valoración y, en definitiva, un manejo diferente de las complicaciones. Sin embargo, parece que lisocabtagene maraleucel podría tener una menor proporción de toxicidades graves en comparación con los otros 2 productos ya aprobados. Globalmente, la

mortalidad asociada al procedimiento descrita en los ensayos no supera el 3% y en pacientes tratados con los productos comerciales oscila entre el 2 y el 8%⁽²⁶⁾.

En la actualidad se está explorando el papel de estos 3 productos CART-19 en pacientes con LDCGB refractarios o en recidiva precoz tras la primera línea de tratamiento. Se trata de ensayos aleatorizados, que comparan el tratamiento de rescate convencional con inmunoterapia basada en combinaciones de platinos seguida de TPH autógeno frente a la infusión del CART-19 –ensayos *ZUMA-7* (NCT03391466), *BE-LINDA* (NCT03570892) y *TRANSFORM* (NCT03575351)–.

La falta de respuesta o la recidiva tras terapia CART muchas veces es debida a la modulación o pérdida antigénica tumoral o bien a la limitada persistencia del CART, lo cual está motivando el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento⁽²⁷⁾. Los CART biespecíficos intentan minimizar el riesgo de escape antigénico del tumor desarrollando CART dirigidos frente a múltiples antígenos como anti-CD19 y anti-CD22 o anti-CD19 y anti-CD20. La combinación del CART con el uso de anticuerpos inhibidores del *check-point* buscaría también incrementar la eficacia del CART mejorando su persistencia. Otra estrategia pasaría por el desarrollo de CART “armados”, que buscarían mejorar la persistencia y expansión del CART, así como impedir su bloqueo por un microambiente inmunosupresor mediante la combinación de las moléculas coestimuladoras CD-28 y 4-1BB.

Otros aspectos prácticos que pueden limitar la adopción de la terapia CART son el acceso a centros acreditados con un equipo multidisciplinar para la administración del tratamiento, la fabricación con éxito y la infusión del producto individualizado para cada paciente en unos tiempos adecuados y el importante coste económico de esta terapia. En este sentido, se están haciendo esfuerzos para mejorar los diseños de los productos CART incluyendo diseños humanizados e incluso desarrollar productos CART universales a partir de donantes sanos y productos CAR en células NK que tendrían la ventaja de estar disponibles inmediatamente para su utilización.

› Conclusiones

El rápido desarrollo de la inmunoterapia en la última década está permitiendo revolucionar el tratamiento de muchas enfermedades neoplásicas, entre la que se

encuentra el LDCGB, y se abre sin lugar a dudas una nueva era en el tratamiento de estas enfermedades.

En el LDCGB la introducción de la terapia celular CART ha sido, tras el rituximab, el mayor avance terapéutico de los últimos tiempos. Su accesibilidad e implementación en la práctica clínica suponen, sin embargo, un reto importante. La mejora en el conocimiento de la biología del tumor así como el futuro desarrollo de la inmunoterapia serán claves para optimizar las opciones terapéuticas en el LDCGB.

› Bibliografía

1. Singh AK, McGuirk JP. CART T cells: continuation in a revolution of immunotherapy. *Lancet Oncol*. 2020 Mar;21(3):e168-e178.
2. Batlevi CL, Matsuki E, Younes A. Novel immunotherapies in lymphoid malignancies. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016;13:25-40.
3. Cheson BD, Leonard JP. Monoclonal antibody therapy for B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 2008 Aug 7;359(6):613-26.
4. Coiffier B, Thieblemont C, Van Den Neste E, Lepage G, Plantier I, Castaigne S, et al. Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Études des Lymphomes de l'Adulte. *Blood*. 2010 Sep 23;116:2040-5.
5. Vitolo U, Tmrený M, Belada D, Burke JM, Carella AM, Chua N, et al. Obinutuzumab or rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone in previously untreated diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2017;35:3529-37.
6. Jurczak W, Zinzani PL, Gaidano G, Goy A, Provencio M, Nagy Z, et al. Phase IIa study of the CD19 antibody MOR208 in patients with relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol*. 2018;29:1266-72.
7. Advani R, Flinn I, Popplewell L, Forero A, Bartlett NL, Ghosh N, et al. CD47 Blockade by Hu5F9-G4 and Rituximab in Non-Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med*. 2018 Nov 1;379:1711-21.
8. Sehn LH, Herrera AF, Flowers CR, Kamdar MK, McMillan A, Hertzberg M, et al. Polatuzumab Vedotin in Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2020 Jan 10;38:155-65.
9. Dang NH, Ogura M, Castaigne S, Fayad LE, Jerkeman M, Radford J, et al. Randomized, phase 3 trial of inotuzumab ozogamicin plus rituximab versus chemotherapy plus rituximab for relapsed/refractory aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol*. 2018 Aug;182:583-6.
10. Jacobsen ED, Sharman JP, Oki Y, Advani RH, Winter JN, Bello CM, et al. Brentuximab vedotin demonstrates objective responses in a phase 2 study of relapsed/ refractory DLBCL with variable CD30 expression. *Blood*. 2015;125:1394-402.
11. Budde LE, Halwani A, Yassenchak CA, Farber CM, Burke JM, Fayad LE, et al. Results of an ongoing phase 2 study of brentuximab vedotin with rchp as frontline therapy in patients with high-intermediate/high-risk diffuse large B cell lymphoma (DLBCL). *Blood*. 2016;128(22):104.

12. Kahl BS, Hamadani M, Radford J, Carlo-Stella C, Caimi P, Reid E, et al. A Phase I Study of ADCT-402 (Loncastuximab Tesirine), a Novel Pyrrolbenzodiazepine-Based Antibody-Drug Conjugate, in Relapsed/Refractory B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2019;25:6986-94.
13. Goebeler ME, Knop S, Viardot A, Kufer P, Topp MS, Einsele H, et al. Bispecific T-Cell Engager (BiTE) Antibody Construct Blinatumomab for the Treatment of Patients With Relapsed/Refractory Non-Hodgkin Lymphoma: Final Results From a Phase I Study. *J Clin Oncol.* 2016;34:1104-11.
14. Viardot A, Goebeler ME, Hess G, Neumann S, Pfreundschuh M, Adrian N, et al. Phase 2 study of the bispecific T-cell engager (BiTE) antibody blinatumomab in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2016 Mar 17;127(11):1410-6.
15. Budde LE, Sehn LH, Assouline S, Flinn IW, Isufi I, Yoon SS, et al. Mosunetuzumab, a full-length bispecific CD20/CD3 antibody, displays clinical activity in relapsed/refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma (NHL): interim safety and efficacy results from a phase 1 study. *Blood.* 2018;132:399.
16. Lesokhin AM, Ansell SM, Armand P, Scott EC, Halwani A, Gutierrez M, et al. Nivolumab in patients with relapsed or refractory hematologic malignancy: preliminary results of a phase Ib study. *J Clin Oncol.* 2016;34:2698-704.
17. Ansell SM, Minnema MC, Johnson P, Timmerman JM, Armand P, Shipp MA, et al. Nivolumab for relapsed/refractory diffuse large b-cell lymphoma in patients ineligible for or having failed autologous transplantation: a single-arm, phase II study. *J Clin Oncol.* 2019;37:481-9.
18. Kline J, Godfrey J, Ansell SM. The immune landscape and response to immune checkpoint blockade therapy in lymphoma. *Blood.* 2020;135:523-33.
19. Zinzani PL, Ribrag V, Moskowitz CH, Michot JM, Kuruvilla J, Balakumaran A, et al. Safety and tolerability of pembrolizumab in patients with relapsed/refractory primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood.* 2017;130:267-70.
20. Nayak L, Iwamoto FM, LaCasce A, Mukundan S, Roemer MGM, Chapuy B, et al. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed/refractory primary central nervous system and testicular lymphoma. *Blood.* 2017;129:3071-3.
21. Tilly H, Gomes da Silva M, Vitolo U. Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2015;26:116-25.
22. Dreger P, Fenske TS, Montoto S, Pasquini MC, Sureda A, Hamadani M; European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) and the Center for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR). Cellular Immunotherapy for Refractory Diffuse Large B Cell Lymphoma in the Chimeric Antigen Receptor-Engineered T Cell Era: Still a Role for Allogeneic Transplantation? *Biol Blood Marrow Transplant.* 2020;26:e77-e85.
23. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, et al. Axicabtagene Ciloleuce CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med.* 2017;377:2531-44.
24. Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, Waller EK, Borchmann P, McGuirk JP, et al. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med.* 2019;380:45-56.
25. Abramson JS, Palomba ML, Gordon LI, Lunning MA, Wang ML, Arnason JE, et al. Pivotal Safety and Efficacy Results from Transcend NHL 001, a Multicenter Phase 1 Study of Lisocabtagene Maraleuce (liso-cel) in Relapsed/Refractory (R/R) Large B Cell Lymphomas. *Blood.* 2019;134:241a.
26. Nastoupil LJ, Jain MD, Feng L, Spiegel JY, Ghobadi A, Lin Y, et al. Standard-of-Care Axicabtagene Ciloleuce for Relapsed or Refractory Large B-Cell Lymphoma: Results From the US Lymphoma CART Consortium. *J Clin Oncol.* 2020 May 13;JCO1902104.
27. Shah NN, Fry TJ. Mechanisms of resistance to CAR T cell therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2019;16:372-85.

AVANCES EN EL DIAGNÓSTICO Y EL TRATAMIENTO DE LAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS CRÓNICAS Ph NEGATIVAS

Coordinadores:

Dr. José María Raya Sánchez. Complejo Hospitalario Universitario de Canarias. Santa Cruz de Tenerife

Dra. María Luisa Antelo Caamaño. Complejo Hospitalario de Navarra. Pamplona

Tiempos difíciles estos que nos ha tocado vivir desde que en marzo pasado la pandemia por COVID-19 se empezara a extender en nuestro planeta, lo que ha condicionado y modificado tantos y tantos aspectos de nuestra vida cotidiana. Ejemplo de estos cambios sobrevenidos es la celebración *on-line* de nuestro tradicional Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH) y la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia (SETH), que nos impide saludarnos en persona y departir y debatir como siempre habíamos hecho. Pero, sea como fuere, la investigación y el progreso en temas médicos debe continuar y en este simposio que me honra moderar contamos con 3 ponentes de experiencia contrastada para hablarnos de novedades en neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMPc).

En primer lugar, la Dra. Bellosillo nos hablará en su ponencia de algunas novedades incorporadas al diagnóstico molecular de las NMPc Filadelfia-negativas. Teniendo en cuenta las mutaciones *driver* y *no driver* que pueden darse en las NMPc, recientemente se ha propuesto una clasificación molecular de estas enfermedades, la cual permite estratificar el riesgo de transformación de las mismas a mielofibrosis o a leucemia aguda. Igualmente, diversas mutaciones *no driver* han demostrado tener implicaciones pronósticas al analizar amplias series de pacientes con policitemia vera o trombocitemia esencial. Por otra parte, si bien aún no extendido su uso, la detección de ADN tumoral circulante (ctDNA) podría ser de gran utilidad en establecer la carga mutacional de pacientes con NMPc. De todo ello y más versará la ponencia de la Dra. Bellosillo, a la cual, además, quiero agradecer muy sinceramente su pronta respuesta y predisposición a colaborar *in extremis* en este simposio, cuando la ponente prevista declinó a última hora su participación.

La segunda ponente, la Dra. Ferrer Marín, con gran experiencia en trombosis y NMPc, nos hablará del papel emergente de los neutrófilos en la trombosis asociada a las NMPc. En los pacientes con este tipo de enfermedades, los neutrófilos se encuentran activados y contribuyen de forma cada vez más evidente a la formación del trombo. Un aspecto novedoso en esta patogenia de la trombosis es el papel de las "trampas extracelulares de neutrófilos" (NET), del que nos hablará la Dra. Ferrer. Al igual que del concepto relativamente nuevo de inmunotrombosis, es decir, del rol que juega la inmunidad innata en el proceso de trombogénesis y de cómo las NET pueden producir una respuesta procoagulante que contribuya a la trombosis, la cual no siempre va a ser patológica, sino que en ocasiones puede ser defensiva, fisiológica. Sería la producción descontrolada de NET la que realmente contribuiría a la aparición de fenómenos trombóticos, bien arteriales o venosos. En el caso concreto de las NMPc, recientemente se ha demostrado la conexión entre la mutación JAK2 V617F, la formación de NET y la trombosis, y cómo algún fármaco anti-JAK como ruxolitinib podría evitar o atenuar esta predisposición, al menos en modelos animales. En el futuro, las NET podrían además utilizarse como biomarcadores de riesgo trombótico.

AVANCES EN EL DIAGNÓSTICO Y EL TRATAMIENTO DE LAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS CRÓNICAS Ph NEGATIVAS

Por último, el Dr. Hernández Boluda nos hará una revisión del tratamiento actual de la mielofibrosis, el cual, aun no estando estandarizado, está encaminado en alrededor del 90% de los casos a intentar controlar los síntomas y a prevenir las eventuales complicaciones asociadas a la enfermedad, reservándose el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos a un porcentaje bajo de pacientes clínicamente bien seleccionados. El tratamiento de la anemia con agentes estimuladores de la eritropoyesis, anabolizantes, agentes inmunomoduladores (IMiD) o corticoides constituye un aspecto muy importante del manejo de estos pacientes. Del mismo modo, la aplicación de agentes citorreductores clásicos, interferón o inhibidores de la vía JAK/STAT (ruxolitinib, fedratinib...), resulta muy útil para controlar la actividad y las manifestaciones hiperproliferativas. Además, deben tenerse en cuenta los diversos ensayos clínicos que pueden estar en desarrollo en cada momento. Finalmente, se nos recuerda el papel que la esplenectomía o la radioterapia esplénica pueden tener en estos pacientes.

Novedades en el diagnóstico molecular de las neoplasias mieloproliferativas Ph-negativas

Beatriz Bellosillo Paricio

Laboratori de Diagnòstic Molecular. Servei de Patologia. Hospital del Mar. Barcelona

Los estudios moleculares son una herramienta imprescindible para poder realizar un correcto diagnóstico de las neoplasias mieloproliferativas Ph-negativas (NMP).

Esta caracterización molecular implica la detección de mutaciones en los genes *driver* de estas entidades, *JAK2*, *MPL* y *CALR*. Como parte del análisis molecular, pueden identificarse, además, mutaciones en otros genes asociados a neoplasias mieloides (genes *non-driver*) que tienen valor pronóstico e incluso, en ocasiones, valor diagnóstico. Recientemente, se ha propuesto una clasificación molecular de las NMP Ph-negativas en función del tipo de mutación *driver* y de la coexistencia de mutaciones en genes *non-driver*. Esta clasificación permite estratificar el riesgo de transformación a mielofibrosis o leucemia aguda. Paralelamente, se ha descrito el papel pronóstico de mutaciones en diversos genes *non-driver* en series amplias de pacientes con policitemia vera y trombocitemia esencial. La presencia de mutaciones en algunos genes *non-driver* se ha asociado a resistencia al tratamiento con hidroxiurea y a un mayor riesgo de transformación a leucemia aguda. Además, se ha descrito el potencial valor predictivo de las mutaciones en los genes implicados en señalización, *RAS* y *CBL*, en pacientes con mielofibrosis.

La estrategia metodológica para realizar la caracterización molecular se realiza habitualmente en muestras de sangre total (sin fraccionar) o a partir de granulocitos. Recientemente, ha surgido la posibilidad de realizar estos análisis a partir de plasma, como fuente de ADN tumoral circulante (ctDNA). El ctDNA puede reflejar de forma similar o incluso mejor (en algunos casos) la carga mutacional que se observa al realizar

el estudio en granulocitos purificados, especialmente para la detección de las mutaciones del gen *MPL*. Estos resultados podrían cambiar en un futuro la estrategia del análisis molecular de los pacientes con NMP Ph-negativas.

› Bibliografía

- Álvarez-Larrán A, Díaz-González A, Such E, Mora E, Andrade-Campos M, García-Hernández C, et al.; MPN Spanish Group (GEMFIN). Genomic characterization of patients with polycythemia vera developing resistance to hydroxyurea. *Leukemia*. 2020 May 5. Epub ahead of print.
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2391-405.
- Coltro G, Rotunno G, Mannelli L, Mannarelli C, Fiaccabrino S, Romagnoli S, et al. RAS/CBL mutations predict resistance to JAK inhibitors in myelofibrosis and are associated with poor prognostic features. *Blood Adv*. 2020 Aug 11;4(15):3677-87.
- García-Gisbert, Fernández-Ibarrondo L, Fernández-Rodríguez C, Gibert J, Andrade-Campos M, Arenillas L, et al. Circulating cell-free DNA improves the molecular characterisation of Ph-negative myeloproliferative neoplasms. *Br J Haematol*. 2020 Sep 18. Epub ahead of print.
- Grinfeld J, Nangalia J, Baxter EJ, Wedge DC, Angelopoulos N, Cantrill R, et al. Classification and Personalized Prognosis in Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med*. 2018 Oct 11;379(15):1416-30.
- Luque Paz D, Jouanneau-Courville R, Riou J, Ianotto JC, Boyer F, Chauveau A, et al. Leukemic evolution of polycythemia vera and essential thrombocythemia: genomic profiles predict time to transformation. *Blood Adv*. 2020 Oct 13;4(19):4887-97.
- Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL, Coltro G, Finke CM, Loscocco GG, et al. Mutation-enhanced international prognostic systems for essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Br J Haematol*. 2020 Apr;189(2):291-302.

Papel emergente de los neutrófilos en la trombosis de las neoplasias mieloproliferativas crónicas

Paqui Ferrer-Marín, Ernesto José Cuenca-Zamora

Hospital General Universitario Morales-Meseguer. Centro Regional de Hemodonación. Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB)-Arrixaca. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) (U765). Universidad Católica San Antonio de Murcia (UCAM)

› Introducción

Numerosos estudios han puesto de manifiesto la contribución de la leucocitosis en el aumento del riesgo trombótico (tanto arterial como venoso) en pacientes con neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMPc)⁽¹⁻³⁾. Clásicamente, la relación fisiopatológica entre leucocitosis y trombosis en NMP se ha explicado por el aumento del componente celular y por la interacción de estas células con el endotelio⁽⁴⁾.

En humanos, los leucocitos más abundantes en la sangre son los neutrófilos (60-70%). Los pacientes con NMP presentan una activación de los neutrófilos, como demuestra el aumento en la membrana de CD11b y el incremento de las concentraciones en plasma de proteasas leucocitarias (elastasa, mieloperoxidasa -MPO-, catepsina-G)^(4,5). Estas últimas provocan un aumento de la expresión de los receptores de adhesión endoteliales (Mac-1, PSGL-1, TREM-1L, CD14 y LAP), lo que favorece la adhesión de estas células al vaso dañado⁽⁴⁾. Sin embargo, cada vez hay una mayor evidencia de que esta no es la única vía por la que los neutrófilos contribuyen a la formación del trombo.

› Trampas extracelulares de neutrófilos y sus mecanismos de formación

Los neutrófilos constituyen la primera barrera de defensa frente a la invasión por patógenos. Participan en el sistema inmune innato eliminando los patógenos bien a través de fagocitosis o bien mediante la liberación de los factores antimicrobianos presentes en sus gránulos. En los últimos años, se ha identificado otra estrategia por la cual los neutrófilos eliminan patógenos, las **trampas extracelulares de neutrófilos (NET)**.

Los neutrófilos vacían su contenido nuclear al espacio extracelular dando lugar a los NET, una malla de ADN cubierta de histonas y proteínas antimicrobianas (como MPO, elastasa, catepsina-G y lactoferrina), que inmoviliza a los microbios y los destruye. Además del contenido nuclear, se ha confirmado la presencia del ADN mitocondrial en su estructura^(6,7).

El proceso de formación de NET se denomina **NETosis**, habiéndose reconocido 2 tipos de NETosis: suicida y vital. La **NETosis suicida (o lítica)** se considera una forma específica de muerte celular. Es dependiente de la activación de la NADPH oxidasa y de la generación de ROS⁽⁸⁾, las cuales provocan la activación de la enzima peptidil arginina deiminasa 4 (PAD4) del neutrófilo⁽⁹⁾. PAD4 se encarga de citrulinar histonas, promoviendo la descondensación de la cromatina dentro del núcleo y la pérdida de la forma lobular del neutrófilo^(9,10). El proceso resultante es la rotura de la membrana nuclear y la dispersión de la cromatina en el citoplasma, donde tiene lugar el ensamblaje entre los ácidos nucleicos y las proteínas granulares. Finalmente, se desintegra la membrana plasmática, las NET se liberan y el neutrófilo muere⁽¹¹⁾. La importancia de PAD4 en este proceso se ha demostrado porque ratones deficientes de PAD4 son incapaces de generar NET^(9,10). La NETosis suicida se produce en horas y conlleva la pérdida de la función del neutrófilo.

Por el contrario, la **NETosis vital (o no lítica)** se induce de forma rápida, en minutos, y preserva la integridad celular. En este caso, la enzima PAD4, tras activarse, induce la descondensación de la cromatina sin necesidad de ROS. Al igual que en la NETosis suicida, las enzimas granulares se translocan al núcleo y facilitan la descondensación de la cromatina y la rotura de la membrana nuclear. Sin embargo, tras la rotura de la membrana nuclear, las proteínas granulares (unidas a

la cromatina) son expulsadas al espacio extracelular pero el neutrófilo permanece vivo. Este tipo de NETosis se asocia sobre todo con enfermedades infecciosas, ya que, al permanecer vivo, puede continuar fagocitando patógenos^(11,12). En general, el que se induzca un mecanismo u otro parece ser dependiente del estímulo que desencadena el proceso⁽¹¹⁻¹³⁾: patógenos (bacterias, hongos, virus y protozoos) u otros factores como estímulos inflamatorios (lipopolisacárido -LPS-, interleucina-8 -IL-8-, factor de necrosis tumoral alfa -TNF- α -), plaquetas activadas, inmunocomplejos o fármacos.

Aunque las NET tienen un papel crítico en la inmunidad innata, su formación en exceso o una eliminación ineficaz pueden dar lugar a efectos adversos. Así, su degradación es un importante proceso fisiológico que lleva a cabo, además de los macrófagos, la DNasa I^(7,14). En la última década, numerosos estudios clínicos y preclínicos apoyan el papel de las NET en una gran variedad de patologías tanto infecciosas como no infecciosas (enfermedades autoinmunes, diabetes, aterosclerosis, vasculitis o cáncer y trombosis)^(7,11,15).

› Inmunotrombosis

La relación existente entre inmunidad innata y trombosis recibe el nombre de inmunotrombosis y se basa en la capacidad de las NET para inducir una respuesta procoagulante que conduzca a la formación de un trombo. La inmunotrombosis propone la existencia de una forma fisiológica de trombosis para la defensa contra los patógenos según la cual: a) la red de fibrina resultante impide la diseminación de patógenos; b) la formación de microtrombos previene la invasión a través de la circulación; c) el trombo genera un compartimento donde se concentran las sustancias antimicrobianas para conseguir una mayor eficacia; y, finalmente, d) la acumulación de depósitos de fibrinógeno o fibrina promueve el reclutamiento de otras células inmunes coordinando la respuesta inmune^(16,17). Mediadas por sus principales constituyentes, las NET pueden inducir trombosis por diferentes mecanismos:

- **Histonas:** se ha demostrado que las histonas H3 y H4 son capaces de activar a las plaquetas, a través de la vía de señalización de receptores TLR2 y TLR4/NF- κ B, favoreciendo su agregación y contribuyendo a la generación de trombina⁽¹⁸⁾. Este proceso se exagera por el secuestro, por parte de las histonas, de inhibido-

res de la coagulación como la trombosmodulina o la proteína C⁽¹⁹⁾.

- **Elastasa y catepsina-G:** localizadas en los gránulos de los polimorfonucleares neutrófilos (PMN), pueden cortar y oxidar, respectivamente, a proteínas anticoagulantes como el inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI) y la trombosmodulina. En concreto, la elastasa provoca la degradación del TFPI y de la antitrombina^(20,21). Además, la elastasa facilita la exposición del factor de von Willebrand (FvW) y, con ello, la adhesión de las plaquetas. Por su parte, la catepsina-G, además de contribuir a bloquear la actividad del TFPI, activa las plaquetas a través de la vía de señalización del receptor activado por proteasas 4 (PAR4). Así, ratones deficientes en elastasa y catepsina-G presentan defectos en la activación del factor tisular (FT), en la formación de fibrina y en la estabilización del trombo⁽¹⁹⁾.

- **FT:** el FT presente en las NET proviene no solo de los monocitos que migran a la zona inflamada, sino también de los neutrófilos, donde se postula que puede llegar por un mecanismo de autofagia. Este FT que llevan las NET es capaz de estimular la generación de trombina y la activación plaquetaria en experimentos *ex vivo*⁽²²⁾.

› Trampas extracelulares de neutrófilos en patología trombótica

Como se mencionó previamente, una producción descontrolada de NET en los vasos sanguíneos puede constituir la base para el desarrollo de trastornos trombóticos (arteriales, venosos o en la microcirculación)^(17,19). La participación de las NET en trombosis arterial y venosa se ha validado tanto en modelos animales como en estudios clínicos⁽²³⁾. A continuación, se detallan los estudios más destacados:

- **Trombosis venosa.** Experimentalmente, la estenosis en la vena cava inferior (VCI) de ratones ha demostrado la presencia de NET asociadas con FvW dentro del trombo venoso y un aumento de sus marcadores en plasma⁽²⁴⁾. Además, la inyección de histonas extracelulares promueve el desarrollo de trombosis venosa profunda (TVP), mientras que la administración de DNasa I la atenúa⁽²⁴⁾. También se han identificado NET en trombos venosos humanos y en plasma de pacientes con TVP y tromboembolismo venoso, asociándose con un mayor riesgo trombótico⁽²⁵⁾.

- **Enfermedad cardiovascular y trombosis arterial.**

Recientes estudios han mostrado cómo las NET contribuyen al inicio y la progresión de lesiones ateroscleróticas y al crecimiento del trombo arterial⁽²⁶⁾. Así, en un modelo murino de aterosclerosis, la inhibición de PAD4 fue capaz de prevenir la formación de NET, disminuir el tamaño de la lesión aterosclerótica y retrasar la trombosis de la arteria carótida⁽²⁷⁾. Otro trabajo realizado sobre ratones *ApoE*^{-/-} mostró que los cristales de colesterol (estímulo estéril) tienen la capacidad de generar NET que activaban macrófagos durante el proceso de aterosclerosis. Las NET así generadas liberan citocinas proinflamatorias, a través de la vía del interferón (IFN) de tipo I, amplificando así el reclutamiento celular en la zona de la lesión⁽²⁸⁾. En humanos, la presencia de NET se ha asociado con aterosclerosis coronaria e infarto de miocardio⁽²⁹⁾.

- **Trombosis microvascular.** La inyección de histonas extracelulares en ratones reproduce la fisiopatología de la coagulación intravascular diseminada (CID) al inducir trombocitopenia, formación de microtrombos ricos en plaquetas y trombosis microvascular⁽¹⁸⁾. En el modelo murino de ratones deficientes en elastasa/catesina-G se observa menores depósitos de fibrina en los órganos afectados y el tratamiento con antihistonas disminuye la oclusión microvascular⁽¹⁹⁾. Pacientes con sepsis y/o CID tienen niveles elevados de marcadores de NET y de agregados leucocitos-plaquetas⁽³⁰⁾.

› **Trampas extracelulares de neutrófilos en neoplasias mieloproliferativas crónicas**

En la actualidad, cada vez existe una mayor evidencia del papel de la inflamación en la patogenia de las NMPc y, como se mencionó previamente, las NET aparecen en situaciones inflamatorias⁽¹¹⁾ y en cáncer⁽¹⁵⁾ bajo el estímulo de citocinas (TNF- α e IL-8)⁽³¹⁾ secretadas por la propia neoplasia o por plaquetas activadas⁽³²⁾.

El primer estudio publicado sobre el papel de las NET en pacientes con NMPc se realizó, *in vivo*, en plasma de pacientes con NMPc en condiciones basales, esto es, sin estimulación alguna. Los autores de este estudio demostraron un aumento del ADN libre circulante (el cual se correlacionaba con los niveles de LDH). Sin embargo, no encontraron un aumento de los complejos MPO-histona, marcador específico de NETosis. Tampoco encontraron asociación de NET o nucleosomas

con trombosis. Las limitaciones de este trabajo, sin embargo, son numerosas debido a la heterogeneidad genotípica y clínica de los pacientes incluidos⁽³³⁾.

Recientemente, el grupo de la Dra. D. Wagner y B. Elbert (Boston) ha demostrado la conexión entre la mutación JAK2V617F y la formación de NET y trombosis⁽³⁴⁾. Sus hallazgos muestran que neutrófilos estimulados de pacientes con NMPc presentan un aumento de la formación de NET, el cual se anula tras la inhibición farmacológica de la vía JAK. Ratones *knock-in* de JAK2V617F son propensos a la formación de NET y tienen un fenotipo protrombótico. La inhibición de la vía JAK-STAT con ruxolitinib evita la formación de NET y reduce la trombosis venosa en el modelo murino. Además, los neutrófilos de pacientes con policitemia vera y JAK2V617F homocigotos tienen un aumento en la expresión de PAD4, proteína requerida en la formación de NET. En un modelo murino JAK2V617F, los mismos autores demuestran que, *in vivo*, la formación de NET y la trombosis son dependientes de PAD4. Estos hallazgos son consistentes con estudios previos en los que la eritrocitosis aislada en ratones (tras inyección exógena de eritropoyetina) no es suficiente para la formación de trombos. Finalmente, realizaron un estudio poblacional que incluyó a más de 10.000 individuos sin enfermedad mielóide conocida (estudio caso-control con controles sanos y pacientes con esquizofrenia); la presencia de hematopoyesis clonal de significado incierto (CHIP) con mutación en JAK2V617F se asoció a un aumento significativo del riesgo de trombosis en comparación con los que no tenían mutaciones CHIP o a individuos CHIP portadores de otras mutaciones somáticas. En función de estos hallazgos, los autores sugieren que las mutaciones de JAK2V617F, incluso con baja carga alélica, se asocian a un incremento del riesgo de trombosis venosa que puede estar detrás de algunos casos de trombosis espontánea en la población general.

› **Consideraciones finales**

En vista de todo lo expuesto, se ha postulado que las NET podrían utilizarse como biomarcadores de riesgo trombótico. Se necesitan más estudios para saber si la inhibición de moléculas implicadas en la formación de NET o la activación de moléculas implicadas en su eliminación (por ejemplo, la adición de DNasa) tienen implicaciones pronósticas.

► Bibliografía

- Barbui T, Carobbio A, Rambaldi A, Finazzi G. Perspectives on thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera: is leukocytosis a causative factor? *Blood*. 2009;114(4):759-63.
- Buxhofer-Ausch V, Gisslinger H, Thiele J, Gisslinger B, Kvasnicka HM, Müllauer L, et al. Leukocytosis as an important risk factor for arterial thrombosis in WHO-defined early/prefibrotic myelofibrosis: an international study of 264 patients. *Am J Hematol*. 2012;87:669-72.
- Carobbio A, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Ruggeri M, Rodeghiero F, et al. Risk factors for arterial and venous thrombosis in WHO-defined essential thrombocythemia: an international study of 891 patients. *Blood*. 2011;117:5857-9.
- Falanga A, Marchetti M. Thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *Sem Thromb Hemost*. 2014;40(3):348-58.
- Barbui T, Finazzi G, Falanga A. Myeloproliferative neoplasms and thrombosis. *Blood*. 2013;122(13):2176-84.
- Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(3):159-75.
- Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(2):134-47.
- Stoiber W, Obermayer A, Steinbacher P, Krautgartner WD. The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Formation of Extracellular Traps (ETs) in Humans. *Biomolecules*. 2015;5(2):702-23.
- Li P, Li M, Lindberg MR, Kennett MJ, Xiong N, Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med*. 2010;207(9):1853-62.
- Leshner M, Wang S, Lewis C, Zheng H, Chen XA, Santy L, et al. PAD4 mediated histone hypercitullination induces heterochromatin decondensation and chromatin unfolding to form neutrophil extracellular trap-like structures. *Front Immunol*. 2012 Oct 4;3:307.
- Jorch SK, Kubes P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in non-infectious disease. *Nat Med*. 2017;23(3):279-87.
- Desai J, Mulay SR, Nakazawa D, Anders HJ. Matters of life and death. How neutrophils die or survive along NET release and is "NETosis" = necroptosis?. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(11-12):2211-9.
- Zawrotniak M, Rapala-Kozik M. Neutrophil extracellular traps (NETs) - formation and implications. *Acta Biochim Pol*. 2013;60(3):277-84.
- Farrera C, Fadeel B. Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process. *J Immunol*. 2013;191(5):2647-56.
- Olsson AK, Cedervall J. NETosis in Cancer - Platelet-Neutrophil Crosstalk Promotes Tumor-Associated Pathology. *Front Immunol*. 2016;7:373.
- Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(1):34-45.
- Pfeiler S, Stark K, Massberg S, Engelmann B. Propagation of thrombosis by neutrophils and extracellular nucleosome networks. *Haematologica*. 2017;102(2):206-13.
- Semeraro F, Ammollo CT, Morrissey JH, Dale GL, Friese P, Esmon NL, Esmon CT. Extracellular histones promote thrombin generation through platelet-dependent mechanisms: involvement of platelet TLR2 and TLR4. *Blood*. 2011 Aug 18;118(7):1952-61.
- Massberg S, Gahl L, von Bruehl ML, Manukyan D, Pfeiler S, Goosmann C, et al. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med*. 2010;16(8):887-96.
- Steppich BA, Seitz I, Busch G, Stein A, Ott I. Modulation of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor-1 by neutrophil proteases. *Thromb Haemost*. 2008;100(6):1068-75.
- Jordan RE, Nelson RM, Kilpatrick J, Newgren JO, Esmon PC, Fournel MA. Inactivation of human antithrombin by neutrophil elastase. Kinetics of the heparin-dependent reaction. *J Biol Chem*. 1989;264(18):10493-500.
- Kambas K, Mitroulis I, Ritis K. The emerging role of neutrophils in thrombosis - the journey of TF through NETs. *Front Immunol*. 2012;3:385.
- Qi H, Yang S, Zhang L. Neutrophil Extracellular Traps and Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis and Thrombosis. *Front Immunol*. 2017;8:928.
- Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, Thomas GM, Martinod K, De Meyer SF, et al. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost*. 2012;10(1):136-44.
- Savchenko AS, Martinod K, Seidman MA, Wong SL, Borissoff JI, Piazza G, et al. Neutrophil extracellular traps form predominantly during the organizing stage of human venous thromboembolism development. *J Thromb Haemost*. 2014;12(6):860-70.
- Doring Y, Soehnlein O, Weber C. Neutrophil Extracellular Traps in Atherosclerosis and Atherothrombosis. *Circ Res*. 2017;120(4):736-43.
- Knight JS, Luo W, O'Dell AA, Yalavarthi S, Zhao W, Subramanian V, et al. Peptidylarginine deiminase inhibition reduces vascular damage and modulates innate immune responses in murine models of atherosclerosis. *Circ Res*. 2014;114(6):947-56.
- Nahrendorf M, Swirski FK. Immunology. Neutrophil-macrophage communication in inflammation and atherosclerosis. *Science*. 2015;349(6245):237-8.
- Mangold A, Alias S, Scherz T, Hofbauer T, Jakowitsch J, Panzenböck A, et al. Coronary neutrophil extracellular trap burden and deoxyribonuclease activity in ST-elevation acute coronary syndrome are predictors of ST-segment resolution and infarct size. *Circ Res*. 2015;116(7):1182-92.
- Hashiba M, Huq A, Tomino A, Hiraoka A, Hattori T, Miyabe H, et al. Neutrophil extracellular traps in patients with sepsis. *J Surg Res*. 2015;194(1):248-54.
- Keshari RS, Jyoti A, Dubey M, Kothari N, Kohli M, Bogra J, et al. Cytokines Induced Neutrophil Extracellular Traps Formation: Implication for the Inflammatory Disease Condition. *PLoS One*. 2012;7(10):e48111.
- Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss BM, Nguyen JX, Marques MB, Monestier M, et al. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest*. 2012;122:2661-71.
- Oyarzún CPM, Carestia A, Lev PR, Glembotsky AC, Castro Ríos MA, Moiraghi B, et al. Neutrophil extracellular trap formation and circulating nucleosomes in patients with chronic myeloproliferative neoplasms. *Sci Rep*. 2016;6:38738.
- Wolach O, Sellar RS, Martinod K, Cherpokova D, McConkey M, Chappell RJ, et al. Increased neutrophil extracellular trap formation promotes thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *Sci Transl Med*. 2018;10(436):eaan8292.

Tratamiento actual de la mielofibrosis

Juan Carlos Hernández Boluda

Servicio de Hematología. Hospital Clínico Universitario de Valencia

► Principios generales del tratamiento

Dada la heterogeneidad de las manifestaciones clínicas de la mielofibrosis (MF) y la ausencia de un tratamiento eficaz para todas ellas, no existe un tratamiento estándar para la enfermedad (Tabla 1). La elección de la modalidad terapéutica más adecuada en cada paciente deberá tener en consideración: a) la gran variabilidad clínica de la MF; b) que el tratamiento es por ahora fundamentalmente paliativo (con la excepción del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos); y c) las limitaciones derivadas de la edad, ya que la mayoría de los pacientes tiene una edad avanzada y, por lo tanto, no son candidatos a terapéuticas intensivas.

La primera decisión en relación con el manejo de un paciente con MF consiste en valorar si precisa o no tra-

tamiento^(1,2). Si el paciente está asintomático (~ 30% al diagnóstico) y no presenta datos analíticos que supongan un riesgo potencial es factible mantener una conducta expectante. En caso contrario, debe determinarse si el paciente es candidato a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos, teniendo en cuenta su edad, estado general, comorbilidades y previsible supervivencia según los índices pronósticos de la MF.

En general, se suele reservar el trasplante para los pacientes de edad inferior a 65-70 años con adecuado estado funcional cuya expectativa de vida sea inferior a 5 años en función de los modelos pronósticos de la MF (grupos de riesgo intermedio-2 y alto)⁽³⁾. Existe controversia con respecto a los pacientes de riesgo intermedio-1, grupo en el que los resultados del trasplante son relativamente buenos. Así, la mayoría de los autores considera excesiva la mortalidad del procedimiento como para recomendarlo, debiendo valorarse en estos casos la posible existencia de otros factores desfavorables como la anemia con dependencia transfusional refractaria al tratamiento, un porcentaje elevado de blastos circulantes (> 2%) o alteraciones citogenéticas o moleculares de alto riesgo (triple negatividad, mutación de los genes *ASXL1*, *EZH2*, *SRSF2*, *U2AF1* Q157, *IDH1* o *IDH2*).

Cabe destacar que en la práctica clínica la mayoría de los pacientes con MF (~ 90%) no serán candidatos a trasplante y su tratamiento irá dirigido al control de los síntomas y a la prevención de las complicaciones de la enfermedad (deterioro funcional orgánico, trombosis, hemorragia).

► Tratamiento de la anemia

La anemia es uno de los problemas clínicos más frecuentes de la MF. Está presente en una cuarta parte de los pacientes al diagnóstico y hasta un 80% la desarrollará durante el curso de la enfermedad. Suele

Tabla 1. Opciones de tratamiento en la mielofibrosis

| Abstención terapéutica | |
|--|--|
| Tratamiento de la anemia | • Agentes eritropoyéticos (eritropoyetina 30.000 U/semana, darbepoetina 150-300 µg/semana) |
| | • Anabolizantes (danazol 600 mg/día, dosis inicial) |
| | • Inmunomoduladores + prednisona (talidomida 50 mg/día, lenalidomida 5-10 mg/día) |
| | • Corticoides (prednisona 0,5 mg/kg/día) |
| Tratamiento de las manifestaciones hiperproliferativas | • Agentes citorreductores (hidroxiurea 0,5-2 g/día) |
| | • Interferón pegilado |
| | • Ruxolitinib (5, 15 o 20 mg/12 h según la cifra de plaquetas) |
| | • Fedratinib (400 mg/día) |
| | • Esplenectomía |
| | • Irradiación esplénica |
| Ensayos clínicos con nuevos fármacos | |
| Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos | |

tener un origen multifactorial (anemia arregenerativa, hiperesplenismo, hemodilución por expansión del volumen plasmático, hemólisis, ferropenia, déficit vitamínico). Por tanto, primero habrá que corregir todas aquellas causas tratables que puedan haber contribuido a su desarrollo.

› *Agentes estimuladores de la eritropoyesis*

El tratamiento inicial dependerá de los niveles séricos basales de eritropoyetina. Si estos son inadecuados al grado de anemia (en la práctica, < 125-150 U/L), el fármaco de elección es un agente estimulante de la eritropoyesis (eritropoyetina 30.000 U/semana, darbepoetina alfa 150-300 µg/semana)⁽¹⁾. Con ello, se obtienen alrededor de un 50% de respuestas, muchas de ellas duraderas (mediana: 19 meses)^(4,5). Cabe destacar que este tratamiento puede ser eficaz para el manejo de la anemia inducida por ruxolitinib⁽⁶⁾. Las respuestas se observan en los 3 primeros meses, por lo que una falta de respuesta tras ese periodo es criterio de suspensión del tratamiento. Se ha observado un incremento del riesgo de trombosis venosa en los pacientes con neoplasias sólidas tratados con agentes eritropoyéticos, pero esta asociación no se ha descrito en enfermos con MF⁽⁵⁾. De cualquier forma, este tratamiento debe suspenderse cuando la hemoglobina (Hb) sea > 12 g/dL.

› *Tratamiento anabolizante*

Cuando los niveles basales de eritropoyetina son altos se recomiendan los fármacos anabolizantes de entrada, ya que con ellos se obtiene un 30% de respuestas favorables de la anemia (duración mediana: 14 meses), que con frecuencia se acompañan de un incremento en la cifra de plaquetas⁽⁷⁾. El más utilizado es el danazol, a la dosis inicial de 600 mg/día, con disminución progresiva de la dosis una vez obtenida la respuesta hasta llegar a una dosis de mantenimiento de 200 mg/día. Las respuestas suelen aparecer entre los 3 y los 6 meses del inicio del tratamiento. La probabilidad de respuesta es significativamente menor (~ 20%) en pacientes con dependencia transfusional de hemafíes. En cuanto a los efectos adversos, destacan el hirsutismo, las alteraciones en la función hepática y la posibilidad de inducir o estimular el crecimiento de tumores de próstata e hígado, motivo por el que se recomienda realizar un cribaje de cáncer de próstata

(PSA) antes de iniciar el tratamiento y controles ecográficos periódicos.

› *Agentes inmunomoduladores (IMiD)*

Se emplean la talidomida (50 mg/día) o la lenalidomida (10 mg/día; 5 mg/día si hay trombopenia) en combinación con prednisona a dosis bajas (30 mg/día el primer mes, con retirada progresiva en los siguientes 2 meses)⁽¹⁾. Estos fármacos mejoran la anemia en una cuarta parte de los casos y pueden elevar la cifra de plaquetas, si bien son poco eficaces para el control de la esplenomegalia. Provocan frecuentes efectos adversos, como la neuropatía, el estreñimiento y la aceleración mieloproliferativa en el caso de la talidomida o la mielosupresión y las erupciones cutáneas con la lenalidomida. Se recomienda el uso de ácido acetilsalicílico para la prevención de los fenómenos trombóticos.

› *Tratamiento corticoide*

Constituye el tratamiento de elección de la anemia hemolítica autoinmune asociada a la MF, pero también puede ser útil en casos seleccionados de anemia de origen no inmune tras el fracaso a otros tratamientos. En una serie retrospectiva española un 40% de los pacientes respondió a los corticoides tras el fracaso a tratamientos previos de la anemia, siendo la duración mediana de las respuestas de 12 meses⁽⁸⁾. Una cuarta parte de los enfermos con trombocitopenia presentó un incremento clínicamente significativo de la cifra de plaquetas. En general, se recomienda el uso de prednisona, a una dosis inicial de 30 mg/día, con disminución progresiva en caso de respuesta a una dosis de mantenimiento de 15-20 mg al día o retirada rápida si no la hay tras un mes de tratamiento. Las respuestas no suelen mantenerse si se suspende el tratamiento corticoide.

› *Tratamiento de las manifestaciones hiperproliferativas*

› *Agentes citorreductores clásicos*

En los enfermos con síntomas constitucionales leves, leucocitosis y/o trombocitosis o molestias derivadas de un aumento moderado del tamaño del bazo, el

tratamiento citorreductor oral constituye una opción terapéutica razonable⁽²⁾. El fármaco más utilizado es la hidroxiurea, a una dosis inicial de 500 mg/día, que posteriormente se ajusta en función de la tolerancia hematológica⁽⁹⁾. En ocasiones, su uso acentúa la intensidad de la anemia y obliga a reducir o suspender su administración, o a añadir un agente eritropoyético. Permite controlar la esplenomegalia en alrededor de un 40% de los casos, pero durante un periodo corto (mediana de la respuesta de un año).

› Interferón

El interferón pegilado α -2a se ha empleado en series pequeñas de pacientes con MF en fase inicial/prefibrótica o con un perfil clínico mieloproliferativo (con leucocitosis y/o trombocitosis)⁽¹⁰⁾. Es útil para controlar la leucocitosis y en ocasiones los síntomas constitucionales y el prurito, pero tiene un efecto limitado para reducir la esplenomegalia. En un estudio francés, la carga alélica de JAK2V617F disminuyó más del 50% en 10 de 27 casos evaluables (37%), si bien este efecto no influyó en la supervivencia ni en el riesgo de leucemia⁽¹⁰⁾. Los efectos adversos comunes del interferón incluyen el cuadro pseudogripal, la astenia, las alteraciones neurológicas y psiquiátricas (depresión) y la disfunción inmune tiroidea.

› Inhibidores de la vía JAK/STAT

› Ruxolitinib

Ruxolitinib (Jakavi®), un inhibidor de JAK1 y JAK2, fue aprobado en 2012 por las autoridades sanitarias europeas (European Medicines Agency -EMA-) para los pacientes adultos con MF primaria o secundaria a una trombocitemia o policitemia vera que presenten esplenomegalia sintomática y/o síntomas constitucionales, en función de 2 grandes estudios pivotaes fase III llamados *COMFORT-I* (ruxolitinib frente a placebo)⁽¹¹⁾ y *COMFORT-II* (ruxolitinib frente al mejor tratamiento disponible)⁽¹²⁾. La experiencia conjunta de los 2 estudios *COMFORT* evidenció una mejoría significativa de la carga sintomática de forma generalizada, mientras que alrededor de un 50% de los enfermos tuvieron una disminución de al menos un 35% en el volumen del bazo (50% del tamaño por palpación)⁽¹³⁾. La mediana de duración de las respuestas fue de 3 años, pero muchos pacientes siguieron beneficián-

dose del control sintomático a pesar del recrecimiento del tamaño del bazo.

La resistencia primaria a ruxolitinib es rara (~ 5%), siendo más frecuente el desarrollo de respuesta subóptima (pérdida de beneficio clínico) en el contexto de ajuste de dosis por efectos adversos. No se han descrito mutaciones del dominio catalítico de JAK2 en los pacientes con resistencia a ruxolitinib. En cambio, la presencia de mutaciones somáticas adicionales⁽¹⁴⁾ o su adquisición durante el tratamiento⁽¹⁵⁾ se han asociado a un mayor riesgo de resistencia a ruxolitinib.

Diversos estudios han demostrado un incremento en la supervivencia de los pacientes con MF tratados con ruxolitinib^(13,16), lo que se atribuye a una mejora en su condición física que los hace menos vulnerables a las complicaciones de la enfermedad. Sin embargo, ruxolitinib no parece tener capacidad de erradicar la clona neoplásica de la MF, dado que ni la carga alélica de la forma mutada de JAK2 ni la fibrosis medular se reducen de forma sustancial en la mayoría de los pacientes. El pronóstico de los pacientes que fracasan a ruxolitinib es malo, con una supervivencia mediana algo superior al año^(15,17).

Ruxolitinib tiene un perfil de toxicidad favorable, siendo los efectos adversos más frecuentes las citopenias. La dosis de inicio debe adaptarse al recuento de plaquetas del paciente (20 mg/12 h si más de 200.000 plaquetas/mm³, 15 mg/12 h si 100.000-200.000 plaquetas/mm³, 5 mg/12 h si 50.000-100.000 plaquetas/mm³). La toxicidad extrahematológica de ruxolitinib (equimosis, diarrea, mareo, cefalea) suele ser de grado leve. La toxicidad neurológica, que ha supuesto un problema limitante para algunos inhibidores de JAK, no es un efecto adverso frecuente con ruxolitinib, si bien algunos pacientes (~ 5%) desarrollan neuropatía periférica sensitiva de grado leve. Se ha descrito un aumento en la incidencia de infecciones urinarias y de reactivaciones del virus herpes zóster, sin relación con la dosis del fármaco^(18,19). Ocasionalmente, se han referido infecciones por gérmenes oportunistas o reactivación del virus de la hepatitis B. Por último, ruxolitinib podría facilitar el desarrollo de tumores cutáneos de perfil biológico agresivo, por lo que se recomienda protección solar y una adecuada monitorización dermatológica.

Es importante recordar que, en caso de tener que suspender el tratamiento, ello debe hacerse de forma progresiva, a fin de evitar la reaparición brusca de los síntomas debido al aumento en la producción

de las citocinas suprimidas por el fármaco. En ocasiones puede ser útil añadir prednisona a bajas dosis (30 mg/día) durante unos días.

› Fedratinib

Fedratinib (Inrebic®), un inhibidor selectivo de JAK2 y FLT3, fue aprobado en 2019 por las autoridades sanitarias norteamericanas (Food and Drug Administration -FDA-) para los pacientes adultos con MF primaria o secundaria a una trombocitemia o policitemia vera con riesgo intermedio-2 o alto, incluidos aquellos tratados previamente con ruxolitinib, en función del estudio pivotal de fase III *JAKARTA1* (fedratinib frente a placebo)⁽²⁰⁾. El control de la esplenomegalia con fedratinib en pacientes sin exposición previa a ruxolitinib (38% de respuestas a los 6 meses) fue similar al referido en los estudios *COMFORT*. El ensayo clínico de fase II *JAKARTA2* incluyó pacientes con MF que habían desarrollado resistencia/intolerancia a ruxolitinib. En el análisis de 97 pacientes por intención de tratamiento, las tasas de respuesta esplénica y sintomática fueron del 31 y el 27%, respectivamente⁽²¹⁾.

Fedratinib tiene una vida media prolongada que permite su administración en una toma diaria (400 mg/día). Sus efectos adversos más frecuentes son las citopenias y las alteraciones digestivas (náuseas, diarrea). El desarrollo clínico de fedratinib fue detenido por la FDA entre 2013 y 2017 tras detectarse varios casos con sospecha clínica de encefalopatía de Wernicke, por lo que la experiencia a largo plazo con este fármaco es limitada. Posteriormente, se comprobó que la incidencia de esta complicación es muy baja (3-5 casos de 670 pacientes expuestos a fedratinib). De cualquier forma, es obligatorio medir los niveles de tiamina basales y periódicamente durante el tratamiento de cara a reponer depósitos en caso necesario y prevenir así el desarrollo de esta complicación neurológica.

› Esplenectomía y radioterapia esplénica

La esplenectomía sigue teniendo un papel en el tratamiento de la anemia hemolítica autoinmune refractaria a los corticoides y en pacientes con esplenomegalia sintomática o dependencia transfusional de hematíes que no mejora con tratamiento farmacológico⁽²²⁾. En esta última situación, la esplenectomía permite respuestas duraderas de la anemia en un 25% de los casos. La esplenectomía en la MF tiene una ele-

vada morbilidad y una mortalidad perioperatoria del 5-10%, debido a complicaciones hemorrágicas (hemoperitoneo), infecciones y, con menor frecuencia, a trombosis⁽²²⁾.

La radioterapia esplénica es eficaz en el control transitorio del dolor (durante unos 4-6 meses), pero en un tercio de los casos provoca pancitopenia severa y prolongada, asociada a cierta mortalidad⁽¹⁾. Está indicada solo en pacientes candidatos a esplenectomía cuyo estado general contraindica este procedimiento.

› Bibliografía

1. Cervantes F. How I treat myelofibrosis. *Blood*. 2014;124(17):2635-42.
2. Barbui T, Tefferi A, Vannucchi AM, Passamonti F, Silver RT, Hoffman R, et al. Philadelphia chromosome-negative classical myeloproliferative neoplasms: revised management recommendations from European LeukemiaNet. *Leukemia*. 2018;32(5):1057-69.
3. Kröger NM, Deeg JH, Olavarria E, Niederwieser D, Bacigalupo A, Barbui T, et al. Indication and management of allogeneic stem cell transplantation in primary myelofibrosis: a consensus process by an EBMT/ELN international working group. *Leukemia*. 2015;29(11):2126-33.
4. Cervantes F, Álvarez-Larrán A, Hernández-Boluda JC, Sureda A, Granell M, Vallansot R, et al. Darbepoetin-alpha for the anaemia of myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol*. 2006;134(2):184-6.
5. Hernández-Boluda JC, Correa JG, García-Delgado R, Martínez-López J, Álvarez-Larrán A, Fox ML, et al. Predictive factors for anemia response to erythropoiesis stimulating agents in myelofibrosis. *Eur J Haematol*. 2017 Apr;98(4):407-14.
6. McMullin MF, Harrison CN, Niederwieser D, Demuyneck H, Jäkel N, Gopalakrishna P, et al. The use of erythropoiesis-stimulating agents with ruxolitinib in patients with myelofibrosis in COMFORT-II: an open-label, phase 3 study assessing efficacy and safety of ruxolitinib versus best available therapy in the treatment of myelofibrosis. *Exp Hematol Oncol*. 2015;4:26.
7. Cervantes F, Isola IM, Álvarez-Larrán A, Hernández-Boluda JC, Correa JG, Pereira A. Danazol therapy for the anemia of myelofibrosis: assessment of efficacy with current criteria of response and long-term results. *Ann Hematol*. 2015;94(11):1791-6.
8. Hernández-Boluda JC, Martínez-Trillos A, García-Gutiérrez V, Ferrer-Marín F, Xicoy B, Álvarez-Larrán A, et al. Long-term results of prednisone treatment for the anemia of myelofibrosis. *Leuk Lymphoma*. 2016;57(1):120-4.
9. Martínez-Trillos A, Gaya A, Maffioli M, Arellano-Rodrigo E, Calvo X, Díaz-Beyá M, Cervantes F. Efficacy and tolerability of hydroxyurea in the treatment of the hyperproliferative manifestations of myelofibrosis: results in 40 patients. *Ann Hematol*. 2010 Dec;89(12):1233-7.
10. Iannotto JC, Chauveau A, Boyer-Perrard F, Gyan E, Laribi K, Cony-Makhoul P, et al. Benefits and pitfalls of pegylated interferon-2a therapy in patients with myeloproliferative neoplasm-associated myelofibrosis: a French Inter-

- group of Myeloproliferative neoplasms (FIM) study. *Haematologica*. 2018 Mar;103(3):438-46.
11. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, Levy RS, Gupta V, DiPersio JF, et al. A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis. *N Engl J Med*. 2012;366(9):799-807.
 12. Harrison C, Kiladjian JJ, Al-Ali HK, Gisslinger H, Waltzman R, Stalbovskaya V, et al. JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. *N Engl J Med*. 2012;366(9):787-98.
 13. Vannucchi AM, Kantarjian HM, Kiladjian JJ, Gotlib J, Cervantes F, Mesa RA, et al. A pooled analysis of overall survival in COMFORT-I and COMFORT-II, 2 randomized phase III trials of ruxolitinib for the treatment of myelofibrosis. *Haematologica*. 2015;100(9):1139-45.
 14. Patel KP, Newberry KJ, Luthra R, Jabbour E, Pierce S, Cortes J, et al. Correlation of mutation profile and response in patients with myelofibrosis treated with ruxolitinib. *Blood*. 2015;126(6):790-7.
 15. Newberry KJ, Patel K, Masarova L, Luthra R, Manshouri T, Jabbour E, et al. Clonal evolution and outcomes in myelofibrosis after ruxolitinib discontinuation. *Blood*. 2017 Aug 31;130(9):1125-31.
 16. Verstovsek S, Kantarjian HM, Estrov Z, Cortes JE, Thomas DA, Kadia T, et al. Long-term outcomes of 107 patients with myelofibrosis receiving JAK1/JAK2 inhibitor ruxolitinib: survival advantage in comparison to matched historical controls. *Blood*. 2012;120(6):1202-9.
 17. Palandri F, Breccia M, Bonifacio M, Polverelli N, Elli EM, Benevolo G, et al. Life after ruxolitinib: Reasons for discontinuation, impact of disease phase, and outcomes in 218 patients with myelofibrosis. *Cancer*. 2020;126(6):1243-52.
 18. Lussana F, Cattaneo M, Rambaldi A, Squizzato A. Ruxolitinib-associated infections: a systematic review and meta-analysis. *Am J Hematol*. 2018;93(3):339-47.
 19. Polverelli N, Breccia M, Benevolo G, Martino B, Tieghi A, Latagliata R, et al. Risk factors for infections in myelofibrosis: role of disease status and treatment. A multicenter study of 507 patients. *Am J Hematol*. 2017;92(1):37-41.
 20. Pardanani A, Harrison C, Cortes JE, Cervantes F, Mesa RA, Milligan D, et al. Safety and Efficacy of Fedratinib in Patients With Primary or Secondary Myelofibrosis: a Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2015;1(5):643-51.
 21. Harrison CN, Schaap N, Vannucchi AM, Kiladjian JJ, Jourdan E, Silver RT, et al. Fedratinib in patients with myelofibrosis previously treated with ruxolitinib: an updated analysis of the JAKARTA2 study using stringent criteria for ruxolitinib failure. *Am J Hematol*. 2020 Jun;95(6):594-603.
 22. Tefferi A, Mesa RA, Nagorney DM, Schroeder G, Silverstein MN. Splenectomy in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a single-institution experience with 223 patients. *Blood*. 2000;95(7):2226-33.

SUPERANDO GRANDES DESAFÍOS EN EL TRASPLANTE HEMATOPOYÉTICO

Coordinadores:

Dr. Juan Carlos Vallejo Llamas. Hospital Universitario Donostia. Gipuzkoa

Dr. José Luis Bello López. Complejo Hospitalario Universitario de Santiago.
Santiago de Compostela

Microangiopatía trombótica asociada al trasplante hematopoyético: diagnóstico y tratamientos actuales

Enric Carreras

Barcelona Endothelium Team (BET). Josep Carreras Foundation and Leukemia Research Institute. Hospital Clinic/University of Barcelona Campus. Barcelona

➤ Introducción

La microangiopatía trombótica (MAT) asociada al trasplante hematopoyético (TH) es consecuencia de la disfunción del endotelio vascular que todo TH comporta^(1,2). Esta disfunción postrasplante parece ser la causante de diversos síndromes clínicos observados después de este procedimiento que se agrupan bajo la denominación de síndromes de disfunción endotelial pos-TH (Tabla 1). Estos síndromes tienen como principales características: presentarse precozmente tras el trasplante, compartir diversas manifestaciones clínicas y poder evolucionar hacia un fallo multiorgánico de no ser diagnosticados y tratados precozmente.

➤ Fisiopatogenia

La fisiopatología de las MAT asociadas al TH (MAT-AT) difiere notablemente de la observada en la púrpura

trombótica trombocitopénica idiopática, como evidencian los niveles normales de ADAMTS13 y de factor de von Willebrand. Tiene más semejanza con el síndrome hemolítico urémico atípico (aHUS), como sugieren las crecientes pruebas del papel de la activación del complemento en su fisiopatología. La lesión de las células endoteliales (EC) es fundamental en la patogénesis de la MAT-AT. La actual hipótesis de los 2 estímulos⁽³⁾ intenta unificar todos sus posibles mecanismos patogénicos. El primer estímulo sería producido por las habituales señales que modifican el fenotipo de cualquier EC (mediadores solubles, oxigenación, hemodinámica, temperatura, pH), así como factores predisponentes, como la inmovilización prolongada, la infección bacteriana-fúngica, la actividad de la enfermedad de base y el empleo de G-CSF, de donantes no emparentados o con incompatibilidades HLA, o de agentes muy lesivos para las EC como la fludarabina, o las dosis altas de busulfán. El segundo estímulo sería producido por el empleo de inhibidores de la calcineurina (ICN) o agentes mTOR, la irradiación corporal total y la presencia de enfermedad injerto contra el receptor aguda (EICRa). Todos estos estímulos desencadenarían la sucesión de eventos que se indican en la Figura 1.

La disfunción endotelial parece la responsable de la activación del sistema del complemento a través de la activación de los neutrófilos por la IL-8 (originada en los cuerpos de Weibel-Palade de las EC o en los propios neutrófilos) y otras muchas citocinas menos estudiadas. Estos neutrófilos activados liberan al espacio extracelular las denominadas NET (*neutrophil extracellular traps*) formados por una malla de ADN que encierra histonas y proteínas antimicrobianas, como mieloperoxidasa, elastasa, proteinasa 3, catepsina G, lactoferrina, triptasa y gelatinasa, entre otras⁽⁴⁾. Además, de esta acción antibacteriana, las NET pueden, entre otras funciones, activar tanto la vía clásica como la alternativa del

Tabla 1. Síndromes de disfunción endotelial postrasplante hematopoyético

- Síndrome de obstrucción sinusoidal⁽¹⁾
- Síndrome de hiperpermeabilidad capilar
- Síndrome del preimplante
- Síndrome del implante
- Microangiopatía trombótica asociada al trasplante hematopoyético
- Síndromes de neumonía idiopática de origen vascular
 - Hemorragia alveolar difusa
 - Síndrome de hiperpermeabilidad capilar pulmonar
 - Síndrome de distrés respiratorio periimplante
- Síndrome de encefalopatía posterior reversible
- Enfermedad injerto contra el receptor aguda (entidad provisional)

Carreras E. Bone Marrow Transplantation 2020 Mar 12. doi: 10.1038/s41409-020-0852-2

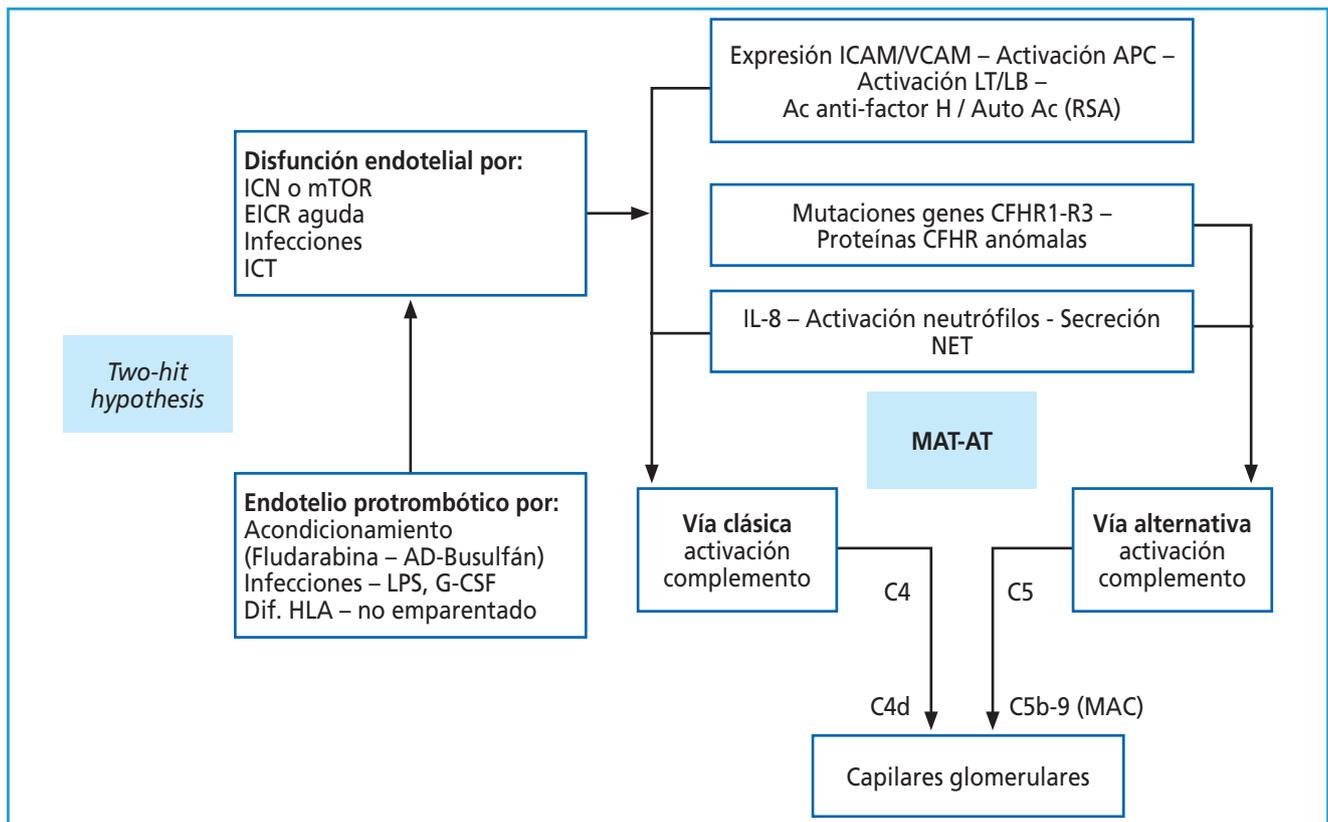


Figura 1. Esquema de la fisiopatología en las microangiopatías trombóticas asociadas al trasplante hematopoyético (MAT-AT). Adaptado de Carreras E, Díaz-Ricart M. Manual de Trasplante Hematopoyético 2016. AD-busulfán: altas dosis de busulfán; CFHR: *complement factor H-related*; EICR: enfermedad injerto contra receptor; ICAM: *intercellular adhesion molecule*; ICN: inhibidores de la calcineurina; ICT: irradiación corporal total; LPS: lipopolisacáridos; NET: *neutrophil extracellular traps*; RSA: *recipient specific antibodies*; VCAM: *vascular cell adhesion protein*.

complemento, favoreciendo el depósito de la fracción c5b-9 en su malla y en los capilares glomerulares⁽⁵⁾. La fracción C5b-9 constituye el denominado MAC (*membrane attack complex*) y es el causante de la lesión renal en los pacientes con MAT-AT o con aHUS⁽⁶⁾.

› Manifestaciones clínicas

En la **Tabla 2** se describen los principales síntomas y signos observables en la MAT-AT⁽⁷⁾.

› Diagnóstico

Se han publicado diversos criterios diagnósticos de las MAT-AT (**Tabla 3**). Los publicados por 2 grupos cooperativos, uno americano (CTN-TMA)⁽⁸⁾ y otro europeo (IWG-TMA)⁽⁹⁾, presentan escasas diferencias entre sí.

Los terceros, publicado por Cho⁽¹⁰⁾, introducen el concepto de "MAT probable" que, al ser más inespecífico, posibilita un diagnóstico de sospecha precoz y favorece la adopción de medidas terapéuticas precoces. Su principal crítica es que no valoran los factores indicadores de MAT con afectación multiorgánica de mal pronóstico. Los criterios propuestos por Jodele⁽¹¹⁾ incluyen estos factores que, si bien no son necesarios para el diagnóstico, de estar presentes confieren un especial mal pronóstico. Así, la supervivencia de los pacientes sin proteinuria y sin depósito de C5b-9 es del 100%. La presencia de uno de los 2 factores la reduce al 60-70% y, si ambos están presentes, al 20%.

› Formas clínicas, incidencia y factores de riesgo

• **Clínicamente**, las MAT-AT pueden manifestarse de 2 formas:

Tabla 2. Manifestaciones clínicas

Anemia hemolítica microangiopática

- Anemia
- Trombocitopenia
- Aumento del requerimiento transfusional
- Elevación de LDH^a
- Esquistocitos circulantes
- ↓ haptoglobina

Con afectación orgánica:

| | |
|---------------------------------|---|
| Renal | <ul style="list-style-type: none"> • Disminución del filtrado glomerular • Proteinuria^{b,c} • HTA que requiere ≥ 2 hipotensores^c |
| Pulmonar | <ul style="list-style-type: none"> • Incidencia desconocida • Hipoxemia, distrés respiratorio |
| Gastrointestinal | <ul style="list-style-type: none"> • Dolor abdominal • Sangrado gastrointestinal • Íleo |
| Sistema nervioso central | <ul style="list-style-type: none"> • Cefalea • Confusión • Alucinaciones • Convulsiones |
| Poliserositis | <ul style="list-style-type: none"> • Derrame pericárdico, pleural y/o ascitis refractarios al tratamiento, sin edemas periféricos |

Adaptada de Jodele 2014

^a De no existir proteinuria e hipertensión, suele ser el primer hallazgo; ^b en niños debe confirmarse con una muestra al levantarse por la mañana para descartar proteinuria ortostática fisiológica; ^c de existir, suelen ser hallazgos precoces, previos a los datos clásicos de microangiopatía trombótica
HTA: hipertensión arterial

1. MAT-AT asociada al empleo de ICN. Es la forma más frecuente y comporta un buen pronóstico, ya que suelen resolverse en pocos días tras retirar dicho fármaco. Su verdadera incidencia es desconocida.

2. MAT-AT que no se resuelve al retirar los ICN. Suelen acompañarse de alguno de los factores de riesgo mencionados a continuación, presentar múltiples manifestaciones de afectación orgánica, comportar un mal pronóstico y requerir de medidas terapéuticas específicas.

- **Inicio:** la mediana de días para el inicio de las manifestaciones clínicas se sitúa entre el día + 32 y el + 40 (> 92% antes del día + 100).

- **Incidencia:** desconocida debido a los diferentes criterios clínicos diagnósticos empleados a lo largo de los años. Criterios IWP: 7%⁽⁹⁾; metaanálisis con criterios variables: 8,2%⁽¹²⁾; criterios de Cho⁽¹²⁾: 39%. Incidencia similar tras TH alogénico mieloablativo o de intensidad reducida. La incidencia en el auto-TH es muy inferior.

- **Factores de riesgo:** uso de ICN (en especial si se asocian a sirolimus)⁽¹³⁾, infecciones virales (citomegalovirus, adenovirus, virus BK, etc.) o fúngicas, EICR acti-

Tabla 3. Diagnóstico de microangiopatía trombótica asociada al trasplante hematopoyético (MAT-AT)

De certeza

MAT-AT diagnosticada en biopsia de un tejido

De sospecha clínica

Blood & Marrow Transplant Clinical Trials Network⁽⁸⁾

1. Hematíes fragmentados y ≥ 2 esquistocitos por campo en SP
2. Aumento de la LDH sérica
3. Alteración función renal y/o neurológica no justificable por otras causas
4. Coombs directo e indirecto negativo

International Working Group de la EBMT⁽⁹⁾

1. ≥ 8 esquistocitos por campo en SP (≥ 4%)
2. Aumento de LDH sérica brusco y persistente
3. Trombocitopenia < 50 × 10⁹/L o un descenso ≥ 50% del recuento de plaquetas
4. ↓ hemoglobina o aumento del requerimiento transfusional de hematíes
5. ↓ concentración sérica de haptoglobina

MAT probable⁽¹⁰⁾

1. ≥ 2 esquistocitos por campo en SP
2. Aumento de la LDH sérica
3. Trombocitopenia *de novo* < 50 × 10⁹/L o recuento con descenso ≥ 50%
4. ↓ hemoglobina o aumento del requerimiento transfusional de hematíes
5. ↓ concentración sérica de haptoglobina
6. Coombs directo e indirecto negativo
7. Ausencia de coagulopatía

Criterios diagnósticos con valor pronóstico⁽¹¹⁾

1. Microangiopatía, esquistocitos en SP o evidencia histológica
2. Aumento de LDH sérica
3. Trombocitopenia *de novo* (< 50 × 10⁹/L o ↓ en ≥ 50% en recuento)
4. Anemia *de novo* (↓ Hb o aumento requerimiento transfusional)
5. Proteinuria ≥ 30 mg/dL
6. Hipertensión arterial
7. Activación del complemento terminal (↑ concentración sC5b-9)

EBMT: European Society for Blood and Marrow Transplantation; Hb: hemoglobina; LDH: lactato deshidrogenasa; SP: sangre periférica

va, TH de donante no emparentado o con incompatibilidades HLA, diversos polimorfismos genéticos que predominan en las poblaciones no caucásicas^(7,10,14).

➤ Microangiopatía trombótica asociada al trasplante hematopoyético: aproximación diagnóstica-diagnóstico precoz

En la **Figura 2**⁽¹⁵⁾ se muestra el algoritmo de valoración diaria de los receptores de un TH alogénico, así como las medidas específicas a controlar evolutivamente, en caso de sospecha clínica de MAT, con la finalidad de lograr un diagnóstico precoz⁽⁷⁾.

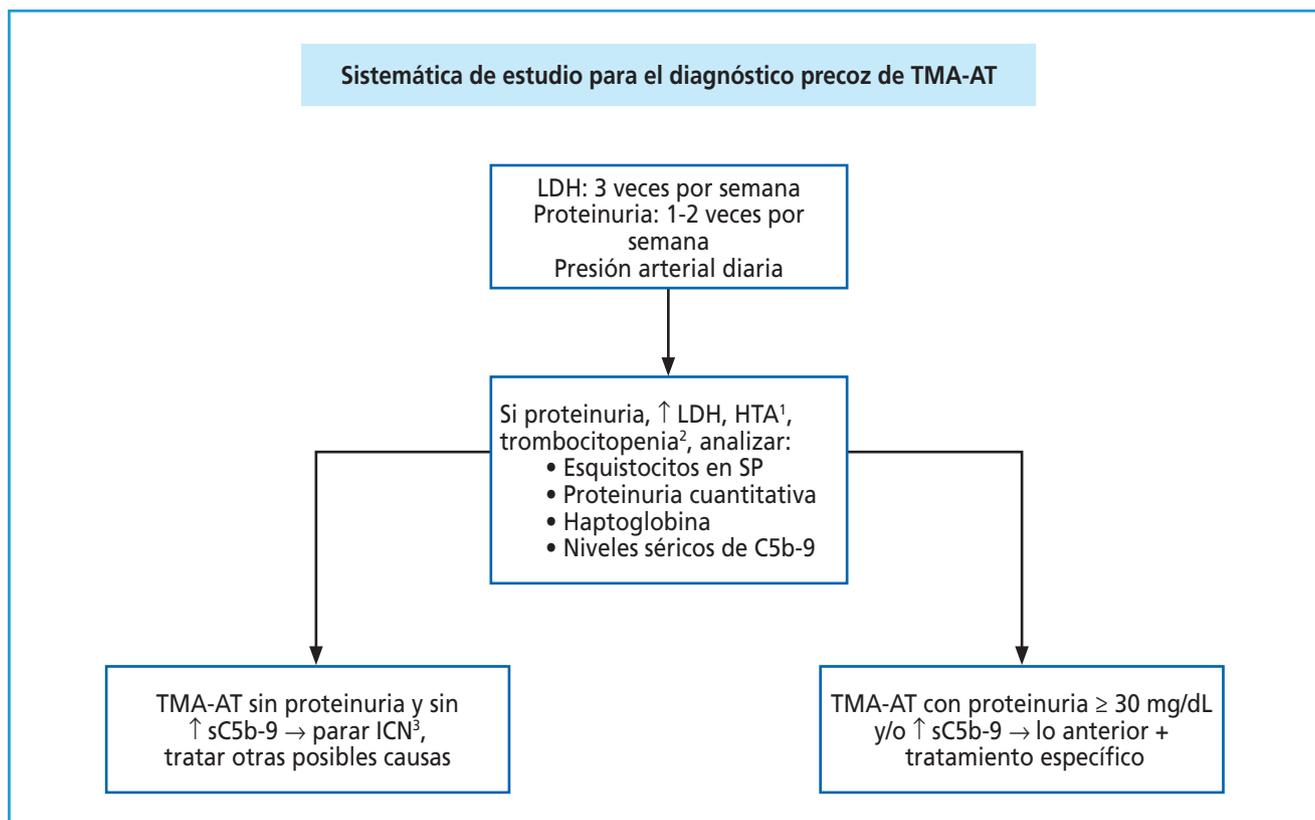


Figura 2. Adaptado de Jodele *et al.* 2014⁽²³⁾. ¹ Hipertensión arterial (HTA): en mayores de 18 años, TA en el percentil 95 correspondiente por edad, sexo y altura. En menores de 18 años, TA > 149/90 mmHg; ² plaquetas: recuentos < $50 \times 10^9/L$ o reducción superior al 50% en los recuentos de plaquetas. Hematíes: hemoglobina por debajo del límite normal por la edad o requerimiento transfusional; ³ no todos los autores de acuerdo, en especial si los niveles séricos son normales, valorar cuidadosamente riesgos y beneficios de esta medida, en especial en pacientes con enfermedad injerto contra receptor (EICR) activa.

› Evolución⁽¹⁶⁾

- En las MAT asociadas a los ICN la evolución suele ser favorable tras la retirada del inhibidor.
- En las MAT graves no asociadas a los ICN y en especial en aquellas asociadas a proteinuria e incremento de sC5b-9, el pronóstico suele ser muy desfavorable.
- En los supervivientes a una MAT el riesgo de insuficiencia renal crónica (IRC) es 4,3 veces superior que en los pacientes sin MAT. Lo mismo ocurre con la hipertensión arterial (HTA; 9 veces superior). De igual modo, la mortalidad de los pacientes con MAT es 5 veces superior al año del trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH), aunque la muerte no siempre es atribuible a la propia MAT. En los pacientes con MAT y afectación multiorgánica la mortalidad es > 90%.

› Tratamiento

› De soporte

- Suspender (o reducir) ICN (algunos autores consideran que, en las formas leves, la supresión del ICN comporta un riesgo demasiado elevado de EICRa).
- Tratar enérgicamente la EICRa y las infecciones asociadas (vigilar la toxicidad renal).
- Tratamiento de la HTA con ≥ 2 agentes.

› Recambio plasmático (RP)

- Las revisiones históricas evidencian que su beneficio es escaso (media de respuestas del 36% y mortalidad del 80%). Sin embargo, estudios más recientes, algunos de ellos prospectivos, ofrecen respuestas del 59-64%⁽¹⁷⁾.

- Los RP deben emplearse siempre de forma precoz. Su duración debe ser superior a la del resto de las MAT (2-3 semanas) y deben discontinuarse progresivamente por el riesgo de rebotes.

- Si se asocian a rituximab, para tratar los escasos pacientes con anticuerpos anti-factor H, rituximab debe administrarse después del RP.

- Si se asocian a eculizumab (ECZ), los RP deben realizarse antes de administrar este fármaco, ya que reducen su actividad y aumentan los niveles de C5.

› Defibrótido (DF)

- DF reduce la disfunción endotelial, evento inicial en las MAT-AT, y favorece su resolución por su efecto profibrinolítico, trombolítico y antiinflamatorio⁽¹⁸⁾.

- En la serie más larga existente (56 pacientes tratados), la tasa de respuestas al DF (solo o asociado a otras medidas) en MAT graves fue del 55%⁽¹⁹⁾. En una serie más reciente de MAT-AT, diagnosticadas empleando los criterios de Cho, con 29 niños y 17 adultos, se obtuvo un 77% de respuestas completas en ambos grupos⁽²⁰⁾. Recientemente, se han publicado buenos resultados con DF administrado en bajas dosis (< 10 mg/kg/día)⁽²¹⁾.

› Rituximab

- Se cree que actúa por depleción de anticuerpos y regulación inmune. Es de especial interés si hay presencia de anticuerpos anti-factor H, asociado o no a RP.

- Doce de los 15 casos reportados y algunos casos aislados respondieron a rituximab asociado a RP. Si se asocia con ECZ, disminuye su actividad^(14,22).

› Daclizumab

- Tan solo hay 13 casos publicados con 9 respuestas. Pero en estos casos daclizumab fue utilizado para sustituir al ICN al detectarse la MAT-AT, por lo que no queda claro cuál es el motivo de dichas remisiones⁽²³⁾.

› Eculizumab

- En la actualidad, es el mejor agente para tratar las MAT-AT (y aHUS) que cursan con proteinuria y elevación de C5b-9.

- En un análisis de las series publicadas hasta 2014, se recopilaron 26 pacientes con una mediana de

edad de 33 años. La mediana de tiempo entre el trasplante y la iniciación del ECZ fue de 63 días (rango: 11-512). Se utilizaron una mediana de 5,5 dosis (rango: 2-21) y en el 92% la respuesta se produjo después de una mediana de 2 dosis (rango: 1-18). Tras una mediana de seguimiento de 52 semanas (rango: 3-113), los supervivientes (92%) evolucionaban correctamente⁽²⁴⁾.

- En una reciente revisión de casos de MAT-AT en niños tratados con ECZ, Jodele *et al.*⁽²⁵⁾ confirman las cifras previamente publicadas con una supervivencia del 66% al año del TH (sin ECZ: 17%). Los pacientes que respondieron se beneficiaron de un curso breve pero intensivo de ECZ utilizando una dosis guiada farmacocinética/farmacodinámica, que requirió una mediana de 11 dosis de ECZ. El tratamiento se interrumpió porque la MAT-AT se resolvió tras una mediana de 66 días. Los sujetos con mayor activación del complemento medida por la elevación de sC5b-9 en sangre al comienzo del tratamiento tuvieron menos probabilidades de responder (*odds ratio*: 0,15; $p = 0,0014$) y requirieron más dosis de ECZ ($r = 0,43$; $p = 0,0004$)⁽²⁵⁾.

- La cuantificación de CH50 permite controlar la efectividad del tratamiento y el ajuste de las dosis. Si bien no se dispone aún de una amplia experiencia en la valoración *in vitro* del depósito de C5b-9 en cultivos de EC, se está mostrando como el método más simple y rápido para valorar si ECZ es efectivo o no; esta técnica se ha validado en aHUS y se está validando en las MAT-AT⁽²⁶⁾.

› Bibliografía

1. Palomo M, Díaz-Ricart M, Carbo C, Rovira M, Fernández-Avilés F, Escolar G, et al. The release of soluble factors contributing to endothelial activation and damage after hematopoietic stem cell transplantation is not limited to the allogeneic setting and involves several pathogenic mechanisms. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009;15:537-46.
2. Palomo M, Díaz-Ricart M, Carbo C, Rovira M, Fernández-Avilés F, Martínez C, et al. Endothelial dysfunction after hematopoietic stem cell transplantation: role of the conditioning regimen and the type of transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010;16:985-93.
3. Khosla J, Yeh AC, Spitzer TR, Dey BR. Hematopoietic stem cell transplant-associated thrombotic microangiopathy: current paradigm and novel therapies. *Bone Marrow Transplant.* 2018;53:129-37.
4. Ravindran M, Khan MA, Palaniyar N. Neutrophil Extracellular Trap Formation: Physiology, Pathology, and Pharmacology. *Biomolecules.* 2019;9:365-80.

5. Wang H, Wang C, Zhao MH, Chen M. Neutrophil extracellular traps can activate alternative complement pathways. *Clin Exp Immunol*. 2015;181:518-27.
6. Gloude NJ, Khandelwal P, Luebbering N, Louder DT, Jodele S, Alder MN, et al. Circulating dsDNA, endothelial injury, and complement activation in thrombotic microangiopathy and GVHD. *Blood*. 2017;130:1259-66.
7. Jodele S, Davies SM, Lane A, Khoury J, Dandoy C, Goebel J, et al. Diagnostic and risk criteria for HSCT-associated thrombotic microangiopathy: a study in children and young adults. *Blood*. 2014;124:645-53.
8. Ho VT, Cutler C, Carter S, Martin P, Adams R, Horowitz M, et al. Blood and marrow transplant clinical trials network toxicity committee consensus summary: thrombotic microangiopathy after hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005;11:571-5.
9. Ruutu T, Barosi G, Benjamin RJ, Clark RE, George JM, Gratwohl A, et al. Diagnostic criteria for hematopoietic stem cell transplant-associated microangiopathy: results of a consensus process by an International Working Group. *Haematologica*. 2007;92:95-100.
10. Cho BS, Yahng SA, Lee SE, Eom KS, Kim YJ, Lee S, et al. Validation of recently proposed consensus criteria for thrombotic microangiopathy after allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. *Transplantation*. 2010;90:918-26.
11. Jodele S, Laskin BL, Dandoy CE, Myers KC, El-Bietar J, Davies SM, et al. A new paradigm: Diagnosis and management of HSCT-associated thrombotic microangiopathy as multi-system endothelial injury. *Blood Rev*. 2015;29:191-204.
12. George JN, Selby GB. Thrombotic microangiopathy after allogeneic bone marrow transplantation: a pathologic abnormality associated with diverse clinical syndromes. *Bone Marrow Transplant*. 2004;33:1073-4.
13. Carmona A, Díaz-Ricart M, Palomo M, Molina P, Pino M, Rovira M, et al. Distinct deleterious effects of cyclosporine and tacrolimus and combined tacrolimus-sirolimus on endothelial cells: protective effect of defibrotide. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013;19:1439-45.
14. Uderzo C, Bonanomi S, Busca A, Renoldi M, Ferrari P, Iacobelli M, et al. Risk factors and severe outcome in thrombotic microangiopathy after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transplantation*. 2006;82:638-44.
15. Jodele S, Fukuda T, Vinks A, Mizuno K, Laskin BL, Goebel J, et al. Eculizumab therapy in children with severe hematopoietic stem cell transplantation-associated thrombotic microangiopathy. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20:518-25.
16. Carreras E, Díaz-Ricart M. Early Complications of Endothelial Origin. En: Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N (eds.). *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*. 7th ed. Cham (CH): Springer; 2019. Chapter 42.
17. Poullin P, Delmotte N, Sanderson F, Roche M, Gensollen S. Efficacy and safety of plasma exchange using a double viral inactivated and prion reduced solvent/detergent fresh frozen plasma for the treatment of thrombotic microangiopathy: the first French experience in a single center. *Transfus Apher Sci*. 2020;59:102587.
18. Richardson PG, Carreras E, Iacobelli M, Nejadnik B. The use of defibrotide in blood and marrow transplantation. *Blood Adv*. 2018;2:1495-509.
19. Uderzo CC, Jodele S, Missiry ME, Ciceri F, Busca A, Bacigalupo A, et al. Transplant-Associated Thrombotic Microangiopathy (TA-TMA) and Consensus Based Diagnostic and Therapeutic Recommendations: Which TA-TMA Patients to Treat and When? *J Bone Marrow Res*. 2014;2:1000152.
20. Yeates L, Slatter MA, Bonanomi S, Lim FLWI, Ong SY, Dalissier A, et al. Use of defibrotide to treat transplant-associated thrombotic microangiopathy: a retrospective study of the Paediatric Diseases and Inborn Errors Working Parties of the European Society of Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2017;52:762-4.
21. Devadas SK, Toshniwal M, Bagal B, Khattri N. Successful Treatment of Transplant Associated Thrombotic Microangiopathy (TA-TMA) with Low Dose Defibrotide. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2018;34:469-73.
22. Marr H, McDonald EJ, Merriman E, Smith M, Mangos H, Stoddart C, et al. Successful treatment of transplant-associated microangiopathy with rituximab. *N Z Med J*. 2009;122:72-4.
23. Wolff D, Wilhelm S, Hahn J, Gentilini C, Hilgendorf I, Steiner B, et al. Replacement of calcineurin inhibitors with daclizumab in patients with transplantation-associated microangiopathy or renal insufficiency associated with graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*. 2006;38:445-51.
24. Dhakal P, Giri S, Pathak R, Bhatt VR. Eculizumab in Transplant-Associated Thrombotic Microangiopathy. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2017;23:175-80.
25. Jodele S, Dandoy CE, Lane A, Laskin BL, Teusink-Cross A, Myers KC, et al. Complement blockade for TA-TMA: lessons learned from a large pediatric cohort treated with eculizumab. *Blood*. 2020;135:1049-57.
26. Palomo M, Blasco M, Molina P, Lozano M, Praga M, Torramade-Moix S, Marín-Sánchez J. Complement Activation and Thrombotic Microangiopathies. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2019;14:1719-32.

➤ Agradecimientos

Este trabajo ha sido posible gracias a las ayudas recibidas por parte de la Deutsch José Carreras Leukämie Stiftung (grant 11R/2016 and 03R/2019) y de Jazz Pharmaceuticals (IST-16-10355).

➤ Conflictos de interés

EC forma parte del grupo de ponentes de Jazz Pharmaceutical plc.

EL MASTOCITO: MASTOCITOSIS SISTÉMICAS AVANZADAS

Coordinadores

Dra. María Rozman Jurado. Hospital Clínic. Barcelona

Dra. Gemma Azaceta Reinares. Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa. Zaragoza

Esperamos que este simposio, que tiene como protagonista al mastocito y está especialmente dirigido a la mastocitosis sistémica avanzada, sea de gran interés, puesto que cuenta con unos ponentes expertos en el tema y con una gran capacidad comunicativa. Esta es una enfermedad poco frecuente y de difícil diagnóstico y abordaje terapéutico; por tanto, una actualización integral resulta de gran utilidad para cualquier hematólogo.

En primer lugar, contamos con la Dra. Concepción Prats, que conoce en profundidad la citología y la citometría aplicadas al diagnóstico de las hemopatías. Desde el punto de vista diagnóstico, la citología es clave para sospechar una mastocitosis y también para detectar la existencia de otra hemopatía asociada, que es un importante factor a tener en cuenta para establecer el pronóstico y el tratamiento de la enfermedad. La citometría de flujo es fundamental para confirmar el fenotipo patológico de los mastocitos, puesto que, además de aportar un criterio diagnóstico menor, identifica patrones madurativos que se pueden relacionar con subtipos de la enfermedad y su pronóstico.

La segunda ponencia corre a cargo de la Dra. Dolors Colomer, experta bióloga molecular y miembro de diversos grupos cooperativos nacionales e internacionales que trabajan en la estandarización de estas técnicas diagnósticas y de seguimiento. A diferencia de lo que ocurre con otras hemopatías, debido a la frecuente escasez de mastocitos en la médula ósea de los pacientes con mastocitosis, las técnicas moleculares para la detección de la mutación D816V de KIT, la más característica de la enfermedad, deben tener alta sensibilidad y la mayor especificidad posible. En esta ponencia se exponen los avances recientes en este sentido, con la incorporación de la PCR digital, que permite además cuantificar y estandarizar los resultados entre los distintos laboratorios. También se hablará de las mutaciones adicionales, frecuentes en la mastocitosis sistémica avanzada y de demostrado valor pronóstico adverso.

Por último, para hablarnos de las novedades en cuanto al tratamiento de la mastocitosis sistémica avanzada, contaremos con la inestimable aportación del Dr. Iván Álvarez-Twose, líder del recién creado Grupo Español de Mastocitosis y cuyo equipo tiene la más amplia experiencia a nivel nacional en el manejo de esta enfermedad. Puesto que los mastocitos atípicos liberan citocinas responsables de muchos de los síntomas de la enfermedad y que esta afecta a diversos órganos y tejidos de manera variable en cada paciente, el tratamiento debe ser necesariamente individualizado. Se expondrán tanto las medidas de soporte y antimedradoras como las terapias específicas, campo en el que se están produciendo mayores avances y novedades, y que incluyen los citostáticos, los inhibidores de tirosina cinasas como imatinib y midostaurina, y los anticuerpos monoclonales.

Citomorfolología y citometría del mastocito

Concepción Prats Martín¹, Rosario M. Morales Camacho¹,
Teresa Caballero-Velázquez¹, Rainiero Ávila², Ricardo Bernal¹

¹ Unidad de Gestión Clínica (UGC) de Hematología y Hemoterapia. Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla;

² UGC de Anatomía Patológica. Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla

› El mastocito: origen y función

El mastocito fue descrito por primera vez por Paul Ehrlich en 1877, que identificó esta célula en el tejido conectivo, denominándola *Mastzellen* –en alemán, ‘célula cebada o bien alimentada’–, al observar la gran cantidad de gránulos contenidos en su citoplasma⁽¹⁾. Se origina en la médula ósea a partir de una célula progenitora hematopoyética pluripotencial^(2,3). El principal inductor de su maduración es el factor de células madre (*stem cell factor* –SCF–), además de otras citocinas como la interleucina 3 (IL-3), la IL-4, la IL-9 y la IL-10, entre otras^(4,5). El receptor para el SCF es una proteína transmembrana con actividad tirosina cinasa (KIT), abundante en el mastocito y que está codificada por el gen *c-Kit*, localizado en el cromosoma 4(q11-12). Los precursores de mastocitos comprometidos salen a la circulación y migran a diferentes tejidos, donde completan su maduración y diferenciación, adquiriendo características específicas según su localización^(3,4,6). Predominan en la piel y en los tractos respiratorio, gastrointestinal y genitourinario. Se ubican especialmente en la proximidad de los vasos sanguíneos y linfáticos y alrededor de las terminaciones nerviosas.

Desde el punto de vista funcional, el mastocito participa en las respuestas inmunitarias innata y adquirida, tiene capacidad de fagocitar, procesar y presentar antígenos a través de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I y de clase II, activar a los linfocitos y liberar citocinas inductoras de la migración de neutrófilos. Además, es conocida su participación en la angiogénesis y la remodelación tisular. En las enfermedades alérgicas, es una célula efectora principal, a través del receptor de alta afinidad para la IgE (FCεRI) presente en su superficie y mediante la liberación de mediadores^(7,8).

› Morfología del mastocito normal

En un aspirado medular, con la tinción de May-Grünwald-Giemsa, el mastocito normal muestra un tamaño grande, variable entre 12 y 25 μm , y un contorno más o menos redondeado. El núcleo también es redondeado, con la cromatina densa y ocupa normalmente una posición centrada. El citoplasma es amplio con granulación muy abundante e intensamente basófila, que suele ocultar el núcleo. A veces se encuentran fragmentados, con la granulación dispersa a su alrededor (Figura 1). Los gránulos lisosomales contienen enzimas y mediadores preformados, entre otros histamina, triptasa, carboxipeptidasa A, heparina o sulfato de condroitina, y algunas citocinas, como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), que se liberan de manera inmediata tras la activación del mastocito. Otros me-

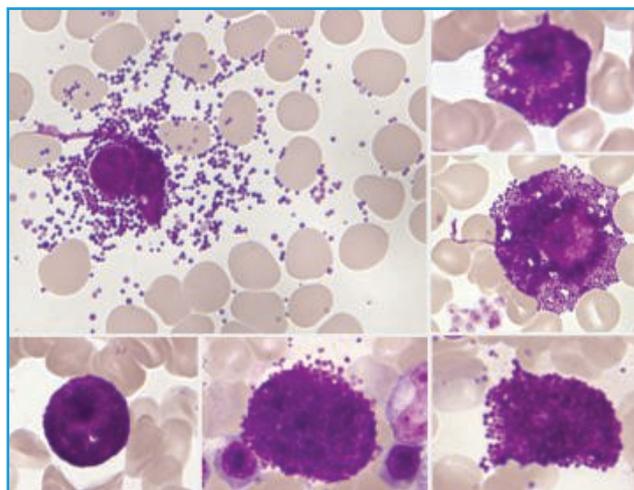


Figura 1. May-Grünwald-Giemsa (MGG) $\times 1.000$, aspirado de médula ósea (AMO). Mastocitos normales, grandes, con abundante granulación (núcleo semiculto), más o menos redondeados y que a veces se fragmentan liberando su contenido.

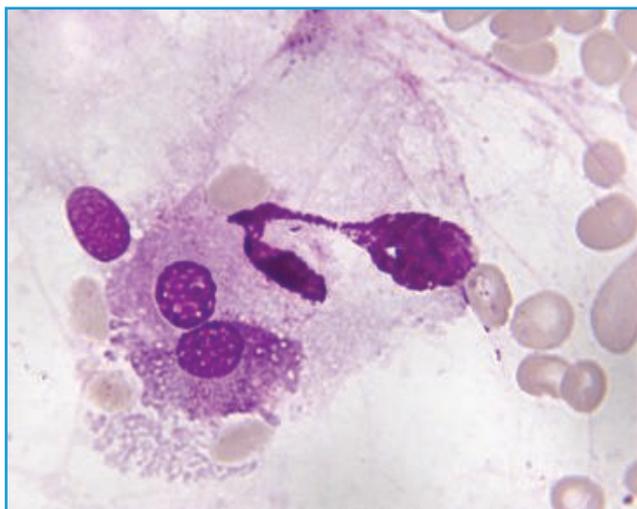


Figura 2. May-Grünwald-Giemsa (MGG) \times 1.000, aspirado de médula ósea (AMO). Aplasia medular. Mastocito fusiforme, reactivo.

diadores son de nueva síntesis, como prostaglandinas, leucotrienos, factor activador de plaquetas, interleucinas, factor de crecimiento tumoral β (TGF- β) y también el TNF- α ⁽⁷⁾.

Con el microscopio electrónico, los aspectos más característicos del mastocito son la granulación y la gran cantidad de proyecciones digitiformes o *microvilli* en su superficie. Los gránulos, que miden hasta unos 700 nm, presentan una morfología y una densidad electrónica muy variables, algunos de contenido homogéneo y otros que presentan una estructura interna variable (hexagonal, lamelar, en panal de abejas o con bucles periféricos)⁽⁹⁾.

En un aspirado medular normal se observa una escasa proporción de mastocitos, habitualmente inferior a 1/1.000 células nucleadas. Su número puede aumentar reactivamente en procesos inflamatorios, inmunológicos o neoplásicos, y así pueden verse en aplasias medulares o en neoplasias linfoides B de células maduras como la macroglobulinemia de Wäldenström. Suelen mostrar un aspecto normal y conservar su abundante granulación, aunque ocasionalmente pueden adoptar un aspecto fusiforme (Figura 2)^(10,11).

› Características morfológicas del mastocito patológico

El mastocito patológico maligno muestra rasgos atípicos muy característicos que facilitan su distinción del

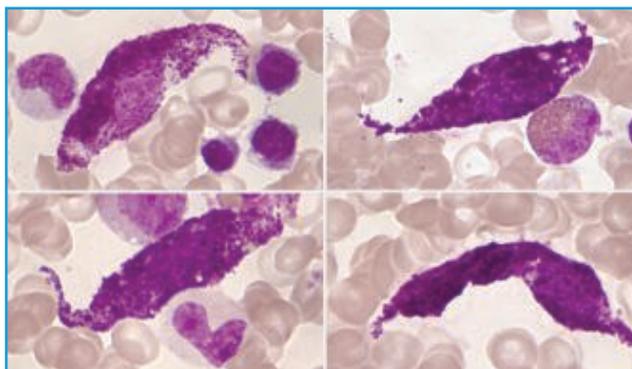


Figura 3. May-Grünwald-Giemsa (MGG) \times 1.000, aspirado de médula ósea (AMO). Mastocitosis sistémica. Grandes mastocitos ahusados.

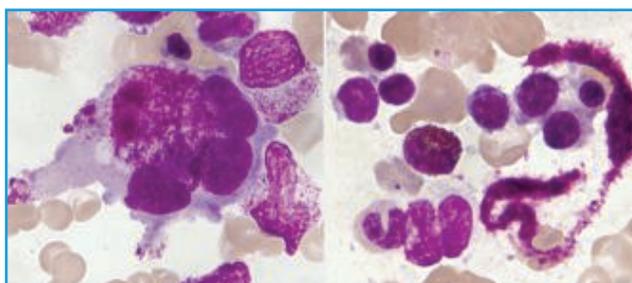


Figura 4. May-Grünwald-Giemsa (MGG) \times 1.000, aspirado de médula ósea (AMO). A la izquierda, leucemia de mastocitos: elemento de gran tamaño multinucleado con abundante granulación irregularmente distribuida. A la derecha, mastocitosis sistémica indolente asociada a síndrome mielodisplásico: mastocito gigante fusiforme.

mastocito normal⁽¹²⁻¹⁵⁾. De una manera estructurada, podríamos considerar los siguientes aspectos:

- Forma: los mastocitos patológicos tienden a ser polimórficos en un mismo paciente. Con preferencia adoptan un patrón ahusado o fusiforme (Figura 3), y/o muestran proyecciones citoplasmáticas, ocasionalmente muy abigarradas.

- Tamaño: la variabilidad en el tamaño suele ser un hallazgo típico, predominando elementos grandes e incluso gigantes, a menudo alargados (Figura 4). También se encuentran mastocitos de tamaño reducido.

- Contenido granular: por lo general, son característicamente hipogranulares, hecho que permite reconocer el núcleo y que deja a la vista un citoplasma amplio, hialino o con débil basofilia (Figura 5). Las formas pequeñas con gránulos salpicados deben distinguirse de mielocitos y metamielocitos neutrófilos,

especialmente si son displásicos (Figura 6). Igualmente, las formas grandes elongadas pueden prestarse a

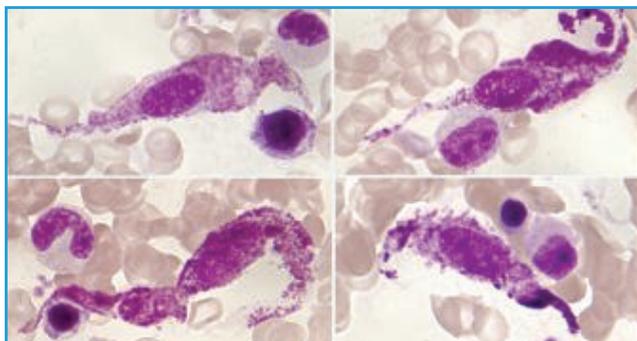


Figura 5. May-Grünwald-Giemsa (MGG) × 1.000, aspirado de médula ósea (AMO). Mastocitosis sistémica indolente. Mastocitos ahusados variablemente hipogranulares, en los que se aprecian los grandes núcleos ovalados.

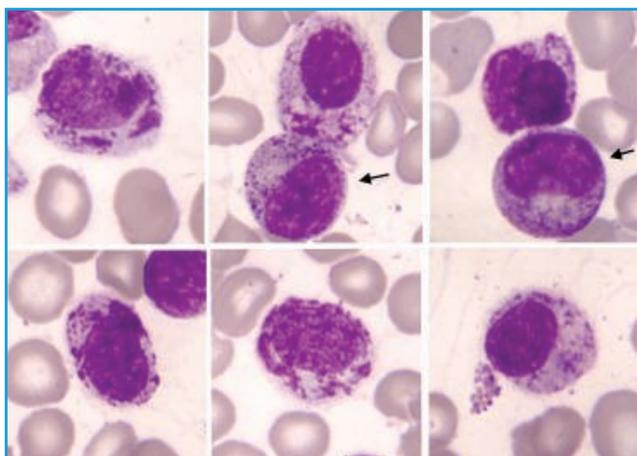


Figura 6. May-Grünwald-Giemsa (MGG) × 1.000, aspirado de médula ósea (AMO). Mastocitosis sistémica indolente. Mastocitos patológicos redondeados con granulación irregularmente distribuida (agrupaciones puntuales) que se pueden confundir con precursores de la granulopoyesis (flechas).

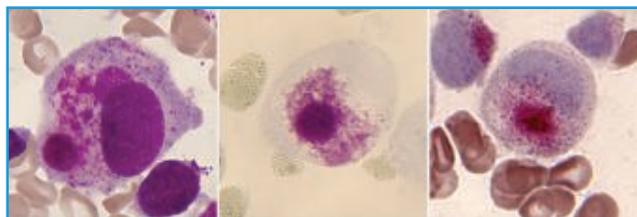


Figura 7. May-Grünwald-Giemsa (MGG) × 1.000, aspirado de médula ósea (AMO). Leucemia de mastocitos: concentración de gránulos en un polo de la célula, correlacionándose la granulación azurófila del MGG (a la izquierda) con el contenido enzimático de la fosfatasa ácida (FA; a la derecha) y la metacromasia con azul de toluidina (AT; centro).

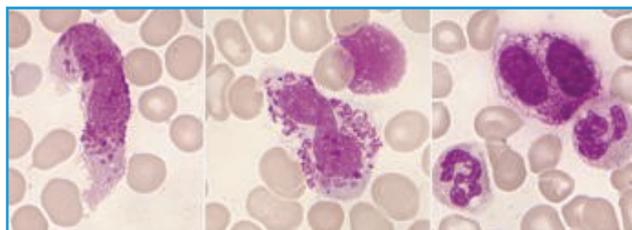


Figura 8. May-Grünwald-Giemsa (MGG) × 1.000, aspirado de médula ósea (AMO). Mastocitos patológicos con núcleos atípicos: a la izquierda y en el centro con núcleos elongados e inicio de lobulación; a la derecha, mastocito hipogranular binucleado.

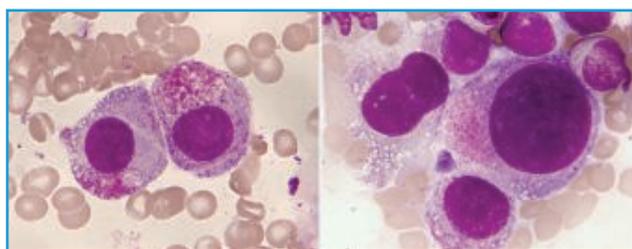


Figura 9. May-Grünwald-Giemsa (MGG) × 1.000, aspirado de médula ósea (AMO). Leucemia de mastocitos: núcleos redondeados de cromatina mínimamente condensada con fina vacuolización en algunos mastocitos.

confusión con macrófagos. Asimismo, es característica una distribución anormal de la granulación, con tendencia a la concentración de los gránulos en una zona determinada del citoplasma (Figura 7). En algunas extensiones llega a apreciarse una granulación dispersa entre la celularidad fruto de la fragmentación de los mastocitos al realizar el aspirado.

- Vacuolas: el hallazgo de vacuolas es poco frecuente. Incidentalmente se puede apreciar en mastocitosis indolentes o quiescentes, siendo su hallazgo reiterado más común en las formas avanzadas.
- Forma del núcleo: tienden a ser alargados u ovoides. Llegan a lobularse con una estrangulación intermedia, a veces en forma de zapatilla, y con menor frecuencia se encuentran elementos multinucleados, la mayor parte de las veces binucleados (Figura 8).
- Inmadurez: como signos más relevantes, pueden manifestar rasgos de indiferenciación consistentes en aumento de la relación núcleo-citoplasmática, disminución de la densidad cromatínica, presencia de nucleolos, mayor hipogranularidad e incluso agranularidad, y vacuolización periférica (Figura 9). La multinuclearidad aumenta significativamente, tanto en el número de células como en la cuantía de los núcleos,

que pueden ser incluso de distintos tamaños (Figura 10). El grado de indiferenciación permiten calificar algunas células aisladas como plenamente blásticas.

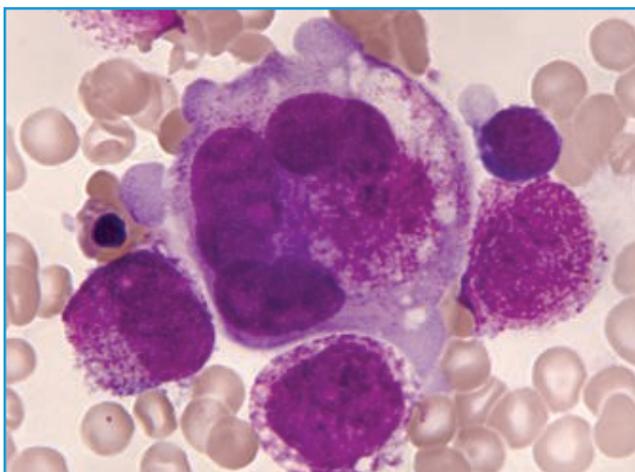


Figura 10. May-Grünwald-Giemsa (MGG) \times 1.000, aspirado de médula ósea (AMO). Leucemia de mastocitos: mastocito severamente patológico gigante y multinucleado, con abundante granulación azurófila concentrada en la región centrosómica.

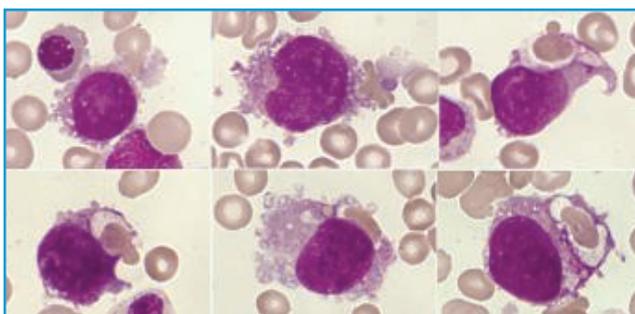


Figura 11. May-Grünwald-Giemsa (MGG) \times 1.000, aspirado de médula ósea (AMO). Leucemia de mastocitos: fagocitosis de hematófagos con diferentes fases del proceso de internalización.

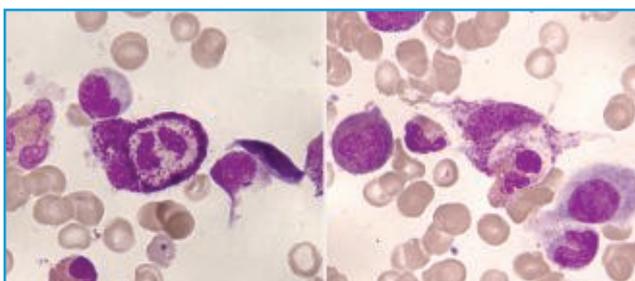


Figura 12. May-Grünwald-Giemsa (MGG) \times 1.000, aspirado de médula ósea (AMO). Mastocitosis avanzada –mastocitosis sistémica agresiva asociada a leucemia mielomonocítica crónica (LMMC)–: a la izquierda, fagocitosis de un neutrófilo segmentado; a la derecha, proceso de englobamiento de un eosinófilo.

- Hemofagocitosis: en raras ocasiones pueden observarse imágenes de hemofagocitosis de hemáties, eritroblastos, neutrófilos, eosinófilos o mixta, e incluso canibalismo entre las propias células neoplásicas (Figuras 11 y 12).

- Mitosis: en las variantes leucémicas la actividad proliferativa puede ser muy pronunciada y definida por la presencia de mitosis que llegan a ser frecuentes (Figura 13).

› Aspectos citoquímicos

La granulación del mastocito normal presenta metacromasia con azul de toluidina. Este fenómeno se debe a su alto contenido en heparinoides (glucosaminoglicanos sulfatados con elevada carga ácida) a los que las moléculas del colorante, una anilina básica, se fijan electrostáticamente de manera muy compacta, polimerizándose entre sí, circunstancia que modifica su absorción lumínica hasta adquirir un tono rojo violáceo característico. Además, estas células tienen un contenido elevado de cloroacetatoesterasa (CAE) y ausencia de mieloperoxidasa (MPO) (Figura 14). La reacción del ácido peryódico de Schiff (PAS) puede ser negativa o mostrar débil positividad intergranular, y la actividad de la fosfatasa ácida (FA) es negativa o débilmente positiva^(12,16).

El mastocito patológico suele mostrar las mismas características citoquímicas que el normal, pero en formas

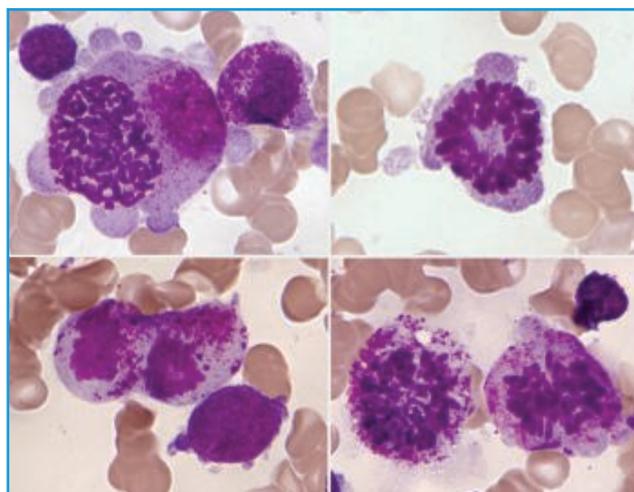


Figura 13. May-Grünwald-Giemsa (MGG) \times 1.000, aspirado de médula ósea (AMO). Leucemia de mastocitos: diferentes etapas del proceso mitótico.

hipogranulares o inmaduras la metacromasia puede reducirse o incluso desaparecer, e igualmente puede debilitarse o aparecer en menor porcentaje la actividad de CAE. Ambos fenómenos podrían ser consecuencia de la

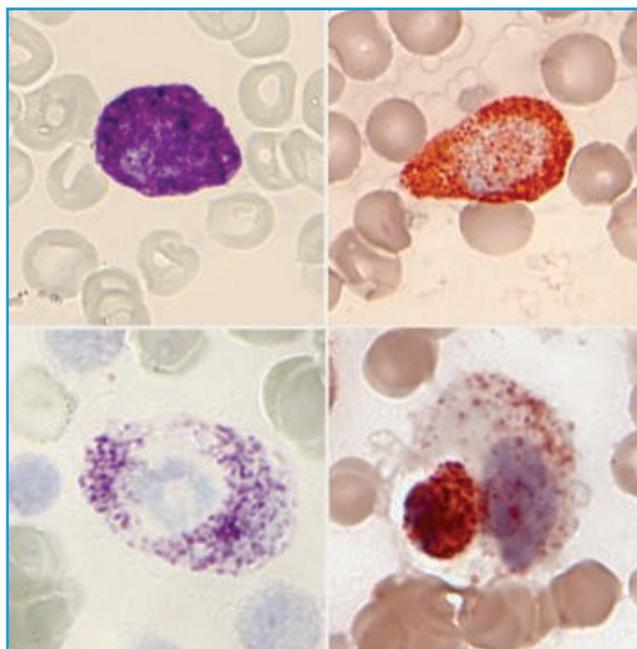


Figura 14. Aspirado de médula ósea (AMO). Arriba, mastocitos normales: a la izquierda azul de toluidina (AT); a la derecha, cloroacetatoesterasa (CAE). Abajo, mastocitos patológicos fagocitando neutrófilos en mastocitosis sistémica agresiva asociada a leucemia mielomonocítica crónica (LMMC): a la izquierda, mastocito AT positivo débil con neutrófilo AT negativo; a la derecha, mastocito CAE débilmente positivo granular fagocitando neutrófilo intensamente positivo para CAE.

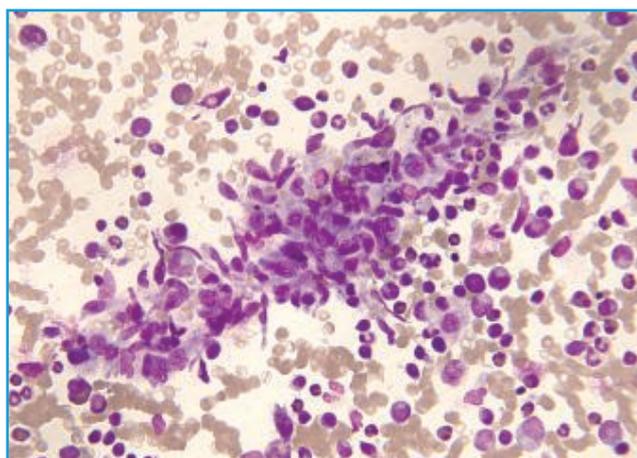


Figura 15. May-Grünwald-Giemsa (MGG) × 250, aspirado de médula ósea (AMO). Leucemia de mastocitos asociada a leucemia mielomonocítica crónica (LMMC). Nido de mastocitos.

falta de gránulos. La actividad de FA puede aumentar en algunos casos. Las técnicas citoquímicas permiten diferenciar mastocitos de granulocitos y de macrófagos (Figura 14).

➤ Aportación del examen citomorfológico del aspirado medular al diagnóstico y la clasificación de las mastocitosis sistémicas

Las mastocitosis sistémicas (MS) se caracterizan por la proliferación clonal de mastocitos que se acumulan especialmente en la piel, la médula ósea o el tubo digestivo. Sus síntomas derivan tanto de la infiltración orgánica como de la activación y la liberación de mediadores por los mastocitos. El diagnóstico se basa en la demostración de mastocitos patológicos integrando estudios analíticos, citomorfológicos, inmunofenotípicos, moleculares e histológicos. Los criterios actuales de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para su diagnóstico y clasificación están recogidos en las Tablas 1 y 2⁽¹⁷⁾.

En las MS la médula ósea está habitualmente afectada y es el material más frecuentemente empleado para el diagnóstico. El estudio citomorfológico debe incluir extensiones de sangre periférica, del aspirado y de los grumos medulares, e improntas de la biopsia. Ante la sospecha diagnóstica, es recomendable añadir la tinción de azul de toluidina. La revisión de las

Tabla 1. Criterios diagnósticos de mastocitosis sistémica

| | |
|------------------------|--|
| Mastocitosis sistémica | Diagnóstico: cuando el criterio mayor y al menos 1 criterio menor están presentes, o cuando ≥ 3 criterios menores están presentes |
| Criterio mayor | Infiltrados densos multifocales de mastocitos (≥ 15 mastocitos en agregados) detectados en biopsia de médula ósea (MO) u otros órganos extracutáneos |
| Criterios menores | 1. En la biopsia de MO u otros órganos extracutáneos, > 25% de los mastocitos son ahusados o de morfología atípica o > 25% de los mastocitos en el aspirado de MO son inmaduros o atípicos |
| | 2. Detección de una mutación en el codón 816 de KIT en la MO, sangre u otro órgano extracutáneo |
| | 3. Los mastocitos de la MO, la sangre u otro órgano extracutáneo expresan CD25, con o sin CD2, además de los marcadores normales de mastocitos |
| | 4. La triptasa sérica total es persistentemente > 20 ng/mL, a menos que haya una neoplasia mieloides asociada, en cuyo caso este parámetro no es válido |

Tabla 2. Criterios diagnósticos para las variantes de mastocitosis sistémica (MS)

| | |
|---|--|
| MS indolente | Cumple criterios de MS. Ausencia de hallazgos C. No hay evidencia de una neoplasia hematológica asociada. Generalmente baja carga tumoral |
| Mastocitosis de la médula ósea (MO) | Criterios de MS indolente, pero con afectación de MO y sin lesiones cutáneas. <i>Categoría provisional</i> |
| MS quiescente | Cumple criterios de MS con ≥ 2 hallazgos B, sin hallazgos C. Sin evidencia de neoplasia hematológica asociada ni criterios de leucemia de mastocitos. Generalmente alta carga tumoral |
| MS con una neoplasia hematológica asociada | Cumple los criterios de MS y los criterios de una neoplasia hematológica asociada |
| MS agresiva | Criterios de MS con ≥ 1 hallazgo C. No cumple los criterios de leucemia de mastocitos |
| Leucemia de mastocitos | Cumple criterios de MS. La biopsia de MO muestra infiltración difusa (generalmente densa) por mastocitos inmaduros atípicos. El aspirado de MO muestra $\geq 20\%$ de mastocitos |

Hallazgos B: 1) elevada carga mastocitaria: infiltración $> 30\%$ de mastocitos en biopsia de MO (agregados densos, focales) y triptasa > 200 ng/mL; 2) signos de displasia o mieloproliferación en líneas celulares no mastocitarias, sin criterios diagnósticos de una neoplasia hematológica asociada, con hemograma normal o solo leves alteraciones; 3) hepatomegalia sin alteración funcional, esplenomegalia palpable sin hiperesplenismo y/o linfadenopatías palpables o detectables en pruebas de imagen

Hallazgos C: 1) insuficiencia medular por la infiltración de mastocitos con ≥ 1 citopenia (neutrófilos $< 1,0 \times 10^9/L$, hemoglobina -Hb- < 100 g/L, plaquetas $< 100 \times 10^9/L$); 2) hepatomegalia palpable con afectación funcional, ascitis y/o hipertensión portal; 3) afectación ósea con lesiones osteolíticas con/sin fracturas patológicas (no incluye osteoporosis); 4) esplenomegalia palpable con hiperesplenismo; 5) malabsorción con pérdida de peso debido a infiltración mastocitaria gastrointestinal

extensiones debe ser metódica, buscando posibles agrupaciones o nidos de mastocitos (Figura 15). Estos también pueden disponerse en torno a adipocitos o con disposición perivascular alrededor de capilares. En un aspirado medular correctamente realizado y revisado, la presencia de agregados de mastocitos puede observarse con una frecuencia similar a la de la histología⁽¹¹⁾. Los porcentajes de mastocitos dispersos deben valorarse en áreas alejadas de los nidos. En la sangre, de manera excepcional pueden observarse mastocitos circulantes.

Entre los criterios diagnósticos de MS, la citomorfología en el aspirado medular aporta un criterio menor, exigiendo que más de un 25% de los mastocitos sean atípicos o inmaduros⁽¹⁷⁾. Conviene destacar que el por-

centaje de mastocitos dispersos puede ser inferior al 1%, especialmente en las formas indolentes o en estadios tempranos de la enfermedad. Las dismorfias más comunes en las formas indolentes son la morfología fusiforme, el núcleo ovalado o bilobulado –incidentalmente binucleado–, y la hipogranularidad, en tanto que la presencia de formas inmaduras, multinuclearidad significativa y hemofagocitosis suele ser más propia de formas agresivas y de la leucemia^(11,13,14,18).

Mención aparte merecen los raros casos de MS bien diferenciadas (MSBD), que se caracterizan por la observación de elementos de apariencia madura, redondeados y con un citoplasma bien granulado⁽¹⁹⁾.

Con respecto a la clasificación, la citomorfología tiene un papel relevante en la diferenciación de las **formas avanzadas**, que incluyen las MS con una neoplasia hematológica asociada, las MS agresivas y la leucemia de mastocitos. El porcentaje de mastocitos patológicos dispersos en el aspirado de médula ósea establece el diagnóstico de la leucemia de mastocitos cuando es igual o superior al 20% y, dentro de estas, la observación de $\geq 10\%$ de mastocitos en sangre tipifica las formas clásicas. En las MS agresivas, definidas por la presencia de criterios “C” (Tabla 2), la observación de $\geq 5\%$ de mastocitos en el aspirado subclasifica las formas en transformación, que están asociadas con un pronóstico especialmente pobre, con frecuente evolución a leucemia^(17,18). La valoración citomorfológica conjunta de la sangre y de la médula ósea es necesaria para descartar una neoplasia hematológica asociada, que definiría el tercer subtipo de MS avanzada.

► El estudio histológico de la médula ósea

La histología tiene un papel fundamental en el diagnóstico de las MS, dado que aporta el único criterio mayor, definido por la presencia en la biopsia de médula ósea (o de otro órgano excepto en la piel) de infiltrados densos multifocales de ≥ 15 mastocitos en forma de agregados, y dos de los criterios menores de diagnóstico ($> 25\%$ de mastocitos atípicos y expresión anómala de CD25 \pm CD2)⁽¹⁷⁾. Aunque en los cortes histológicos los mastocitos pueden ser identificados con tinciones convencionales como hematoxilina-eosina, Giemsa o azul de toluidina (con estas 2 últimas por sus gránulos metacromáticos), los métodos más específicos son las tinciones inmunohistoquímicas como

triptasa y c-kit (CD117), y para los mastocitos neoplásicos, CD25 y CD2.

Existen diversos patrones de infiltración en la biopsia de médula ósea⁽²⁰⁾: a) intersticial difuso (mastocitos dispersos aislados, no agrupados), que es un patrón inespecífico y que puede verse también en hiperplasias mastocitarias reactivas o en neoplasias mieloproliferativas, por lo que para el diagnóstico de MS serían necesarios ≥ 3 criterios menores; b) multifocal denso, en forma de agregados, generalmente con localización paratrabecular y/o perivascular; c) formas mixtas con componente multifocal denso e intersticial asociado (alrededor de los agregados o en toda la biopsia); y d) difuso denso, que es el habitual en la leucemia de mastocitos. La mayoría de las MS tienen un patrón mixto, con cúmulos de mastocitos en forma de agregados y elementos aislados intersticiales.

› Citometría del mastocito normal y patológico

En sujetos sanos, el porcentaje de mastocitos en la médula ósea determinado por citometría de flujo es bajo ($0,008 \pm 0,0082\%$ de las células nucleadas), si bien en situación de reactividad o pacientes con trastornos hematológicos de línea no mastocítica, como el linfoma linfoplasmocítico o el síndrome mielodisplásico, pueden encontrarse variablemente incrementados ($0,027 \pm 0,17\%$; rango: $0,001-0,5\%$)^(21,22). Fenotípicamente, el mastocito normal se caracteriza por un patrón de tamaño (FSC) y complejidad (SSC) elevados y muy heterogéneos, y por la expresión intensa en su superficie de CD117, además de CD203c y el receptor de alta afinidad para la IgE (FC ϵ RI), aunque ningún antígeno es específico. Otros marcadores habitualmente expresados son CD45, proteínas relacionadas con adhesión (CD11c, CD29, CD33), tetraspaninas (CD9, CD63), marcadores de activación (CD69, CD203c) y receptores del complemento (CD55, CD59), además de proteasas como carboxipeptidasa o triptasa citoplasmáticas. El mastocito maduro normal no presenta marcadores asociados a inmadurez (CD34, CD38), asociados a presentación antigénica (CD1a, HLA-DR), marcadores linfoides (CD2, CD3 o CD19) ni receptores de citocinas como CD123 o la cadena alfa del receptor de IL-2 (CD25). El inmunofenotipo de los mastocitos normales y reactivos presenta características similares de tamaño, complejidad y expresión de antígenos, con excepción del patrón que presentan las proteínas

CD35, positiva en condiciones de reactividad, y CD63, cuya expresión está incrementada en los mastocitos de pacientes con síndrome mielodisplásico^(10,21-23).

En las MS el porcentaje de mastocitos se encuentra incrementado ($0,21 \pm 0,27\%$; rango: $0,001-1,7\%$, en formas indolentes), aunque con un rango que se solapa con el normal⁽²²⁾. Los mastocitos neoplásicos pueden expresar de manera aberrante CD25 y/o CD2. Estos marcadores son empleados para el diagnóstico, aunque pueden faltar, siendo CD25 más sensible y específico (criterio menor)^(17,24). Hay que destacar que, además de en las MS, la expresión de CD25 en mastocitos está descrita en las neoplasias mieloides/linfoides con eosinofilia y reordenamientos de *PDGFRA*, *PDGFRB* o, más raramente, *FGFR1*^(17,25); sin embargo, no se observa en sujetos sanos ni en pacientes con otras enfermedades hematológicas en las que puede haber un aumento de mastocitos. La expresión de CD30 también es aberrante y se ha asociado con MSBD y formas agresivas de MS⁽²⁶⁾. Además de estos marcadores, en las MS se observan otras alteraciones cuyo estudio ha permitido establecer 3 perfiles inmunofenotípicos diferenciados, que se correlacionan con distintos subtipos de la enfermedad y se asocian con alteraciones moleculares y pronóstico^(19,23,27):

- Fenotipo maduro activado: patrón de mastocito maduro con expresión aberrante de CD25 y CD2, que se asocia a incremento o expresión anormal de moléculas de activación (CD69), moléculas CMH de clase II (HLA-DR) y asociadas a la degranulación (CD63, CD203c). Está presente en la mayoría de las MS indolentes con o sin afectación cutánea.

- Mastocito maduro en reposo: se caracteriza por la ausencia de CD25 y CD2 (o expresión parcial) y puede presentar expresión aberrante de CD30. Además, puede mostrar infraexpresión o expresión normal de CD117 y FC ϵ RI e incremento de enzimas intracitoplasmáticas. Este es un patrón característico de MSBD.

- Fenotipo inmaduro: en este patrón se observa infraexpresión de moléculas que se adquieren en la maduración (CD117, FC ϵ RI y proteasas citoplasmáticas) junto con expresión de antígenos de inmadurez (CD123, HLADR) y disminución de tamaño y complejidad. Típicamente, muestran expresión intensa de CD25 en ausencia de CD2. Se asocia a las formas agresivas y leucémicas.

En relación con el pronóstico, merece la pena destacar que la detección por citometría de poblaciones de mastocitos normales y aberrantes se observa en

pacientes con mutación de *KIT* restringida a mastocitos. En cambio, un inmunofenotipo inmaduro se relaciona con la presencia de mutación de *KIT* multilínea en la hematopoyesis, que constituye un factor pronóstico adverso asociado a variantes de MS de pobre pronóstico y a mayor probabilidad de progresión⁽²⁸⁻³⁰⁾.

› A recordar

- La valoración de la morfología atípica de los mastocitos patológicos orienta de forma efectiva el diagnóstico de una MS, independientemente del porcentaje, que puede ser inferior al 1%. Se debe buscar activamente la presencia de agrupaciones de mastocitos, cuyo hallazgo podría reflejar la infiltración histológica.

- La demostración de metacromasia con azul de toluidina sigue siendo una técnica de referencia.

- La observación significativa de rasgos morfológicos atípicos, como aumento de la relación núcleo-citoplasmática, cromatinas hipodensas, frecuente multinuclearidad, presencia de mitosis y fagocitosis, apunta a la posibilidad de una mastocitosis agresiva.

- La citometría de flujo, además de aportar un criterio diagnóstico menor, identifica patrones madurativos que se pueden relacionar con subtipos de la enfermedad y con pronóstico.

› Bibliografía

- Ehrlich P. Beitrage zur theorie und praxis der histologischen färbung thesis. Leipzig, Germany: University of Leipzig; 1878.
- Kirshenbaum AS, Kessler SW, Goff JP, Metcalfe DD. Demonstration of the origin of human mast cells from CD34+ bone marrow progenitor cells. *J Immunol*. 1991;146(5):1410-5.
- Agis H, Willheim M, Sperr WR, Wilfing A, Krömer E, Kabrna E, et al. Monocytes do not make mast cells when cultured in the presence of SCF. Characterization of the circulating mast cell progenitor as a c-kit+, CD34+, Ly-, CD14-, CD17-, colony-forming cell. *J Immunol*. 1993;151(8):4221-7.
- Valent P, Spanblöchl E, Sperr WR, Sillaber C, Zsebo KM, Agis H, et al. Induction of differentiation of human mast cells from bone marrow and peripheral blood mononuclear cells by recombinant human stem cell factor/kit-ligand in long-term culture. *Blood*. 1992;80(9):2237-45.
- Rennick D, Hunte B, Holland G, Thompson-Snipes L. Cofactors are essential for stem cell factor-dependent growth and maturation of mast cell progenitors: comparative effects of interleukin-3 (IL-3), IL-4, IL-10, and fibroblasts. *Blood*. 1995;85(1):57-65.
- Gurish MF, Pear WS, Stevens RL, Scott ML, Sokol K, Ghildyal N, et al. Tissue-regulated differentiation and maturation of a v-abl-immortalized mast cell-committed progenitor. *Immunity*. 1995;3(2):175-86.
- Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiol Rev*. 1997;77(4):1033-79.
- Moon TC, St Laurent CD, Morris KE, Marcet C, Yoshimura T, Sekar Y, et al. Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function. *Mucosal Immunol*. 2010;3(2):111-28.
- Rozman C, Woessner S. Ultraestructura celular en hematología. Barcelona: Salvat Editores S. A.; 1976.
- Escribano L, Orfao A, Villarrubia J, Díaz-Agustín B, Cerveró C, Rios A, et al. Immunophenotypic characterization of human bone marrow mast cells. A flow cytometric study of normal and pathological bone marrow samples. *Am J Pathol*. 1998;16:151-9.
- Sánchez-Muñoz L, Álvarez-Twose I, García-Montero AC, Teodosio C, Jara-Acevedo M, Pedreira CE, et al. Evaluation of the WHO criteria for the classification of patients with mastocytosis. *Mod Pathol*. 2011;24(9):1157-68.
- Woessner Casas S, Florensa Brich L. La citología óptica en el diagnóstico hematológico. 5.ª ed. Madrid: Acción Médica S.A.; 2006.
- Sperr WR, Escribano L, Jordan JH, Scherthaner GH, Kundi M, Horny HP, et al. Morphologic properties of neoplastic mast cells: delineation of stages of maturation and implication for cytological grading of mastocytosis. *Leuk Res*. 2001;25(7):529-36.
- Morales-Camacho RM, Villanueva-Herraiz S, Prats-Martín C, Borrero JJ, Bernal R, Vargas MT. Eosinophil phagocytosis in advanced systemic mastocytosis with eosinophilia. *Br J Haematol*. 2018;181(5):578.
- Prats-Martín C, Morales-Camacho RM. Circulating hypergranular neoplastic cells: not always leukemic promyelocytes. *Blood*. 2017;130(24):2689.
- Li CY. Diagnosis of mastocytosis: value of cytochemistry and immunohistochemistry. *Leuk Res*. 2001;25(7):537-41.
- Horny HP, Akin C, Arber DA, et al. Mastocytosis. En: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J (eds.). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th edition. IARC: Lyon; 2017. pp. 61-9.
- Valent P, Sotlar K, Sperr WR, Escribano L, Yavuz S, Reiter A, et al. Refined diagnostic criteria and classification of mast cell leukemia (MCL) and myelomastocytic leukemia (MML): a consensus proposal. *Ann Oncol*. 2014;25(9):1691-700.
- Álvarez-Twose I, Jara-Acevedo M, Morgado JM, García-Montero A, Sánchez-Muñoz L, Teodosio C, et al. Clinical, immunophenotypic, and molecular characteristics of well-differentiated systemic mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(1):168-78.
- Krokowski M, Sotlar K, Krauth MT, Födinger M, Valent P, Horny HP. Delineation of Patterns of Bone Marrow Mast Cell Infiltration in Systemic Mastocytosis: Value of CD25, Correlation With Subvariants of the Disease, and Separation From Mast Cell Hyperplasia. *Am J Clin Pathol*. 2005;124(4):560-8.
- Orfao A, Escribano L, Villarrubia J, Velasco JL, Cerveró C, Ciudad J, et al. Flow cytometric analysis of mast cells from normal and pathological human bone marrow samples: identification and enumeration. *Am J Pathol*. 1996;149(5):1493-9.

22. Escribano L, García Montero AC, Núñez R, Orfao A. Flow cytometric analysis of normal and neoplastic mast cells: role in diagnosis and follow-up of mast cell disease. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2006;26:535-47.
23. Teodosio C, Mayado A, Sánchez-Muñoz L, Morgado JM, Jara-Acevedo M, Álvarez-Twose I, et al. The immunophenotype of mast cells and its utility in the diagnostic work-up of systemic mastocytosis. *J Leukoc Biol*. 2015;97(1):49-59.
24. Morgado JMT, Sánchez-Muñoz L, Teodosio CG, Jara-Acevedo M, Álvarez-Twose I, Matito A, et al. Immunophenotyping in systemic mastocytosis diagnosis: 'CD25 positive' alone is more informative than the 'CD25 and/or CD2' WHO criterion. *Mod Pathol*. 2012;25(4):516-21.
25. Roth CG, Agha M. FGFR1-associated myeloid neoplasm with increased mast cells. *Br J Haematol*. 2017;177(2):172.
26. Sotlar K, Cerny-Reiterer S, Petat-Dutter K, Hessel H, Berezowska S, Müllauer L, et al. Aberrant expression of CD30 in neoplastic mast cells in high-grade mastocytosis. *Mod Pathol*. 2011;24(4):585-95.
27. Teodosio C, García-Montero AC, Jara-Acevedo M, Sánchez-Muñoz L, Álvarez-Twose I, Núñez R, et al. Mast cells from different molecular and prognostic subtypes of systemic mastocytosis display distinct immunophenotypes. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(3):719-26.e4.
28. Teodosio C, García-Montero AC, Jara-Acevedo M, Álvarez-Twose I, Sánchez-Muñoz L, Almeida J, et al. An immature immunophenotype of bone marrow mast cells predicts for multilineage D816V KIT mutation in systemic mastocytosis. *Leukemia*. 2012;26(5):951-8.
29. Escribano L, Álvarez-Twose I, Sánchez-Muñoz L, García-Montero A, Núñez R, Almeida J, et al. Prognosis in adult indolent systemic mastocytosis: a long-term study of the Spanish Network on Mastocytosis in a series of 145 patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(3):514-21.
30. García-Montero AC, Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sánchez ML, Núñez R, Prados A, et al. KIT mutation in mast cells and other bone marrow hematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood*. 2006;108(7):2366-72.

Aspectos moleculares de las mastocitosis sistémicas avanzadas

Dolors Colomer

Secció Hematopatologia. Anatomia Patològica. Hospital Clínic. Institut d' Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS).
Centro de Investigación Biomédica en Red Cáncer (CIBERONC). Barcelona

En los últimos años, la caracterización molecular y el manejo de los pacientes con mastocitosis sistémica (MS) se han beneficiado enormemente de la aplicación de tecnologías moleculares. Los ensayos altamente sensibles y precisos para la detección y la cuantificación de la mutación KIT D816V han permitido realizar el diagnóstico de mastocitosis a partir de pruebas de sangre periférica (SP) no invasivas; la cuantificación de la carga alélica tiene implicaciones pronósticas y puede usarse para controlar la eficacia al tratamiento. La detección de las mutaciones de KIT, junto con el uso de paneles de secuenciación masiva para la caracterización de mutaciones genéticas asociadas, ha permitido la estratificación de los pacientes en 3 subgrupos que difieren en términos de patogénesis y pronóstico: a) pacientes con restricción de mastocitos *KIT D816V*; b) pacientes con participación de *KIT D816V* multilínea; y c) pacientes con mutaciones adicionales. Gracias a estos hallazgos, se han desarrollado nuevos sistemas pronósticos que combinan datos clínicos y moleculares. Esta presentación discute cómo el progreso en los últimos años ha complementado rápidamente el conocimiento previo que mejora la caracterización molecular de la MS y en particular de la MS avanzada.

› Introducción

El mastocito es una célula hematopoyética derivada de células progenitoras hematopoyéticas pluripotentes de médula ósea (MO) CD34+ que abandonan la MO a través de la circulación sanguínea como una célula mononucleada indiferenciada, pero comprometida, a la línea de mastocito "célula precursora del mastocito" (CPM). Esta célula se dirigirá a diferentes tejidos y órganos vascularizados del organismo, preferentemente en la piel, el tracto gastrointestinal y el

aparato respiratorio, y allí es donde terminará su diferenciación a mastocito. Este proceso está controlado por citocinas y factores de crecimiento. El mastocito participa en la inducción y la amplificación de la respuesta inmune primaria e innata y en el control de la respuesta inmune adaptativa⁽¹⁾.

La mastocitosis es una enfermedad clonal caracterizada por la proliferación de mastocitos neoplásicos y por su acumulación en diferentes localizaciones, que habitualmente incluyen más de un tejido u órgano. Se considera una enfermedad rara con una prevalencia aproximada de una persona entre 10.000 individuos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2016 distingue la mastocitosis en 3 categorías: la **mastocitosis cutánea (MC)**, la **MS** y el **sarcoma de mastocitos**. A su vez, la MS se divide en formas indolentes y agresivas. Las formas indolentes son las más frecuentes, correspondiendo al 82-89% de todas las MS. Estas incluyen la **MS indolente (MSI)**, que es la más frecuente, y la **quiescente o smoldering MS (MSS)**. Las formas de MS agresivas tienen un alto riesgo de progresión y muerte, corresponden al 8-12% de todas las MS e incluyen la **MS asociada a una neoplasia hematológica (MS-ANH)** (4-5%), la **MS agresiva (MSA)** (2-6%) y la **leucemia de mastocitos (LM)** (0,2-1%). El sarcoma de mastocitos también se incluiría en el grupo de mastocitosis agresivas. La MC es más frecuente en niños y las MS suelen presentarse a partir de la segunda década de la vida. La MSS tiene más posibilidad de progresar a una MSA que las MSI y las MS-ANH generalmente están asociadas a una neoplasia mieloide⁽²⁾.

› Mutación KIT

El protooncogén *c-KIT* se describió en 1987⁽³⁾. El gen *KIT* codifica para un receptor de transmembrana con actividad tirosina cinasa. *KIT* se expresa en mastocitos,

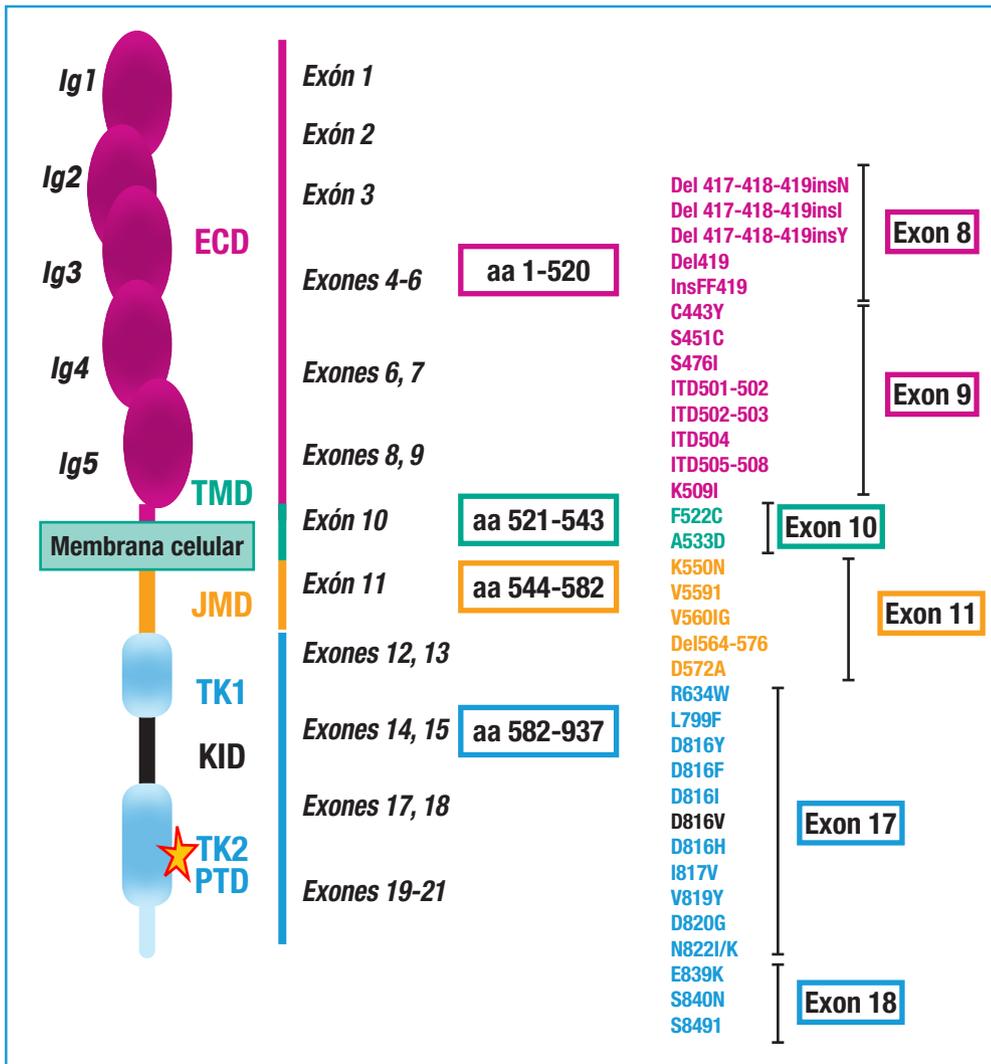


Figura 1. Estructura y mutaciones de KIT. KIT es miembro de la superfamilia de receptores de tirosina cinasa de tipo III compuesta por un dominio extracelular (ECD) constituido por 5 dominios de tipo inmunoglobulina (Ig), el dominio ECD que está ligado a la región citoplasmática por un dominio transmembrana (TMD) y la región citoplasmática que consiste de un dominio yuxtamembrana (JMD) y un dominio citoplasmático con actividad tirosina cinasa (TKD) constituido por el lugar de unión a ATP y un dominio de fosfotransferasa (PTD). Se detallan las mutaciones halladas en KIT, señalando en negro la mutación recurrente más frecuente, la D816V, que se halla en el exón 17 en el dominio citoplasmático con actividad tirosina cinasa. Figura modificada de Arock *et al.*, *Leukemia*. 2015;29(6):1223-32.

melanocitos, las células progenitoras hematopoyéticas y células germinales. Durante la maduración hematopoyética las células pierden la expresión de *KIT*. El ligando de KIT es el *mast cell growth factor* o factor de crecimiento del mastocito, posteriormente conocido como *stem cell factor* (SCF)⁽⁴⁾. *KIT* se localiza en el brazo largo del cromosoma 4q12 (GenBank NG_007456) y está compuesto de 21 exones que corresponden

a 80 kb de ADN y codifican para una proteína de 145 kDa formada por 976 aminoácidos (Figura 1)⁽⁵⁾.

KIT está implicado en la diferenciación tanto de las células mieloides como linfoides. La unión a su ligando SCF da lugar a la dimerización y autofosforilación del receptor en los residuos de tirosina y a la activación de múltiples vías de señalización implicadas en la proliferación celular, la supervivencia y la migración celular.

La primera mutación activante de *KIT* independiente de ligando se describió en la línea celular de mastocitos humanos HMC-1⁽⁶⁾. En la actualidad se han detectado mutaciones de *KIT* en diferentes tipos de tumores. En la MS más del 90% de los pacientes afectados de MS presentan una mutación en el codón 816 situado en el exón 17 de *KIT*. La mutación D816V se produce por la sustitución de una adenina por una timina (GAC por GTC), provocando el cambio del aminoácido aspartato por valina y dando lugar a la activación constitutiva de KIT independientemente del ligando y de la dimerización del receptor. La mutación D816V de *KIT* se incluye dentro de los criterios (menores) de la OMS para el diagnóstico de MS⁽²⁾.

Se han descrito otras mutaciones en el codón 816 (ejemplos: D816A/F/H/I/N/T/Y), aunque son muy infrecuentes y funcionalmente son equivalentes a la mutación D816V. También se han descrito mutacio-

Tabla 1. Métodos disponibles para la identificación de mutaciones del gen *KIT*

| Método de detección | Límite de detección | Ventajas | Desventajas |
|---|---------------------|---|--|
| Secuenciación Sanger | 25% | Detecta todas las mutaciones de <i>KIT</i> si secuenciados todos los exones Cualitativo | Baja sensibilidad Laborioso No es cuantitativo |
| Secuenciación masiva de nueva generación (NGS) | 0,2% | Detecta todas las mutaciones de <i>KIT</i> si se secuencia todo el gen Aporta información sobre otras mutaciones Cuantitativo | Sensibilidad media Laborioso |
| Digestión mediante enzimas de restricción y análisis de fragmentos (RFLP) | 1-5% | Simple Rápido Barato | No es cuantitativo |
| PCR con bloqueo de ADN silvestre | 1% | Simple Rápido | No es cuantitativo |
| PCR cuantitativa específica de alelo (qPCR) | < 0,01% | Simple Rápido Barato Muy sensible | Cuantificación relativa |
| PCR digital | < 0,01% | Simple Rápido Muy sensible | Cuantificación absoluta |

nes en otras posiciones del dominio tirosina cinasa (exones 17 y 18; D820G o N822I/K), y más de 30 mutaciones diferentes en los dominios extracelulares (exones 8-9), transmembrana (exón 10; F522C) y de yuxtamembrana (exón 11; V560G/I) (Figura 1). En cambio, en niños, donde la mastocitosis es esencialmente cutánea (MC) y tiende a retroceder espontáneamente en la pubertad, también se detecta en un 75% de los casos la mutación en *KIT* pero solo una tercera parte presentan la mutación específica de *KIT* D816V. Estas mutaciones de las MC infantiles se localizan fundamentalmente en el dominio extracelular del receptor, siendo la más frecuente una delección en la posición 419⁷ mostly in exon 17 (D 816 V). En la Figura 1 se describen todas las mutaciones descritas en la MS.

» ¿Dónde se origina la mutación?

En una tercera parte de las MSI y prácticamente en todas las MS en fase avanzada, la mutación D816V de *KIT* está presente además de en los mastocitos, en una o varias líneas celulares hematopoyéticas (CD34+, eosinófilos, monocitos, linfocitos B y neutrófilos). La presentación multilínea se asocia con un mayor riesgo de progresión de MSI a formas más

agresivas de la enfermedad. Además, el 60-80% de los pacientes con MS avanzada **presentan** signos de proliferación y displasia, y en muchos casos hay asociada una enfermedad hematológica (MS-ANH) de origen mielóide. Las células hematopoyéticas de pacientes afectados de MS-ANH también presentan la mutación de *KIT* D816V⁽⁸⁾. Recientemente, estudios realizados de secuenciación de célula única han demostrado la presencia de la mutación *KIT* D816V en células progenitoras hematopoyéticas⁽⁹⁾, sugiriendo un origen clonal común en una célula progenitora hematopoyética con potencial multilínea.

» ¿Cómo detectar la mutación?

La determinación de la mutación D816V tiene una especial importancia tanto para el diagnóstico como para la estratificación pronóstica de los pacientes con mastocitosis.

Desde la detección de la mutación se han desarrollado y aplicado distintas estrategias y métodos moleculares que se resumen en la Tabla 1. Así, disponemos de: 1) técnicas basadas en la secuenciación de la muestra; 2) métodos basados en el análisis del tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP) para la detección de la mutación; y 3) estrategias basadas

en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Así, mientras los métodos de secuenciación convencional apenas detectan la mutación en un 14% de los pacientes analizados, el uso de métodos más sensibles incrementa el porcentaje de casos positivos hasta casi el 100% de los pacientes.

Inicialmente, la purificación de los mastocitos de MO mediante citometría de flujo, juntamente con la detección de la mutación mediante técnicas de PCR altamente específicas, permitió la identificación de la mutación incluso en aquellos pacientes que presentaban una baja carga de mastocitos patológicos en la MO. En la actualidad, las técnicas de detección aún son más sensibles y es posible detectar la mutación de *KIT* en SP en la mayoría de los casos de MS.

En la actualidad, las 3 técnicas más utilizadas en el análisis de la mutación *KIT* D816V son, por una parte, la **PCR cualitativa con bloqueo de la amplificación del ADN silvestre mediante una sonda** (PNA-PCR) y, por otra, las 2 técnicas cuantitativas que son la **PCR cuantitativa específica de alelo** (ASO-qPCR) y la **PCR digital**.

Las técnicas de PCR cuantitativa han sido capaces de detectar la mutación D816V en muestras de SP con sensibilidades inferiores al 0,01%⁽¹⁰⁻¹²⁾. Estas 2 tecnologías se basan en cebadores específicos del alelo de interés (*allele specific oligonucleotide* -ASO-), por lo que solo de esta forma lograremos la amplificación selectiva del material genético portador de la mutación. A su vez, esto tiene como inconveniente el que solo sería posible la identificación de la mutación que estuviésemos buscando (por ejemplo, D816V) en el ensayo. El método de ASO-qPCR utilizado de forma cualitativa (resultado positivo vs. negativo) permitía identificar la presencia de la mutación D816V de *KIT* en más del 80% de los pacientes⁽¹⁰⁾. Por el contrario, la técnica de PNA-PCR solo fue positiva en menos de la mitad de esas muestras, lo cual confirmaría la mayor utilidad de la ASO-qPCR para la identificación de la mutación D816V de *KIT*. La cuantificación del porcentaje de células portadoras de la mutación permite predecir con elevada eficiencia el grado de afectación de la hematopoyesis medular por la mutación. La presencia de afectación multilineal de la hematopoyesis se asocia con niveles más elevados de células portadoras de la mutación en SP. Un resultado negativo, especialmente cuando se observa en pacientes con síntomas de activación mastocitaria (por ejemplo, anafilaxia), en ausencia de lesiones

cutáneas (MSI-), debe ser corroborado con un análisis de MO, ya que la mutación de *KIT* está restringida a los mastocitos anómalos y estos son poco abundantes.

Se han sugerido distintos puntos de corte de la carga tumoral para definir los diferentes grupos pronósticos. Se ha definido una carga tumoral del 2% para estratificar a los pacientes teniendo en cuenta la supervivencia⁽¹¹⁾ y una carga tumoral del 6% en SP para discriminar si la mutación se halla restringida en mastocitosis o no⁽¹⁰⁾. Basado en estos estudios, la European Competence Network on Mastocytosis (ECNM) ha sugerido que el análisis de la mutación de *KIT* D816V en SP debe utilizarse como el primer *screening* en pacientes con sospecha de MS conjuntamente con el análisis de los niveles de triptasa sérica para el diagnóstico de las MSI (Figura 2)⁽¹³⁾.

Recientemente, se ha demostrado que el análisis cuantitativo por PCR digital en biopsias de MO fijadas en formol e incluidas en parafina presenta una muy buena correlación de la carga tumoral con la infiltración de mastocitos en MO y que puede ser un método muy sensible en los casos de MSI⁽¹⁴⁾. Se propone que un punto de corte del 9% identifica 2 subgrupos clínicamente distintos analizados en las muestras de MO.

› Mutaciones adicionales en la mastocitosis

Los estudios de secuenciación masiva han detectado mutaciones adicionales en la MS. Así, un 5-10% de los casos de MSI progresarán a formas más avanzadas y estas estarán asociadas a un peor pronóstico. Teniendo en cuenta en qué línea celular se detecta la mutación de *KIT* D816V y la presencia de otras mutaciones, la MS se puede subclasificar en 3 grupos. La mayoría de las MSI presentarán mutación de *KIT* D816V solo en mastocitos; la mutación se hallará en multilineal en el 11% de las MSI sin lesiones de piel, en un 37% de las MSI con lesiones de piel y en la casi totalidad de las MS agresivas. Más del 90% de las MS agresivas además presentarán otras mutaciones somáticas. Se ha descrito que un 17% de las MSI presentan mutaciones adicionales; en particular, la presencia de mutaciones en *ASXL1*, *RUNX1* y/o mutaciones en *DNMT3a* (A/R/D) con una frecuencia alélica (VAF) de más del 30% es el único predictor independiente de supervivencia global de las MSI⁽¹⁵⁾.

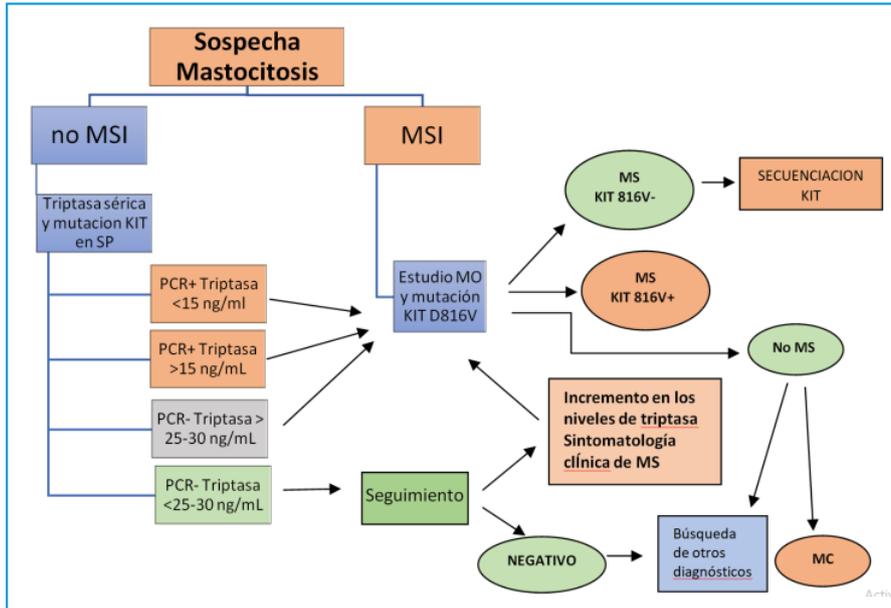


Figura 2. Algoritmo propuesto por la European Competence Network on Mastocytosis para el análisis y la cuantificación de la mutación de KIT D816V en la mastocitosis sistémica indolente (MSI). Modificada de Arock *et al.*, *Leukemia*. 2015;29(6):1223-32.

➤ Mastocitosis sistémica avanzada

Las MS avanzadas son entidades raras que incluyen la MSA, la MS-ANH y la LM. La MS-ANH corresponde al 80% de los pacientes y la neoplasia hematológica es en más del 90% de los casos de origen mieloide. Estos subtipos de MS pueden aparecer *de novo* o pueden ser por progresión de las formas indolentes MSI y MSS. La mutación de *KIT* se detecta en > 90% de los pacientes y generalmente en multilínea. En estas entidades se han detectado en un 80% de los casos múltiples

mutaciones somáticas además de la mutación de *KIT* D816V, siendo más frecuentes en los casos de MS-ANH⁽¹⁶⁾. Las mutaciones más frecuentes son: *TET2*, *SRSF2*, *ASXL1*, *RUNX1*, *N/KRAS* e *IDH2*, identificándose preferentemente en MS-ANH y LM-ANH. La presencia y el número de mutaciones, en particular de *SRSF2*, *ASXL1* y *RUNX1*, son indicativos de transformación leucémica a una LM o de LAM, de peor respuesta al tratamiento y de disminución de la supervivencia. Los casos que no presentan mutaciones adicionales presentan un fenotipo menos agresivo, generalmente sin citopenias y una mejor supervivencia⁽¹⁸⁾.

Recientemente, se han validado estos resultados y se han generado diferentes clasificaciones moleculares (Tabla 2). El MARS

(Mutation-Adjusted Risk Score) incluye la presencia de una de estas mutaciones (*SRSF2*, *ASXL1* y *RUNX1*) y en él la presencia de 2 o más mutaciones ayudaría a la subclasificación de las mastocitosis avanzadas⁽¹⁹⁾, y el Mutation-Augmented Prognostic Scoring System (MAPSS), que incluye la mutación de *ASXL1*⁽²⁰⁾. También se ha descrito que, en aquellos casos que presentan una mutación de *KIT* multilínea, la presencia de más de 1 mutación multilínea de *SRSF2*, *ASXL1*, *RUNX1* y/o *EZH2* es el único predictor independiente de progresión, que afecta a la supervivencia libre de progresión y a la supervivencia global⁽²¹⁾.

Tabla 2. Scores pronósticos en la mastocitosis sistémica (MS) que tienen en cuenta las mutaciones somáticas adicionales a KIT

| MARS Score | Puntos | Tratamiento | MAPSS Score | Puntos |
|---|--------|-----------------------------|--------------------------------------|--------|
| > 60 años | 1 | | > 60 años | 1,5 |
| Hemoglobina < 10 g/dL | 1 | | Hemoglobina < valores de referencia | 1 |
| Plaquetas < 100 × 10 ⁹ /L | 1 | | Plaquetas < 150 × 10 ⁹ /L | 2 |
| Una mutación en SRSF2, ASXL1 o RUNX | 1 | | Mutaciones en ASXL1 | 1,5 |
| Dos o más mutaciones en SRSF2, ASXL1 o RUNX | 2 | | Incremento de fosfatasa alcalina | 1,5 |
| Bajo riesgo | 0-1 | Midostaurina | Bajo riesgo | 0-1,5 |
| Riesgo intermedio | 2 | Tratamientos más intensivos | Riesgo intermedio | 2-4,5 |
| Alto riesgo | 3-5 | Tratamientos más intensivos | Alto riesgo | 5-7,5 |

› Conclusiones

El conocimiento sobre la mastocitosis, y en particular de la mastocitosis avanzada, ha aumentado constantemente en los últimos años gracias al mayor conocimiento biológico de la enfermedad y a la disponibilidad de nuevas tecnologías para la detección de la mutación de *KIT* y de nuevas opciones terapéuticas. La detección y la cuantificación de la mutación de *KIT* D816V y la detección de mutaciones somáticas adicionales son muy importantes para poder realizar un buen diagnóstico y una clasificación de estos pacientes.

› Bibliografía

- Boyce JA. Mast cells: Beyond IgE. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(1):24-32.
- Valent P, Akin C, Metcalfe DD. Mastocytosis: 2016 updated WHO classification and novel emerging treatment concepts. *Blood*. 2017;129(11):1420-7.
- Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull TJ, et al. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J*. 1987;6(11):3341-51.
- Besmer P. The kit ligand encoded at the murine Steel locus: a pleiotropic growth and differentiation factor. *Curr Opin Cell Biol*. 1991;3(6):939-46.
- Chabot B, Stephenson DA, Chapman VM, Besmer P, Bernstein A. The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse *W* locus. *Nature*. 1988;335(6185):88-9.
- Furitsu T, Tsujimura T, Tono T, Ikeda H, Kitayama H, Koshimizu U, et al. Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J Clin Invest*. 1993;92(4):1736-44.
- Bodemer C, Hermine O, Palmérini F, Yang Y, Grandpeix-Guyodo C, Leventhal PS, et al. Pediatric mastocytosis is a clonal disease associated with D 816 v and other activating c-KIT mutations. *J Invest Dermatol*. 2010;130(3):804-15.
- Martelli M, Monaldi C, De Santis S, Bruno S, Mancini M, Cavo M, et al. Recent advances in the molecular biology of systemic mastocytosis: Implications for diagnosis, prognosis, and therapy. *Int J Mol Sci*. 2020 Jun 2;21(11):E3987.
- Grootens J, Ungerstedt JS, Ekoff M, Rönnerberg E, Klimkowska M, Amini RM, et al. Single-cell analysis reveals the KIT D816V mutation in haematopoietic stem and progenitor cells in systemic mastocytosis. *EBioMedicine*. 2019;43150-8.
- Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sánchez-Muñoz L, Álvarez-Twose I, Mayado A, Caldas C, et al. Detection of the KIT D816V mutation in peripheral blood of systemic mastocytosis: diagnostic implications. *Mod Pathol*. 2015;28(8):1138-49.
- Hoermann G, Gleixner KV, Dinu GE, Kundi M, Greiner G, Wimazal F, et al. The KIT D816V allele burden predicts survival in patients with mastocytosis and correlates with the WHO type of the disease. *Allergy*. 2014;69(6):810-3.
- Greiner G, Gurbisz M, Ratzinger F, Witzeneder N, Simonitsch-Klupp I, Mitterbauer-Hohendanner G, et al. Digital PCR: A Sensitive and Precise Method for KIT D816V Quantification in Mastocytosis. *Clin Chem*. 2018;64(3):547-55.
- Arock M, Sotlar K, Akin C, Broesby-Olsen S, Hoermann G, Escribano L, et al. KIT mutation analysis in mast cell neoplasms: Recommendations of the European Competence Network on Mastocytosis. *Leukemia*. 2015;29(6):1223-32.
- Greiner G, Gurbisz M, Ratzinger F, Witzeneder N, Class SV, Eisenwort G, et al. Molecular quantification of tissue disease burden is a new biomarker and independent predictor of survival in mastocytosis. *Haematologica*. 2020;105(2):366-74.
- Muñoz-González JI, Álvarez-Twose I, Jara-Acevedo M, Henriques A, Viñas E, Prieto C, et al. Frequency and prognostic impact of KIT and other genetic variants in indolent systemic mastocytosis. *Blood*. 2019;134(5):456-68.
- Schwaab J, Cabral do O Hartmann N, Naumann N, Jawhar M, Weiß C, Metzgeroth G, et al. Importance of Adequate Diagnostic Workup for Correct Diagnosis of Advanced Systemic Mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2020. [Epub ahead of print].
- Reiter A, George TI, Gotlib J. New developments in diagnosis, prognostication, and treatment of advanced systemic mastocytosis. *Blood*. 2020;135(16):1365-76.
- Jawhar M, Döhner K, Kreil S, Schwaab J, Shoumariyeh K, Meggendorfer M, et al. KIT D816 mutated/CBF-negative acute myeloid leukemia: a poor-risk subtype associated with systemic mastocytosis. *Leukemia*. 2019;33(5):1124-34.
- Jawhar M, Schwaab J, Álvarez-Twose I, Shoumariyeh K, Naumann N, Lübke J, et al. MARS: Mutation-Adjusted Risk Score for Advanced Systemic Mastocytosis. *J Clin Oncol*. 2019;37(31):2846-56.
- Pardanani A, Shah S, Mannelli F, Elala YC, Guglielmelli P, Lasho TL, et al. Mayo alliance prognostic system for mastocytosis: clinical and hybrid clinical-molecular models. *Blood Adv*. 2018;2(21):2964-72.
- Muñoz-González JI, Jara-Acevedo M, Álvarez-Twose I, Merker JD, Teodosio C, Hou Y, et al. Impact of somatic and germline mutations on the outcome of systemic mastocytosis. *Blood Adv*. 2018;2(21):2814-28.

Actualización terapéutica en mastocitosis sistémicas avanzadas

Iván Álvarez-Twose

Instituto de Estudios de Mastocitosis de Castilla La Mancha (CLMast) – CSUR de Mastocitosis.
Hospital Virgen del Valle. Complejo Hospitalario de Toledo

› Consideraciones generales sobre la mastocitosis sistémica avanzada

Bajo el término mastocitosis sistémica (MS) avanzada se incluyen 3 subtipos de MS recogidos en la actual clasificación de mastocitosis de la Organización Mundial de la Salud (OMS), que tienen en común una esperanza de vida acortada⁽¹⁾: 1) MS agresiva (MSA); 2) MS asociada a neoplasia hematológica (MS-ANH); y 3) leucemia de mastocitos (LM).

El diferente comportamiento clínico de las MS avanzadas con respecto a las MS indolentes (MSI) no puede ser explicado por la presencia de la mutación D816V de *KIT*, puesto que esta se detecta en la mayoría de los casos de MS independientemente de la variante clínica de que se trate^(2,3). Sin embargo, existen 2 aspectos moleculares que sí han demostrado tener impacto en el pronóstico de las MS.

El primero de estos aspectos hace referencia al grado de afectación de la hematopoyesis por la mutación D816V de *KIT*, de manera que en las MS existen 2 patrones de afectación molecular⁽²⁾: 1) patrón de afectación restringida al mastocito, en el que el mastocito es la única célula hematopoyética portadora de la mutación D816V de *KIT*; y 2) patrón de afectación multilineal, en el que la mutación D816V es detectable no solo en los mastocitos de médula ósea (MO), sino también en otras células hematopoyéticas de estirpe mieloide (por ejemplo, basófilos, eosinófilos, neutrófilos, monocitos) y en ocasiones también células de serie linfóide. Si se analiza la frecuencia de estos patrones moleculares en MSI vs. MSA, el patrón multilineal está presente en el 100% de los pacientes con MSA, pero en solo un 5-30% de pacientes con MSI, en función de si carecen de, o presentan, respectivamente, lesiones cutáneas de mastocitosis^(2,4-6). Además, estudios pros-

pectivos de la Red Española de Mastocitosis (REMA) han demostrado que la afectación multilineal de la hematopoyesis por la mutación D816V de *KIT* es uno de los factores más determinantes para predecir la progresión clínica de MSI a formas avanzadas de la enfermedad, mientras que la demostración de la mutación D816V de *KIT* restringida a los mastocitos permite identificar un grupo de pacientes con MSI con un riesgo virtualmente nulo de progresión clínica⁽⁵⁾.

El segundo aspecto molecular relevante desde el punto de vista pronóstico de las MS tiene que ver con el desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva que se ha venido produciendo en los últimos años y que ha permitido identificar mutaciones en genes diferentes a *KIT* en una elevada proporción de pacientes con MS avanzadas. Estas mutaciones afectan a genes comúnmente afectados en otras hemopatías, como son *TET2*, *SRSF2*, *ASXL1*, *RUNX1*, *JAK-2*, *NRAS*, *CBL*, *EZH2*, *ETV6*, *U2AF1*, *DNMT3A*, *IDH2* o *SF3B1*. En el caso de las MS avanzadas, únicamente la presencia de mutaciones en los genes *SRSF2*, *ASXL1* y *RUNX1* (panel S/A/R) –y, más recientemente, también en *DNMT3A*– y el número de genes mutados han demostrado tener impacto pronóstico en términos de supervivencia^(7,8).

Estos recientes hallazgos genéticos y también diferentes parámetros analíticos y características clínicas se han utilizado en los últimos años para desarrollar diferentes scores pronósticos para MS. De ellos, los que han demostrado mayor eficiencia para identificar grupos de diferente pronóstico en pacientes con MS avanzada son: 1) el International Prognostic Scoring System for Mastocytosis (IPSM), desarrollado por la European Competence Network on Mastocytosis (ECNM)⁽⁹⁾, que discrimina entre 4 grupos pronósticos con una supervivencia global a 5 años de 100, 93, 47 y 17%; y 2) el Global Prognostic Score for Mastocytosis (GPSM) de la REMA⁽¹⁰⁾, que es ca-

paz de identificar 3 grupos pronósticos con una supervivencia global a 5 años de 100, 94 y 62%. Estos scores ponen de manifiesto que existen algunos pacientes con MS avanzada que presentan supervivencias globales prolongadas a pesar de pertenecer a una categoría de la enfermedad considerada *a priori* como de mal pronóstico, que puede tener implicaciones terapéuticas.

› Tratamiento citorreductor en mastocitosis sistémica avanzada

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, a la hora de decidir el inicio de tratamientos citorreductores en pacientes con MS se debe tener en cuenta en primer lugar el pronóstico individual de cada caso y, en segundo lugar, las expectativas de respuesta y la posible toxicidad del tratamiento seleccionado. A diferencia de enfermedades más prevalentes, la selección de terapias para MS avanzada tiene como principal limitación la escasez de ensayos clínicos y, muy especialmente, de ensayos aleatorizados, por lo que a menudo resulta complicado saber si una aproximación terapéutica podría ser superior a otras en un contexto clínico determinado. Además, hasta hace unos años no existían criterios consensuados para evaluar la respuesta a fármacos citorreductores en pacientes con mastocitosis, por lo que los criterios de respuesta empleados en diferentes estudios variaban extraordinariamente de unos a otros, lo que dificulta significativamente la interpretación de los datos.

Dentro del arsenal terapéutico con perfil citorreductor disponible actualmente para pacientes con MS avanzada, distinguimos 4 grandes grupos de tratamiento: 1) fármacos citostáticos clásicos; 2) anticuerpos monoclonales; 3) trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH); y 4) terapias dirigidas.

› Fármacos citostáticos

Dentro de este grupo de fármacos, los más utilizados clásicamente en mastocitosis son la cladribina y el interferón. Aunque se han reportado tasas de respuesta de entre el 40 y el 70% con estos tratamientos, la mayor parte de los estudios se refieren a análisis retrospectivos, casos aislados o series cortas de pacientes, en los que, además, se emplearon criterios de respuesta heterogéneos^(11,12). A pesar de que en algunos pacientes se pueden objetivar respuestas robustas en términos de disminución de carga mastocitaria, incluso con norma-

lización del fenotipo de una fracción de los mastocitos de MO en algunos casos⁽¹³⁾, no se han reportado respuestas completas con este tipo de terapias. Además, se trata de fármacos no exentos de efectos secundarios, como la mielosupresión asociada a cladribina o los problemas de tolerancia, alteraciones tiroideas o cardiotoxicidad que pueden ocurrir con interferón.

› Anticuerpos monoclonales

En el mastocito se han identificado un total de 6 antígenos frente a los cuales existen anticuerpos monoclonales comercializados⁽¹⁴⁾. De estos, únicamente 4 se han empleado en pacientes con mastocitosis, que son: el dalcizumab (anti-CD25)⁽¹⁵⁾, el brentuximab vedotina (anti-CD30)⁽¹⁶⁾, el gemtuzumab ozogamicina (anti-CD33)^(17,18) y el omalizumab (antirreceptor de alta afinidad para IgE)^(19,20). A pesar del escaso número de pacientes tratados con este tipo de fármacos, el que tiene mayor relevancia de todos ellos para el tratamiento de pacientes con MS avanzadas es el gemtuzumab ozogamicina, con el cual se han reportado respuestas completas en combinación con quimioterapia en un niño de 9 años con MS-ANH, en la que la hemopatía era una leucemia mieloblástica aguda t(8:21)⁽¹⁷⁾, y en monoterapia en una paciente de 69 años con una LM multirrefractaria⁽¹⁸⁾.

› Trasplante de progenitores hematopoyéticos

El TPH es un procedimiento que se ha llevado a cabo de forma excepcional en pacientes con mastocitosis. El único estudio de una serie de pacientes con MS sometidos a TPH publicado en la literatura es un análisis retrospectivo de 57 pacientes (38 MS-ANH, 12 LM y 7 MSA) en el que se objetivó una tasa de respuesta global del 70%⁽²¹⁾. Aunque conviene tener en cuenta las limitaciones propias de tratarse de un estudio retrospectivo, 16 pacientes (28%) alcanzaron una remisión completa de la MS, con una supervivencia global y libre de progresión a 3 años de 55 y 51%, respectivamente. La supervivencia global fue significativamente mayor en el grupo de MS-ANH (74%) y menor en pacientes con LM y en aquellos en los que se utilizó un acondicionamiento de intensidad reducida.

› Terapias dirigidas

El receptor KIT es una proteína transmembrana perteneciente a la familia de los receptores tirosina cinasa

(TK) de tipo III que regula los procesos de proliferación, diferenciación, migración y supervivencia del mastocito⁽²²⁾, y que se encuentra mutado en más del 90% de los pacientes con MS⁽²⁻⁴⁾. La mutación más frecuentemente detectada en pacientes con MS es la D816V, que afecta al exón 17 de *KIT* y pertenece al dominio catalítico de la molécula, aunque en ocasiones es posible detectar otras mutaciones en el exón 17 de *KIT* o incluso en otros exones como el 5, el 8, el 9, el 10, el 11, el 13 o el 18⁽²³⁻²⁵⁾. Por este motivo, terapias dirigidas con fármacos inhibidores de TK constituyen uno de los tratamientos más usados en pacientes con MS.

El primer inhibidor de TK aprobado para su uso en mastocitosis es imatinib. En concreto, imatinib está aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) americana, pero no por la European Medicines Agency (EMA), en pacientes con MSA que no presentan la mutación D816V o cuyo estado mutacional se desconoce. La presencia de la mutación D816V de *KIT* (y de otras mutaciones que afectan al dominio catalítico de *KIT*) produce un cambio conformacional de *KIT* que impide la unión de imatinib, confiriendo una resistencia constitutiva al fármaco⁽²⁶⁾. Por el contrario, estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado la capacidad inhibitoria de imatinib en pacientes con mastocitosis que presentan *KIT* silvestre o mutaciones fuera del dominio enzimático de *KIT* como la del419 en el exón 8, la K509I en el exón 9, la F522C en el exón 10 y la V560G en el exón 11, entre otras⁽²⁷⁻³²⁾. Otra indicación de imatinib, en este caso aprobada tanto por la FDA como la EMA, es el síndrome hipereosinofílico (SHE) o leucemia eosinofílica crónica (LEC) con el gen de fusión *FIP1L1/PDGFR*⁽²⁸⁾, que en ocasiones pueden presentarse asociados a MS con *KIT* silvestre⁽³³⁾.

Un estudio retrospectivo llevado a cabo por la REMA en 2016 en el que se evaluaron todos los pacientes con mastocitosis tratados con imatinib hasta la fecha reveló tasas de respuesta del 100% en pacientes con MS asociada a SHE o LEC con el gen de fusión *FIP1L1/PDGFR* y en MS con mutaciones en los exones 8, 9 y 10 de *KIT*⁽²⁸⁾. Por el contrario, la tasa de respuesta al fármaco en los pacientes con MS y *KIT* silvestre (en ausencia del gen de fusión *FIP1L1/PDGFR*) y en aquellos en los que la mutación D816V de *KIT* no había sido analizada era del 36 y el 6%, respectivamente⁽²⁸⁾. Estos hallazgos indican que la respuesta a imatinib en pacientes con mastocitosis depende fundamentalmente de la presencia de mutaciones sensibles al fármaco, ya sea en el gen *KIT* o en *PDGFR*, más que de la ausencia de la mutación D816V de *KIT* por sí misma.

Inhibidores de TK de segunda generación como nilotinib y dasatinib han sido utilizados con éxito en otras enfermedades mediadas por proteínas con actividad TK como la leucemia mieloide crónica. Sin embargo, la eficacia de estos inhibidores de TK en términos de respuesta objetiva en pacientes con mastocitosis ha sido muy limitada^(34,35).

Más recientemente, otro inhibidor de TK, la midostaurina, ha conseguido la aprobación de ambas agencias reguladoras, la FDA y la EMA, para su uso en pacientes con MS avanzada. Esta indicación del fármaco se basa en los resultados de un ensayo clínico fase II en el que se incluyeron 116 pacientes con MSA, LM o MS-ANH, de los que 89 fueron evaluables para respuesta⁽³⁶⁾. Globalmente, la tasa de respuesta fue del 60%, pero llegó al 75% en el grupo de pacientes con MSA y al 73% en los casos que no asociaban hemopatía. En lo referente a citorreducción, la midostaurina fue capaz de reducir más del 50% la infiltración mastocitaria de MO en el 57% de los casos y más del 50% la triptasa sérica en el 60% de los pacientes. Además, en un 77% de los pacientes se consiguió reducir el tamaño esplénico. Clínicamente, todos los síntomas relacionados con la liberación de mediadores mastocitarios mejoraron con el tratamiento, excepto las náuseas y los vómitos, que son los efectos secundarios no hematológicos más frecuentes de la midostaurina. El resto de los efectos secundarios fueron similares a los de otros inhibidores de TK, incluida la toxicidad hematológica, que fue más frecuente en pacientes con citopenias previas. Algo más de la mitad de los pacientes requirió disminuir la dosis inicial de midostaurina, principalmente por efectos adversos del fármaco, aunque una tercera parte logró retomar la dosis de inicio tras la reducción de dosis. La supervivencia global de los pacientes a 2 años fue del 86% para MSA, del 49% para MS-ANH y del 26% para LM, siendo la mediana de supervivencia de los pacientes respondedores el triple que la de los no respondedores (44,4 vs. 15,4 meses; $p = 0,0054$). Aunque no hay estudios aleatorizados en mastocitosis, la comparación de la tasa de supervivencia global de los pacientes incluidos en el ensayo clínico con la de una cohorte histórica de control del registro de la Universidad de Mannheim pone de manifiesto que los pacientes tratados con midostaurina podrían tener hasta el doble de supervivencia (mediana de supervivencia de 41,4 vs. 19,5 meses, respectivamente)⁽³⁷⁾. Los factores de mayor relevancia asociados a una tasa de respuesta significativamente mejor en pacientes tratados con midostaurina incluyen

la ausencia de mutaciones en los genes *SRSF2*, *ASXL1* y *RUNX1*, y la disminución de $\geq 25\%$ de carga alélica de la mutación D816V de *KIT* en sangre a los 6 meses⁽³⁸⁾. Estudios más recientes han demostrado que el tratamiento a largo plazo con midostaurina puede conseguir remisiones completas tardías en algunos pacientes⁽³⁹⁾ y que el fármaco es capaz de mejorar significativamente la calidad de vida de los pacientes⁽⁴⁰⁾.

Finalmente, un inhibidor selectivo de *KIT* desarrollado recientemente, el avapritinib, ha demostrado, en un ensayo clínico fase I en el que se han evaluado 39 pacientes con MS avanzada, una tasa de respuesta global del 77% con un 23% de remisiones completas con una toxicidad manejable incluyendo una baja frecuencia de efectos secundarios gastrointestinales⁽⁴¹⁾. El fármaco es capaz de hacer desaparecer los agregados de mastocitos en MO en el 79% de los pacientes y de hacer indetectable la mutación D816V de *KIT* en un 33% de los casos, lo cual se asocia a una mediana de supervivencia a los 2 años del 100% en MSA, del 70% en MS-ANH y del 88% en LM⁽⁴¹⁾. Estos hallazgos sitúan al avapritinib como un fármaco prometedor para el tratamiento de la MS avanzada, en espera de los resultados del ensayo clínico fase II que se está desarrollando actualmente en diversos centros de Europa y los Estados Unidos.

► Conclusiones

A modo de resumen, aunque el tratamiento citorreductor de la MS avanzada debe evaluarse de forma individualizada teniendo en cuenta diferentes aspectos clínico-biológicos de la enfermedad, es posible concluir que:

1) El tratamiento con imatinib debería restringirse a pacientes con MS asociada a mutaciones entre los exones 8 y 10 de *KIT* o con *KIT* silvestre.

2) En pacientes con MS avanzada con la mutación D816V de *KIT* los fármacos más eficaces actualmente en términos de respuesta objetiva y de supervivencia son la midostaurina y el avapritinib, este último solo disponible en ensayos clínicos.

3) El TPH debe plantearse fundamentalmente en MS-ANH, cuando el TPH estuviera indicado para la hemopatía asociada, e idealmente debería usarse un régimen de acondicionamiento mieloablativo siempre que fuera posible.

4) Gemtuzumab ozogamicina podría ser una alternativa potencialmente eficaz en cualquiera de los subtipos

de MS avanzada, dado que todos los mastocitos (normales y clonales) expresan de forma sistemática CD33.

► Bibliografía

- Horny HP, Akin C, Arber DA, Peterson LC, Tefferi A, Metcalfe DD, et al. Mastocytosis. In: WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC; 2017. pp. 61-9.
- García-Montero AC, Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sánchez ML, Núñez R, Prados A, et al. KIT mutation in mast cells and other bone marrow haematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders. A prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood*. 2006;108(7):2366-72.
- Kristensen T, Vestergaard H, Moller MB. Improved detection of the KIT D816V mutation in patients with systemic mastocytosis using a quantitative and highly sensitive real-time qPCR assay. *J Mol Diagn*. 2011;13(2):180-8.
- Sánchez-Muñoz L, Álvarez-Twose I, García-Montero AC, Teodosio C, Jara-Acevedo M, Pedreira CE, et al. Evaluation of the WHO criteria for the classification of patients with mastocytosis. *Mod Pathol*. 2011;24(9):1157-68.
- Escribano L, Álvarez-Twose I, Sánchez-Muñoz L, García-Montero A, Núñez R, Almeida J, et al. Prognosis in adult indolent systemic mastocytosis: a long-term study of the Spanish Network on Mastocytosis in a series of 145 patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(3):514-21.
- Álvarez-Twose I, González de Olano D, Sánchez-Muñoz L, Matito A, Esteban-López MI, Vega A, et al. Clinical, biological, and molecular characteristics of clonal mast cell disorders presenting with systemic mast cell activation symptoms. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(6):1269-78.e2.
- Jawhar M, Schwaab J, Schnittger S, Meggendorfer M, Pfirrmann M, Sotlar K, et al. Additional mutations in *SRSF2*, *ASXL1* and/or *RUNX1* identify a high-risk group of patients with KIT D816V(+) advanced systemic mastocytosis. *Leukemia*. 2016;30(1):136-43.
- Muñoz-González JI, Jara-Acevedo M, Álvarez-Twose I, Merker JD, Teodosio C, Hou Y, et al. Impact of somatic and germline mutations on the outcome of systemic mastocytosis. *Blood Adv*. 2018;2(21):2814-28.
- Sperr WR, Kundi M, Álvarez-Twose I, van Anrooij B, Oude Elberink JNG, Gorska A, et al. International prognostic scoring system for mastocytosis (IPSM): a retrospective cohort study. *Lancet Haematol*. 2019;6(12):e638-49.
- Muñoz-González JI, Álvarez-Twose I, Jara-Acevedo M, Zanotti R, Perkins C, Jawhar M, et al. Comparison between the REMA, IPSM, MAPS, CRS and MARS risk-stratification scores for systemic mastocytosis: Toward a global prognostic score (GPSM). *Lancet Haematol*. 2020. In press.
- Barete S, Lortholary O, Damaj G, Hirsch I, Chandresris MO, Elie C, et al. Long-term efficacy and safety of cladribine (2-CdA) in adult patients with mastocytosis. *Blood*. 2015;126(8):1009-16.
- Hauswirth AW, Simoniitsch-Klupp I, Uffmann M, Koller E, Sperr WR, Lechner K, et al. Response to therapy with interferon alpha-2b and prednisolone in aggressive systemic mastocytosis: report of five cases and review of the literature. *Leuk Res*. 2004;28(3):249-57.

13. Escribano L, Pérez de Oteyza J, Núñez R, Orfao A. Cladribine induces immunophenotypical changes in bone marrow mast cells from mastocytosis. Report of a case of mastocytosis associated with a lymphoplasmacytic lymphoma. *Leuk Res.* 2002;26(11):1043-6.
14. Dasilva-Freire N, Mayado A, Teodosio C, Jara-Acevedo M, Álvarez-Twose I, Matito A, et al. Bone Marrow Mast Cell Antibody-Targetable Cell Surface Protein Expression Profiles in Systemic Mastocytosis. *Int J Mol Sci.* 2019;20(3):552.
15. Quintás-Cardama A, Amin HM, Kantarjian H, Verstovsek S. Treatment of aggressive systemic mastocytosis with daclizumab. *Leuk Lymphoma.* 2010;51(3):540-2.
16. Gotlib J, Baird JH, George TI, Langford C, Reyes I, Abuel J, et al. A phase 2 study of brentuximab vedotin in patients with CD30-positive advanced systemic mastocytosis. *Blood Adv.* 2019;3(15):2264-71.
17. Jeong D, Fauman K, Ross C, Akin C, Mody R. Successful treatment of systemic mastocytosis associated with AML-M2, t(8:21) in a child using MRC-based AML chemotherapy along with gemtuzumab. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;119 (Suppl. 1):S207.
18. Álvarez-Twose I, Martínez-Barranco P, Gotlib J, García-Montero A, Morgado JM, Jara-Acevedo M, et al. Complete response to gemtuzumab ozogamicin in a patient with refractory mast cell leukemia. *Leukemia.* 2016;30(8):1753-6.
19. Carter MC, Robyn JA, Bressler PB, Walker JC, Shapiro GG, Metcalfe DD. Omalizumab for the treatment of unprovoked anaphylaxis in patients with systemic mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;119(6):1550-1.
20. Douglass JA, Carroll K, Voskamp A, Bourke P, Wei A, O'Hehir RE. Omalizumab is effective in treating systemic mastocytosis in a nonatopic patient. *Allergy.* 2010;65(7):926-7.
21. Ustun C, Reiter A, Scott BL, Nakamura R, Damaj G, Kreil S, et al. Hematopoietic stem-cell transplantation for advanced systemic mastocytosis. *J Clin Oncol.* 2014;32(29):3264-74.
22. Galli SJ, Tsai M, Wershil BK, Tam SY, Costa JJ. Regulation of mouse and human mast cell development, survival and function by stem cell factor, the ligand for the c-kit receptor. *Int Arch Allergy Immunol.* 1995;107(1-3):51-3.
23. Orfao A, García-Montero AC, Sánchez L, Escribano L, REMA. Recent advances in the understanding of mastocytosis: the role of KIT mutations. *Br J Haematol.* 2007;138(1):12-30.
24. Arock M, Sotlar K, Akin C, Broesby-Olsen S, Hoermann G, Escribano L, et al. KIT mutation analysis in mast cell neoplasms: recommendations of the European competence network on mastocytosis. *Leukemia.* 2015;29(6):1223-32.
25. Bibi S, Langenfeld J, Jeanningros S, Brenet F, Soucie E, Hermine O, et al. Molecular defects in mastocytosis: KIT and beyond KIT. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2014;34(2):239-62.
26. Akin C, Brockow K, D'Ambrosio C, Kirshenbaum AS, Ma Y, Longley BJ, et al. Effects of tyrosine kinase inhibitor STI571 on human mast cells bearing wild-type or mutated c-kit. *Exp Hematol.* 2003;31(8):686-92.
27. Álvarez-Twose I, González P, Morgado JM, Jara-Acevedo M, Sánchez-Muñoz L, Matito A, et al. Complete response after imatinib mesylate therapy in a patient with well-differentiated systemic mastocytosis. *J Clin Oncol.* 2012;30(12):e126-9.
28. Álvarez-Twose I, Matito A, Morgado JM, Sánchez-Muñoz L, Jara-Acevedo M, García-Montero A, et al. Imatinib in systemic mastocytosis: a phase IV clinical trial in patients lacking exon 17 KIT mutations and review of the literature. *Oncotarget.* 2017;8(40):68950-63.
29. Hartmann K, Wardelmann E, Ma Y, Merkelbach-Bruse S, Preussner LM, Woolery C, et al. Novel germline mutation of KIT associated with familial gastrointestinal stromal tumors and mastocytosis. *Gastroenterology.* 2005;129(3):1042-6.
30. De Melo Campos P, Machado-Neto JA, Scopim-Ribeiro R, Visconte V, Tabarrok A, Duarte ASS, et al. Familial systemic mastocytosis with germline KIT K509I mutation is sensitive to treatment with imatinib, dasatinib and PKC412. *Leuk Res.* 2014;38(10):1245-51.
31. Akin C, Fumo G, Yavuz AS, Lipsky PE, Neckers L, Metcalfe DD. A novel form of mastocytosis associated with a transmembrane c-kit mutation and response to imatinib. *Blood.* 2004;103(8):3222-5.
32. Frost MJ, Ferrao PT, Hughes TP, Ashman LK. Juxtamembrane mutant V560G-KIT is more sensitive to Imatinib (STI571) compared with wild-type c-kit whereas the kinase domain mutant D816VKIT is resistant. *Mol Cancer Ther.* 2002;1(12):1115-24.
33. Pardanani A, Ketterling RP, Brockman SR, Flynn HC, Paternoster SF, Shearer BM, et al. CHIC2 deletion, a surrogate for FIP1L1-PDGFR fusion, occurs in systemic mastocytosis associated with eosinophilia and predicts response to imatinib mesylate therapy. *Blood.* 2003;102(9):3093-6.
34. Verstovsek S, Tefferi A, Cortes J, O'Brien S, García-Manero G, Pardanani A, et al. Phase II study of dasatinib in Philadelphia chromosome-negative acute and chronic myeloid diseases, including systemic mastocytosis. *Clin Cancer Res.* 2008;14(12):3906-15.
35. Hochhaus A, Baccarani M, Giles FJ, le Coutre PD, Müller MC, Reiter A, et al. Nilotinib in patients with systemic mastocytosis: analysis of the phase 2, open-label, single-arm nilotinib registration study. *J Cancer Res.* 2015;141(11):2047-60.
36. Gotlib J, Kluijn-Nelemans HC, George TI, Akin C, Sotlar K, Hermine O, et al. Efficacy and Safety of Midostaurin in Advanced Systemic Mastocytosis. *N Engl J Med.* 2016;374(26):2530-41.
37. Reiter A, Kluijn-Nelemans H, George T, Akin C, DeAngelo D, Hermine O, et al. Pooled Survival Analysis Of Midostaurin Clinical Study Data (D2201+A2213) In Patients With Advanced Systemic Mastocytosis Compared With Historical Controls. *Haematologica.* 2017;S788.
38. Jawhar M, Schwaab J, Naumann N, Horny HP, Sotlar K, Haferlach T, et al. Response and progression on midostaurin in advanced systemic mastocytosis: KIT D816V and other molecular markers. *Blood.* 2017;130(2):137-45.
39. DeAngelo DJ, George TI, Linder A, Langford C, Perkins C, Ma J, et al. Efficacy and safety of midostaurin in patients with advanced systemic mastocytosis: 10-year median follow-up of a phase II trial. *Leukemia.* 2018;32(2):470-8.
40. Hartmann K, Gotlib J, Akin C, Hermine O, Awan FT, Hexner E, et al. Midostaurin improves quality of life and mediator-related symptoms in advanced systemic mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol.* 2020;146(2):356-66.e4.
41. Radia D. Avapritinib, a potent and selective inhibitor of KIT D816V, induces complete and durable responses in patients with advanced systemic mastocytosis (ADVSM). In Amsterdam, The Netherlands; 2019.

NOVEDADES EN PIRUVATO KINASA. CONTROVERSIAS EN HEMOGLOBINOPATÍA S HETEROCIGOTA

Coordinadores

Dr. David Beneitez Pastor. Hospital Universitario Vall d'Hebron. Barcelona

Dra. Silvia de la Iglesia Íñigo. Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín.

Las Palmas de Gran Canaria

El Dr. Ataúlfo Fernández González y la Dra. Celina Benavente, del Hospital Clínico San Carlos de Madrid, han realizado una revisión actualizada sobre el rasgo falciforme y su posible implicación en la salud. La Hb S tiene una alta prevalencia en los países del África subsahariana, la península arábiga y en la India, al igual que en la población originaria de dichas zonas geográficas, por lo cual actualmente es muy frecuente encontrar individuos portadores en nuestro país. Los programas de cribado neonatal puestos en marcha en muchos países europeos, incluido España, consiguen la identificación temprana de la enfermedad de células falciformes, al igual que la detección de portadores a los que se debe informar de su condición y ofrecer consejo genético. Es por ello que es importante identificar si los sujetos heterocigotos, normalmente asintomáticos, presentan mayor incidencia de algún tipo de patología que precisase algún tipo de seguimiento o la adopción de medidas profilácticas. Con este fin se han realizado varios estudios que se analizan en esta ponencia sobre si existe un riesgo aumentado en los portadores de complicaciones renales y urológicas, fenómenos vasooclusivos, infarto esplénico, trombosis venosa profunda (TVP), tromboembolismo pulmonar (TEP), enfermedad vascular arterial, lesión relacionada con el ejercicio como rhabdomiolisis y muerte súbita, complicaciones quirúrgicas, postraumáticas, pediátricas y gestacionales.

Por otro lado, la Dra. Marta Morado Arias, del Hospital Universitario La Paz-IdiPaz de Madrid, y el Dr. Eduardo Salido Fierrez, del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca-IMIB de Murcia, nos presentan las novedades en el déficit de piruvato cinasa. La Dra. Morado nos hace una revisión en relación con los "Avances en el diagnóstico y el manejo clínico del déficit de piruvato cinasa" y el Dr. Salido se centra en "Nuevos aspectos terapéuticos en la enfermedad por déficit de piruvato cinasa".

Según nos explica la Dra. Morado, el déficit de piruvato cinasa (DPK) es la causa más frecuente de anemia hemolítica crónica no esferocítica y es debida a una alteración enzimática de la vía de la glicolisis. Es una enfermedad con poca prevalencia, pero existe una discrepancia entre la prevalencia calculada y la real que se debe en gran parte a la dificultad en el diagnóstico y a la falta de registros de esta enfermedad. En los últimos años se han producido avances en el conocimiento de la enfermedad, especialmente en el diagnóstico, en el manejo clínico y en aspectos terapéuticos. Respecto al diagnóstico, suele ser complejo, ya que los estudios enzimáticos y genéticos tienen ambas limitaciones. Realiza una revisión del procedimiento diagnóstico del DPK haciendo hincapié en los aspectos de estudios enzimáticos y moleculares, cómo interpretarlos, presenta datos de estudios moleculares de población afectada y habla de la correlación genotipo-fenotipo. Respecto al manejo clínico, comenta la amplia presentación clínica que pueden presentar estos pacientes, desde casos que pueden pasar desapercibidos a casos de *hydrops fetalis*, repasando las manifestaciones más frecuentes, así como las complicaciones más frecuentes, entre las que destaca la sobrecarga férrica, y aborda su correcto manejo terapéutico y de seguimiento.

NOVEDADES EN PIRUVATO KINASA. CONTROVERSIAS EN HEMOGLOBINOPATÍA S HETEROCIGOTA

El Dr. Salido, por su parte, introduce las novedades terapéuticas de la enfermedad por DPK. En este sentido, comenta que el tratamiento se basa en medidas de soporte no curativas dirigidas a mejorar la anemia y prevenir las complicaciones que presentan estos pacientes, entre las que destacan los suplementos de ácido fólico, la transfusión individualizada y el papel de la esplenectomía. En los últimos años se están desarrollando ensayos clínicos que nos pueden hacer cambiar la perspectiva de tratamiento en estos pacientes en un futuro cercano. Realiza una revisión de los ensayos clínicos que utilizan moléculas activadoras de la glucolisis y también en la terapia génica. Hasta hoy, el DPK no tiene tratamiento curativo a excepción de escasos casos sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (TPH) de donante HLA-idéntico y sin un tratamiento farmacológico aprobado para la enfermedad.

Respecto a los activadores de la PK (AG48, mitapivat), hace una revisión del inicio del desarrollo del fármaco y del desarrollo de los ensayos clínicos desde la fase I hasta la actual fase III, en especial analizando los resultados del ensayo de fase II *DRIVE* publicados en septiembre de 2019 donde se incluían 52 pacientes sin dependencia transfusional. Hace una revisión de la eficacia y del perfil de seguridad del fármaco, que a raíz de esa publicación recibió designación de medicamento huérfano por la European Medicines Agency (EMA), estando actualmente en marcha los ensayos en fase III para pacientes dependientes y no dependientes de transfusión.

Respecto a la terapia génica, el hecho de que se trate de una enfermedad monogénica y en la que se ha mostrado potencial curativo con el TPH hace que sea un escenario ideal para este tipo de terapias. En este sentido, nos cuenta que la terapia con vector lentiviral se encuentra en fases más avanzadas, habiendo recibido la aprobación de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) para el primer ensayo clínico fase I de terapia génica para el DPK utilizando células progenitoras autólogas transducidas con un vector lentiviral con el gen PK modificado.

Tanto los activadores de la glucolisis como la terapia génica son tratamientos emergentes y, en caso de estar clínicamente disponibles, el enfoque terapéutico de estos pacientes cambiará, concluye el Dr. Salido.

Avances en el diagnóstico y el manejo clínico del déficit de piruvato cinasa

Marta Morado Arias

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

► Introducción

El déficit de piruvato cinasa (DPK) es la causa más frecuente de anemia hemolítica crónica no esferocítica por alteración enzimática de la vía de la glicolisis. Esta enzima es la responsable de la transformación del fosfoenolpiruvato a piruvato, reacción que produce el 50% de la cantidad de ATP del hematíe. El DPK reduce la cantidad de ATP del hematíe, lo que afecta a la vida media eritrocitaria, ya que en ausencia de mitocondrias depende de la glicolisis para sobrevivir. La depleción de ATP produce depleción de potasio y deshidratación, rigidez y hemólisis en el bazo (que aumenta en situaciones de estrés), produciendo la destrucción celular especialmente en los hematíes más jóvenes, más dependientes de ATP. El acúmulo de 2,3-BPG desplaza la curva de disociación de la hemoglobina (Hb) a la derecha, mejorando la distribución del oxígeno a los tejidos, haciendo que la anemia sea bien tolerada.

La PK humana esta codificada por 2 genes (*PK-LR* en 1q21 y *PK-M* en 15q22) que codifican para 4 isoenzimas. El subtipo eritrocitario (isoenzima PK-R) está codificado por el gen *PK-LR* (que codifica también la enzima hepática) de 9,5 kb y 12 exones (10 comunes a ambas isoenzimas) y que da lugar a la proteína PK-R de 2.060 pd y 574 aa. La proteína funcional es un tetrámero (L'4 o L'2 L2) de 240 kDa con 4 subunidades, cada una de ellas con 4 dominios (N terminal, dominio A, dominio B y extremo C terminal).

El DPK se hereda de forma autosómica recesiva, calculándose una prevalencia de 51 casos por millón de habitantes, aunque la prevalencia comunicada en Europa es de 3,3 casos por millón, considerablemente menor. La discrepancia entre la prevalencia calculada y la real se debe básicamente a la dificultad del diagnóstico y a la falta de registros fiables que recojan de forma completa los pacientes diagnosticados

de DPK. Actualmente, está en marcha un registro observacional internacional (PEAK Registry AG348-C-008, NCT03481738) que incluye datos epidemiológicos y clínicos de los casos diagnosticados a nivel internacional.

En los últimos años se están produciendo nuevos avances en el conocimiento del DPK, especialmente en 3 aspectos: diagnóstico, manejo clínico y opciones terapéuticas. A continuación, se comentan los aspectos clínicos y de diagnóstico.

► Diagnóstico: situación actual y avances

El diagnóstico se debe sospechar en casos de anemia hemolítica crónica congénita, haciendo el diagnóstico diferencial con el resto de las enzimopatías, membranopatías y hemoglobinopatías, así como con otras causas de anemia congénita de origen central con componente hemolítico, en especial las anemias diseritropoyéticas congénitas (ADC). Generalmente, es un diagnóstico complejo, ya que los estudios enzimáticos y genéticos tienen ambos sus limitaciones. El diagnóstico de DPK se debe basar en:

- **Frotis:** la presencia de equinocitos contraídos e hiperdensos es altamente sugestiva de DPK, pero hay que tener en cuenta que pueden observarse en otras patologías y en artefactos. Estos equinocitos aparecen en el 15% de los pacientes y su porcentaje es menor del 30%. Lo más habitual es que el frotis muestre anisocitosis y policromasia, siendo los equinocitos más evidentes tras esplenectomía.

- **Pruebas complementarias** que sirven para identificar otras anemias hemolíticas congénitas, más que para el diagnóstico de DPK. Las membranopatías pueden descartarse con pruebas como la resistencia osmótica (fragilidad disminuida en el 25% de los DPK), la 5-EMA y los estudios de permeabilidad iónica;

las enzimopatías se descartan con cuantificación de HbA2 y F, y electroforesis; el déficit de GP6DH se puede descartar por la clínica y por la cuantificación de la enzima. Para descartar otras enzimopatías (por ejemplo, déficit de glucosa fosfato isomerasa -GPI-) u otras patologías congénitas (banda 3, ADC, etc.) es necesario recurrir a estudios enzimáticos y/o moleculares. La ectacitometría de gradiente osmótico (*osmoscan*) es una técnica poco accesible pero de gran utilidad para el estudio de la patología eritrocitaria, ya que permite ver de forma simultánea la fragilidad osmótica, la deformabilidad y el grado de hidratación celular. Los pacientes con DPK presentan un incremento de la OHyper (osmolaridad en medio hipertónico) que, si bien es común a otras enzimopatías, permite diferenciarlos del déficit de GPI, que presenta una curva de perfil específico.

· **Cuantificación enzimática:** detectar una reducción de la actividad enzimática (< 25%) mediante la cuantificación enzimática de la actividad de la PK ha sido la técnica de elección para el diagnóstico. Se basa en medir la actividad de la enzima a partir de la formación de piruvato, vinculada a la oxidación de NADH, que produce un descenso de la densidad óptica medida a 340 nm. Esta técnica es laboriosa y la variación de los rangos de normalidad entre los distintos laboratorios es muy amplia. Además, presenta una alta tasa de falsos negativos debida a la contaminación con leucocitos, la presencia de reticulocitosis intensa, la interferencia con trasfusión, la persistencia de la isoenzima PK-M2 embrionaria y la cinética falsamente normal *in vitro* de algunas variantes. Los falsos positivos se deben a una incorrecta conservación de la muestra, déficit de otras enzimas y portadores de variantes de PK. Al ser la PK una enzima dependiente de la edad del hematíe, es preciso no solo la cuantificación de la actividad enzimática, sino su normalización respecto a la actividad de otras enzimas también dependientes de la edad, como la hexocinasa o la G6PDH. Por ello, las técnicas de cuantificación de PK aislada pueden no ser adecuadas.

· **Estudio molecular:** tradicionalmente, la detección de las variantes génicas se ha utilizado para confirmar los casos con cuantificación enzimática disminuida. Históricamente, el estudio genético se ha realizado por secuenciación de Sanger, pero se ha ido sustituyendo paulatinamente por técnicas de secuenciación masiva (NGS), que permiten el estudio simultáneo de uno o varios genes completos en varios pacientes a la vez.

Las dificultades del estudio enzimático y la mayor accesibilidad a los estudios genéticos han hecho que los estudios moleculares sean cada vez más utilizados. Su ventaja respecto al estudio enzimático radica en la facilidad del manejo y el envío de muestras, la no interferencia con transfusiones, la correcta identificación de enfermos homocigotos frente a portadores heterocigotos (pueden ser indistinguibles por técnicas enzimáticas), así como facilitar el asesoramiento genético y/o el diagnóstico prenatal.

Están descritas más de 300 variantes del gen *PK-LR*, la mayoría de ellas de sentido equivocado (*missense* -M-). Las más frecuentes son 1529G>A (R510Q) en los EE. UU. (42%) y el centro-norte de Europa (41%), 1456C>T (R486W) en el sur de Europa (32% España, 35% Portugal y 29% Italia) y 1468C>T en Asia, 1436G>A en población *amish*. Un estudio reciente ha demostrado la alta prevalencia de las variantes 721G>T (E241X) (26%) y 1456C>T (R486W) (13,33%) en España.

El estudio genético resulta imprescindible para confirmar el diagnóstico dadas las limitaciones del estudio enzimático y para predecir el fenotipo y la respuesta a determinados tratamientos farmacológicos. La correlación genotipo-fenotipo está descrita en el *Estudio sobre la historia natural del DPK* publicado recientemente. Las formas más graves se deben a mutaciones sin sentido (*no missense* -NM-) de tipo codón de parada, mutación en zona de *splicing*, cambio del marco de lectura o deleciones que dan lugar a una gran pérdida proteica. Aquellos pacientes con 2 mutaciones NM se diagnostican a edades más tempranas y presentan menor Hb, mayor tasa de esplenectomía, mayores requerimientos transfusionales y sobrecarga férrica, así como una ausencia de respuesta a Mitapivat.

› Clínica: avances en el conocimiento y el manejo

El DPK produce anemia hemolítica congénita y crónica, con episodios de exacerbación en situaciones de fiebre, infección, embarazo o intervención quirúrgica. La intensidad tanto de la anemia como de la hemólisis es muy variable, desde formas asintomáticas o leves sin anemia (lo que dificulta su identificación), hasta formas graves con *hydrops fetalis* y/o intensa anemia. En general, los valores de Hb varían de 65 a 110 g/L y se incrementan 15 g/L tras esplenectomía. El incremento de 2,3-BPG hace que la anemia sea bien

tolerada. Los reticulocitos están aumentados, pero no son proporcionales al grado de anemia. Es más, como los reticulocitos son preferentemente secuestrados por el bazo y tras la esplenectomía, se produce un típico incremento paradójico de reticulocitos.

Debido a que la clínica es muy variable, numerosos casos pasan desapercibidos o se confunden con otras patologías eritrocitarias, especialmente en los casos más leves, que pueden llegar a diagnosticarse en la edad adulta. También pueden quedar sin diagnosticar los casos en los que se produce muerte fetal intraútero o perinatal. Lo normal es que produzcan clínica desde la edad pediátrica, siendo frecuente la presencia de anemia con hiperbilirrubinemia posnatal, que precisa exanguinotransfusión o fototerapia. Durante la infancia y la adolescencia los pacientes pueden presentar anemia dependiente de transfusión, pero esta tiende a mejorar en la edad adulta, incluso puede desaparecer (hemólisis compensada).

La principal complicación es la sobrecarga férrica, causa de morbilidad a largo plazo, que se detecta en el 47% de los pacientes de forma global y que precisa de quelación en prácticamente todos ellos. Se detecta en todos los pacientes regularmente transfundidos, pero también en un porcentaje variable pero significativo de los no transfundidos (29-52%). En este último caso se debe a la presencia de eritropoyesis ineficaz, que estimula HIF, EPO, ERFE y GDF15 e inhibe a la hepcidina, lo que aumenta la absorción intestinal de hierro. Pacientes con DPK presentan niveles de hepcidina 13 veces menores que los controles y un aumento significativo de GDF-15. Los datos del *Estudio sobre la historia natural del DPK* han demostrado sobrecarga férrica medida por valores de ferritina > 1.000 ng/mL en el 38% de los pacientes no transfundidos regularmente, que asciende al 82% si se utiliza resonancia magnética (RM) hepática (concentración de hierro en el hígado -LIC- > 3 mg Fe/g de peso seco) para su diagnóstico. La sobrecarga es mayor en pacientes de más edad, menor Hb y esplenectomizados, así como en aquellos con genotipo NM/NM. La asociación con otras anemias o hemocromatosis congénita puede agravar el cuadro. No existen guías específicas de manejo de la sobrecarga férrica en pacientes con DPK, por lo que se tiende a utilizar las recomendaciones de tratamiento de los pacientes talasémicos. En

pacientes no transfundidos de forma sistemática, la medición de la ferritina puede infraestimar la sobrecarga de hierro de forma similar a lo que ocurre en la talasemia intermedia, por lo que se recomienda utilizar la RM para el seguimiento cuando la ferritina sea mayor de 500 ng/dL. El objetivo es mantener una ferritina menor de 1.000 µg/L y el hierro hepático menor o igual a 3 mg/g, con una T2* cardiaca mayor o igual a 20 ms. Ya que muchos de estos pacientes no toleran las flebotomías por su anemia, es preciso realizar la quelación con fármacos.

El resto de las complicaciones son similares a las detectadas en otros pacientes con anemias hemolíticas crónicas. La colelitiasis, a diferencia de los pacientes con esferocitosis hereditaria, en el DPK aparece también en esplenectomizados. Están descritos casos de pancreatitis por litiasis biliar. Otras complicaciones infrecuentes son el desarrollo de masas de hematopoyesis extramedular, úlceras maleolares, fracturas óseas, hipertensión pulmonar, crisis de aplasia medular por parvovirus B19 y trombosis, especialmente en pacientes esplenectomizados.

► Bibliografía recomendada

- Bianchi P, Fermo E, Glader B, Kanno H, Agarwal A, Barcellini W, et al. Addressing the diagnostic gaps in pyruvate kinase (PK) deficiency: consensus recommendations on the diagnosis of PK deficiency. *Am J Hematol*. 2019;94:149-61.
- Bianchi P, Fermo E, Lezon-Geyda K, van Beers EJ, Morton HD, Barcellini W, et al. Genotype-Phenotype Correlation and Molecular Heterogeneity in Pyruvate Kinase Deficiency. *Am J Hematol*. 2020;95(5):472-82.
- Grace RF, Bianchi P, Van Beers EJ, Eber SW, Glader B, Yaish HM, et al. Clinical spectrum of pyruvate kinase deficiency data from the pyruvate kinase deficiency natural history study. *Blood*. 2018;131:2183-92.
- Grace RF, Layton DM, Barcellini W. How we manage patients with pyruvate kinase deficiency. *Br J Haematol*. 2019;184:721-34.
- Van Beers EJ, van Straaten S, Morton DH, Barcellini W, Eber SW, Glader B, et al. Prevalence and management of iron overload in pyruvate kinase deficiency: report from pyruvate kinase deficiency natural history study. *Haematologica*. 2019;104:e51-e53.
- Zanella A, Fermo E, Bianchi P, Valentini G. Red cell pyruvate kinase deficiency: molecular and clinical aspects. *Br J Haematol*. 2005;130:11-25.
- Zanella A, Fermo E, Bianchi P, Chiarelli LR, Valentini G. Pyruvate kinase deficiency. The genotype-phenotype association. *Blood Rev*. 2007;21:217-21.

Nuevos aspectos terapéuticos en la enfermedad por déficit de piruvato cinasa

Eduardo J. Salido Fierrez, Antonio J. Martínez Mellado, Elena Fernández Poveda, Valentín Cabañas Perianes

Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca. Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB). Murcia

› Introducción

El tratamiento de los pacientes con déficit de piruvato cinasa (PK) se basa en medidas de soporte no curativas dirigidas a mejorar la anemia y prevenir las complicaciones. Estas medidas incluyen suplementos con ácido fólico, transfusión individualizada de concentrados de hematíes, esplenectomía en aquellos pacientes que reciben transfusiones regulares, tienen anemia severa o esplenomegalia masiva, y otras medidas encaminadas al control de las complicaciones derivadas de la hemólisis crónica, como la sobrecarga férrica, que a menudo requieren un manejo multidisciplinar^(1,2).

Sin embargo, en los últimos años se están desarrollando ensayos clínicos que nos están haciendo cambiar algunas perspectivas de la enfermedad, como el conocimiento de su historia natural, cómo debe ser el enfoque diagnóstico y probablemente el manejo terapéutico en un futuro cercano.

En esta ponencia analizaremos los aspectos más novedosos de los ensayos clínicos recientes que se centran en el desarrollo farmacológico con moléculas activadoras de la glucolisis y en la terapia génica.

El déficit de PK hoy en día es una enfermedad sin tratamiento curativo, a excepción los apenas 20 casos anecdóticos sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos con donante HLA-idéntico publicados en la literatura⁽³⁾, y sin un tratamiento farmacológico aprobado para esta enfermedad.

A diferencia de los tratamientos clásicos, las terapias actualmente en desarrollo clínico tienen el potencial de modificar la expresión y la actividad enzimática de la enzima PK, prolongar la vida útil de los hematíes y disminuir la hemólisis y sus consecuencias. Estos tratamientos son de 2 tipos: moléculas activadoras de la glucolisis y terapia génica.

› Tratamientos farmacológicos. Activadores de la piruvato cinasa (AG348, mitapivat)

En los mamíferos existen 2 genes de PK, el gen PKM que controla la expresión de la PK muscular y el gen PKLR (Cr 1q21) que controla la expresión de las isoformas hepática y de los hematíes. La pérdida de función del gen PKLR afecta fundamentalmente a la función de los hematíes, los cuales dependen casi exclusivamente de la glucolisis para la obtención de energía (ATP), aunque la mayoría de las mutaciones asociadas a déficit de PK afectan a ambas isoformas, PK-R y PK-L⁽⁴⁾.

PK-R cataliza la conversión de fosfoenolpiruvato (PEP) en piruvato. Este paso es clave, siendo el paso final e irreversible de la glucolisis, con la formación final de una molécula de ATP (50% del ATP generado en la glucolisis) (Figura 1A). PK-R es una enzima tetramérica (Figura 1B) que existe en un equilibrio entre el estado menos activo (T) y más activo (R), el cual puede ser inducido por fructosa bifosfato (FBP), producto intermedio glucolítico. Sin embargo, este por sí solo es insuficiente para mejorar la actividad PK en pacientes con déficit de PK⁽⁴⁾.

Se han descrito más de 300 mutaciones en el gen PKLR, la mayoría de las cuales consisten en una simple mutación de tipo *missense* en un nucleótido, que alteran la capacidad catalítica de la enzima PK-R afectando a su expresión o estabilidad. La enfermedad tiene un carácter autosómico recesivo, es decir, los pacientes han de ser homocigotos o más frecuentemente heterocigotos para 2 alelos mutados (mtPK-R)⁽⁴⁾.

En la actualidad, no existen fármacos aprobados que actúen directamente sobre la PK-R mutada. En 2017 Kung *et al.*⁽⁵⁾ publicaron los primeros estudios de una molécula llamada AG-348, una quinolona sulfonamida (Figura 1A), que resulta ser un activador alostérico de la enzima PK, induciendo la formación y estabilización del estado activo (R) del tetrámero de PK,

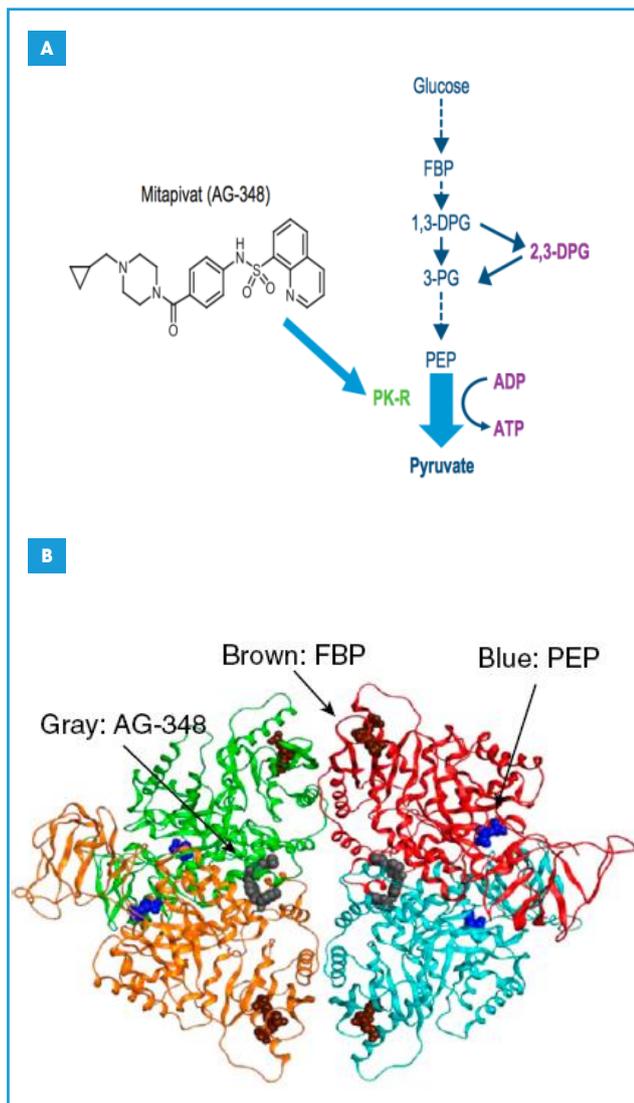


Figura 1. A: esquema simplificado de la glucólisis y paso final con la transformación de fosfoenolpiruvato (PEP) a piruvato; B: estructura del tetrámero de PK-R con los correspondientes sitios de unión de PEP, fructosa bifosfato (FBP) y AG-348. Tomado de Kung *et al.*⁽⁴⁾.

mejorando la actividad enzimática tanto de la forma nativa como de muchas de sus variantes patogénicas.

Inicialmente, AG-348 fue descrita como una molécula perteneciente a la familia de activadores de PKM2, la isoforma muscular de PK, uniéndose en un "bolsillo" molecular distinto a la unión de FBP (**Figura 1B**)⁽⁵⁾. Surgió entonces la idea de si también podría activar la enzima PKR de forma análoga. Así, Kung *et al.*⁽⁴⁾ observaron en estudios preclínicos que AG-348 resultó ser un potente activador tanto de la forma nativa (wtPK-R)

como de múltiples formas mutadas (mtPK-R) en ensayos bioquímicos en ratones *in vivo* y en células *ex vivo* de pacientes con déficit de PK. Estos experimentos demuestran que AG-348 puede aumentar la actividad de PK en los hematíes, por encima del umbral alcanzable por FBP, uniéndose a la molécula de PK en un sitio de unión distinto, en la interfase dímero-dímero (**Figura 1B**), mejorando los niveles de ATP, disminuyendo el acúmulo de intermediarios glucolíticos "aguas arriba" y mejorando el flujo glucolítico. La unión de AG-348 induce un cambio conformacional hacia el estado R activo del tetrámero PK-R, incluso en ausencia de cualquier deficiencia de PK. Es más, AG-348 mostró capacidad de activar una amplia variedad de mutantes y, dada la heterogeneidad genética de la enfermedad, podría ser suficiente la activación de un solo alelo para mejorar la actividad enzimática. En estos ensayos, ya se intuyó la posibilidad de que ciertas variantes no respondan al AG-348, como aquellas en las que los niveles de PK-R resultan insuficientes como consecuencia de una pérdida de la expresión del gen o aquellas que alteran la estabilidad de la enzima (por ejemplo, la mutación R479H, detectada en el 20% de la población *amish*)⁽⁴⁾.

A raíz de estos experimentos, posteriormente se desarrollaron ensayos clínicos fase I y II con la finalidad de demostrar la relación entre la activación de mtPK-R por AG-348 y su respuesta fisiológica^(6,7). En individuos voluntarios sanos (ClinicalTrials.gov: NCT02108106 y ClinicalTrials.gov: NCT02149966)⁽⁶⁾, la droga demostró inducción de la actividad PK *in vivo*, aumenta los niveles de ATP de los hematíes y disminuye 2,3-DPG, con un perfil de seguridad tolerable. Los efectos adversos más frecuentes fueron cefalea (16%) y náuseas (14%). Estos resultados apoyaron el desarrollo del ensayo fase II, *DRIVE-PK*, un ensayo multicéntrico de seguridad y eficacia de AG-348 en adultos con deficiencia de PK (ClinicalTrials.gov: NCT02476916)⁽⁷⁾ y un ensayo sobre la historia natural de la enfermedad (ClinicalTrials.gov: NCT02053480)⁽⁸⁾.

Los resultados del ensayo fase II *DRIVE* de AG-348 (a partir de entonces denominado mitapivat, Agios®), fueron publicados en septiembre de 2019⁽⁷⁾. En este ensayo se incluyeron 52 pacientes con déficit de PK sin dependencia transfusional. La aleatorización fue de 1:1 entre recibir mitapivat 50 vs. 300 mg cada 12 horas. La aleatorización fue estratificada teniendo en cuenta el tipo de mutación en PKLR: R510Q vs. r486W vs. R479H vs. otras mutaciones. El objetivo principal del estudio fue

evaluar el perfil de seguridad y los efectos secundarios de mitapivat. Los objetivos secundarios fueron la caracterización farmacocinética y farmacodinámica de mitapivat y evaluar su eficacia clínica en pacientes con déficit de PK, determinada como cambio del nivel de hemoglobina (el criterio de respuesta fue la elevación de > 10 g/L en más del 50% de las determinaciones) y de los marcadores de hemólisis. También se determinaron los niveles basales de PK en los hematíes⁽⁷⁾.

Respecto al perfil de seguridad, AG-348 fue generalmente bien tolerado, con la mayoría de los eventos adversos de grado 1 o 2. Los más comúnmente observados fueron cefalea (44%), insomnio (40%) y náuseas (38%) en ambos grupos, algo más frecuentes en el de 300 mg. Estos efectos adversos son tolerables, suelen aparecer inicialmente y desaparecen con el tiempo. Otros efectos adversos de grado 3 o más fueron hipertrigliceridemia (2%) y osteoporosis (2%). Es importante conocer que se puede producir hemólisis de rebote si se suspende el tratamiento bruscamente⁽⁷⁾.

Es de destacar que AG-348 es un inhibidor leve y reversible de la aromatasas. Por ello, en los ensayos muestran especial atención a los niveles hormonales, observándose cambios en los mismos. En hombres, se observó una disminución de los niveles de testosterona y estradiol, aunque en el rango de la normalidad y reversible con la interrupción del tratamiento, mientras que en mujeres los resultados son más confusos por la variabilidad en el ciclo reproductivo y el uso de contracepción⁽⁷⁾. Esperaremos a los resultados de los ensayos fase III para obtener más información a este respecto.

En cuanto a la eficacia, se observó un incremento de la hemoglobina mayor de 10 g/L en la mitad de los pacientes, con un máximo de 34 g/L (rango: 11-58), incremento observado como término medio en los primeros 10 días. Este incremento se produjo en todos los pacientes con al menos una mutación de tipo *missense* (a excepción de homocigotos R479H). En ninguno de los 10 pacientes con mutación de tipo *no-missense* y en ninguno de los 5 pacientes homocigotos para R479H (mutación de tipo *missense* pero que causa una mutación de *splicing* que afecta gravemente a la estabilidad) se observó este incremento⁽⁷⁾.

Según el criterio de respuesta definido, esta se produjo en 20 (38,5%) de los 52 pacientes. Sin embargo, si eliminamos los pacientes con mutaciones *no-missense* y a los homocigotos R479H, las respuestas se producen en 20 de 37 pacientes (54%)⁽⁷⁾. La respuesta no depende de la dosis (el 80% responde con 50 mg/12 h),

pero parece que podría relacionarse con la actividad enzimática residual (Figura 2B) (aunque podría haber otros factores, ya que se ha observado que pacientes con el mismo nivel residual de PK difieren en la respuesta de la hemoglobina) y, como se ha comentado, con el tipo de mutación, siendo menor la probabilidad y la intensidad de la respuesta en aquellos pacientes que tienen 2 mutaciones de tipo *no-missense* o son homocigotos para R479H (Figura 2A)⁽⁷⁾.

En los pacientes con respuesta, el nivel de hemoglobina se mantuvo durante el resto del periodo central del estudio (24 semanas) y, en aquellos que continuaron con AG-348, en el estudio de extensión durante 3,5 años⁽⁹⁾. Además, los pacientes experimentaron mejoría en los marcadores de hemólisis (disminución del recuento de reticulocitos y bilirrubina indirecta e incremento de haptoglobina) (Figura 3)⁽⁷⁾.

En función de estos resultados, esta molécula fue designada como medicamento huérfano por la European Medicines Agency (EMA) y actualmente están en marcha 2 ensayos fase III con su extensión para pacientes dependientes y no dependientes de transfusión (estudio AG348-C-007-NCT03559699, estudio AG348-C-006-NCT03548220 y estudio AG348-C-011-NCT03853798), respectivamente. Estos ensayos determinarán si este activador oral es un tratamiento efectivo y seguro para pacientes adultos con déficit de PK y el seguimiento a largo plazo determinará si el mejor control de la hemólisis se asocia con una disminución de la incidencia de complicaciones. Debido a su actividad como inhibidor de la aromatasas, los ensayos se han limitados a adultos, aunque se va a iniciar en breve un ensayo pediátrico.

La hipótesis atractiva de que mejorar los niveles de ATP puede alargar la vida del hematíe y el hecho de que la estabilidad de la PK parece reducida en los hematíes en otras anemias hemolíticas congénitas⁽¹⁰⁾ han propiciado el desarrollo de estudios con mitapivat en talasemias⁽¹¹⁾ y xerocitosis hereditaria⁽¹²⁾, o con otros activadores como FT4202 en anemia falciforme⁽¹³⁾.

➤ Terapia génica

El déficit de PK es una enfermedad monogénica en la que se ha demostrado el potencial curativo con el trasplante de progenitores hematopoyéticos. Estas circunstancias hacen que sea un escenario ideal para desarrollar enfoques de terapia génica.

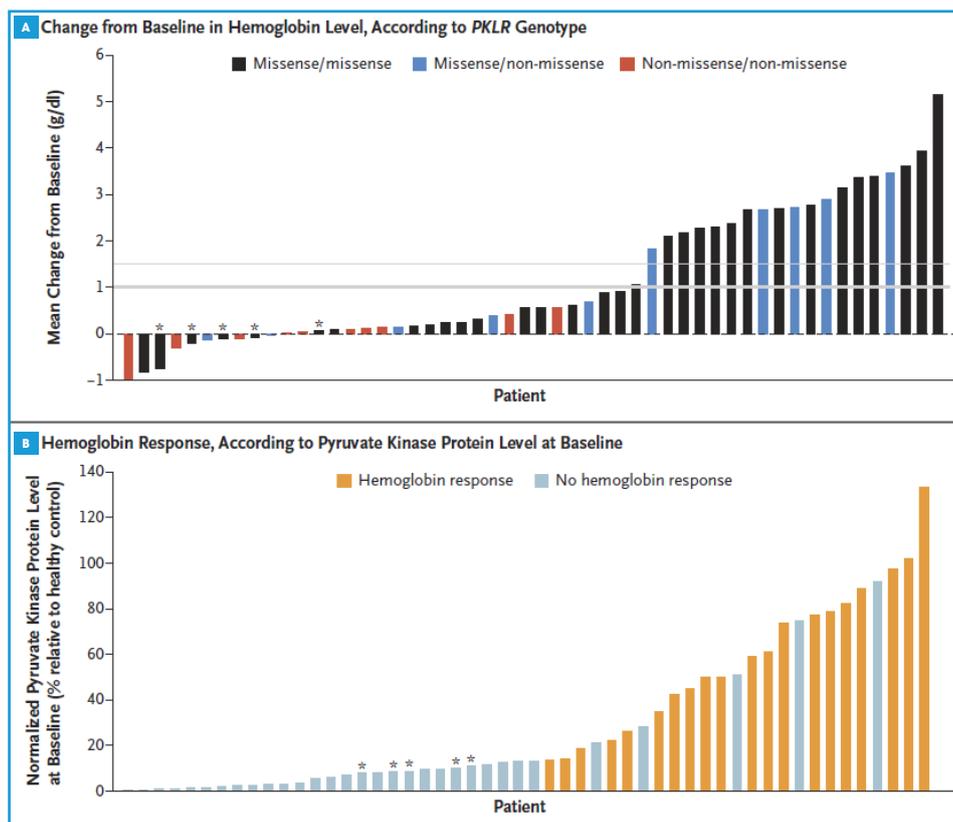


Figura 2. Cambio en los niveles de hemoglobina según el genotipo PKLR (A) y respuesta según el nivel basal de piruvato cinasa (PK) (B). Tomado de Grace *et al.*⁽⁷⁾. La figura A muestra el cambio medio desde el inicio en el nivel de hemoglobina según la categoría de genotipo PKLR del paciente. De los 52 pacientes que recibieron mitapivat, en 20 (38%, de los cuales, todos tuvieron al menos una mutación sin sentido) se produjo un aumento medio de más de 1,0 g/dL en la hemoglobina (línea gruesa gris); 19 pacientes tuvieron un aumento medio de al menos 1,5 g/dL (línea gris delgada). En 5 pacientes homocigotos para la mutación R479H (asterisco) no aumentó el nivel de hemoglobina más de 1,0 g/dL, ni en cualquiera de los 10 pacientes que fueron homocigotos para mutaciones sin sentido (en rojo). La figura B muestra los pacientes que tuvieron una respuesta (definida como un aumento de hemoglobina desde el inicio de > 1,0 g/dL en > 50% de las evaluaciones) y aquellos que no la tuvieron en función del nivel basal de la proteína PK. La respuesta es más probable en los pacientes con un aumento basal de PK.

La viabilidad de la terapia génica en el déficit de PK se ha ensayado en estudios preclínicos en modelos mieloablativos de ratón con déficit de PK utilizando un vector lentiviral (adición génica) que induce la expresión del gen PKLR. En este modelo, el vector terapéutico es transducido a células *stem* hematopoyéticas de ratón y posteriormente trasplantadas, demostrando un aumento de la actividad de la PK y de los niveles de hemoglobina, y una reducción en el recuento de reticulocitos y del tamaño del bazo⁽¹⁴⁻¹⁷⁾. También se han ensayado terapias de edición génica con téc-

nicas de tipo TALEN⁽¹⁸⁾. Tanto en una como en otras, los modelos en animales demuestran que es posible la corrección del fenotipo y de la funcionalidad celular, mejorando el flujo glucolítico de los hematíes sin evidencia de genotoxicidad.

De las 2 técnicas, la terapia con vector lentiviral se encuentra en fases más avanzadas, de forma que recientemente la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) ha aprobado el primer ensayo clínico fase I de terapia génica para el déficit de PK, utilizando células progenitoras autólogas transducidas con un vector lentiviral que lleva el gen de PK optimizado (ClinicalTrials.gov: NCT04105166). Este ensayo trata de evaluar la seguridad de la administración del producto biológico RP-L301 en una cohorte de 2 adultos, seguida de otras 2 con 2 pacientes cada una de entre 12 y 17 años, y 8 y 11 años. Los pacientes deben tener historia transfusional previa y estar esplenectomizados. Como se muestra en la **Figura 4**, los pacientes son movilizados con G-CSF + plerixafor. Posteriormente, se produce la

transducción *in vitro* de las células CD34+ con el vector lentiviral y, finalmente, se infunden al paciente tras recibir un acondicionamiento con busulfán.

➤ Conclusiones

El conocimiento de la enfermedad por déficit de PK está cambiando en los últimos años gracias a una mejor comprensión a nivel molecular y el desarrollo de ensayos clínicos hasta ahora inexistentes.

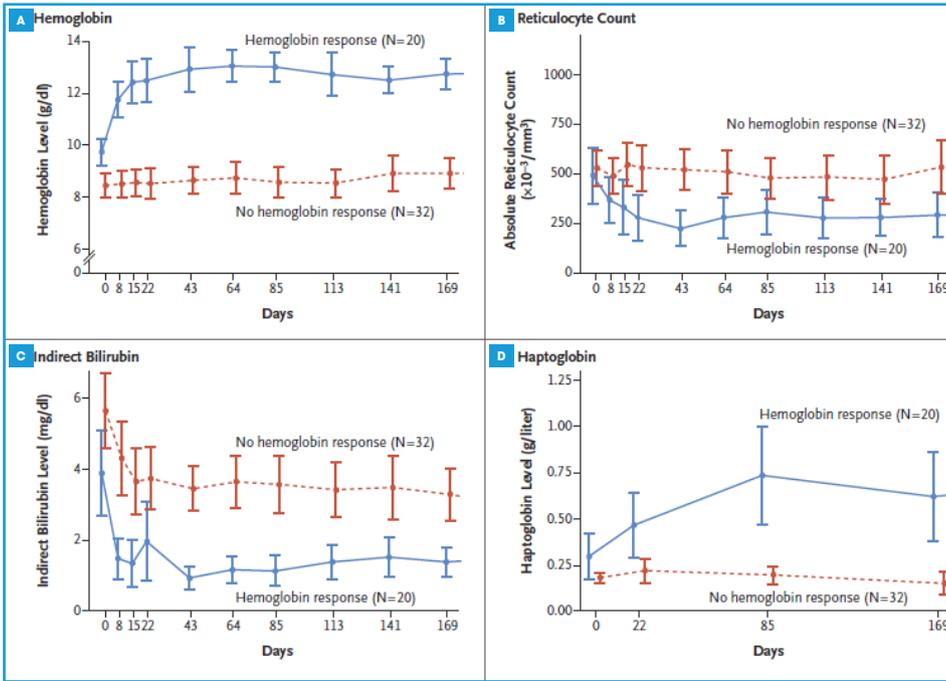


Figura 3. Niveles de hemoglobina (A) y parámetros de hemólisis –reticulocitos (B), bilirrubina indirecta (C) y haptoglobina (D)– durante el periodo central de 24 semanas entre los pacientes respondedores y no respondedores a mitapivat. Tomado de Grace *et al.*⁽⁷⁾. Los niveles de bilirrubina indirecta disminuyeron en todos los pacientes. Sin embargo, los niveles de LDH y reticulocitos mejoraron solo en los pacientes con respuesta. Los autores describen que podría haber un efecto independiente de mitapivat sobre el metabolismo de la bilirrubina.

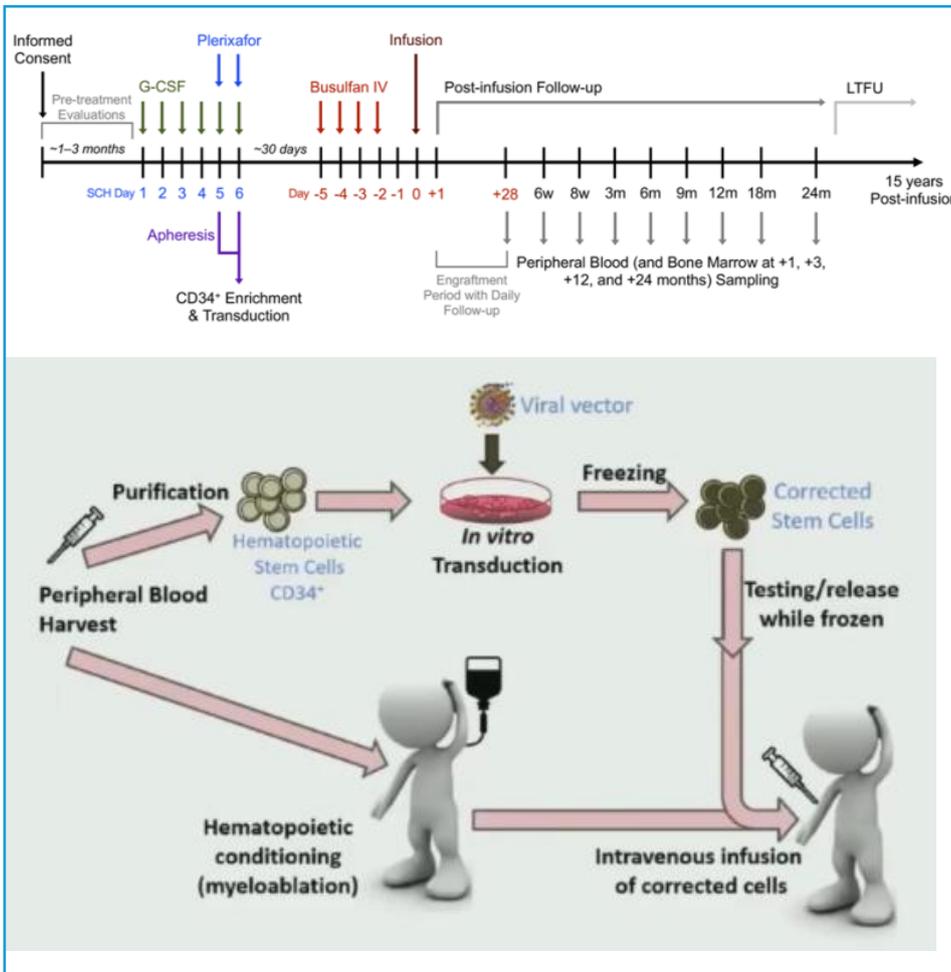


Figura 4. Esquema del ensayo fase I de terapia génica con vector lentiviral actualmente en desarrollo (ClinicalTrials.gov: NCT04105166). Cortesía del Dr. J. C. Segovia.

El tratamiento con mitapivat produce un rápido, sostenido y clínicamente significativo incremento de la hemoglobina en la mitad de los pacientes con déficit de PK, con mejoría de los parámetros de hemólisis en una amplia variedad de pacientes. Dada la relación de la respuesta con el genotipo observada con mitapivat, los pacientes con 2 mutaciones de tipo *no-missense* u homocigotos para R479H, en principio no candidatos a este tratamiento, probablemente podrían ser elegibles en el futuro para ensayos de terapia génica.

Tanto los activadores de la glucólisis como la terapia génica son terapias emergentes en eritropatología y, si se vuelven clínicamente disponibles, el enfoque terapéutico de estos pacientes cambiaría significativamente.

► Bibliografía

- Grace RF, Layton DM, Barcellini W. How we manage patients with pyruvate kinase deficiency. *Br. J Haematol.* 2019;184:721-34.
- Bianchi P, Fermo E, Glader B, Kanno H, Agarwal A, Barcellini W, et al. Addressing the diagnostic gaps in pyruvate kinase (PK) deficiency: consensus recommendations on the diagnosis of PK deficiency. *Am J Hematol.* 2019;94:149-61.
- Van Straaten S, Bierings M, Bianchi P, Akiyoshi K, Kanno H, Serra IB, et al. Worldwide study of hematopoietic allogeneic stem cell transplantation in pyruvate kinase deficiency. *Haematologica.* 2018 Feb;103:e82-e86.
- Kung C, Hixon J, Kosinski PA, Cianchetta G, Histen G, Chen Y, et al. AG-348 enhances pyruvate kinase activity in red blood cells from patients with pyruvate kinase deficiency. *Blood.* 2017;130:1347-56.
- Kung C, Hixon J, Choe S, Marks K, Gross S, Murphy E, et al. Small molecule activation of PKM2 in cancer cells induces serine auxotrophy. *Chem Biol.* 2012;19(9):1187-98.
- Yang H, Merica E, Chen Y, Cohen M, Goldwater R, Kosinski PA, et al. Phase I Single and Multiple-Ascending-Dose Randomized Studies of the Safety, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of AG-348, a First-in-Class Allosteric Activator of Pyruvate Kinase R, in Healthy Volunteers. *Clin Pharmacol Drug Dev.* 2019 Feb;8(2):246-59.
- Grace RF, Rose C, Layton DM, Galactéros F, Barcellini W, Morton DH, et al. Safety and Efficacy of Mitapivat in Pyruvate Kinase Deficiency. *N Engl J Med.* 2019;381:933-44.
- Grace RF, Bianchi P, Van Beers EJ, Eber SW, Glader B, Yaish HM, et al. Clinical spectrum of pyruvate kinase deficiency data from the pyruvate kinase deficiency natural history study. *Blood.* 2018;131:2183-92.
- Grace RF, Layton DM, Galactéros F, Barcellini W, van Beers EJ, Yaish HM, et al. EP1561. Mitapivat (AG-348) long-term safety and efficacy in pyruvate kinase deficiency: 3-year results of the drive PK study. Paper presented at: 25th Virtual Congress of the European Hematology Association; 2020 June 11-21.
- Rab M, Van Oirschot B, Van Straaten S, Biemond B, Bos J, Kosinski PA, et al. Paper N.º 3506. Decreased activity and stability of pyruvate kinase in hereditary hemolytic anemia: a potential target for therapy by AG-238 (mitapivat), an allosteric activator of red blood cell pyruvate kinase. Paper presented at: 61st ASH Annual Meeting and Exposition. 2019 Dec 6-10; Orlando (USA).
- Kuo K, Layton DM, Lal A, Al-Samkari H, Tai F, Lynch M, et al. S297. Proof of concept for the oral pyruvate kinase activator mitapivat in adults with non-transfusion-dependent thalassemia: interim results from an ongoing, phase 2, open-label, multicenter study. Communication presented at: 25th Virtual Congress of the European Hematology Association; 2020 June 11-21.
- Rab M, van Dooijeweert B, Bos J, van Oirschot B, Kosinski P, van Wesel A, et al. EP1566. Secondary deficiency of pyruvate kinase and altered red cell metabolism in hereditary xerocytosis caused by PIEZO1 and KCNN4 defects. Paper presented at: 25th Virtual Congress of the European Hematology Association; 2020 June 11-21.
- Estépp JH, Kalfa T, Saraf S, Kim H, Biernat L, Malik P, et al. EP1531. Phase 1 single (SAD) and multiple ascending dose (MAD) study of the safety, pharmacokinetics (PK) and pharmacodynamics (PD) of FT-4202, a PKR-activator, in healthy and sickle cell disease subjects. Paper presented at: 25th Virtual Congress of the European Hematology Association; 2020 June 11-21.
- Tani K, Yoshikubo T, Ikebuchi K, Takahashi K, Tsuchiya T, Takahashi S, et al. Retrovirus-mediated gene transfer of human pyruvate kinase (PK) cDNA into murine hematopoietic cells: implications for gene therapy of human PK deficiency. *Blood.* 1994 Apr 15;83(8):2305-10.
- Kanno H, Utsugisawa T, Aizawa S, Koizumi T, Aisaki K, Hamada T, et al. Transgenic rescue of hemolytic anemia due to red blood cell pyruvate kinase deficiency. *Haematologica.* 2007 Jun;92(6):731-7.
- Meza NW, Alonso-Ferrero ME, Navarro S, Quintana-Bustamante O, Valeri A, García-Gómez M, et al. Rescue of pyruvate kinase deficiency in mice by gene therapy using the human isoenzyme. *Mol Ther.* 2009 Dec;17(12):2000-9.
- García-Gómez M, Calabria A, García-Bravo M, Benedicenti F, Kosinski P, López-Manzaneda S, et al. Safe and efficient gene therapy for pyruvate kinase deficiency. *Mol Ther.* 2016 Aug;24(7):1187-98.
- Quintana-Bustamante O, Fañanas-Baquero S, Orman I, Torres R, Duchateau P, Poirat L, et al. Gene editing of PKLR gene in human hematopoietic progenitors through 5' and 3' UTR modified TALEN mRNA. *PLoS One.* 2019 Oct 16;14(10):e0223775.

Hemoglobinopatía S heterocigota. ¿Algo más que un simple rasgo?

F. Ataúlfo Fernández González, Celina Benavente Cuesta
Hospital Clínico San Carlos. Madrid

La hemoglobina (Hb) S es una variante de Hb o hemoglobinopatía estructural debida a una mutación puntual en el codón 6 del primer exón del gen beta de globina que determina la sustitución de la adenina por timina y, por tanto, la codificación del aminoácido valina en lugar de glutamina en la sexta posición de la cadena beta de la globina. Cuando la Hb S se desoxigena, se produce un cambio conformacional que permite que los residuos de valina, que son hidrofóbicos, interaccionen con lugares hidrofóbicos complementarios en cadenas beta de globina adyacentes, iniciando la polimerización y, por tanto, la pérdida de su solubilidad. La unión intermolecular de tetrámeros de Hb S desoxigenada genera filamentos de polímeros que, a su vez, se asocian entre ellos para formar haces parecidos a cuerdas, que distorsionan la forma de la célula transformándose el hematíe en una célula falciforme elongada y poco deformable, lo que condiciona la existencia de hemólisis con consumo de óxido nítrico y fenómenos vasooclusivos en la microcirculación, que constituyen la base fisiopatológica de la anemia de células falciformes (ACF) o drepanocitosis⁽¹⁾.

La tasa y la extensión de la polimerización de la Hb S dependen fundamentalmente de 3 variables independientes: el grado de desoxigenación celular, la concentración intraeritrocitaria de Hb S y la concentración intracelular de Hb fetal, aunque también otros factores como el pH, la temperatura y la fuerza iónica influyen en la misma⁽¹⁾.

Los portadores de Hb S heterocigota (HbAS) o rasgo falciforme sintetizan entre un 35 y un 40% de Hb S, por lo que en condiciones fisiológicas no presentan una concentración suficiente de Hb S para que se desencadene la polimerización. Sin embargo, bajo condiciones de hipoxia marcada, acidosis, incremento en la viscosidad, deshidratación e hipotermia, con estas

concentraciones puede tener lugar la polimerización de la Hb y, de esta forma, la falciformación de los hematíes⁽²⁾. Por tanto, aunque la anemia falciforme es una enfermedad recesiva que para que se manifieste es necesario que los 2 alelos sean beta S o exista una doble heterocigocia de un alelo beta S asociado a una beta talasemia u otra variante de cadena beta (Hb C, Hb D, Hb O, Hb E), existen comunicaciones en la literatura científica que plantean la cuestión de si la HbAS es algo más que un simple rasgo.

› Epidemiología

La Hb S constituye una de las alteraciones monogénicas más frecuentes en el mundo debido a sus efectos protectores, en los casos heterocigotos, frente a las formas severas de malaria⁽³⁾. Su prevalencia más alta corresponde a los países del África tropical y subtropical, la península arábiga y la India, donde en algunas zonas el 25-30% de la población es portadora de HbAS. En los Estados Unidos, casi 3 millones de individuos presentan HbAS, de forma que constituyen del 7 al 9% de la población afroamericana, que es similar a la de otras poblaciones africanas que emigraron de África como resultado de la trata de esclavos, como en Brasil y Jamaica, con una prevalencia aproximadamente del 10%⁽⁴⁾.

Los cambios migratorios de las últimas décadas desde estas zonas de alta prevalencia han determinado que la HbAS sea relativamente común en cualquier parte del mundo y que probablemente su frecuencia aumente en los próximos años. Se estima que en todo el mundo el número de individuos con HbAS supera los 300 millones y en Europa constituyen cerca de 1% de la población, por lo que en la actualidad se considera un problema importante de salud pública⁽⁴⁾.

› Consejo genético y opciones reproductivas

La identificación y el asesoramiento de portadores de HbAS se han considerado una estrategia eficaz en la reducción la prevalencia de la ACF. Se han establecido diferentes estrategias, desde pruebas de identificación de hemoglobinopatías premaritales o preconcepcionales legalmente obligatorias (sobre todo en países donde el arreglo matrimonial es la norma) hasta programas de cribado neonatal y campañas de educación pública. Estas estrategias han sido efectivas en la disminución de las tasas de fenotipos de beta talasemia severa en pequeñas regiones de alta endemicidad, como Chipre y Cerdeña⁽⁵⁾. Sin embargo, en el caso de la ACF no han sido tan eficaces; así, en Arabia Saudí, donde un decreto real de 2003 ordenó la detección prematrimonial de beta talasemia y HbAS antes de la formalización de un contrato de matrimonio, en un estudio de casos-controles las pruebas prematrimoniales no cambiaron significativamente el matrimonio o la toma de decisiones reproductivas en el grupo que recibió asesoramiento genético respecto a los que no recibieron asesoramiento⁽⁶⁾. En este sentido, en Jamaica, un gran estudio de un programa educativo integral de HbAS realizado entre 16.600 estudiantes de último año de secundaria no logró reducir la tasa de nacimientos con enfermedad de células falciformes (ECF) en los participantes después de 8 años de seguimiento⁽⁷⁾. En los Estados Unidos, un estudio controlado aleatorio de una plataforma educativa electrónica para adultos jóvenes con HbAS demostró un aumento significativo en el conocimiento de los participantes sobre la HbAS y la ECF, pero no afectó la toma de decisiones reproductivas de los participantes⁽⁸⁾.

Uno de los problemas principales de la falta de eficacia en la reducción de los nacimientos con ECF, al igual que en otras enfermedades genéticas, radica en la posible estigmatización de los portadores de HbAS, que puede determinar una discriminación racial, laboral, económica y social, así como miedo y desconfianza en los portadores, lo que dificulta el establecimiento de programas de detección o cribado tanto prematrimoniales o preconcepcionales, como prenatales y neonatales⁽⁹⁾. El cribado neonatal bien universal o dirigido a poblaciones de riesgo para la ECF está establecido en muchos países desde hace décadas, como los EE.UU. y muchos países europeos, incluido España, y ha demostrado un claro coste beneficio al

facilitar la institución de tratamientos tempranos con el objetivo de salvar vidas, como la profilaxis con penicilina en los niños con ECF^(9,10). Aunque en estos cribados además se puede identificar a los portadores de HbAS, existe una gran variabilidad en la notificación del estado de portador de HbAS e incluso en algunos países esta notificación no es obligatoria. En los EE.UU. estudios recientes sugieren que solo el 16% de las personas encuestadas conocen su propio estado de HbAS⁽¹¹⁾ y solo el 37% de los padres informaron haber recibido una notificación directa del estado de HbAS de sus hijos⁽¹²⁾. Incluso si los padres son informados del resultado de sus hijos, pueden no ser conscientes de las implicaciones que conlleva. En un estudio, el 27,5% de las familias que se sometieron a entrevistas de seguimiento creían que su hijo con el rasgo falciforme podría desarrollar síntomas de ECF⁽¹³⁾. Se han sugerido diferentes estrategias para mitigar la estigmatización de los portadores como: educación sobre la prevalencia poblacional de HbAS y su ventaja evolutiva; evitar los programas de cribado racialmente selectivos; evitar los términos de etiquetado como "portador de ECF", "enfermedad falciforme" o "enfermo"; garantía de privacidad y confidencialidad; transparencia de los protocolos de detección; educación a los portadores sobre la HbAS y las diferencias con respecto a la ECF; y asesoramiento genético y reproductivo para portadores de HbAS⁽⁹⁾.

Otro problema en relación con el consejo genético y las opciones reproductivas radica en el desconocimiento o la falta de implicación de los servicios sanitarios que podrían estar implicados en esta problemática. De esta forma, en una encuesta en 15 centros de pediatría en atención primaria de los EE.UU. el 28% de los médicos no buscó activamente los resultados del cribado, aunque la información era generalmente accesible⁽¹⁴⁾. En otra encuesta del Colegio Americano de Obstetricia y Ginecología se ha evidenciado que existe una gran variabilidad en las prácticas de detección y que el conocimiento de la evaluación de las hemoglobinopatías entre los obstetras es generalmente bajo⁽¹⁵⁾.

Este último colectivo es muy importante en la planificación del embarazo o en la etapa posterior a la concepción para guiar el asesoramiento de las mujeres y sus parejas respecto a las opciones reproductivas, teniendo en cuenta la posibilidad de la realización de un diagnóstico genético previo a la implantación (PGD) junto con la fertilización *in vitro* (FIV) y la inte-

rupción voluntaria del embarazo. En última instancia, estas decisiones reproductivas que cambian la vida son profundamente personales y pueden estar influenciadas por creencias individuales, culturales o religiosas con respecto a la importancia de tener un hijo con ACF, y con las posibilidades económicas y la ética de las tecnologías reproductivas artificiales y el aborto⁽¹⁶⁾.

› Manifestaciones clínicas

El rasgo falciforme no es una enfermedad y, por tanto, la esperanza de vida de los portadores de HbAS no está reducida^(17,18). Aunque estudios epidemiológicos, ensayos experimentales y modelos matemáticos demuestran claramente que la HbSA confiere una ventaja selectiva de resistencia frente a las formas severas de malaria, las tasas de parasitemia asintomática por *P.falciparum* no parecen diferir entre los portadores de HbAS y los no portadores. Esto sugiere que la HbAS no protege contra la infección en sí, sino más bien contra la progresión a la malaria clínica y su mortalidad infantil asociada, por lo que no elimina este riesgo y la profilaxis de la malaria en individuos con el rasgo de células falciformes (*sickle cell trait* -SCT-) debería ser la misma que para la población general⁽¹⁹⁾.

La salud general de las personas con el SCT es comparable con los individuos sin la HbAS, de forma que en un gran estudio poblacional, el seguimiento a largo plazo de 18.257 niños portadores de HbAS diagnosticados en el periodo neonatal no demostró una mayor incidencia de afecciones médicas comunes ni un mayor uso de los servicios de atención médica, sobre las tasas de trastornos comunes y uso de la atención médica respecto a 74.523 niños que no tenían SCT⁽²⁰⁾. No obstante, los grandes estudios de población no están diseñados para buscar eventos de salud específicos raros o poco frecuentes en los portadores de HbAS y existen comunicaciones en la literatura científica que, bajo ciertas circunstancias, indican un mayor riesgo de presentar ciertas condiciones o complicaciones patológicas.

› Lesión relacionada con el esfuerzo

Constituye la complicación más importante y debatida en los portadores de HbAS. En un primer estudio

entre el personal militar de los EE.UU. desde 1977 a 1981, se demostró un riesgo relativo de muerte súbita casi 15 veces mayor entre los reclutas portadores de HbSA frente al resto, aunque la estimación se basó en solo un pequeño número de muertes, 13 (0,03%) entre los portadores y 10 (0,002%) entre los no portadores⁽²¹⁾. Un estudio similar entre atletas en la Asociación Nacional de Atletismo Colegial (NCAA) también ha demostrado un riesgo relativo aproximadamente 5 veces mayor, pero con un riesgo absoluto bajo (0,02%), de muerte por esfuerzo entre los portadores de HbAS afroamericanos⁽²²⁾.

Estos estudios, por lo tanto, sugieren que solo una pequeña fracción de las personas con SCT está en riesgo de esta complicación grave y que probablemente otros factores adicionales como la duración y la recuperación de la actividad, la hidratación y la aclimatación al clima probablemente también contribuyan significativamente en las lesiones por esfuerzo con el ejercicio de alta intensidad. Por lo tanto, estos hallazgos no pueden extrapolarse a la población general, donde los patrones de esfuerzo habituales, como el ejercicio recreativo o el deporte, no se han relacionado con la muerte súbita de los portadores de HbAS⁽¹⁶⁾. En 2003, el Ejército de los EE.UU. formalizó una política de precauciones universales para disminuir el riesgo de lesiones relacionadas con el esfuerzo entre todos sus reclutas. La institución de estas medidas ha resultado en una disminución de la muerte súbita tanto en portadores como no portadores de HbAS. De esta forma, en un estudio reciente de ~ 50 000 reclutas entre 2011 y 2014 no se encontró un mayor riesgo de muerte súbita entre los portadores de HbAS⁽²³⁾. En este sentido, en la misma cohorte tampoco se observó un mayor grado de lesiones por golpe de calor entre los portadores de HbAS⁽²⁴⁾. Estos datos epidemiológicos respaldan el uso de precauciones universales para prevenir lesiones por esfuerzo con el entrenamiento de alta intensidad, independientemente del estado de la HbSA, y sugieren que la detección de HbAS que ha sido muy debatida en el pasado en este contexto es probablemente innecesaria⁽¹⁶⁾.

Respecto a la rabdomiólisis, existe un riesgo independiente moderado persistente de 1,54 veces (IC: 1,12 a 2,12) de rabdomiólisis por esfuerzo entre los portadores de HbAS en el ejército que no se disminuye por completo con las precauciones universales. De forma similar a la muerte súbita, la rabdomiólisis es una complicación rara ante la que solo una peque-

na proporción de portadores de HbAS está en riesgo (1,2%) y es importante destacar que factores como la obesidad, el consumo de tabaco y el uso de medicamentos demuestran un mayor riesgo independiente de rhabdomiólisis que la HbAS en individuos que realizan esfuerzos de alta intensidad. Estos últimos son factores fácilmente modificables, con lo que se obtendría una disminución del riesgo si se actuara sobre ellos⁽²³⁾.

En el caso de los atletas, la instauración de precauciones universales para prevenir lesiones por esfuerzo ha sido más lenta y complicada debido a la posible estigmatización y discriminación en la participación deportiva basada en el estado de portador de HbAS y al establecimiento obligatorio del cribado del estado de portador como repuesta directa a las consecuencias legales de demandas judiciales por muerte relacionadas con el estado de portador⁽²⁵⁾. En este sentido, varias organizaciones, como la Sociedad Americana de Hematología (ASH) y la Asociación de Enfermedad de Células Falciformes de América (SCDAA), se oponen a las pruebas obligatorias de los atletas, señalando que se deben adoptar precauciones universales para prevenir lesiones relacionadas con el ejercicio⁽²⁶⁾. Recientemente, en febrero de 2018, la NCAA comunicó la necesidad de reforzar ciertas medidas preventivas, como la aclimatación y las relaciones trabajo-descanso, sin mencionar a la HbSA, lo que refleja el objetivo de cambiar la cultura e incorporar estas pautas para todos los atletas⁽²⁷⁾.

› Enfermedad renal

Los portadores de HbAS presentan un riesgo aumentado de ciertas complicaciones urológicas y renales, aunque la verdadera prevalencia de estas complicaciones en relación con la población general no está bien caracterizada.

En un estudio que incluía a 23.192 adultos afroamericanos hospitalizados encontró una mayor prevalencia de hematuria con un riesgo relativo 1,98 veces mayor (IC: 1,52 a 2,62 veces) en portadores de HbAS frente a no portadores⁽²⁸⁾. Desde un punto de vista fisiopatológico, se ha relacionado con la existencia de necrosis papilar en la médula renal por microinfartos debidos a la falciformación favorecida por el ambiente de acidosis, baja tensión de oxígeno, alta osmolaridad y el entrecimiento del flujo sanguíneo de los vasos rectos en la médula renal. Estos mecanismos también se han

involucrado en un deterioro en la capacidad de concentrar la orina (hipostenuria) que es responsable de la enuresis nocturna en niños mayores portadores de HbAS y aumenta la probabilidad de deshidratación en situaciones de riesgo como la rhabdomiólisis por esfuerzo⁽²⁹⁾. Además, ante una hematuria siempre hay que descartar un carcinoma medular renal, un tumor muy poco frecuente y agresivo que se observa casi exclusivamente en pacientes jóvenes portadores de HbAS según algunas series de casos de esta patología⁽³⁰⁾.

En diferentes estudios se ha observado un aumento del riesgo de presentar albuminuria entre los portadores de HbAS frente a los no portadores. De esta forma, en un metaanálisis que incluía 4 cohortes que incluían 6.432 adultos afroamericanos se evidenció un mayor riesgo de albuminuria basal entre portadores (31,8%) frente a no portadores de HbAS (19,6%), con un aumento de 1,86 veces del riesgo (IC: 1,49 a 2,31)⁽³¹⁾. De forma similar, en este mismo metaanálisis, incrementando el número de individuos a 15.969 al incluir una cohorte más en el análisis, se encontró la presencia de enfermedad renal crónica (ERC) en función de la creatinina en el 19,2% de los portadores con HbAS, en comparación con el 13,5% de los no portadores, con un incremento del riesgo de 1,57 veces (IC: 1,34 a 1,84)⁽³¹⁾. En un segundo estudio con una población de 9.909 adultos afroamericanos se objetivó un riesgo aumentado de 1,89 veces (IC: 1,59 a 2,23 veces) de ERC según la tasa de filtración glomerular estimada y la albuminuria en los portadores frente a no portadores de HbAS, así como un mayor riesgo de enfermedad renal terminal dependiente de diálisis entre los portadores, con un riesgo de 2,03 (IC: 1,44 a 2,84) ajustando los análisis por edad, sexo, tabaquismo, diabetes, hipertensión y genotipo APOL1⁽³²⁾.

Recientemente, se ha demostrado que la herencia conjunta de alfa talasemia por la delección de 3,7 kb en el rasgo falciforme protege contra la ERC. En un estudio en 2.000 portadores de HbAS, el riesgo de ERC entre individuos portadores sin alfa talasemia asociada fue de 2,6 (IC: 1,7-4,0) en comparación con 1,1 (IC: 0,6-2,3) en portadores de HbAS con una alfa+ talasemia heterocigota⁽³³⁾. Este efecto protector de la asociación de una alfa talasemia está en relación con la disminución de la concentración de Hb S según se van perdiendo genes alfa funcionales cuando se asocia a una alfa talasemia. Esta asociación, que está presente en casi el 30% de los afroamericanos con HbAS, elimina prácticamente el riesgo de ERC⁽³³⁾.

A diferencia de las lesiones por esfuerzo, la nefropatía es extremadamente común entre los adultos afroamericanos; por lo tanto, la prevalencia general de ERC en HbAS es relativamente alta a pesar del riesgo relativo modesto. Específicamente, en adultos con una edad media de 50 a 65 años, la prevalencia de ERC entre los portadores de HbAS es de aproximadamente el 15 al 35%, en comparación con el 10 al 25% en individuos sin HbAS. Es importante tener en cuenta que la HbAS es, por lo tanto, un factor de riesgo para la ERC, en lugar de una enfermedad en sí misma, y que es probable que haya varios factores en juego que provoquen ERC en la población afroamericana. Además, debido a que aún no se ha establecido la progresión natural de la ERC entre los portadores de HbAS y no se han realizado estudios de tratamientos para detener la progresión de la ERC, actualmente no existen recomendaciones sobre la necesidad y el momento para la detección de ERC entre los portadores de HbAS y no se justifica la detección de rutina de la HbAS entre individuos con ERC⁽¹⁶⁾.

› Fenómenos vasooclusivos

Los fenómenos vasooclusivos son característicos de la ECF; no obstante, se han descrito casos en portadores de HbAS aunque con incidencia muy baja y en la mayoría de los casos con dudas sobre su clara relación causal.

El infarto esplénico es el fenómeno vasooclusivo mejor documentado y los casos reportados en la mayoría de las ocasiones tuvieron lugar a gran altitud, incluida la escalada de montañas y volar en aviones no presurizados, y con un predominio en varones y en individuos de origen caucásico respecto a los de ascendencia africana. El tratamiento fue conservador, incluido el cambio de altitud, aunque se requirió esplenectomía en algunos casos y en otros se desarrolló asplenia posteriormente. También se han comunicado crisis de secuestro esplénico y episodios de dolor agudo, pero estos eventos son muy raros y con mayor frecuencia debido a otros problemas médicos concomitantes o condiciones extremas, como altitud elevada, aumento de la presión (buceo), bajo oxígeno, ejercicio severo prolongado o deshidratación⁽³⁴⁾.

Se ha descrito una mayor incidencia de complicaciones graves de hipema traumático (entrada de sangre en la cámara anterior del ojo debido a una le-

sión), que incluyen aumento de la presión intraocular después del hipema inicial, resangrado y pérdida de visión⁽³⁵⁾. Aunque se han comunicado casos de priapismo en portadores de SCT, no existen pruebas concluyentes sobre su relación causal; por lo general, el priapismo se produjo en el contexto de otros posibles factores precipitantes como el uso de drogas y el trasplante de corazón. No existen estudios que demuestren una incidencia mayor de priapismo en relación con la población general⁽³⁶⁾.

› Enfermedad vascular venosa

En varios estudios se ha demostrado que el rasgo falciforme constituye un factor de riesgo leve para la trombosis venosa profunda (TVP) y el tromboembolismo pulmonar (TEP), con un riesgo general de 1,5 a 2 veces de tromboembolismo venoso (TEV) mayor en los portadores de HbAS que en los no portadores. A diferencia de la población general y como ocurre en la ECF, la mayoría de los fenómenos corresponden a TEP en lugar de a TVP. De esta forma, el riesgo de TEV atribuible en la población al estado de portador de HbAS se ha calculado en torno a un 3% para TVP y a un 7% para TEP. Aunque se desconoce el mecanismo de este fenómeno, se ha sugerido que la hipoxia extrema en las válvulas venosas, que puede alcanzar un nadir de una presión parcial de oxígeno < 20 mmHg, como ocurre en la médula renal, tendría como resultado una falciformación subclínica a dicho nivel con un mayor riesgo de embolización. También se ha propuesto como mecanismo la trombosis de la arteria pulmonar *in situ*; sin embargo, en el sistema pulmonar, en condiciones normales, no existe una hipoxia extrema en un grado similar al de las válvulas venosas, aunque en el contexto de la enfermedad parenquimatosa subyacente podría ocurrir⁽³⁷⁾.

El riesgo del rasgo falciforme es similar a las trombofilias de bajo riesgo, como el factor V Leiden y la mutación del gen de protrombina; por lo tanto, es probable que no esté justificado el despistaje de la HbAS en el contexto de una TEV y las decisiones con respecto a la elección y la duración de la anticoagulación tampoco deben verse influenciadas por la presencia de la HbAS⁽¹⁶⁾.

Los niveles medios de dímero D son significativamente más altos en los afroamericanos con HbAS en comparación con los no portadores, de forma que más

del 50% de los portadores con HbAS muestran dímeros D basales mayores a 0,5 µg/mL. Por tanto, el dímero D puede no ser un marcador fiable para descartar TEV o guiar la interrupción de la anticoagulación en individuos con HbAS⁽³⁸⁾.

› Enfermedad vascular arterial

En varios estudios se ha valorado la posible asociación de la presencia del rasgo falciforme y complicaciones como accidentes cerebrovasculares, hipertensión, diabetes mellitus, cardiopatía isquémica y retinopatía. En ninguno de ellos se ha encontrado un aumento significativo de presentar alguna de estas complicaciones entre los portadores de HbAS y los no portadores⁽³⁹⁾. La Hb glicosilada de la Hb S presenta un tiempo de retención diferente de la Hb A glicosilada (HbA1c), por lo que los portadores de HbAS presentan niveles de HbA1c más bajos⁽⁴⁰⁾, lo que puede tener implicaciones en el manejo de la diabetes.

› Complicaciones quirúrgicas y postraumáticas

Salvo en el caso del hipema, en ningún estudio donde se evaluaron las complicaciones quirúrgicas y postraumáticas se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número de complicaciones quirúrgicas, efectos adversos de la anestesia o la duración de la estancia hospitalaria, entre portadores y no portadores de HbAS⁽³⁹⁾.

› Complicaciones pediátricas y gestacionales

En varios países como Jamaica, República Dominicana, India, Brasil, Nigeria y EE.UU. se ha evaluado el posible efecto del rasgo falciforme sobre el crecimiento. En ninguno se encontró una asociación entre el estado de portador de HbAS y retraso ponderal o menor altura⁽³⁹⁾. También se ha estudiado el riesgo del síndrome de muerte súbita del lactante y no se ha encontrado asociación con el rasgo falciforme⁽⁴¹⁾.

La mayoría de los estudios publicados que evalúan el estado de portador de HbAS y las complicaciones del embarazo son contradictorios, tienen problemas metodológicos y no demuestran una fuerte relación entre el SCT y el riesgo de complicaciones^(42,43).

› Rasgo falciforme y donación

Los portadores de HbAS pueden donar sangre para el banco general, aunque no se recomienda que su sangre se administre a las personas con ECF porque sería más difícil alcanzar el porcentaje de Hb S objetivo apropiado para tratar o prevenir sus complicaciones. Por otro lado, también hay que tener en cuenta que puede ser difícil la citorreducción de la sangre de donantes con HbAS, encontrando un aumento de los leucocitos residuales y de hemólisis, debido al bloqueo de los filtros de leucodepleción⁽⁴⁴⁾.

Las personas con el SCT pueden servir como donantes para el trasplante de células hematopoyéticas. Si la donación se usa para un hermano con ECF, el trasplante transformaría al hermano de la enfermedad sintomática en un estado de portador asintomático. Las personas con el SCT pueden recibir factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) para la movilización de células madre hematopoyéticas, a diferencia de aquellos con ECF, en quienes no se debe usar G-CSF⁽⁴⁵⁾.

Aunque no se han estudiado formalmente los resultados de los receptores y donantes del trasplante renal en portadores de HbAS, en un estudio se encontró que el 37% de los centros de trasplante renal analizan y excluyen a los portadores de SCT de la donación de riñón vivo⁽⁴⁶⁾.

› Consideraciones finales

- La Hb S constituye una de las alteraciones monogénicas más frecuentes en el mundo.
- El rasgo falciforme no es una enfermedad y, por tanto, la esperanza de vida de los portadores de HbAS no está reducida.
- Existen comunicaciones en la literatura científica que, bajo ciertas circunstancias, indican un mayor riesgo de presentar ciertas condiciones o complicaciones patológicas (lesión relacionada con el esfuerzo, enfermedad renal, fenómenos vasooclusivos, enfermedad vascular venosa).
- La corrección de estas circunstancias en la mayoría de las complicaciones iguala el riesgo al de la población general; no obstante, su conocimiento y despistaje debe considerarse por sus posibles implicaciones terapéuticas.
- La identificación y el asesoramiento de portadores de HbAS se ha considerado una estrategia eficaz en la

reducción la prevalencia de la ACF. Se han establecido diferentes estrategias, desde pruebas de identificación de hemoglobinopatías premaritales o preconcepcionales legalmente obligatorias hasta programas de cribado neonatal y campañas de educación pública.

- La menor eficacia en la reducción de nacimientos con ECF de la esperada, al igual que en otras enfermedades genéticas, radica en la posible estigmatización de los portadores de HbAS que puede determinar una discriminación racial, laboral, económica y social, así como miedo y desconfianza en los portadores, y en el desconocimiento o la falta de implicación de los servicios sanitarios que podrían estar implicados en esta problemática.

► Bibliografía

- Steinberg MH, Rodgers GP. Pathophysiology of Sickle Cell Disease: Role of Cellular and Genetic Modifiers. *Semin Hematol*. 2001;38:299-306.
- Okoli K, Irani F, Horvath W. Pathophysiologic considerations for the interactions between obstructive sleep apnea and sickle hemoglobinopathies. *Med Hypotheses*. 2009 May;72(5):578-80.
- Taylor SM, Parobek CM, Fairhurst RM. Haemoglobinopathies and the clinical epidemiology of malaria: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2012;12(6):457-68.
- Kotilla TR. Sickle Cell Trait: A Benign State? *Acta Haematol*. 2016;136:147-51.
- Cousens NE, Gaff CL, Metcalfe SA, Delatycki MB. Carrier screening for beta-thalassaemia: a review of international practice. *Eur J Hum Genet*. 2010;18(10):1077-83.
- Alswaidi FM, Memish ZA, O'Brien SJ, Al-Hamdan NA, Al-Enzy FM, et al. At risk marriages after compulsory premarital testing and counseling for b-thalassaemia and sickle cell disease in Saudi Arabia, 2005-2006. *J Genet Couns*. 2012;21(2):243-55.
- Serjeant GR, Serjeant BE, Mason KP, Gibson F, Gardner R, Warren L, Jonker M. Voluntary premarital screening to prevent sickle cell disease in Jamaica: does it work? *J Community Genet*. 2017;8(2):133-9.
- Wilkie DJ, Gallo AM, Yao Y, Molokie RE, Stahl C, Hershberger PE, et al. Reproductive health CHOICES for young adults with sickle cell disease or trait: randomized controlled trial outcomes over two years. *J Genet Couns*. 2016;25(2):325-36.
- Naik RP, Haywood C Jr. Sickle cell trait diagnosis: clinical and social implications. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2015;2015:160-7.
- Gaston MH, Verter JI, Woods G, Pegelow C, Kelleher J, Presbury G, et al. Prophylaxis with oral penicillin in children with sickle cell anemia: a randomized trial. *N Engl J Med*. 1986; 314(25):1593-9.
- Treadwell MJ, McClough L, Vichinsky E. Using qualitative and quantitative strategies to evaluate knowledge and perceptions about sickle cell disease and sickle cell trait. *J Natl Med Assoc*. 2006 May;98(5):704-10.
- Kavanagh PL, Wang CJ, Therrell BL, Sprinz PG, Bauchner H. Communication of positive newborn screening results for sickle cell disease and sickle cell trait: variation across states. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2008;148C(1):15-22.
- Farrell MH, La Pean Kirschner A, Tluczek A, Farrell PM. Experience with Parent Follow-Up for Communication Outcomes after Newborn Screening Identifies Carrier Status. *J Pediatr*. 2020;224:37-43.e2.
- Hinton CF, Neuspiel DR, Gubernick RS, Geleske T, Healy J, Kemper AR, et al. Improving newborn screening follow-up in pediatric practices: quality improvement innovation network. *Pediatrics*. 2012 Sep;130(3):e669-75.
- Azonobi IC, Anderson BL, Byams VR, Grant AM, Schulkin J. Obstetrician-gynecologists' knowledge of sickle cell disease screening and management. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2014;14:356.
- Pecker LH, Naik RP. The current state of sickle cell trait: implications for reproductive and genetic counseling. *Blood*. 2018 Nov 29;132(22):2331-8.
- Ashcroft MT, Desai P. Mortality and morbidity in Jamaican adults with sickle-cell trait and with normal haemoglobin followed up for twelve years. *Lancet*. 1976;2(7989):784-6.
- Castro O, Rana SR, Bang KM, Scott RB. Age and prevalence of sickle-cell trait in a large ambulatory population. *Genet Epidemiol*. 1987;4(4):307-11.
- Tsaras G, Owusu-Ansah A, Boateng FO, Amoateng-Adjepong Y. Complications associated with sickle cell trait: a brief narrative review. *Am J Med*. 2009;122:507-12.
- Reeves SL, Jary HK, Gondhi JP, Kleyn M, Dombkowski KJ. Health outcomes and services in children with sickle cell trait, sickle cell anemia, and normal hemoglobin. *Blood Adv*. 2019;3(10):1574-80.
- Kark JA, Posey DM, Schumacher HR, Ruehle CJ. Sickle-cell trait as a risk factor for sudden death in physical training. *N Engl J Med*. 1987;317(13):781-7.
- Harmon KG, Drezner JA, Klossner D, Asif IM. Sickle cell trait associated with a RR of death of 37 times in National Collegiate Athletic Association football athletes: a database with 2 million athlete-years as the denominator. *Br J Sports Med*. 2012;46(5):325-30.
- Nelson DA, Deuster PA, Carter R III, Hill OT, Wolcott VL, Kurina LM. Sickle cell trait, rhabdomyolysis, and mortality among U.S. Army soldiers. *N Engl J Med*. 2016;375(5):435-42.
- Nelson DA, Deuster PA, O'Connor FG, Kurina LM. Sickle cell trait and heat injury among US Army soldiers. *Am J Epidemiol*. 2018;187(3): 523-8.
- Thompson AA. Sickle cell trait testing and athletic participation: a solution in search of a problem? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013;2013:632-7.
- ASH Statement on Screening for Sickle Cell Trait and Athletic Participation. Disponible en: <http://www.hematology.org/Advocacy/Policy-Statements/7704.aspx>.
- Sitzler B. NCAA addresses exertional rhabdomyolysis. Disponible en: <https://www.nata.org/blog/beth-sitzler/ncaa-addresses-exertionalrhabdomyolysis>.
- Heller P, Best WR, Nelson RB, Becktel J. Clinical implications of sickle-cell trait and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in hospitalized black male patients. *N Engl J Med*. 1979;300:1001-5.
- Goldsmith JC, Bonham VL, Joiner CH, Kato GJ, Noonan AS, Steinberg HM. Framing the research agenda for sickle cell trait: building on the current un-

- derstanding of clinical events and their potential Implications. *Am J Hematol*. 2012 March;87(3):340-6.
30. Álvarez O, Rodríguez MM, Jordan L, Sarnaik S. Renal medullary carcinoma and sickle cell trait: a systematic review. *Pediatr Blood Cancer*. 2015;62(10):1694-9.
 31. Naik RP, Derebail VK, Grams ME, Franceschini N, Auer PL, Peloso GM, et al. Association of sickle cell trait with chronic kidney disease and albuminuria in African Americans. *JAMA*. 2014;312:2115-25.
 32. Naik RP, Irvin MR, Judd S, Gutiérrez OM, Zakai NA, Derebail VK, et al. Sickle cell trait and the risk of ESRD in blacks. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28:2180-7.
 33. Raffield LM, Ulirsch JC, Naik RP, Lessard S, Handsaker RE, Jain D, et al.; NHLBI Trans-Omics for Precision Medicine (TOPMed) Consortium, Hematology & Hemostasis, Diabetes, and Structural Variation TOPMed Working Groups. Common α -globin variants modify hematologic and other clinical phenotypes in sickle cell trait and disease. *PLoS Genet*. 2018 Mar 28;14(3):e1007293.
 34. Goodman J, Hassell K, Irwin D, Witkowski EH, Nuss R. The splenic syndrome in individuals with sickle cell trait. *High Alt Med Biol*. 2014;15(4):468-71.
 35. Kaplowitz K, Nobe M, Abazari A, Honkanen R. Trabeculectomy for traumatic hyphema in sickle cell trait. *Semin Ophthalmol*. 2015;30:297-304.
 36. Matta A, Tandra PK, Berim L. Priapism in a patient with sickle cell trait using marijuana. *BMJ Case Rep*. 2014;2014:bcr2014204199.
 37. Folsom AR, Tang W, Roetker NS, Kshirsagar AV, Derebail VK, Lutsey PL, et al. Prospective study of sickle cell trait and venous thromboembolism incidence. *J Thromb Haemost*. 2015;13(1):2-9.
 38. Naik RP, Wilson JG, Ekunwe L, Mwasongwe S, Duan Q, Li Y, et al. Elevated D-dimer levels in African Americans with sickle cell trait. *Blood*. 2016;127(18):2261-3.
 39. Naik RP, Smith-Whitley K, Hassell KL, Umeh NI, de Montalembert M, Sahota P, et al. Clinical Outcomes Associated With Sickle Cell Trait: a Systematic Review. *Ann Intern Med*. 2018;169(9):619-27.
 40. Lee ST, Weykamp CW, Lee YW, Kim JW, Ki CS. Effects of 7 hemoglobin variants on the measurement of glycohemoglobin by 14 analytical methods. *Clin Chem*. 2007;53:2202-5.
 41. Gozal D, Lorey FW, Chandler D, Derry MK, Lisbin A, Keens TG, et al. Incidence of sudden infant death syndrome in infants with sickle cell trait. *J Pediatr*. 1994;124:211-4.
 42. Wellenstein WL, Sullivan S, Darbinian J, Ritterman Weintraub ML, Greenberg M. Adverse Pregnancy Outcomes in Women with Sickle Cell Trait. *AJP Rep*. 2019;9(4):e346-e352.
 43. Wilson S, Ellsworth P, Key NS. Pregnancy in Sickle Cell Trait: What We Do and Don't Know. *Br J Haematol*. 2020;190(3):328-35.
 44. Amar KO, Bourdonné O, Bruneau S, Sellami F, Richard P. Assessment of leucoreduction of sickle cell trait blood: quality of the filtered product. *Blood Transfus*. 2014;12 Suppl 1(Suppl 1):s193-s198.
 45. Fitzhugh CD, Hsieh MM, Bolan CD, Saenz C, Tisdale JF. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) administration in individuals with sickle cell disease: time for a moratorium?. *Cytotherapy*. 2009;11(4):464-71.
 46. Reese PP, Hoo AC, Magee CC. Screening for sickle trait among potential live kidney donors: policies and practices in US transplant centers. *Transpl Int*. 2008;21(4):328-31.

ACTUALIZACIÓN EN LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA

Coordinadores:

Dra. Lucrecia Yáñez San Segundo. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander

Dr. Julio Delgado González. Hospital Clínic. Barcelona

Importance of the karyotype in chronic lymphocytic leukemia (CLL)

Blanca Espinet^{1,2}, Anna Puiggros^{1,2}, Silvia Ramos²

¹ Laboratori de Citogenètica Molecular. Servei de Patologia. Hospital del Mar. Barcelona;

² Programa de Recerca en Càncer, Institut Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM). Barcelona

› Acknowledgements

The authors want to thank members of Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica (GCECGH), Grupo Español de Leucemia Linfática Crónica (GELLC) and European Research Initiative on Chronic Lymphocytic Leukemia (ERIC) for their contribution to several cooperative projects on complex karyotype and genomic complexity. Cooperative studies have been performed in part thanks to Gilead Sciences Fellowship GLD17/00282 and 2017/SGR437 from Generalitat de Catalunya.

› Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common adult leukemia in Western countries, with a median age at diagnosis of 70 years. Its clinical course is highly variable, ranging from very indolent cases to patients with aggressive disease and rapid progression. This heterogeneity has important consequences for the clinical follow-up, therapeutic strategies and patients' survival⁽¹⁾. The presence of deletions of 17p13 region (involving *TP53*), usually detected by fluorescence *in situ* hybridization (FISH), and *TP53* mutations as well as the mutational status of the variable region of the immunoglobulin heavy chain (IGHV) gene represent the most important prognostic/predictive markers which allow the stratification of patients into different risk groups in the era of chemoimmunotherapy⁽²⁾. Nevertheless, new mechanism-based therapeutic agents have been developed in CLL. In the last years, two inhibitors of the signaling pathway of the B-cell receptor (BCR), named ibrutinib and idelalisib, as well as the BCL2 inhibitor venetoclax, have been approved by the Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicines Agency (EMA)^(3,4). These new

drugs have improved the outcomes of CLL patients and have been able to overcome or at least attenuate the adverse impact of *TP53* deletions or mutations as well as the unmutated IGHV (U-IGHV) status^(5,6).

Even though the prognostic value of *TP53* and IGHV is well established, several studies have highlighted the prognostic and predictive value of complex karyotype (CK) in CLL. Different cooperative studies have been conducted to analyze the clinical impact of CK⁽⁷⁻¹⁰⁾. Besides, the presence of CK has been included in clinical trials in order to elucidate its prognostic/predictive value, especially with the use of new therapeutic modalities.

The aim of this talk is to review the cytogenetic/cytogenomic techniques that allow to detect genomic complexity, to show cooperative studies which deal with the definition of complex karyotype and to discuss the prognostic value of CK in the management of CLL.

› Chromosome banding analysis (CBA)

Chromosome banding analysis (CBA) allows the detection of numerical and structural aberrations in the karyotype. Initial cytogenetic studies in CLL were highly limited by the low mitotic rate of tumor B-cells in culture. Traditional B-cell mitogens, such as pokeweed mitogen, 12-O-tetradecanoly-phorpol-13-acetate (TPA), and lipopolysaccharide were not very effective, with detection of abnormal clones in only 40-50% of cases⁽¹¹⁾. Indeed, interphase FISH analysis –with the centromeric probe of chromosome 12 and *locus* specific probes for 13q14, 11q23 (*ATM*) and 17p13 (*TP53*)– was implemented as the gold standard for cytogenetic risk stratification of CLL patients⁽¹²⁾. Nonetheless, the detection of abnormalities by FISH was limited to the probes used and underestimated the true complexity and heterogeneity of chromosomal

aberrations in CLL. Since the 2010s, the combination of Interleukin 2 (IL-2) and the CpG-oligonucleotide DSP30, which immunostimulates CLL cells *in vitro*, has been implemented as the gold standard mitogen in CLL and yields abnormal metaphases in up to 65-80% of patients⁽¹³⁾. Improved cytogenetic techniques in CLL have prompted renewed interest in the karyotype in this setting.

› Complex karyotype. Definition, incidence, genomic complexity

The seminal paper from Juliusson *et al.*⁽¹¹⁾ already pointed out that the increasing number of chromosomal abnormalities in the karyotype were associated with a poor outcome. Furthermore, evidence was provided that 25-37% of patients without alterations by FISH carried chromosomal abnormalities not covered by the standard FISH panel and were associated with a poor prognosis⁽¹⁴⁾.

The concept of "complex karyotype" (CK) was firstly described in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias^(15,16), associated to a negative prognostic impact in these diseases. In CLL, initial studies defined a CK as the presence of 3 or more chromosomal alterations detected by CBA in the same cell clone^(13,17). Taking into account this definition, CK are detected in 15% of patients at diagnosis^(7,18) and increase up to 30% in relapsed patients after treatment. These are frequently found in Richter Syndrome, and often, but not always, associated with *del(17p)/TP53* mutations, *del(11q)* or *U-IGHV*⁽⁹⁾. Both the detection of CK and the number of anomalies in the karyotype are predictors of an unfavourable clinical outcome in patients treated not only with standard chemoimmunotherapy^(7,19) but also in the initial clinical trials with the new mechanism-based therapeutic agents^(3,20-22). In this sense, the importance of CBA was recognized by the 2018 Guidelines of the International Workshop on CLL⁽²⁾, with the aim of identifying patients with CK, which may present shorter time to first treatment, progression free survival and overall survival.

Nevertheless, not all cases with CK are equal regarding genomic aberrations and prognosis. In a Spanish cooperative study (Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica y Grupo Español de LLC, Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia) led by our group, we demonstrated that

among CLL patients with CK, up to 50% do not present abnormalities of *TP53* and/or *ATM* although they show an aggressive clinical evolution equivalent to those patients with *TP53* and/or *ATM* aberrations who do not have a CK. Furthermore, CK worsens the prognosis of patients with altered *TP53* and/or *ATM*^(7,23). Besides, we and other Spanish groups have also participated in a large retrospective study on CLL and CK from the European Research Initiative on CLL (ERIC)⁽⁹⁾. The main aim was to define this subgroup of patients from a genetic point of view and the impact of CK in clinical practice. So far, we have shown that the standard criterion for defining a CK (detection of 3 or more chromosomal alterations by CBA) might be refined for the prognostic stratification of patients with CLL, being 5 or more the number of aberrations that best predict a worse prognosis⁽⁹⁾. Moreover, we have been able to confirm that patients with multiple trisomies (+12, +18, +19) constitute a particular subgroup who, despite having a CK according to standard criteria, is characterized by a particularly benign clinical course^(9,24).

Regarding genomic complexity, a second study has been conducted by the ERIC Cytogenetics Network with the aim of determining the clinical utility of genomic microarrays for copy number alterations (CNA) assessment in CLL diagnostics. The study has revealed that only high genomic complexity (high-GC), defined as ≥ 5 CNAs emerges as an independent adverse prognosticator on multivariable analysis for time to first treatment and overall survival⁽¹⁰⁾. Moreover, our group has conducted a cooperative study with the aim of comparing the performance of CBA and genomic microarrays to detect genomic complexity. Besides, we aimed to compare risk stratification based on genomic complexity measured by both techniques. We have concluded that both methods are helpful for assessing genomic complexity in CLL patients and risk categories established by CBA and genomic microarrays have a significant impact on TTT although they show a moderate agreement. Discordant cases are being investigated to refine genomic complexity criteria equivalent by both techniques⁽²⁵⁾.

› Complex karyotype. Prognostic value

Over the last years, much has changed in the landscape of CLL treatments. Besides chemotherapy,

chemoimmunotherapy and bone marrow transplantation, new therapeutic agents, such as ibrutinib, idelalisib and venetoclax, have emerged acting independently of the p53 pathway and have demonstrated high efficacy in CLL patients with *TP53* abnormalities.

As previously discussed, CK is a very good predictor for progression-free survival (PFS) in patients treated with chemoimmunotherapy, in particular when > 5 aberrations are present or in relapsed/refractory patients^(9,17,19). Nevertheless, the prognostic impact of CK in patients receiving the new treatment modalities has not been fully established. Whereas the first early phase clinical trials for ibrutinib and venetoclax did find that CK was an independent poor prognostic factor for PFS^(3,4), newer studies at frontline, in R/R patients not heavily pretreated or real-world studies with such treatments have shown that the negative impact of CK on PFS vanishes^(5,22,26-29). In conclusion, the prognostic value of CK still needs additional validation studies, especially prospective ones.

► Take-home messages

1. Cytogenetic methods have improved up to 60-80% the abnormality detection rates by using IL2 + DSP30 combination as mitogens.

2. Genomic complexity is an important prognostic factor in patients treated with chemoimmunotherapy but not all complex karyotypes are equivalent.

- Cases with +12, +19, +other show a very good prognosis.

- Low and intermediate complexity (3 or 4 abnormalities) impact on outcome only if accompanied by *TP53* deletions and/or mutations.

- High complexity (≥ 5 abnormalities) is associated homogeneously with the worst clinical outcome independently of *TP53* abnormalities and IGHV SHM status.

3. The prognostic value (in terms of PFS) of CK in the era of new agents (ibrutinib, idelalisib, venetoclax) is still controversial and depends on the type of patients (front line vs. heavily treated) as well as the type of treatment and drug combinations.

4. Additional studies are needed to define if this parameter should be incorporated in future guidelines as part of the prognostic factors to be determined before receiving treatment.

► References

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press; 2017.
2. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*. 2018;131:2745-60.
3. Anderson MA, Tam C, Lew TE, Juneja S, Juneja M, Westerman D, et al. Clinicopathological features and outcomes of progression of CLL on the BCL2 inhibitor venetoclax. *Blood*. 2017;129(25):3362-70.
4. O'Brien S, Furman RR, Coutre S, Flinn IW, Burger JA, Blum K, et al. Single agent ibrutinib in treatment-naive and relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia: a 5-year experience. *Blood*. 2018;131(17):1910-9.
5. Brown JR, Hillmen P, O'Brien S, Barrientos JC, Reddy NM, Coutre SE, et al. Extended follow-up and impact of high-risk prognostic factors from the phase 3 RESONATE study in patients with previously treated CLL/SLL. *Leukemia*. 2018;32(1):83-91.
6. Stilgenbauer S, Eichhorst B, Schetelig J, Hillmen P, Seymour JF, Coutre S, et al. Venetoclax for patients with chronic lymphocytic leukemia with 17p deletion: results from the full population of a phase II pivotal trial. *J Clin Oncol*. 2018 Jul 1;36(19):1973-80. Erratum in: *J Clin Oncol*. 2019 Sep 1;37(25):2299.
7. Puiggros A, Collado R, Calasanz MJ, Ortega M, Ruiz-Xivillé N, Rivas-Delgado A, et al. Patients with chronic lymphocytic leukemia and complex karyotype show an adverse outcome even in absence of *TP53*/*ATM* FISH deletions. *Oncotarget*. 2017;8:54297-303.
8. Rigolin GM, Cavallari M, Quaglia FM, Formigaro L, Lista E, Urso A, et al. In CLL, comorbidities and the complex karyotype are associated with an inferior outcome independently of CLL-IPI. *Blood*. 2017;129:3495-8.
9. Baliakas P, Jeromin S, Iskas M, Puiggros A, Plevova K, Nguyen-Khac F, et al. Cytogenetic complexity in chronic lymphocytic leukemia: definitions, associations, and clinical impact. *Blood*. 2019;133:1205-16.
10. Leeksa AC, Baliakas P, Moysiadis T, Puiggros A, Plevova K, van der Kevie-Kersemaekers AM, et al. Genomic arrays identify high-risk chronic lymphocytic leukemia with genomic complexity: a multi-center study. *Haematologica*. 2020 Jan 23;haematol.2019.239947.
11. Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M, Ross FM, Stockdill G, Mackie MJ, et al. Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N Engl J Med*. 1990 Sep 13;323(11):720-4.
12. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000 Dec 28;343(26):1910-6.
13. Haferlach C, Dicker F, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV(H) status and immunophenotyping. *Leukemia*. 2007 Dec;21(12):2442-51.
14. Rigolin GM, Cibien F, Martinelli S, Formigaro L, Rizzotto L, Tammiso E, et al. Chromosome aberrations detected by conventional karyotyping using novel

- mitogens in chronic lymphocytic leukemia with "normal" FISH: correlations with clinicobiologic parameters. *Blood*. 2012;119(10):2310-3.
15. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997;89:2079-88.
 16. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood*. 1998;92:2322-33.
 17. Badoux XC, Keating MJ, Wang X, O'Brien SM, Ferrajoli A, Faderl S, et al. Fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab chemoimmunotherapy is highly effective treatment for relapsed patients with CLL. *Blood*. 2011;117:3016-24.
 18. Baliakas P, Iskas M, Gardiner A, Davis Z, Plevova K, Nguyen-Khac F, et al. Chromosomal translocations and karyotype complexity in chronic lymphocytic leukemia: a systematic reappraisal of classic cytogenetic data. *Am J Hematol*. 2014 Mar;89(3):249-55.
 19. Herling CD, Klaumünzer M, Rocha CK, Altmüller J, Thiele H, Bahlo J, et al. Complex karyotypes and KRAS and POT1 mutations impact outcome in CLL after chlorambucil-based chemotherapy or chemoimmunotherapy. *Blood*. 2016;128:395-404.
 20. Thompson PA, O'Brien SM, Wierda WG, Ferrajoli A, Stingo F, Smith SC, et al. Complex karyotype is a stronger predictor than del(17p) for an inferior outcome in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia patients treated with ibrutinib-based regimens. *Cancer*. 2015;121(20):3612-21.
 21. Chanan-Khan A, Cramer P, Demirkan F, Fraser G, Silva RS, Grosicki S, et al. Ibrutinib combined with bendamustine and rituximab compared with placebo, bendamustine, and rituximab for previously treated chronic lymphocytic leukaemia or small lymphocytic lymphoma (HELIOS): a randomised, double-blind, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2016;17(2):200-11.
 22. Kreuzer KA, Furman RR, Stilgenbauer S, Dubowy RL, Kim Y, Munugalavada V, et al. The impact of complex karyotype on the overall survival of patients with relapsed chronic lymphocytic leukemia treated with idelalisib plus rituximab. *Leukemia*. 2020;34:296-300.
 23. Blanco G, Puiggros A, Baliakas P, Athanasiadou A, García-Malo M, Collado R, et al. Karyotypic complexity rather than chromosome 8 abnormalities aggravates the outcome of chronic lymphocytic leukemia patients with TP53 aberrations. *Oncotarget*. 2016;7:80916-24.
 24. Baliakas P, Puiggros A, Kochelli A, Sutton LA, Nguyen-Khac F, Gardiner A, et al. Additional trisomies amongst patients with chronic lymphocytic leukemia carrying trisomy 12: the accompanying chromosome makes a difference. *Haematologica*. 2016;101(7):e299-e302.
 25. Ramos S, Puiggros A, Bea S, Bougeon S, Larrayoz MJ, Clot G, et al. Chromosome banding analysis versus genomic microarrays: a comparison of methods for genomic complexity risk stratification in chronic lymphocytic leukemia patients with complex karyotype. *Blood*. 2019;134(Supplement_1):4287.
 26. Mato AR, Thompson M, Allan JN, Brander DM, Pagel JM, Ujjani CS, et al. Real-world outcomes and management strategies for venetoclax-treated chronic lymphocytic leukemia patients in the United States. *Haematologica*. 2018;103(9):1511-7.
 27. Woyach JA, Ruppert AS, Heerema NA, Zhao W, Booth AM, Ding W, et al. Ibrutinib regimens versus chemoimmunotherapy in older patients with untreated CLL. *N Engl J Med*. 2018;379(26):2517-28.
 28. Abrisqueta P, Bosch F. Venetoclax-obinutuzumab: harnessing complexity. *Blood*. 2020;135(11):788-9.
 29. Al-Sawaf O, Liliënweiss E, Bahlo J, Robrecht S, Fink AM, Patz M, et al. High efficacy of venetoclax plus obinutuzumab in patients with complex karyotype and chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2020;135(11):866-70.

NUEVOS RETOS EN EL MANEJO DE LOS PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

Coordinadores:

Dr. José Manuel Puerta Puerta. Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada

Dr. Fernando Marco de Lucas. Hospital Universitario Basurto. Bilbao

Cuánto nos ayudan los estudios mutacionales en los pacientes con fracaso al tratamiento con inhibidores de la tirosina cinasa en la práctica clínica habitual

María Teresa Gómez Casares, Ruth Stuckey

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

› Introducción

Actualmente, el hematólogo puede elegir, dependiendo de cada caso, entre imatinib, 3 inhibidores de la tirosina cinasa (ITC) de segunda generación (dasatinib, nilotinib, bosutinib) y uno de tercera generación (ponatinib) para el tratamiento de pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC). Estos ITC actúan en el dominio tirosina cinasa de ABL1, compitiendo por el sitio de unión de ATP y así inhiben selectivamente la actividad catalítica de la oncoproteína BCR-ABL1.

Sin embargo, el desarrollo de resistencias a los ITC es común, pudiendo afectar al 10-15% de los pacientes que reciben imatinib y a menos de un 10% de los pacientes que reciben un ITC de segunda generación en primera línea, según la European Leukemia Net (ELN)⁽¹⁾. Las mutaciones en el dominio cinasa (DC) de *BCR-ABL1* son la causa más frecuente y mejor conocida de resistencia. Aunque su origen no está claro (hay indicios de que pueden ser consecuencia de la inestabilidad génica producida por BCR-ABL1), se ha demostrado que la prevalencia de mutaciones del DC de *BCR-ABL1* depende de la fase de la enfermedad y de la sensibilidad del método empleado para su estudio.

› Estudio de mutaciones en pacientes con fracaso al tratamiento con inhibidores de la tirosina cinasa

Hasta la fecha se han descrito más de 100 mutaciones puntuales del DC con más de 90 cambios de aminoácido y se siguen describiendo nuevas mutaciones con el empleo de nuevos inhibidores. Estas mutaciones se localizan con mayor frecuencia en ciertas regiones del DC, sobre todo en el *P-loop* (sitio de unión al ATP, residuos 244-255), por ejemplo, M244V, G250E, Y253F/H,

E255K/V y los sitios de contacto con el fármaco Thr315 y Phe317. También son comunes las mutaciones en el dominio catalítico (residuos 350-363) y el *A-loop* (residuos 381-402), aunque hay múltiples mutaciones descritas en otras regiones. Como consecuencia de la sustitución de un aminoácido se puede alterar la estructura de la oncoproteína BCR-ABL1, induciendo un cambio conformacional o perturbando los sitios de contacto con el ITC en el sitio de unión y así causando la pérdida de sensibilidad al fármaco.

Hoy en día se conoce el espectro de sensibilidad de la mayoría de las mutaciones descritas a los ITC disponibles. Se ha demostrado que algunas de las mutaciones tienen especial relevancia clínica, como la mutación T315I, la cual es única, dado que concede una falta de sensibilidad absoluta a imatinib, dasatinib, bosutinib y nilotinib. En el caso de la T315I, ponatinib o el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas son las únicas opciones terapéuticas.

Por otro lado, una mutación puntual en el mismo sitio puede producir diferencias marcadas en el nivel de resistencia a los fármacos. Un ejemplo es el de la treonina 315, donde la ELN recomienda nilotinib o bosutinib para el tratamiento de pacientes con T315A, mientras actualmente el único ITC aprobado para tratar pacientes con T315I es ponatinib.

› ¿Por qué es tan importante el estudio de mutaciones en pacientes que no responden al tratamiento con un inhibidor de la tirosina cinasa?

› Informan sobre la elección del inhibidor de la tirosina cinasa

Cuando se produce un fallo al tratamiento con el ITC, es necesario un cambio de fármaco debido al riesgo

sustancial de progresión de la LMC⁽¹⁾. Esta decisión es especialmente importante porque se ha demostrado que clonas con mutaciones en baja carga (por debajo del nivel de sensibilidad de la secuenciación Sanger) se expandieron cuando el ITC administrado no era apropiado según su espectro de sensibilidad⁽²⁾. Además, una terapia secuencial o con un ITC no adecuado puede producir la expansión de células policlónicas (un clon con múltiples mutaciones) y/o clones con mutaciones compuestas^(3,4).

Existen estudios que han demostrado que células que expresan BCR-ABL1 con mutaciones compuestas requieren un valor IC₅₀ del ITC mucho más alto para su inhibición que cuando la mutación es sencilla⁽⁵⁾. Por ejemplo, tanto BCR-ABL1 con la mutación V299L como F317L son sensibles a dasatinib, pero la mutación compuesta V299L/F317L es muy resistente. Algunas mutaciones compuestas tienen incluso resistencia a ponatinib. Dado que la presencia de mutaciones compuestas limita las opciones terapéuticas, el estudio de mutaciones en el DC en los pacientes con fracaso al tratamiento ITC es imprescindible para seleccionar la terapia apropiada.

Los ensayos clínicos con asciminib (ABL001), un inhibidor alostérico que no compite por el sitio de unión de ATP, han demostrado que este inhibidor es efectivo contra la mutación T315I⁽⁶⁾. Este mecanismo de inhibición diferente de BCR-ABL1 permite al fármaco tener eficacia contra mutaciones resistentes a los demás ITC salvo las producidas en el residuo F359 y plantea la posibilidad muy prometedora de una terapia combinada de asciminib con otros ITC, incluyendo ponatinib, para afrontar mutaciones compuestas que actualmente no son tratables⁽⁷⁾. En todo caso, el uso de asciminib no está aprobado actualmente por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS).

› Asociación con progresión de la enfermedad

Los ITC son muy efectivos en la fase crónica (FC) pero no es así en la crisis blástica (CB). Además, las mutaciones del DC de BCR-ABL1 son mucho más frecuentes en fases tardías, de tal manera que su prevalencia se estima en un 70-80% de los pacientes en CB en comparación con un 25-30% en FC⁽⁸⁾. Se ha demostrado una asociación clara entre el desarrollo de estas mutaciones durante el tratamiento con un ITC y una supervivencia libre de progresión más corta⁽⁹⁾, por lo

que se ha sugerido que la detección de mutaciones en el DC podría identificar pacientes con alto riesgo de progresión. En adición a la presencia de una mutación del DC, el tipo de mutación también puede influir en la supervivencia del paciente. En este sentido, hay estudios que demuestran que los pacientes que desarrollaron una mutación del *P-loop* durante el tratamiento con un ITC tenían mayor probabilidad de progresión y una supervivencia más corta en comparación con los que tenían mutaciones en otras regiones del DC⁽¹⁰⁾. Asimismo, la presencia de mutaciones compuestas se asoció con un peor pronóstico que se refleja en una supervivencia sin evento a los 4 años del 49% en pacientes con una mutación *versus* 0% en pacientes con mutaciones compuestas⁽¹¹⁾. Por tanto, el estudio de mutaciones en el DC de BCR-ABL1 puede tener valor pronóstico y contribuir al manejo óptimo del paciente en la clínica.

Finalmente, puesto que la transición de la FC a la CB también se ha asociado con el desarrollo de mutaciones en los genes *TP53*, *TET2*, *ASXL1*, *RUNX1*, *IDH1/2*, *GATA2* y *CBL*, entre otros⁽¹²⁾, en un futuro el análisis de mutaciones fuera del DC podría tener también relevancia.

› ¿Qué técnicas se deben emplear para el estudio mutacional de BCR-ABL1?

El método estándar para el estudio de mutaciones del DC de BCR-ABL1 ha sido hasta hace muy poco la secuenciación Sanger convencional. La sensibilidad de la secuenciación Sanger se sitúa entre el 15 y el 25%, por lo que pueden no detectarse mutaciones con baja carga alélica (< 20%). En años recientes, la secuenciación de nueva generación (*next generation sequencing* -NGS-) ha entrado en la práctica clínica habitual para el diagnóstico de pacientes en hematología y oncología. Debido a su mayor sensibilidad (1% o mayor), la NGS puede detectar mutaciones presentes en niveles que están por debajo del límite de detección de la secuenciación Sanger. Es importante destacar que hay estudios empleando la técnica de NGS que han confirmado que estas mutaciones de baja carga alélica también tienen relevancia clínica^(2,13). Por ejemplo, se ha comunicado que mutaciones responsables de la resistencia a una segunda línea (hasta con una VAF baja) eran detectables por NGS (hasta en un 43% de las muestras analizadas) en

niveles bajos al estudiar la misma muestra que había sido secuenciada por Sanger y había sido negativa en el momento del fallo a la primera línea de tratamiento⁽¹⁴⁾. Por tanto, la NGS puede detectar clones mutados emergentes meses antes que la secuenciación Sanger y, como consecuencia, podría haber informado sobre la elección de ITC de segunda línea más apropiado^(2,14,15).

Otra ventaja del uso de la NGS para el estudio mutacional es su capacidad para detectar mutaciones compuestas, ya que la secuenciación Sanger no puede distinguir entre 2 mutaciones en 2 clones distintos o un clon con una mutación compuesta.

Por todas las razones descritas, en las recomendaciones actualizadas de la ELN se recomienda el uso de la NGS para los estudios mutacionales en pacientes que no responden bien al ITC en la práctica clínica habitual⁽¹⁾.

» ¿Cuándo se deben estudiar las mutaciones en el dominio cinasa?

Aumentos progresivos en los niveles del transcrito BCR-ABL1 predicen el desarrollo de una mutación en *BCR-ABL1*. Por ello, la monitorización molecular de los transcritos BCR-ABL1 en intervalos regulares es de vital importancia para el seguimiento de los pacientes con LMC.

Según los criterios de la ELN, se recomienda el análisis de las mutaciones en el DC en todos los pacientes con una respuesta subóptima al tratamiento con el ITC o en pacientes con un ITC de larga duración que pierde en cualquier momento la respuesta molecular mayor (RMM) (Tabla 1). Su estudio también es imprescindible cada vez que se considera un cambio de terapia.

Aunque actualmente no hay recomendaciones sobre la frecuencia con la que deben realizarse estos análisis mutacionales, la repetición del estudio de mutaciones del DC podría estar indicada en los siguientes casos: si hay resultado negativo y respuesta subóptima, repetir como mínimo a los 6 meses; si hay resultado positivo, debido a la aparición secuencial de mutaciones clínicamente significativas a lo largo del tiempo (incluyendo mutaciones de baja carga y mutaciones compuestas)^(2,9), se recomienda la realización en más de una ocasión.

» ¿Son informativos los estudios de otras mutaciones en pacientes con fracaso al inhibidor de la tirosina cinasa?

Aparte de las mutaciones en el DC de *BCR-ABL1* (la causa más frecuente de resistencia) y la sobreexpresión de BCR-ABL1 en algunos casos, existen otros mecanismos de resistencia que son independientes de BCR-ABL1. Estos incluyen la activación de la vía de señalización de cinasas de la familia Src y mecanismos que afectan el metabolismo del ITC y a su concentración intracelular, como las enzimas del citocromo P450 y proteínas transportadoras. En ese sentido, se han descrito, por ejemplo, mutaciones y polimorfismos en los genes codificantes de transportadores *ABCB1* (*MDR1*), *SLC22A1* (*OCT1*) y *ABCG2*^(15,16).

Por tanto, en el caso de una resistencia sin la presencia de mutación puntual del DC, los estudios mutacionales de estos genes podrían informar en cierta manera sobre la elección del ITC de segunda (o posterior) línea. Por ejemplo, nilotinib y bosutinib no son buenos sustratos para el transportador P-glicoproteína (producto del gen *ABCB1*), mientras que dasatinib es un inhibidor de cinasas de la familia Src, por lo que

Tabla 1. Criterios de alarma y fallo en la respuesta al tratamiento con inhibidores de la tirosina cinasa (ITC)

| | Alarma | Fallo |
|----------------------|--|---|
| 3 meses | Ratio BCR-ABL1 > 10% | No RCH > 10% si se confirma dentro de 1-3 meses |
| 6 meses | Ratio BCR-ABL1 > 1-10% | Ratio BCR-ABL1 > 10% |
| 12 meses | Ratio BCR-ABL1 > 0,1-1% | Ratio BCR-ABL1 > 1% |
| En cualquier momento | Ratio BCR-ABL1 > 0,1-1% Pérdida de RMM ≤ 0,1% | Ratio BCR-ABL1 > 1%, detección de mutaciones en dominio cinasa y/o anomalías cromosómicas |

Adaptado de las recomendaciones de la European LeukemiaNet (ELN) (2020)⁽¹⁾
RCH: respuesta completa hematológica; RMM: respuesta molecular mayor

podría superar la resistencia debido a la activación de esta vía.

Además de mutaciones en el dominio DC de *ABL*, estudios recientes están identificando otros genes cuya mutación puede impactar la resistencia a los ITC independientemente de BCR-ABL1, entre ellos están *BIM1* y *PTCH1*^(17,18). Otros estudios genómicos han sugerido una asociación importante entre mutaciones en un grupo de genes que codifican moduladores epigenéticos y progresión de la LMC. Uno de ellos, por ejemplo, identificó una relación significativa entre las mutaciones en *ASXL1* y la progresión, y entre *TP53* y una peor respuesta al ITC⁽¹⁹⁾. Otro detectó variantes en genes incluyendo *ASXL1*, *IKZF1*, *DNMT3A* y *CREBBP* en el 30% de los pacientes en FC, la mayoría de ellos con respuesta no óptima a imatinib (41%)⁽²⁰⁾.

Por último, las vías de mTOR/autofagia, PI3K y señalización NF-κB también parecen estar implicadas en la resistencia al ITC y hay numerosos ensayos clínicos en marcha para determinar la eficacia de inhibidores específicos contra moléculas implicadas en estas vías para combatir la resistencia.

► Perspectivas futuras

En el futuro, el estudio mutacional de pacientes con LMC no solo será útil y sensible para elegir de forma adecuada el ITC, sino que también podría ayudar a predecir aquellos pacientes con mayor riesgo de progresión o incluso estratificar pacientes al diagnóstico según su probabilidad de responder bien al ITC. El uso de un panel de genes cuya mutación haya demostrado valor pronóstico en la LMC, de forma similar al estudio mutacional realizado de manera rutinaria en el diagnóstico de pacientes con leucemia mieloide aguda, facilitaría el abordaje del paciente al diagnóstico y en el momento del fallo al ITC. El diseño de semejante panel podría incluir genes cuya mutación haya sido descrita como mecanismo de resistencia a los ITC, por ejemplo, mutaciones en los genes transportadores como *ABCB1* y *SLC22A1*, y genes cuya mutación puede predecir respuesta a imatinib y/o progresión como *BIM1*, *PTCH1*, *IKZF1*, *RUNX1*, *BCORL1*, *IDH1* y *ASXL1*. Sin embargo, estas aproximaciones en la LMC están pendientes de validación y se necesitaría un proceso de estandarización.

► Bibliografía

- Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, Schiffer C, Apperley JF, Cervantes F, et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2020;34:966-84.
- Soverini S, Bavaro L, De Benedittis C, Martelli M, Iurlo A, Orofino N, et al. Prospective assessment of NGS-detectable mutations in CML patients with non-optimal response: the NEXT-in-CML study. *Blood*. 2020;135(8):534-41.
- Shah NP, Skaggs BJ, Branford S, Hughes TP, Nicoll JM, Paquette RL, Sawyers CL. Sequential ABL kinase inhibitor therapy selects for compound drug-resistant BCR-ABL mutations with altered oncogenic potency. *J Clin Invest*. 2007;117(9):2562-9.
- Khorashad JS, Kelley TW, Szankasi P, Mason CC, Soverini S, Adrian LT, et al. BCR-ABL1 compound mutations in tyrosine kinase inhibitor-resistant CML: frequency and clonal relationships. *Blood*. 2013;121:489-98.
- Gibbons DL, Pricl S, Posocco P, Laurini E, Fermeglia M, Sun H, et al. Molecular dynamics reveal BCR-ABL1 polymutants as a unique mechanism of resistance to PAN-BCR-ABL1 kinase inhibitor therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111:3550-5.
- Hughes TP, Mauro MJ, Cortes JE, Minami H, Rea D, DeAngelo DJ, et al. Asciminib in chronic myeloid leukemia after ABL kinase inhibitor failure. *N Engl J Med*. 2019;381(24):2315-26.
- Eide CA, Zabriskie MS, Savage Stevens SL, Antelope O, Vellore NA, Than H, et al. Combining the allosteric inhibitor asciminib with ponatinib suppresses emergence of and restores efficacy against highly resistant BCR-ABL1 mutants. *Cancer Cell*. 2019;36(4):431-43.e5.
- Soverini S, Colarossi S, Gnani A, Rosti G, Castagnetti F, Paoletti A, et al. Contribution of ABL kinase domain mutations to imatinib resistance in different subsets of Philadelphia-positive patients: By the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res*. 2006;12:7374-9.
- Khorashad JS, de Lavallade H, Apperley JF, Milojkovic D, Reid AG, Bua M, et al. Finding of kinase domain mutations in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia responding to imatinib may identify those at high risk of disease progression. *J Clin Oncol*. 2008;26(29):4806-13.
- Branford S, Rudzki Z, Walsh S, Parkinson I, Grigg A, Szer J, et al. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood*. 2003;102(1):276-83.
- Quintás-Cardama A, Kantarjian H, O'Brien S, Jabbour E, Borthakur G, Ravandi F, et al. Outcome of patients with chronic myeloid leukemia with multiple ABL1 kinase domain mutations receiving tyrosine kinase inhibitor therapy. *Haematologica*. 2011;96(6):918-21.
- Makishima H, Jankowska AM, McDevitt MA, O'Keefe C, Dujardin S, Cazzoli H, et al. CBL, CBLB, TET2, ASXL1, and IDH1/2 mutations and additional chromosomal aberrations constitute molecular events in chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 2011;117:e198-e206.

13. Soverini S, De Benedittis C, Polakova KM, Linhartova J, Castagnetti F, Gugliotta G, et al. Next-generation sequencing for sensitive detection of BCR-ABL1 mutations relevant to tyrosine kinase inhibitor choice in imatinib-resistant patients. *Oncotarget*. 2016;7(16):21982-90.
14. Machova Polakova K, Kulvait V, Benesova A, Linhartova J, Klamova H, Jaruskova M, et al. Next-generation deep sequencing improves detection of BCR-ABL1 kinase domain mutations emerging under tyrosine kinase inhibitor treatment of chronic myeloid leukemia patients in chronic phase. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2015;141(5):887-99.
15. Donato NJ, Wu JY, Stapley J, Gallick G, Lin H, Arlinghaus R, Talpaz M. BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571. *Blood*. 2003;101:690-8.
16. Angelini S, Soverini S, Ravegnini G, Barnett M, Turrini E, Thornquist M, et al. Association between imatinib transporters and metabolizing enzymes genotype and response in newly diagnosed chronic myeloid leukemia patients receiving imatinib therapy. *Haematologica*. 2013;98:193-200.
17. Ng K, Hillmer A, Chuah C, Juan WC, Ko TK, Teo AS, et al. A common *BIM* deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer. *Nat Med*. 2012;18:521-8.
18. Alonso-Domínguez JM, Casado LF, Anguita E, Gómez-Casares MT, Buño I, Ferrer-Marín F, et al. *PTCH1* is a reliable marker for predicting imatinib response in chronic myeloid leukemia patients in chronic phase. *PLoS One*. 2017;12(7):e0181366.
19. Kim T, Tyndel MS, Kim HJ, Ahn JS, Choi SH, Park HJ, et al. Spectrum of somatic mutation dynamics in chronic myeloid leukemia following tyrosine kinase inhibitor therapy. *Blood*. 2017;129(1):38-47.
20. Nteliopoulos G, Bazeos A, Claudiani S, Gerrard G, Curry E, Szydlo R, et al. Somatic variants in epigenetic modifiers can predict failure of response to imatinib but not to second-generation tyrosine kinase inhibitors. *Haematologica*. 2019;104(12):2400-9.

Nuevos enfoques en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica (LMC). Más allá del tratamiento con inhibidores de la tirosina cinasa: papel del asciminib (ABL001) en la LMC

Dr. Luis Felipe Casado Montero

Servicio de Hematología y Hemoterapia. Complejo Hospitalario de Toledo

› Resumen

El asciminib es un nuevo inhibidor alostérico que se une al sitio miristoilo de la proteína BCR-ABL1, bloqueando su conformación inactiva a través de un mecanismo distinto al de todos los demás inhibidores de la tirosina cinasa (ITK). Asciminib se dirige contra BCR-ABL1 nativo y mutado, incluyendo la mutación T315I. Conocemos únicamente los resultados del estudio de fase 1 donde se incluyeron 141 pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) en fase crónica (FC) y 9 en fase acelerada (FA) que tenían resistencia o intolerancia al menos a 2 ITKs competitivos con ATP. El objetivo principal era determinar la dosis máxima tolerada y la dosis recomendada. Asciminib se administró 1 o 2 veces al día (a dosis entre 10 y 200 mg). La mediana de seguimiento fue de 14 meses. El 70% (105 de 150 pacientes) había recibido al menos 3 ITKs. No se alcanzó la dosis máxima tolerada de asciminib. Entre los pacientes con LMC en FC, 34 (92%) tuvieron una respuesta hematológica completa (RHC) y 31 (54%) sin una respuesta citogenética completa (RCyC) al inicio del estudio la alcanzaron. Se logró o mantuvo respuesta molecular mayor (RMM) a los 12 meses en el 48% de los pacientes, incluidos 8 de 14 (57%) con resistencia o intolerancia a ponatinib. Se logró o mantuvo una RMM a los 12 meses en 5 pacientes (28%) con la mutación T315I.

Se mantuvo una RMM en 40 de 44 pacientes. Los efectos tóxicos limitantes de dosis fueron elevaciones asintomáticas de lipasa y pancreatitis clínica. Los efectos adversos (EA) más comunes fueron fatiga, cefalea, artralgia, hipertensión y trombocitopenia. Por tanto, asciminib es activo en pacientes con LMC muy pret tratados con resistencia o intolerancia a múltiples ITKs incluyendo ponatinib y ofrece una nueva oportunidad

a este selecto grupo de pacientes, incluidos los que presentan la mutación T315I. El desarrollo futuro del fármaco es muy prometedor tanto en situaciones más tempranas como en combinación con otros ITKs.

› El ABL

El gen ABL1 en mamíferos codifica la tirosina cinasa ABL que se expresa ubicuamente⁽¹⁾. En respuesta a factores de crecimiento, citocinas, adhesión celular, daño en el ADN o al estrés oxidativo, se activa para estimular la proliferación o la diferenciación celular, la supervivencia o la muerte, y la retracción o la migración. ABL también regula funciones más especializadas, como la señalización del receptor de antígeno en los linfocitos, la formación de sinapsis en las neuronas y la adhesión bacteriana a las células epiteliales intestinales. Aunque se descubrió como el protooncogén del virus de la leucemia de Abelson (oncogén Gag-v-Abl), los estudios recientes lo relacionan con la degeneración neuronal. ABL se desplaza entre el núcleo y el citoplasma, donde se une al ADN y a la actina, modificando funciones fundamentales en una gran variedad de tejidos en casi todos los procesos biológicos.

› Dominios funcionales

El gen ABL conserva en todos los metazoos los dominios N-terminal SH3, SH2, la cinasa y el dominio de unión a actina C-terminal (ABD) y en los vertebrados además un gen ABL (Abl1) o ARG (Abl2)⁽¹⁾. El gen ABL1 de mamífero codifica 2 variantes (Ia e Ib) con diferentes secuencias N-terminales que se transcriben por 2 promotores distintos. La variante Ib contiene un

sitio de miristoilación N-terminal que no se encuentra en la variante Ia. Al revisar la estructura cristalina de la cinasa, se ve cómo SH3-SH2 se inserta en el sitio miristoilo del lóbulo C de la cinasa y esta interacción SH2-C-lóbulo produce su autoinhibición. Esta autoinhibición se pierde en las oncoproteínas BCR-ABL, Gag-v-Abl y en la variante Ia. Ninguna de las proteínas o sustratos que interactúan con ABL muestran especificidad de variante, por lo que su diversidad funcional no se entiende.

› Tolerancia a los inhibidores de ABL/ARG cinasa (ITK)

Aunque ABL y ARG son esenciales para el desarrollo embrionario, los ITK como imatinib (IMA), dasatinib (DASA) y nilotinib (NILO) son bien tolerados durante muchos años en pacientes con LMC. Esta tolerancia puede explicarse por 3 alternativas no excluyentes: a) la función de la cinasa es esencial solo en la embriogénesis y es prescindible en la vida adulta; b) los ITKs no bloquean completamente la función de la cinasa; y c) las proteínas ABL/ARG, pero no su actividad cinasa, llevan a cabo las funciones esenciales no bloqueadas por los ITKs.

› BCR-ABL

BCR-ABL es una proteína de fusión oncogénica cuya expresión permite la tumorigénesis de la LMC. BCR-ABL se activa continuamente porque la fusión de ABL con BCR dificulta la inhibición por la abrazadera SH3-SH2. La pérdida del exón 1 de ABL conlleva la pérdida del sitio para el miristato; sin embargo, el bolsillo no se pierde en la translocación. Por tanto, es atacable si se imita el papel del péptido miristato con un fármaco que doble y cierre la cinasa. Esta interacción es compatible con otros ITKs que bloquean el dominio catalítico del ATP.

› Asciminib (ABL001)

› Desarrollo de asciminib

Estudios preliminares mostraron cómo pequeñas moléculas se podían unir al bolsillo miristoilo de BCR-ABL e inhibir la actividad de la cinasa a través de un mecanismo alostérico. Desafortunadamente, estas moléculas tenían una potencia limitada y carecían de actividad contra la mutación BCR-ABL T315I. Em-

pleando cristalografía y un estudio conformacional basado en resonancia magnética nuclear (RMN), se optimizaron para mejorar la potencia, la selectividad y la farmacocinética *in vivo* que permitió la identificación de ABL001⁽²⁾. ABL001 (asciminib) se une de forma potente (KD = 0,5-0,8 nM) y selectivamente al bolsillo miristoilo de ABL1 e induce la conformación de la hélice C-terminal requerida para la inducción del estado inactivo. Por lo tanto, la unión de asciminib imita las consecuencias estructurales de la unión del extremo N miristoilado del ABL que proporciona la autoinhibición, perdida en la fusión BCR-ABL.

A diferencia de los sitios de unión a ATP casi ubicuos, las bolsas de unión a miristoilo del ABL se han encontrado en muy pocas cinasas, como SRC. Por eso, asciminib carece de actividad contra todas las cinasas a concentraciones de hasta 10 μM, incluida la SRC cinasa y es la razón de su gran especificidad. Además, no afectó la fosforilación de CRKL como DASA o NILO. El asciminib inhibe selectivamente la proliferación de las líneas celulares de LMC y de leucemia linfoblástica aguda Filadelfia positiva (LLA-Ph¹) que expresan BCR-ABL. En un modelo de xenoinjerto subcutáneo murino (KCL-22), el asciminib consiguió regresión tumoral a una dosis de 7,5 mg/kg/12 h y su eficacia se correlacionó con la inhibición completa del marcador farmacodinámico STAT5. Asciminib es un sustrato de los transportadores ABCB1 y ABCG2. La sobreexpresión de estos lleva a la resistencia al asciminib y su inhibición mejora la sensibilidad. El perfil de especificidad tan estrecho del asciminib (solo ABL1 y ABL2) es probable que sea ventajoso para la eficacia selectiva en LMC y la toxicidad limitada, pero la alta selectividad también puede limitar su eficacia. Por ejemplo, la inhibición de KIT mejora los efectos de IMA, lo que sugiere que el asciminib como agente único puede presentar mayores mecanismos de resistencia. Las células madre CD34+CD38- de LMC son insensibles a la inhibición de la actividad de la cinasa BCR-ABL1 y dependen de otras vías auxiliares para su supervivencia.

La alta selectividad de asciminib también sugiere que solo o en combinación con otros ITKs será poco eficaz en la eliminación de las células madre leucémicas. No obstante, una combinación de inhibidores del sitio miristoilo y del sitio catalítico puede crear una barrera genética para el desarrollo de resistencias adquiridas al evitar la mutación y plantean la posibilidad de que la inhibición dual podría conducir a mejores respuestas profundas⁽³⁾. La combinación *in vitro*

con NILO tiene un fuerte efecto sinérgico. Además, la combinación de asciminib con ponatinib puede erradicar mutantes compuestos altamente resistentes⁽⁴⁾. Primero, aprovechando la sinergia entre diferentes mecanismos de inhibición (alostérica y catalítica) y, en segundo lugar, por la aditividad de 2 ITKs con perfiles de resistencia parcialmente superpuestos pero que combinados pueden inhibir cooperando los mutantes compuestos BCR-ABL1 más resistentes.

► **Propiedades farmacológicas⁽⁵⁾**

Asciminib es un fármaco que se administra por vía oral. Es una fenil-piridina carboxamida que se une alostéricamente al bolsillo vacío de miristoilo de ABL1 y ABL2. Los estudios farmacocinéticos preclínicos de asciminib en mamíferos mostraron un aclaramiento bajo a moderado, un volumen de distribución moderado y una semivida terminal aparente corta, mientras que la biodisponibilidad varió de una especie a otra. Se observó una alta unión a proteínas plasmáticas en todas las especies analizadas. Se metaboliza por glucuronidación por varias enzimas UGT (UGT1A3, UGT1A4, UGT2B7 y UGT2B17), seguido de un metabolismo oxidativo catalizado por varias enzimas del citocromo P450 (CYP), siendo CYP3A4/5 la más potente, seguida de CYP2C8, CYP4F12 y potencialmente CYP2D6.

Asciminib se distribuye ampliamente a la mayoría de los tejidos (a excepción del sistema nervioso central -SNC- y las gónadas). Después de la administración, asciminib es la forma circulante predominante. Existe un efecto negativo de los alimentos, ya que los bajos en grasas disminuyen la biodisponibilidad en un 35% y los de alto contenido la disminuyen en un 65%. Es absorbido con un $T_{máx}$ de 3 h, independiente de la dosis. La $C_{máx}$ y el área bajo la curva (AUC) aumentaron casi proporcionalmente a la dosis. El estado estable se alcanzó el día 15. Muestra eficacia *in vitro* contra todas las mutaciones catalíticas, incluidas las del bucle P y la T315I, en el rango de 1-12 nM.

► **Resultados clínicos iniciales con asciminib en leucemia mieloide crónica⁽⁶⁾**

La información clínica del asciminib proviene del ensayo clínico fase I que se ha comunicado de forma provisional en varios congresos internacionales y que ha culminado con la publicación reciente de los resultados globales en el *New England Journal of Medicine*.

► **Comunicación en el American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting and Exposition de 2015⁽⁷⁾**

Son los primeros resultados del ensayo fase 1 abierto y multicéntrico para pacientes con LMC en FC o FA con fallo a ≥ 2 ITKs debido a resistencia o intolerancia. Los 35 primeros pacientes muy tratados previamente -20 (57%) habían recibido ≥ 3 ITKs- recibieron asciminib a dosis de entre 10 y 150 mg sin alcanzar la máxima dosis tolerada (MDT). Únicamente 5 de 35 interrumpieron: por progresión (1), efectos adversos (EA; 3) y trasplante de médula ósea (TMO; 1). Los EA de grado (G) 3/4 más comunes fueron anemia (9%), trombocitopenia (6%), neutropenia (6%) y aumento de la lipasa (6%). Se vieron importantes tasas de respuesta, ya que todos los pacientes con RHC, RCyC o RMM al inicio del estudio la mantuvieron. Además, mejoraron las respuestas: 5 de 5 lograron RHC en 3 meses, 9 de 11 lograron una RCyM a los 3 meses, incluidos 6 que lograron RCyC. Además, 5 de 17 lograron una RMM a los 5 meses. Se observó actividad clínica en mutaciones resistentes a otros ITKs, incluidas Y253H y V299L. Solo un paciente en FA había recaído con una mutación en la bolsa de miristoilo.

► **Comunicación en el ASH Annual Meeting and Exposition de 2016⁽⁸⁾**

Se ampliaron los resultados del ensayo anterior con 101 pacientes, 67 con LMC y 6 LLA Ph¹ con diferentes dosis de 10 a 200 mg/12 h (19 con 80 a 200 mg/24 h y 9 con combinaciones), sin alcanzar MDT. Se recomendó una dosis de 40 mg/12 h para pacientes con LMC en FC. Eran pacientes muy tratados, 65 (65%) habían recibido > 2 ITKs anteriores y 70 fueron resistentes al último. Solo discontinuaron 17 -por progresión (6), EA (7) y retirada de consentimiento (4)-, con una exposición media de 34 semanas. Hubo 5 toxicidades limitantes de dosis (DLT): 2 elevaciones de lipasa G2, 1 artralgia G2, 1 síndrome coronario agudo y 1 broncoespasmo G3. Se produjeron 3 casos de pancreatitis aguda G2 a dosis ≥ 80 mg/12 h.

Los EA de G3/4 más comunes se mantuvieron: aumento de lipasa (8%), trombocitopenia (7%), anemia (5%) y neutropenia (4%). Se mantuvieron los niveles de respuesta previos: 7/9 alcanzaron RCyC a los 6 meses y los 7 la mantuvieron a los 12 meses; 13 de 55 (23,6%), 16 de 37 (43,2%) y 20 de 55 (57,1%) lograron o mantuvieron RMM a 3, 6 y 12 meses, respectivamente. De 47 con BCR-ABL basal $> 0,1\%$ IS, 6 de 47 (12,8%), 9 de

30 (30%) y 13 de 28 (46,4%) lograron RMM a los 3, 6 y 12 meses, respectivamente. De los 32 con BCR-ABL basal $\leq 10\%$ IS, 4 (12,5%), 9 (28%) y 11 (34%) lograron una reducción ≥ 1 log del BCR-ABL% IS a los 3, 6 y 9 meses, respectivamente, y mantenidas a los 12 meses. Se observó actividad clínica en múltiples mutaciones resistentes a otros ITKs. De 7 pacientes con T3151I, 3 lograron RCyC y 1 RMM, con una mediana de seguimiento de 8 meses. Solo 1 de 6 tenía mutaciones detectables del bolsillo miristoilo (V468F, I502L).

► *Pacientes con mutación T315I, comunicación del ASH Annual Meeting and Exposition de 2018⁽⁹⁾*

Se comunican los resultados específicos de los 24 pacientes del ensayo fase 1 con la mutación T315I. Eran elegibles después de ≥ 1 ITK, sin enfermedades cardiovasculares (CV) y tratados con asciminib 200 mg/12 h. En el momento del análisis, 23 de 24 (95,8%) se mantenían en tratamiento y solo uno (4,2%) discontinuó, con una mediana de seguimiento de 28,5 semanas. Ponatinib fue el último tratamiento en la mitad (12/24; 50%) y los pacientes *naïve* para ponatinib tenían factores de riesgo CV. Los resultados fueron esperanzadores para este grupo, ya que lograron RMM en 24 semanas 8/24; uno logró RMM después de 24 semanas. De los pacientes con BCR-ABL1 $< 10\%$ y $\geq 1\%$, 6/10 (60%) lograron una reducción ≥ 1 -log en 24 semanas. Tanto los pacientes *naïve* como los resistentes a ponatinib lograron RMM en 24 semanas (5/11 y 3/13). Los EA más frecuentes de cualquier G fueron artralgia, fatiga, aumento de lipasa y náuseas, similares a los comunicados previamente. Los autores consideraron que asciminib podría ser una nueva opción para los pacientes con LMC con la mutación T315I que no son elegibles o son resistentes a ponatinib.

► *Pacientes con BCR-ABL1 $\leq 1\%$ ⁽¹⁰⁾*

Recientemente, se ha comunicado este grupo específico de pacientes del ensayo fase 1. Se incluyeron 48 pacientes en 9 cohortes de dosis. La duración media del tratamiento fue de 161 semanas, con 42 pacientes (87,5%) todavía en tratamiento y 36 (75,0%) en RMM o mejor.

► *Publicación del ensayo fase 1⁽⁶⁾*

Se trata de un ensayo realizado para determinar la seguridad, la DMT, la dosis recomendada, la farmaco-

cinética y la actividad antileucémica de asciminib en pacientes con LMC después del fracaso a múltiples ITKs. Participaron 150 pacientes, de los cuales el 70% había recibido ≥ 3 ITKs y el 31% tenía al menos una mutación, la más común T315I.

► *Efectos adversos. Perfil de seguridad*

Se investigaron 7 niveles de dosis cada 12 h: 10 mg (1 paciente), 20 mg (14 pacientes), 40 mg (35 pacientes), 80 mg (12 pacientes), 150 mg (13 pacientes), 160 mg (7 pacientes) y 200 mg (16 pacientes) con 5 TLD: elevaciones de lipasa en 2 pacientes con 40 mg, mialgia y artralgia en 1 paciente con 80 mg, síndrome coronario agudo G3 en uno con 150 mg y broncoespasmo G3 en otro con 200 mg. En los tratados una vez al día, había 3 niveles de dosis: 80 mg (18 pacientes), 120 mg (22 pacientes) y 200 mg (12 pacientes) con 3 TLD en pacientes que recibieron 200 mg: una pancreatitis clínica G3, una elevación asintomática de lipasa G3 y dolor abdominal G3. Los EA no hematológicos más comunes fueron elevaciones asintomáticas en el nivel de lipasa o amilasa, *rash* cutáneo y síntomas constitucionales (por ejemplo, fatiga, náuseas, cefalea y artralgia), de los cuales el 92% eran G1-2. La hipertensión (19% de los pacientes) fue el evento adverso CV más frecuente. La pancreatitis clínica, marcada por dolor abdominal y elevación en el nivel de lipasa, ocurrió en 5 pacientes.

► *Farmacocinética*

Existe una relación entre la dosis y la concentración sanguínea máxima o el AUC para cada nivel de dosis en los días 1 y 29. La semivida fue de aproximadamente 8 horas, lo que sugiere una estabilidad en el día 3. Tanto para la dosis de 40 mg/12 h como para la de 80 mg/24 h, las concentraciones sanguíneas mínimas superaron la concentración inhibitoria preclínica del 90% en un modelo animal de xenoinjerto (medido por inhibición de pSTAST5).

► *Actividad antileucémica*

► *Pacientes con leucemia mieloide crónica en fase crónica sin una mutación T315I*

De los 113 con LMC en FC sin la mutación T315I que recibieron asciminib, 34 de 37 (92%) sin RHC al inicio del estudio la consiguieron. De 57 sin una RCyC, 31 (54%)

la alcanzaron en un tiempo medio de 24 semanas. Se logró o se mantuvo una RMM a los 6 meses en 37 de 99 (37%) y a los 12 meses en 44 de 91 (48%). De los 91 pacientes, 30 de 40 (75%) con una ratio BCR-ABL1IS basal $\leq 1\%$ alcanzaron una RMM a los 12 meses, mientras que 14 de 51 (27%) con una ratio de más del 1% tuvieron una RMM a los 12 meses. De los 85 pacientes sin una respuesta molecular profunda (RMP; BCR-ABL1IS $\leq 0,01\%$) al inicio del estudio, 17 (20%) la tuvieron a los 12 meses. A los 12 meses, 57 de 91 (63%) tuvieron una mejora en su categoría de respuesta molecular. Se observaron respuestas hematológicas, citogenéticas y moleculares en todas las dosis.

► Pacientes con leucemia mieloide crónica en fase crónica con una mutación T315I

Entre los 28 pacientes con una mutación T315I, 14 de 16 (88%) sin una RHC al inicio del estudio la alcanzaron. De los 22 sin una RCyC, 9 (41%) la obtuvieron en un tiempo medio de 8 semanas. Se logró una RMM en 4 de 17 pacientes (24%) y se mantuvo en 1 a los 12 meses, con 9 de 18 (50%) mostrando una mejora en su categoría de respuesta molecular (RM) a los 12. De 5 pacientes con una mutación T315I con resistencia al ponatinib, uno (20%) tuvo una RMM a los 12 meses. Tres de 4 pacientes (75%) con RMM recibieron una dosis de más de 150 mg 2 veces al día. Los 5 pacientes con la mutación T315I en los que se logró o mantuvo una RMM continuaron recibiendo tratamiento y mantenían la respuesta en el momento del análisis.

► Pacientes con leucemia mieloide crónica en fase acelerada

Entre los 9 pacientes en FA, 7 de 8 (88%) tuvieron RHC y 1 de 9 (11%) tuvo una RMM, mantenida durante más de 11 semanas.

► Desarrollo de mutaciones de bolsillo de miristoilo

Se detectaron nuevas mutaciones de bolsillo de miristoilo en 2 de 20 pacientes que progresaron durante el tratamiento con asciminib y en 2 de 66 sin evidencia de progresión tras 12 meses de tratamiento (I502L y V468F). En 4 con progresión antes de los 12 meses no se realizó el análisis por no disponibilidad de la muestra. Un paciente en FC con una ratio de 8,1% y una mutación E255K al inicio recibió asciminib 40 mg/12 h

y obtuvo una RMM a los 6 meses, pero progresó con una nueva mutación G463S en el bolsillo de miristoilo en la semana 50 de tratamiento.

► Conclusiones

Asciminib obtuvo importantes tasas de respuestas duraderas en una población altamente tratada de pacientes con LMC en FC o FA en quienes el tratamiento con ITKs competitivos con el ATP había fallado. Los efectos secundarios principales fueron elevaciones asintomáticas en el nivel de lipasa o amilasa, *rash* y síntomas constitucionales. No se alcanzó la DMT. Se observó pancreatitis clínica en el 3% con dosis de asciminib de más de 40 mg 2 veces al día, pero fue manejable con modificaciones de dosis. En los pacientes con LMC en FC sin la mutación T315I, las tasas de RCyC y RMM a los 12 meses fueron del 70 y el 48%, respectivamente. Se logró o se mantuvo una RMP durante el estudio en el 60% de los pacientes que comenzaron con un BCR-ABL1IS $\leq 0,1\%$. Se logró RCyC y RMM en pacientes con una mutación T315I, con dosis de asciminib de más de 150 mg/12 h, mayor que las dosis requeridas para lograrlo en pacientes sin una mutación T315I. Este hallazgo sustenta las observaciones *in vitro* de que las concentraciones de asciminib necesarias para alcanzar la concentración inhibitoria máxima fueron de 5 a 10 veces superiores en líneas celulares con mutación T315I que sin ella. Esto ofrece una nueva opción en pacientes que no toleran o tienen resistencia a ponatinib como alternativa al TMO.

► Resultados iniciales de las combinaciones

► Con imatinib^(6,11)

Solo 25 pacientes recibieron tratamiento con dosis de asciminib (40, 60 u 80 mg/24 h o 40 mg/12 h) combinados con IMA 400 mg/24 h. De ellos, 8 interrumpieron el tratamiento por decisión del médico/paciente (4), EA (2), embarazo (1) y progresión (1). Los EA más frecuentes de cualquier G fueron náuseas (32%), aumento de la lipasa (20%), dolor abdominal, edema periférico y vómitos (16% cada uno). Se observó interacción entre asciminib e IMA: el AUC y la C_{máx} de asciminib aumentaron en presencia de IMA, mientras que la PK de IMA no se vio afectada por asciminib. Se consiguieron mejoras de la RM $< 1\%$ en 9/15 (60%), RMM en 8/19 (42%) y RM 4,5 en 3/20 (15%). Revisando la eficacia ge-

neral, la seguridad y los datos de PK de este estudio, se seleccionaron 2 dosis de asciminib de 40 y 60 mg/24 h para un ensayo en fase 2 actualmente en curso.

› Con nilotinib o dasatinib⁽¹²⁾

Se comunicaron los resultados de las combinaciones con NILO (17 pacientes) y DASA (17 pacientes) asignados según la intolerancia previa. Para NILO 300 mg/12 h, recibieron asciminib 20 o 40 mg/12 h. Para DASA 100 mg/24 h los pacientes recibieron asciminib 40 mg/12 h u 80 mg/24 h. Mantuvieron la combinación 9 (53%) con NILO y 14 (82%) con DASA. Las interrupciones fueron por decisión del médico/paciente (6), progresión (3) y EA (2). Para NILO, los EA más comunes fueron mialgia (35%), aumento de lipasa (29%) y aumento de amilasa, fatiga y prurito (24% cada uno). Para DASA, aumento de la lipasa (35%) y diarrea, dolor de cabeza y náuseas (18% cada uno). Se observó interacción fármaco-fármaco (DDI) para NILO: el AUC y la C_{máx} de asciminib aumentaron ≈2 veces cuando se combinó con NILO, mientras que la PK de NILO no se vio afectada por el asciminib. No se observó DDI entre asciminib y DASA. Se encontraron mejoras de la RM en ambas cohortes: NILO 6/14 (43%) y DASA 5/9 (56%). Se consiguieron RMM: NILO 4/13 (31%) y DASA 5/14 (36%). Estos resultados permiten seguir con los estudios de combinaciones.

› Nuevos ensayos

Un estudio de fase 3 en curso (NCT03106779) está evaluando asciminib frente a bosutinib en pacientes intolerantes, previamente tratados con ≥ 2 ITKs catalíticos⁽¹³⁾.

Un estudio de fase 2 evalúa la eficacia de agregar asciminib a IMA en pacientes con LMC en FC que no han logrado RMP (ratio de ≤ 1% a > 0,01%) con IMA de primera línea a largo plazo (CABL001E2201; NCT03578367)⁽¹⁴⁾. El estudio evalúa 4 brazos (ASC4MORE) (asciminib 40 o 60 mg/24 h con IMA 400 mg/24 h, continuar con IMA 400 mg/24 h o cambio a NILO 300 mg/12 h).

› Bibliografía

1. Wang JY. The capable ABL: what is its biological function? *Mol Cell Biol.* 2014 Apr;34(7):1188-97.

2. Wylie AA, Schoepfer J, Jahnke W, Cowan-Jacob SW, Loo A, Furet P, et al. The allosteric inhibitor ABL001 enables dual targeting of BCR-ABL1. *Nature.* 2017 Mar 30;543(7647):733-7.

3. G Lindström HJ, Friedman R. The effects of combination treatments on drug resistance in chronic myeloid leukaemia: an evaluation of the tyrosine kinase inhibitors axitinib and asciminib. *BMC Cancer.* 2020 May 7;20(1):397.

4. Eide CA, Zabriskie MS, Savage Stevens SL, Antelope O, Vellore NA, Than H, et al. Combining the Allosteric Inhibitor Asciminib with Ponatinib Suppresses Emergence of and Restores Efficacy against Highly Resistant BCR-ABL1 Mutants. *Cancer Cell.* 2019;36(4):431-43.e5.

5. Menssen HD, Quinlan M, Kemp C, Tian X. Relative Bioavailability and Food Effect Evaluation for 2 Tablet Formulations of Asciminib in a 2-Arm, Crossover, Randomized, Open-Label Study in Healthy Volunteers. *Clin Pharmacol Drug Dev.* 2019 Apr;8(3):385-94.

6. Hughes TP, Mauro MJ, Cortes JE, Minami H, Rea D, DeAngelo DJ, et al. Asciminib in Chronic Myeloid Leukemia after ABL Kinase Inhibitor Failure. *N Engl J Med.* 2019;381(24):2315-26.

7. Ottmann OG, Alimena G, DeAngelo DJ, Goh YT, Heinrich MC, Hochhaus A, et al. ABL001, a Potent, Allosteric Inhibitor of BCR-ABL, Exhibits Safety and Promising Single-Agent Activity in a Phase I Study of Patients with CML with Failure of Prior TKI Therapy. *Blood.* 2015;126(23):138.

8. Hughes TP, Goh YT, Ottmann OG, Minami H, Rea D, Lang F, et al. Expanded Phase 1 Study of ABL001, a Potent, Allosteric Inhibitor of BCR-ABL, Reveals Significant and Durable Responses in Patients with CML-Chronic Phase with Failure of Prior TKI Therapy. *Blood.* 2016;128(22):625.

9. Rea D, Lang F, Kim DW, Cortes JE, Hughes TP, Minami H, et al. Asciminib, a Specific Allosteric BCR-ABL1 Inhibitor, in Patients with Chronic Myeloid Leukemia Carrying the T315I Mutation in a Phase 1 Trial. *Blood.* 2018;132(Supplement 1):792.

10. Hughes TP, Mauro MJ, Kim DW, Cortes JE, Rea D, Minami H. Asciminib in heavily pretreated patients (pts) with Philadelphia chromosome-positive (Ph+) chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP) sensitive to tyrosine kinase inhibitor (TKI) therapy. *EHA 2020. Abstract S170.*

11. Cortes JE, Lang F, Kim DW, Rea D, Mauro MJ, Minami H, et al. Combination therapy using asciminib plus imatinib (ima) in patients (pts) with chronic myeloid leukemia (CML): results from a phase 1 study. *HemaSphere.* 2019;3(S1):397.

12. Mauro MJ, Kim DW, Cortes JE, Rea D, Hughes TP, Minami H, et al. Combination of asciminib plus nilotinib (nil) or dasatinib (das) in patients (pts) with chronic myeloid leukemia (CML): results from a phase 1 study. *HemaSphere.* 2019;3(S1):397-8.

13. Mauro MJ, Hochhaus A, Boquimpani C, Minami Y, Allepuz A, Polydoros F, et al. A multicenter, randomized phase III study of asciminib (ABL001) versus bosutinib in patients (pts) with chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP) previously treated with ≥2 tyrosine kinase inhibitors (TKIs). *J Clin Oncol.* 2019;37(15_suppl):TPS7070.

14. Saglio G, Hughes TP, Geissler J, Kapoor S, Longin AS, Mukherjee A, et al. Randomized, Open-Label, Multicenter, Phase 2 Study of Asciminib (ABL001) As an Add-on to Imatinib Versus Continued Imatinib Versus Switch to Nilotinib in Patients with Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase Who Have Not Achieved a Deep Molecular Response with Frontline Imatinib. *Blood.* 2019;134(Supplement_1):5910.

¿Es la discontinuación del tratamiento el objetivo principal a medio plazo en la leucemia mieloide crónica? De los resultados de ensayos clínicos a la vida real

Raúl Pérez López

Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca. Murcia

› Introducción

La leucemia mieloide crónica (LMC) puede ser el ejemplo de la enfermedad neoplásica que en unos pocos años ha pasado de tener una evolución nefasta donde solo el interferón y el trasplante hematopoyético podrían cambiar el pronóstico de la enfermedad, aunque solo efectivo en menos del 20% de los pacientes, a la aparición del primer inhibidor de la tirosina cinasa (ITK), imatinib, dando un giro radical al pronóstico; así, los pacientes presentan hoy en día una esperanza de vida casi similar a la de la población general⁽¹⁾.

Más aún, desde hace unos años nos planteamos la posibilidad de suspender el tratamiento sin que reaparezca la enfermedad.

Antes de contestar a la pregunta que nos planteamos en el título, hay que plantearse otras para poder dar una respuesta adecuada:

- ¿Por qué la discontinuación?
- ¿Es segura para el paciente la discontinuación?
- ¿Es efectiva la discontinuación?

› ¿Por qué la discontinuación?⁽²⁾

Si ya con imatinib la esperanza de vida de los pacientes se acercaba a la de la población general, unos pocos años después aparecieron nuevos tratamientos de segunda (dasatinib, nilotinib, bosutinib) y de tercera generación (ponatinib) que rescataban a aquellos pacientes que no respondían a imatinib (resistencia primaria o por mutaciones) o que presentaban efectos secundarios no controlables, dejando una pequeña proporción de pacientes en los que la enfermedad no está controlada⁽³⁾.

Entonces, si tomando 1 o 2 comprimidos al día podemos frenar la enfermedad, ¿para qué intentar suspender el tratamiento?

La calidad de vida de los pacientes con LMC y factores farmacológicos/económicos constituyen 2 problemas que pueden responder a esta pregunta.

› Calidad de vida/Efectos secundarios⁽⁴⁻⁷⁾

Es importante destacar que mejorar la calidad de vida puede proporcionar una justificación suficiente para la consideración de la discontinuación. Los pacientes más jóvenes pueden ser impulsados por un deseo de disminuir el potencial de eventos adversos futuros o por objetivos personales/familiares, como puede ser en mujeres en edad fértil el deseo de ser madres, mientras que los pacientes mayores pueden tratar de mitigar los eventos adversos que experimentan actualmente con la terapia ITK.

Los eventos adversos con ITK han sido bien documentados y la posibilidad de mitigarlos puede persuadir a algunos pacientes a buscar la remisión libre de tratamiento (RLT). Así, imatinib presenta como reacciones adversas más frecuentes la astenia y la retención de líquidos, mientras los efectos adversos más destacables de nilotinib son del tipo cardiovascular (que comparte con ponatinib), así como hiperglucemias, alteraciones pancreáticas...; dasatinib sobre todo pulmonares (derrame pleural, hipertensión pulmonar...) y, aunque bosutinib pareciera tener menor aparición de complicaciones, tampoco está libre y puede provocar diarrea, hipertensión pulmonar...

Los pacientes con LMC presentan una peor calidad de vida en comparación con individuos sanos, particularmente si los pacientes son más jóvenes y sobre todo en mujeres. Esto se ha visto en diferentes ensayos y estudios donde se hicieron cuestionarios de calidad de vida.

› Coste económico⁽⁴⁾

Aunque en nuestro país el tratamiento de la LMC no provoca un gasto económico directo en el paciente, el costo de los pacientes es muy alto, a pesar de la aparición en los últimos años del imatinib genérico; y este puede ser otro punto importante para la valoración de la RLT. Aquí conviene reseñar que, aunque las recomendaciones de los expertos no diferencian entre los ITK a la hora de poder discontinuar o no el tratamiento (únicamente pueden diferenciarse en los años de tratamiento antes de la RLT), en ficha técnica solo nilotinib tiene esta indicación.

Cabe señalar que muchos pacientes no están dispuestos a detener el tratamiento. En una encuesta, solo el 42% de los encuestados estaban dispuestos a suspender el tratamiento con ITK debido al temor a la recurrencia de la enfermedad y al aumento de la mortalidad. Los pacientes que actualmente toman ITK y que cumplen los criterios para RLT pueden no estar dispuestos a considerar la interrupción del tratamiento debido a que hasta hace pocos años los profesionales sanitarios incidiábamos en que la duración del tratamiento probablemente sería para toda la vida del paciente y se hacía hincapié en el impacto negativo que cualquier dosis omitida tendría en el resultado clínico a largo plazo, lo que puede estar profundamente enraizado en los temores actuales del paciente.

› ¿Es segura para el paciente la discontinuación?

Este punto puede que sea el más importante, ya que es la primera pregunta que suele hacer el paciente ante el planteamiento de la discontinuación. Para una persona a la que se le suspende el ITK y en quien reaparece la enfermedad, es importante saber la respuesta que tendrá a la reintroducción del ITK.

La respuesta nos la han dado multitud de estudios donde se ha visto: en los registros mundiales de ITK en más de 4.000 pacientes en los que, tras RLT, progresó la enfermedad y se precisó reintroducir el fármaco, solo hay 2 informes de progresión de LMC a fase aguda y, sorprendentemente, ambas progresiones ocurrieron cuando los pacientes (después de fallar la RLT) habían reiniciado el tratamiento con ITK durante algunos meses y habían recuperado la respuesta molecular mayor (RMM) en ambos casos y en un caso también una respuesta molecular profunda (RMP)⁽⁸⁾.

› ¿Es efectiva la discontinuación?

Aquí está la clave para poder llegar a contestar la pregunta que plantea este artículo. Debemos saber qué probabilidad de éxito tendremos cuando suspendemos un tratamiento y qué condiciones debe presentar el paciente para ser candidato a la discontinuación.

Así, existen numerosos ensayos clínicos que nos pueden llevar a la respuesta, pero no solo eso, debemos saber también qué ocurre fuera de los ensayos, para lo cual es importante conocer la recogida de datos de series nacionales y hasta las experiencias a nivel local.

La European Leukemia Net (ELN) en 2020 ha publicado en las últimas guías las recomendaciones de discontinuación del ITK, donde se incide sobre todo en la presencia de una LMC en fase crónica con transcrito típico, con una duración del tratamiento mínima de 4-5 años y una RMP mínima de 2-3 años⁽⁸⁾ (Tabla 1)⁽⁹⁾.

› Ensayos clínicos^(8,10-13)

Si imatinib apareció en escena en 2001, ya en 2004 comenzaron a aparecer algunos informes anecdóticos de personas con LMC que interrumpían la terapia con ITK por diversas razones, pero sin recurrencia de la leucemia. A partir de aquí comenzaron los estudios clínicos. Los 2 primeros fueron *STIM* y *TWISTER*, que informaron de que la RLT era posible. En estos estudios, el 40-50% de las personas con LMC con una respuesta molecular completa estable durante al menos 2 años estaban sin recurrencia de la enfermedad después de detener imatinib; la duración mediana actual de la RLT es > 7-8 años. Se ha observado que la mayoría de las personas en RLT tienen células residuales de leucemia que provocan concentraciones fluctuantes de transcritos de *BCRABL1* sin pérdida de la RMM y en estas situaciones no es necesario reiniciar la terapia con ITK de inmediato. En la mayoría de los estudios, la terapia con ITK se reinicia solo cuando la concentración de transcripción de *BCRABL1* es > 0,1%^{IS}.

Hay más de 50 estudios de interrupción de ITK. Como imatinib es el ITK con más experiencia, la mayoría de los estudios incluyen pacientes tratados con imatinib, pero van apareciendo cada vez más otros donde se incluyen pacientes que reciben ITK de segunda generación. El ensayo actual *EUROSKI* de la ELN se considera el más

Tabla 1. Requerimientos para la discontinuación de inhibidores de la tirosina cinasa (ITK) según la European Leukemia Net (ELN)(9)**Obligatorio**

- LMC en primera fase crónica únicamente (faltan datos en otras situaciones)
- Paciente motivado y con buena comunicación médico-paciente
- Acceso a PCR cuantitativa
- Poder realizar la PCR mensual frecuente tras la suspensión: mensual los primeros 6 meses, bimensual 6-12 meses y después cada 3 meses

Mínimo (permitida la suspensión)

- Tratamiento en primera línea o en segunda si es por intolerancia
- Transcrito BCRABL1 típico: e12a2 o e14a2
- Duración mínima de tratamiento previo con ITK de 5 años para imatinib y 4 para ITK de segunda generación
- RMP (RM4,0 o mejor) un mínimo de 2 años
- Sin fracaso a tratamiento previo

Óptimo (suspensión recomendada)

- Duración de tratamiento ITK previo > 5 años
- Duración de RMP4,0 > 3 años
- Duración de RM4,5 > 2 años

LMC: leucemia mieloide crónica; RM: respuesta molecular; RMP: respuesta molecular profunda

informativo. La suma de estos datos es que el 30-70% de los pacientes con una respuesta buena y sostenida a la terapia con ITK logran RLT y son la base para las recomendaciones con respecto a la interrupción de ITK.

En la Tabla 2 se puede observar un resumen de los principales ensayos clínicos llevados a cabo.

Ahora bien, un punto que aún no ha sido aclarado es saber qué pacientes son los mejores candidatos a la RLT. Se habla de la duración del tratamiento, de la profundidad de la respuesta, del tiempo de esta profundidad o de la rapidez en alcanzarla.

En lo que parece que la mayoría de los expertos están de acuerdo es en la duración recomendada de la RMP antes de planearnos la retirada del fármaco. En los artículos publicados se concluye que el paciente debe estar un mínimo de 2 años en el caso de RM4,5 y más de 3 en RM4,0 para la discontinuación. Pero este punto solo nos indica la recomendación para suspender el tratamiento, pero no parece haber correlación entre la profundidad de la respuesta molecular y la probabilidad de RLT. Por lo tanto, la profundidad de la respuesta molecular es un requisito, pero no parece

representar el único elemento determinante para una RLT exitosa. Así, los estudios que se están llevando a cabo en la actualidad con este objetivo nos lo dirán en un futuro.

También sabemos que, cuanto más rápida sea la respuesta inicial, mayor será la probabilidad de lograr y mantener la RMP.

› Series nacionales⁽¹⁴⁻¹⁶⁾

Hay varias series nacionales que han realizado estudios observacionales de la interrupción de ITK. Todas obtienen mejores resultados que los presentados por los ensayos clínicos, posiblemente porque en las series nacionales se seleccionan a conciencia los pacientes para suspender el ITK.

El grupo italiano⁽¹⁴⁾ recoge su experiencia de suspensión de ITK en 293 pacientes con los siguientes resultados: después de una mediana de seguimiento de 34 meses (rango: 12-161), la RLT global estimada fue del 62% (intervalo de confianza -IC- del 95%: 56-68). A los 12 meses, la RLT fue del 68% (IC 95%: 62-74) para imatinib y del 73% (IC 95%: 64-83) para ITK de segunda generación. El tiempo promedio general para reiniciar el tratamiento fue de 6 meses (rango intercuartílico -IQR-: 4-11). No se produjeron progresiones.

Resultados similares o un poco peores se obtienen en un registro chino⁽¹⁵⁾ pero donde el número de pacientes es reducido: se suspendió el ITK a 45 pacientes, de los cuales en 20 (44%) se produjo recaída molecular después de una mediana de seguimiento de 18 meses (rango: 1-54 meses) y la RLT estimada a los 24 meses fue del 40%.

En la misma línea está el estudio español liderado por Hernández Boluda⁽¹⁶⁾, que presentó la experiencia nacional de suspensión de ITK. Así, en los 236 pacientes registrados a quienes se interrumpió el ITK, la probabilidad de RLT a los 4 años fue del 64% (IC 95%: 55-72%). La incidencia acumulada de recurrencia molecular fue del 33% (IC 95%: 26-38%) a los 3 años. Cuarenta y nueve recaídas (75% del total) ocurrieron en los primeros 6 meses. Ningún paciente progresó a las fases avanzadas de LMC.

› Experiencia local

Presentamos los datos de nuestro centro. En el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA) de

Tabla 2. Resumen de los principales ensayos clínicos de discontinuación de inhibidores de la tirosina cinasa (ITK)^(2,4,13)

| Ensayo | ITK | Número pacientes | Requisitos | RLT % –tiempo evaluación– | % RMM tras reintroducción ITK |
|----------------------|--|------------------|---|------------------------------------|-------------------------------|
| <i>STIM</i> | Imatinib | 100 | BCR/ABL indetectable/RM4,5 > 2 años | 39% –77 meses– | 96% |
| <i>A-STIM</i> | Imatinib | 80 | BCR/ABL indetectable/RM4,5 > 2 años | 61% –26 meses– | 100% |
| <i>STIM2</i> | Imatinib | 218 | BCR/ABL indetectable/RM4,5 > 2 años/no tratados con interferón | 50% –24 meses– | 100% |
| <i>TWISTER</i> | Imatinib | 40 | RM4,5 > 2 años | 47% –2 años– | 100% |
| <i>KIDS</i> | Imatinib | 90 | RM4,5 > 2 años | 41% –12 meses– | 100% |
| <i>JALSG-STIM213</i> | Imatinib | 68 | RM4 > 2 años y RM4,5 al discontinuar | 68% –12 meses– | 100% |
| <i>ISAV</i> | Imatinib | 108 | RM4,0 > 18 meses | 52% –22 meses– | 100% |
| <i>HOVON</i> | Imatinib | 15 | RM4,5 > 2 años | 33% –36 meses– | 100% |
| <i>EUROSKI</i> | Imatinib/Dasatinib/Nilotinib | 755 | RM4,5 > 12 meses | 50% –24 meses– | 86% |
| <i>DESTINITY</i> | Imatinib/Dasatinib/Nilotinib | 174 | RMM > 12 meses | 72% en grupo RM4, 36% en grupo RMM | 100% |
| <i>STOP-2G-TKI</i> | Dasatinib/Nilotinib | 100 | RM4,5 > 2 años | 63% –12 meses– | 100% |
| <i>LAST</i> | Imatinib/Dasatinib/Nilotinib/Bosutinib | 172 | RM4 > 2 años | 62% –2 años– | No recogido |
| <i>DADI</i> | Dasatinib | 63 | RM4 > 12 meses | 48% –20 meses– | 100% |
| <i>D-STOP</i> | Dasatinib | 54 | RM4 > 2 años | 63% –16 meses– | 100% |
| <i>DASFREE</i> | Dasatinib | 63 | MR4,5 > 12 meses/reducción > 1 log de BCR/ABL a los 3-6,5 meses del inicio de dasatinib | 49% –12 meses– | 98% |
| <i>TRAD</i> | Dasatinib | 67 | RM4,5 > 2 años | 65% –6 meses– | 100% |
| <i>ENESTFreedom</i> | Nilotinib | 190 | RM4,5 > 3 años | 49% –96 meses– | 98,8% |
| <i>ENESTop</i> | Nilotinib (2.ª línea) | 126 | RM4,5 > 3 años | 48% –144 semanas– | 97,1% |
| <i>STAT2</i> | Nilotinib | 78 | RM4,5 mantenida 2 años en la fase de consolidación con nilotinib | 68% –12 meses– | 86% RM4,5 |
| <i>ENESTGoal</i> | Nilotinib | 59 | RM4,5 > 2 años | 41% –no indicado– | 33% RM4,5 |
| <i>NILSt</i> | Nilotinib | 112 | RM4,5 > 2 años | 61% –3 años– | 100% RM4,5 |

RLT: respuesta libre de tratamiento; RM: respuesta molecular; RMM: respuesta molecular mayor

Murcia tenemos registrados hasta el momento un total de 71 pacientes diagnosticados de LMC.

De todos ellos, se han sometido a discontinuación un total de 18 pacientes. En la mayoría de los casos el ITK discontinuado fue imatinib (14 de 18; 78%), mientras que dasatinib fue discontinuado en 2 pacientes (11%) y nilotinib y bosutinib 1 en cada caso (5,5%). La media de tratamiento con el ITK fue de 10 años (3-18) y el tiempo en alcanzar una RMP de 18 meses (3-36).

La causa de la discontinuación fue:

- En 9 de ellos por RMP mantenida.
- En otros 9 por efectos secundarios.

De ellos, 13 pacientes (72%) permanecen en RMP desde el inicio de la suspensión, mientras que 5 pacientes (28%) precisaron reintroducción del tratamiento, 4 (21%) por pérdida de RMP y 1 (6%) por aparición de efectos secundarios (cefalea). Además, en 1 de los 5 pacientes a los que se reintrodujo (10%) se intentó una segunda discontinuación, siendo exitosa hasta el momento. Estos 5 pacientes que perdieron la RMP la volvieron a alcanzar en los primeros 3 meses de su reintroducción. Todos estos datos se presentan en la [Tabla 3](#).

La media de aparición de la progresión fue de 3 meses (1-7). De los pacientes que en la actualidad

Tabla 3. Datos de los pacientes sometidos a discontinuación en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca

| | Sexo | Edad diagnóstico | ITK | Causa discontinuación | Meses en alcanzar RMP | Años en tto. ITK | Respuesta actual | Meses en discontinuación | Causa reinicio |
|----|--------|------------------|-----------|--|-----------------------|------------------|------------------|--------------------------|----------------|
| 1 | Mujer | 39 | Imatinib | Consenso médico-paciente | 38 | 13 | RM5 | 4 | |
| 2 | Mujer | 49 | Bosutinib | Efectos secundarios | 36 | 10 | RM5 | 38 | |
| 3 | Mujer | 49 | Imatinib | Consenso médico-paciente | 12 | 10 | RM5 | 8 | |
| 4 | Mujer | 63 | Imatinib | Consenso médico-paciente | 12 | 9 | RM4,5 | 1 | Cefalea |
| 5 | Mujer | 61 | Dasatinib | Consenso médico-paciente | 12 | 10 | RM4,5 | 24 | |
| 6 | Mujer | 24 | Imatinib | Consenso médico-paciente | 9 | 8 | RM5 | 7 | |
| 7 | Hombre | 34 | Nilotinib | Consenso médico-paciente | 3 | 3 | RM4 | 13 | |
| 8 | Mujer | 65 | Imatinib | Efectos secundarios | 24 | 13 | RM4,5 | 60 | |
| 9 | Hombre | 52 | Imatinib | Efectos secundarios | 36 | 11 | RMM | 8 | |
| 10 | Hombre | 40 | Dasatinib | Consenso médico-paciente | 20 | 10 | RM4,5 | 8 | |
| 11 | Mujer | 66 | Imatinib | Efectos secundarios | 36 | 5 | RM5 | 3 | Pérdida RMP |
| 12 | Hombre | 50 | Imatinib | Consenso médico-paciente | 24 | 14 | RM4 | 8 | |
| 13 | Mujer | 63 | Imatinib | Efectos secundarios | 18 | 7 | RM4,5 | 1 | Pérdida RMP* |
| 14 | Hombre | 34 | Imatinib | Decisión del paciente por pérdida de calidad de vida | 18 | 10 | RM4,5 | 40 | |
| 15 | Hombre | 39 | Imatinib | Efectos secundarios | 24 | 14 | RM4 | 79 | |
| 16 | Mujer | 39 | Imatinib | Decisión del paciente por pérdida de calidad de vida | 24 | 6 | RMP | 6 | Pérdida RMP |
| 17 | Hombre | 64 | Imatinib | Efectos secundarios | 24 | 18 | RM4 | 7 | Pérdida RMP |
| 18 | Mujer | 24 | Imatinib | Consenso médico-paciente | 12 | 6 | RM4,5 | 50 | |

*: La paciente 13 se sometió a una segunda discontinuación en septiembre de 2019 que mantiene en la actualidad
ITK: Inhibidor de tirosin quinasa; RM: respuesta molecular; RMP: respuesta molecular profunda

están sin tratamiento, solo 1 lleva 3 meses sin el mismo, mientras que para el resto su tiempo es > 7 meses.

Por tanto, podemos concluir que el 77% (14 pacientes) de los pacientes que se sometieron a una discontinuación (1.ª o 2.ª intención) permanecen actualmente sin tratamiento ni pérdida de RMP.

Estos datos distan de los resultados de los ensayos clínicos posiblemente debido a que, al estar fuera de ensayo, se suele realizar en pacientes que han estado más años tanto en tratamiento (punto clave) como en RMP.

➤ Conclusiones

Podemos concluir que:

- En cada paciente se debe realizar un tratamiento y un seguimiento individualizados, en función de sus comorbilidades, tratamientos concomitantes, calidad de vida...
- Se debe elegir el ITK que aporte el mayor beneficio posible con menores efectos secundarios.
- Por tanto, uno de los objetivos principales a medio plazo de la LMC debe ser la discontinuación del tratamiento por diferentes razones: evitar efectos se-

cundarios, mejorar la calidad de vida y evitar pautar tratamientos que puede que no sean imprescindibles.

› Bibliografía

1. Goldman JM. Chronic myeloid leukemia: a historical perspective. *Semin Hematol.* 2010;47:302-11.
2. Mahon FX. Treatment-free remission in CML: who, how, and why?. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2017;2017(1):102-9.
3. Hehlmann R, Lauseker M, Saussele S, Pffirmann M, Krause S, Kolb HJ, et al. Assessment of imatinib as first-line treatment of chronic myeloid leukemia: 10-year survival results of the randomized CML study IV and impact of non-CML determinants. *Leukemia.* 2017;31:2398-406.
4. Breccia M, Foà R. Current Information and Recommendations on the Discontinuation of TKI Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia. *Curr Oncol Rep.* 2018;20(3):23.
5. Sharf G, Marín C, Bradley JA, Pemberton-Whiteley Z, Bombaci F, Christensen RIO, et al. Treatment-free remission in chronic myeloid leukemia: the patient perspective and areas of unmet needs. *Leukemia.* 2020;34(8):2102-12.
6. Cortes J, Rea D, Lipton JH. Treatment-free remission with first- and second-generation tyrosine kinase inhibitors. *Am J Hematol.* 2019;94(3):346-57.
7. Villemagne Sanchez LA, O'Callaghan C, Gough K, Hall K, Kashima Y, Seymour JF, et al. Patient perceptions of treatment-free remission in chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2018 Feb;59(2):406-15.
8. Saglio G, Gale RP. Prospects for achieving treatment-free remission in chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2020;190(3):318-27.
9. Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, Schiffer C, Apperley JF, Cervantes F, et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 2020;34(4):966-84.
10. Mahon FX, Réa D, Guilhot J, Guilhot F, Huguet F, Nicolini F, et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol.* 2010 Nov;11(11):1029-35.
11. Cortes J, Rea D, Lipton JH. Treatment-free remission with first- and second-generation tyrosine kinase inhibitors. *Am J Hematol.* 2019;94:346-57.
12. Saussele S, Richter J, Guilhot J, Gruber FX, Hjorth-Hansen H, Almeida A, et al. Discontinuation of tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukaemia (EURO-SKI): a prespecified interim analysis of a prospective, multicentre, non-randomised, trial. *Lancet Oncol.* 2018 Jun;19(6):747-57.
13. Harrington P, Radia D, de Lavallade H. What are the considerations for tyrosine kinase inhibitor discontinuation in chronic-phase chronic myeloid leukemia? *Expert Rev Hematol.* 2020 Mar;13(3):213-22.
14. Fava C, Rege-Cambrin G, Dagliotti I, Cerrano M, Berchiolla P, Dragani M, et al. Observational study of chronic myeloid leukemia Italian patients who discontinued tyrosine kinase inhibitors in clinical practice. *Haematologica.* 2019;104:1589-96.
15. Shen N, You Y, Zhong ZD, Meng L, Zhou JF, Zou P, et al. Monitoring and Analysis of Chinese Chronic Myeloid Leukemia Patients Who Have Stopped Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy. *Curr Med Sci.* 2019;39:211-6.
16. Hernández-Boluda JC, Pereira A, Pastor-Galán I, Álvarez-Larrán A, Savchuk A, Puerta JM, et al. Feasibility of treatment discontinuation in chronic myeloid leukemia in clinical practice: result from a nationwide series of 234 patients. *Blood Cancer J.* 2018;8(10):91.



Sociedad Española de
Hematología y Hemoterapia

Fundación Española de
Hematología y Hemoterapia